

ТЕМА 1 ПРЕДМЕТ, ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ, ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ БИОТЕХНОЛОГИИ. БИОСИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Биотехнология (БТ) входит в круг интересов представителей многих специальностей, имеющих разное базовое образование. Как научная дисциплина и область практической деятельности, БТ сформировалась со времени появления антибиотиков. В 50-е годы XX века были разработаны и освоены в производстве питательные среды, в 60-е – вакцины, в 70-е – сконструированы и внедрены новые виды типовых технологических процессов и оборудования для их реализации. По определению большинства ученых, XXI век будет веком БТ. Этому способствует бурное развитие молекулярной биологии и генетики, острая потребность в новых технологиях, призванных улучшить здравоохранение, охрану окружающей среды, ликвидировать нехватку продовольствия, минеральных ресурсов.

БТ – это технологические процессы с использованием биотехнологических систем – живых организмов и компонентов живой клетки. Системы могут быть разными – от микробов и бактерий до ферментов и генов. БТ – это производство, основанное на достижениях современной науки: генетической инженерии, физико-химии ферментов, молекулярной диагностики и молекулярной биологии, селекционной: генетики, микробиологии, биохимии, химии антибиотиков.

Основные направления биотехнологии

Условно можно выделить следующие основные направления биотехнологии:

- БТ пищевых продуктов,
- БТ препаратов для сельского хозяйства,
- БТ препаратов и продуктов для промышленного и бытового использования,
- БТ лекарственных препаратов,
- БТ средств диагностики и реактивов,
- Экологическую БТ

Целью изучения биотехнологии является формирование системных знаний, умений и навыков по разработке получения методами биосинтеза, биологической трансформации и комбинацией методов биологической и химической трансформации субстанций лекарственных препаратов, лекарственных средств, а также профилактических и диагностических средств. Целью также является формирование у провизоров системных знаний по обращению, включая хранение и транспортировку, пользование информацией и передачу информации о биотехнологических препаратах потребителям.

Задачи биотехнологии:

- обучение студентов деятельности провизора, исходя из знания основ молекулярной биологии и генетики продуцентов, совершенствования производства методами генетической инженерии и инженерной энзимологии, знания фундаментальных основ методов контроля качества и подлинности препаратов, получаемых биотехнологическими методами;
- формирование у студентов практических умений и навыков изготовления биотехнологических лекарственных препаратов, оценки качества сырья, питательных сред, полупродуктов и целевых продуктов;
- выработка у студентов способности правильно оценивать соответствие биотехнологического производства правилам GMP, соответствие требованиям экологической безопасности, применительно к используемым на производстве биообъектам - продуцентам и целевым продуктам. Выработка правильной ориентации при оценке качества рекомбинантных белков как лекарственных препаратов;
- выработка у студентов умений и навыков пользования иммуноферментными и радиоиммунными методами определения биологически активных веществ.

В сфере производства лекарственных средств БТ вытесняет традиционные технологии, которые принципиально новые возможности. Биотехнологическим способом производят генно-инженерные белки (интерфероны, интерлейкины, инсулин, вакцины против гепатита и т.п.), ферменты, диагностические средства (тест-системы на наркотики, лекарственные вещества, гормоны и т.п.), витамины, антибиотики, биodeградируемые пластмассы, биосовместимые материалы.

Особая роль отводится сельскохозяйственной БТ. Это создание и культивирование трансгенных растений, микробиологический синтез средств защиты растений, производство кормов, в том числе с использованием ферментов. Для России актуальны такие направления, как ресурсная БТ (использование биосистем для извлечения полезных ископаемых) и биотехнологическая. (с использованием бактериальных штаммов), утилизация промышленных и бытовых отходов, очистка сточных вод, обеззараживание воздуха. Клонирование живых организмов может скоро перейти из раздела научных разработок в разряд практической БТ.

БТ является одной из самых наукоемких, перспективных и в экономическом плане высокорентабельных отраслей производства. Большая часть коммерческих разработок в области БТ приходится на США, где действуют более 1500 биотехнологических компаний (во всем мире свыше 3000). В современной биологии и БТ превосходство США очевидно, в области фундаментальных биологических исследований достижения американской науки составляют около 80% общемировых. Значительный вклад в развитие БТ внесли крупнейшие химические и фармацевтические концерны (Monsanto, Du Pont, American Cyanamid, Eli Lilly, Merck, Novartis, Hoffman-Li-Roche, Genentech и др.). В других странах, где инвестиционный климат не столь благоприятен и бизнес менее активен главную роль в создании биотехнологических предприятий играют крупные корпорации и государство. Так, правительство Японии объявило БТ национальным приоритетом: Неуклонно развивается европейская биотехнологическая индустрия (свыше 600 биотехнологических компаний).

В России развитию биологии и генетики долгое время препятствовали на государственном уровне, но несмотря на это к концу 80-х годов прошлого века все-таки был создан значительный научный и технологический потенциал. К середине 90-х годов в связи с внедрением рыночных механизмов в экономику микробиологические и ферментные производства были практически свернуты как нерентабельные, значительная часть научных разработок осталась без внедрения. Негативную роль сыграл также отток научных кадров за рубеж «По уровню развития БТ мы не входим в число не только развитых, но и развивающихся стран. Ситуация не изменится пока мы не поставим во главу фундаментальную науку. БТ высокотехнологична, поэтому можно смело сказать - нет в стране фундаментальной науки, нет и не будет БТ. Всему виной отсутствие финансирования» (А.С. Спирин, академик РАН).

Несмотря на известные трудности в стране еще имеются биотехнологические разработки мирового уровня, внедрение которых незамедлительно принесло бы ощутимую пользу всему обществу. Так, средняя отдача нефтяных месторождений в России не превышает 50%. Новая уникальная микробиологическая технология регулирования микрофлоры пластов, разработанная в институте микробиологии РАН, уже позволила компании «Татнефть» получить дополнительно около полумиллиона тонн «черного золота». Извлечение металлов из руды с помощью микробного окисления и последующего электролиза дает возможность не только использовать «бедное» сырье, но и позволяет ограничить выброс в атмосферу вредных серосодержащих газов, образующихся в процессе обжига руды при традиционной технологии. По новой технологии Института микробиологии РАН с 2001 г. в Красноярском крае на золотодобывающем комбинате работают 8 ферментеров.

Закончена работа над новым способом снижения концентрации метана в шахтах с использованием метанотрофных бактерий. Разработаны и производятся флокулянты для фильтрации воды в очистных сооружениях, созданы оригинальные технологии производства ферментов для стиральных порошков (Гос. НИИ генетики РАН).

В России имеются около тридцати молекулярно-биологических лабораторий мирового уровня. Но без государственной поддержки фундаментальных исследований и соответствующих научных школ без реализации комплексной инновационной программы в области БТ Россия не сможет стать в XXI. веке полноправным участником мирового биотехнологического рынка.

Безусловно, благодаря уникальным возможностям БТ ей отводится важнейшая роль в решении актуальных медицинских проблем, в частности, в создании лекарственных препаратов.

Общие представления о биотехнологии

Современные биотехнологические производства – сложный комплекс взаимосвязанных биофизических, биохимических и физико-химических процессов; в этих технологических процессах производство и биология представляют единое целое.

БТ – это использование культур клеток, бактерий, животных, растений, метаболизм и биологические возможности которых обеспечивают выработку специфических веществ. В фармацевтической промышленности БТ охватывает разработку вакцин, синтез гормонов, ферментов, интерферонов, антибиотиков, аминокислот, витаминов, алкалоидов, полисахаридов и других биологически активных веществ (БАВ).

В историческом смысле БТ возникла, когда дрожжи были впервые использованы при изготовлении пива, а бактерии для получения йогурта.

С 1961 г. БТ тесно связана с исследованиями в области промышленного производства коммерческих продуктов при участии живых организмов, биологических систем и процессов. С этого времени БТ встала на прочный фундамент микробиологии, биохимии и промышленной инженерии.

Промышленный биотехнологический процесс, в котором для производства коммерческих продуктов, используются микроорганизмы, обычно состоит из трех ключевых этапов:

1. Исходная обработка: обработка сырья для использования в качестве источника питательных веществ для микроорганизма-мишени.

2. Ферментация и биотрансформация: рост микроорганизма-мишени в большом (обычно более 100 л) биореакторе (ферментация) с последующим образованием нужного метаболита, например антибиотика, аминокислоты или белка (биотрансформация).

3. Конечная обработка: очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы (рис. 1).

Цель биотехнологических исследований – максимальное повышение эффективности каждого из этих этапов и поиск микроорганизмов, с помощью которых можно получить целевой продукт.

Наиболее трудным для оптимизации был этап биотрансформации. При использовании природных микробных штаммов выход конечного продукта часто оказывался существенно ниже оптимального. Традиционные схемы генетического усовершенствования бактерий включают скрининг, отбор и тестирование огромного количества колоний. Такие работы высокочрезвычайно затратны, занимают много времени, при этом можно рассчитывать только на усовершенствование уже существующих, передаваемых по наследству свойств штамма, а не на расширение его генетических возможностей. И все же к концу 70-х таким образом были усовершенствованы производственные процессы получения целого ряда конечных продуктов

С развитием технологии рекомбинантных ДНК природа и возможности БТ резко изменились. Стратегия переноса функциональной единицы наследственности (гена) из одного организма в другой была разработана американскими учеными Стенли Коэном и Гербертом. Бойером в 1973 г. Появилась возможность оптимизировать этап биотрансформации – не просто отбирать высокопродуктивные штаммы микроорганизмов и эукариотических клеток, а создавать принципиально

новые, используя их в качестве «биологических фабрик» по производству инсулина, интерферонов, интерлейкинов, гормона роста, вирусных антигенов и множества других белков. Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать в больших количествах ценные низкомолекулярные вещества и макромолекулы, которые в естественных условиях синтезируются в минимальных количествах. Технология рекомбинантных ДНК – это быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание микроорганизмов с заранее заданными генетическими характеристиками. Этот инструмент может работать не только с микроорганизмами, но с растениями и животными.

На стыке технологий рекомбинантных ДНК и БТ возникла динамичная, высококонкурентоспособная молекулярная БТ (МБТ). Биотехнологическая составляющая МБТ – промышленная микробиология и химическая инженерия; молекулярная составляющая – молекулярная биология, молекулярная генетика бактерий, энзимология нуклеиновых кислот.

История развития МБТ (даты, события)

1917 – введен термин БТ;

1943 – произведен в промышленном масштабе пенициллин;

1944 – показано, что генетический материал представляет собой ДНК;

1953 – установлена структура инсулина, расшифрована структура ДНК;

1961 – учрежден журнал «Biotechnology and Bioengineering»;

1961-1966 – расшифрован генетический код, оказавшийся универсальным для всех организмов;

1953-1976. – расшифрована структура ДНК, ее функции в сохранении и передаче организмом наследственной информации, способность ДНК организовываться в гены;

1963 – осуществлен синтез биополимеров по установленной структуре;

1970 – выделена первая рестрикционная эндонуклеаза; осуществлен синтез ДНК;

1972 – синтезирован полноразмерный ген транспортной РНК;

1975 – получены моноклональные антитела;

1976 – разработаны методы определения нуклеотидной последовательности ДНК;

1978 – фирма «Genentech» выпустила человеческий инсулин, полученный с помощью *E. coli*;

1981 – синтезированы фрагменты нуклеиновых кислот;

1982 – разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК;

1983 – гибридные Ti-плазмиды применены для трансформации растений;

1990 – официально начаты работы над проектом «геном человека»;

1994-1995 – опубликованы подробные генетические и физические карты хромосом человека;

1996 – ежегодный объем продаж первого рекомбинантного белка (эритропоэтина) превысил 1 млрд. долларов;

1997 – клонировано млекопитающее из дифференцированной соматической клетки;

2003 – расшифрован геном (набор генов, присущий организму) человека, содержащий приблизительно 30 тысяч генов и три миллиарда «букв» молекул ДНК

В последние годы родилась новая отрасль генетики – геномика, изучающая не отдельные гены, а целые геномы. Достижения молекулярной биологии и геномной инженерии дали человеку возможность читать генетические тексты в начале у вирусов, бактерий; дрожжевых грибов, многоклеточных животных. Например, знание геномной структуры патогенных бактерий очень важно при создании рационально сконструированных вакцин, для диагностики и других медицинских целей.

Апрель 2003 года ознаменовался сенсацией в биологии и медицине: Международный консорциум по составлению генетической карты человека (Центр геномного секвенирования: Вашингтонский университет и Сенгерский центр в Кембридже) опубликовал заявление, что удалось полностью расшифровать геном человека. Титанический труд сотен исследователей из США, Великобритании, Германии, Франции, Японии и Китая занял более 10 лет и обошелся почти в 3 млрд. долларов. При этом были разработаны высокоэффективные технологии и инструменты картирования, такие как коллекция клеток, в которых есть небольшие фрагменты каждой из хромосом или искусственные дрожжевые хромосомы, содержащие крупные фрагменты хромосом человека, бактериальные и фаговые векторы, позволяющие размножить (клонировать) фрагменты ДНК человека. Быстро прогрессировала техника секвенирования (например, многоканальный капиллярный электрофорез ускорил и удешевил расшифровку первичной структуры ДНК): созданы компьютерные программы, позволяющие находить гены в расшифрованных участках ДНК.

Ранее было объявлено о «черновой» расшифровке генома человека с точностью 99,9%, сейчас эта точность увеличена на порядок. Осталось заполнить, расшифровать в геноме примерно 400 «дырок». В геноме человека прочитано 3 млрд. символов, но решающее значение принадлежит пониманию смысла прочитанного. Из 30 тыс. генов, составляющих геном человека, науке известно о предназначении лишь трети их числа. Полная расшифровка генома человека позволит справиться с множеством недугов, таких как наследственные болезни, рак, заболевания сердечно-сосудистой системы, психические и многие другие.

В России существует своя программа «Геном человека», не зависящая от Международного консорциума, гораздо более скромная по финансовым возможностям. Ученые на уровне генома изучают связь различных генов с наиболее распространенными заболеваниями ДНК-диагностику, диагностику хромосомных нарушений, молекулярный цитогенетический анализ. Геномная медицина «корректирует» традиционные методы лечения заболеваний с учетом индивидуальности генетических данных каждого человека. Генетическую обусловленность наследственных заболеваний определяют около 3 тыс. генов.

Геномные методы, идентификации личности, разработанные и практические реализованные в геномике человека, имеют большое значение для общества. Криминалистика получила в свое распоряжение абсолютно достоверный метод доказательства: для геномной дактилоскопии достаточно лишь одной капли крови, одного волоса, кусочка ногтя следов пота, спермы, слюны, перхоти.

Молекулярная биотехнология (МБТ) пользуется достижениями разных областей науки и применяет их для создания разнообразных коммерческих продуктов.

Знания и методы биохимии, микробиологии, молекулярной биологии; генетики, химической технологии, электроники позволяют использовать потенциал живых клеток в интересах человека. Знания и умения биотехнолога простираются от биохимии и генетики, физиологических процессов в биосистемах (микроорганизм, клетка, вирус) до математического моделирования, экономики, вопросов управления биотехнологическими процессами объединёнными в сложные системы.

Биотехнология получила возможность воспроизводить нужные продукты в неограниченных количествах, используя новые технологии; позволяющие переносить гены в микробные клетки-продуценты или в организм млекопитающих (трансгенные животные), синтезировать пептиды, создавать искусственные вакцины это основные биотехнологические процессы, реализующиеся на уровне клетки или с участием отдельных клеточных структур. В промышленном масштабе подобная БТ представляет биоиндустрию.

Биотехнология применяет методы, заимствованные из химии, микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, химической технологии и компьютерной техники с целью создания новых разработок, развития и оптимального использования процессов, в которых каталитические реакции играют фундаментальную и незаменимую роль.

Любой биотехнолог должен стремиться к достижению тесного кооперирования со специалистами других смежных (близких) дисциплин, таких, как медицина, пищевая промышленность, фармацевтика и химическая индустрия, защита окружающей среды и процессы переработки продуктов, представляющих собой отходы различных производств.

Главная причина успехов биотехнологии кроется в разительных успехах и быстром прогрессе молекулярной биологии, в частности в разработке технологии рекомбинантных молекул ДНК. С помощью этой технологии оказалось возможным непосредственно манипулировать с наследственным материалом клеток, получая новые сочетания полезных признаков и способностей. Возможности этих технических приемов, которые впервые были разработаны в лабораториях, вскоре оказались вполне приемлемыми в промышленных условиях. Однако, несмотря на определенные, а порой и весьма значительные выгоды, которые несет технология рекомбинантных молекул, постоянно следует учитывать возможные опасности, связанные с вмешательством человека в природу. В настоящее время развитие биотехнологии осуществляется со скоростью, напоминающей таковую при становлении микроэлектронной промышленности в середине 70-х годов. Ни для кого уже не является секретом, что ископаемое топливо (хотя и добываемое в настоящее время с большим избытком), а также другие не возобновляемые ресурсы, в один прекрасный день станут крайне ограниченными. И совершенно естественно, что данное обстоятельство уже сейчас заставляет искать новые, более дешевые и лучше сохраняемые источники энергии и питания, которые могли бы восполняться биотехнологическим путем. В этой ситуации страны с климатом, позволяющим ежегодно производить большие количества биомассы, будут находиться в более выгодных условиях по сравнению со странами с менее благоприятными климатическими условиями. В частности, тропические области земного шара в этом отношении имеют существенное преимущество над другими регионами. Следующим фактором, способствующим росту интереса к биотехнологии, является современный мировой спад в химических и инженерных направлениях, обусловленный частичным истощением источников энергии. В силу этого биотехнология рассматривается в качестве одного из важнейших средств рестимуляции (обновления) экономики на основе новых методов, новой технологии и новых сырьевых материалов. Фактически, индустриальный бум 1950-х и 1960-х годов был обусловлен дешевой нефтью, так же как успехи в информационной технологии обусловили в 1970-х и 1980-х годах развитие микроэлектроники. И есть основания полагать, что 2000-е годы станут эрой биотехнологии. Во всяком случае, в мире отмечается существенный подъем исследований в области молекулярной биологии, возникновение новых биотехнологических компаний, увеличение инвестиций в биотехнологические отрасли промышленности (как национальными компаниями, так и отдельными лицами), а также рост фундаментальных знаний, увеличение количества источников информации и средств информатики.

Многие биотехнологические процессы могут рассматриваться как имеющие три главных стержневых компонента: первая часть состоит в получении наиболее оптимальных катализаторов специфических процессов, вторая часть сводится к обеспечению по возможности оптимальных условий для осуществления требуемого каталитического процесса и третья – связана с отделением и очисткой целевого продукта или продуктов из ферментационной смеси.

В большинстве случаев наиболее эффективной, стабильной и удобной формой для катализа биотехнологических процессов являются целые организмы, вследствие чего в биотехнологии широко используются микробиологические процессы. Конечно, это не исключает использование и высших организмов (в частности, культур растительных и животных клеток), которые, несомненно, в будущем будут играть важную роль в биотехнологии. Микроорганизмы обладают огромным генетическим пулом (фондом), позволяющим им осуществлять практически неограниченную биосинтетическую деятельность и потенциал деградации. Кроме того, микроорганизмам присущ исключительно быстрый рост, скорость которого намного превышает скорость роста высших организмов (растений и животных). Указанное свойство позволяет за короткий промежуток времени осуществить синтез больших количеств требуемого продукта в строго контролируемых условиях. Существенным моментом первого компонента биотехнологии является селекция и улучшение объекта с помощью различных генетических методов, а в последнее время с использованием высокоэффективных приемов молекулярной биологии,

которые, как уже упоминалось, способны обеспечить конструирование организмов с новыми биохимическими возможностями.

Во многих случаях катализатор используется в изолированной форме в виде очищенного фермента, для получения которого в настоящее время разработаны эффективные методы выделения и очистки, а также методы стабилизации.

Второй компонент биотехнологии связан с изготовлением систем, обеспечивающих оптимальное функционирование организмов-продуцентов или чистых ферментов. Сюда относятся специальные знания о химии процессов, а также сведения об инженерном обеспечении конструирования и изготовления этих систем.

Наконец, третий компонент представляет собой довольно сложную и дорогую процедуру биотехнологического процесса – выделение и очистку целевого продукта. Этот компонент существенно увеличивает стоимость всего процесса и может составлять до 70% стоимости готового коммерческого препарата.

Многоэтапность биотехнологических процессов определяет необходимость привлечения к их осуществлению специалистов самого различного профиля: генетиков и молекулярных биологов, биохимиков, вирусологов, микробиологов и клеточных физиологов, инженеров-технологов, конструкторов биотехнологического оборудования и т. п. Сказанное позволяет утверждать, что чистых специалистов-биотехнологов в природе не существует, да такого специалиста нельзя себе и представить. Поэтому в биотехнологии с равным успехом работают и микробиологи, и генетики, и биохимики, и клеточные и генетические инженеры, и конструкторы, и т. д. и т. п., от деятельности которых зависит прогресс и успех данной отрасли. Однако необходимо отдавать себе отчет в том, что на развитие биотехнологии существенное влияние могут оказывать деятельность различных политических и экономических сил.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В BIOTEKHOЛОГИИ

Характер биологической системы (микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы) исключительно важен для биотехнологического процесса. Во многих случаях именно генетически модифицированная самовоспроизводящаяся биологическая единица (микроорганизм, вирус, растение или животное) является конечным коммерческим продуктом.

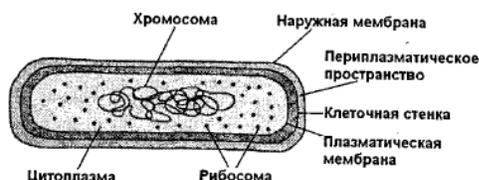
Прокариоты и эукариоты. Все живые организмы принято делить на две основные группы: прокариоты и эукариоты. Приблизительно 1,5 млрд лет назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой внутренней структурой (так называемых прокариот, к которым относятся различные бактерии) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным эукариотическим клеткам, подобным клеткам высших животных и растений.

Основные структурные различия про- и эукариот:

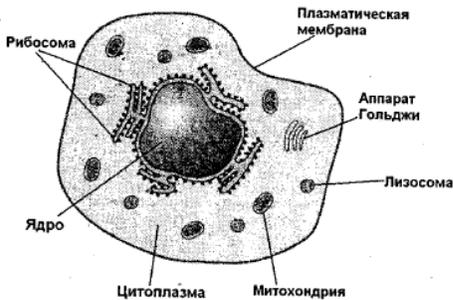
- наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- строение и химический состав клеточной стенки;
- наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической бактериальной клетке хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой. В клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 мин и таким образом давать жизнь более 10 млрд клеток менее чем за сутки.

В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре. В цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы: мембраны, окружающие ядро, митохондрии, образующие лабиринт эндоплазматического ретикулаума (ЭПР), где синтезируются липиды и мембранные белки. Мембраны формируют стопки уплощенных пузырьков, составляющих аппарат Гольджи, который участвует в синтезе и транспорте различных органических молекул. Мембраны окружают лизосомы (субклеточные структуры диаметром 0,20-0,5 мкм), содержащие гидролитические ферменты, необходимые для внутриклеточного пищеварения.



Схематическое изображение прокариотической бактериальной клетки



Схематическое изображение эукариотической животной клетки

Мембраны, таким образом, защищают от действия этих ферментов белки и нуклеиновые кислоты самой клетки. Мембраны также окружают пероксисомы, содержащие окислительные ферменты, производящие и разрушающие опасные высокореакционноспособные перекиси (пероксиды). Обмен между внутриклеточными, окруженными мембранами структурами и внеклеточной средой происходит с помощью эндоцитоза.

Различают две группы бактерий – эубактерии, населяющие почву, воду и другие организмы, и архебактерии, встречающиеся в таких средах обитания, как болота, океанские глубины, очень соленые воды и горячие кислые источники.

Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их подразделяют на термофилы (от 45 до 90°C и выше), мезофилы (от 10 до 47°C) и психрофилы или психротрофы (от -5 до 35°C). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур – полезный инструмент для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, а генетически видоизмененные психротрофы используются при пониженной температуре для биодеградации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде.

Среди множества биологических объектов, используемых в биотехнологии, основными «рабочими лошадками» являются бактерии *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Sacharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

E. coli - граммотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Традиционная среда ее обитания с кишечник человека, может также высеваться из почвы и воды. Штаммы *E. coli* культивируются на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода. *E. coli* можно культивировать в аэробных и анаэробных условиях, но для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются содержанием в питательной среде растворенного кислорода, для этого в ферментерах создают условия аэрации.

Кроме *E. coli* в МБТ используют множество других микроорганизмов, которые подразделяют на две группы:

микроорганизмы как источники специфических генов (например, ген, кодирующий стабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широко применяемой полимеразной цепной реакции - ПЦР; этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E. coli*).

микроорганизмы, созданные генноинженерными методами для решения определенных задач (например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, генетически модифицированные с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот).

Sacharomyces cerevisiae - непатогенные одноклеточные организмы диаметром клетки около 5 мкм. Во многих отношениях представляют эукариотический аналог *E. coli*. *S. cerevisiae* размножаются почкованием, их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления напитков и хлеба. Клетки дрожжей делятся каждые 1,5-2 ч. *S. cerevisiae* является удобной моделью для исследования других эукариот, в т.ч. человека, так как многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Генетическая система дрожжей является неперенным участником всех исследований по изучению ДНК человека.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто подвергают ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения, что необходимо для правильного функционирования белка. Однако *E. coli* и другие прокариоты способны осуществлять эту модификацию, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae* и другие виды дрожжей.

В качестве биологических систем в МБТ используют культуру эукариотических клеток. Кусочек ткани определенного организма (насекомого, растения, млекопитающего) обрабатывают протеолитическими ферментами (трипсином), расщепляющими белки межклеточного материала; при работе с растительными клетками используют ферменты, разрушающие клеточную стенку. Высвободившиеся клетки помещают в питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу, факторы роста. В этих условиях (деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки) на стенке емкости с культурой образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкости со свежей питательной средой, рост прекращается. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных генераций исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут.

ТЕМА 2

БИООБЪЕКТЫ КАК СРЕДСТВА ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ, ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ.

Главным звеном биотехнологического процесса, определяющим всю его сущность, является биологический объект, способный осуществлять определенную модификацию исходного сырья и образовывать тот или иной необходимый продукт. **В качестве таких объектов биотехнологии могут выступать клетки микроорганизмов, животных и растений, трансгенные животные и растения, а также многокомпонентные ферментные системы клеток и отдельные ферменты.**

Основой большинства современных биотехнологических производств до сих пор все еще является микробный синтез, т. е. синтез разнообразных биологически активных веществ с помощью микроорганизмов. К сожалению, объекты растительного и животного происхождения в силу ряда причин еще не нашли столь широкого применения.

Независимо от природы объекта, первичным этапом разработки любого биотехнологического процесса является получение чистых культур организмов (если это микробы), клеток или тканей (если это более сложные организмы – растения или животные). Многие этапы дальнейших манипуляций с последними (т.е. с клетками растений или животных), по сути дела, являются принципами и методами, используемыми в микробиологических производствах. И культуры микробных клеток, и культуры тканей растений и животных с методической точки зрения практически не отличаются от культур микроорганизмов. Поэтому дальнейшие рассуждения целесообразно вести применительно к микробиологическим объектам. Мир микроорганизмов крайне разнообразен. В настоящее время относительно хорошо охарактеризовано (или известно) более 100 тысяч различных их видов. Это в первую очередь прокариоты (бактерии, актиномицеты, риккетсии, цианобактерии) и часть эукариот (дрожжи, нитчатые грибы, некоторые простейшие и водоросли). При столь большом разнообразии микроорганизмов весьма важной, а зачастую и сложной, проблемой является правильный выбор именно того организма, который способен обеспечить получение требуемого продукта, т. е. служить промышленным целям. Разделение микроорганизмов на промышленные и непромышленные для лиц, далеких от микробиологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, кажется достаточно определенным: те микроорганизмы, которые используются в промышленном производстве – промышленные, а те, которые не используются, – непромышленные.

Однако для тех, кто близко соприкасается с вышеперечисленными отраслями биологических знаний, граница проходит между немногочисленной, но глубоко изученной группой микроорганизмов, служащих модельными объектами при исследованиях фундаментальных жизненных процессов, и всеми остальными микроорганизмами, которые, как правило, генетиками, молекулярными биологами и генными инженерами не изучались совсем или изучались в очень ограниченной степени. К числу первых относятся кишечная палочка (*E. coli*), сенная палочка (*Bac. subtilis*) и пекарские дрожжи (*S. cerevisiae*). Во многих биотехнологических процессах используется ограниченное число микроорганизмов, которые классифицируются как GRAS («generally recognized as safe» обычно считаются безопасными). К таким микроорганизмам относятся бактерии *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, другие виды бацилл и лактобацилл, виды *Streptomyces*. Сюда также относят виды грибов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* и дрожжей *Saccharomyces* и др. GRAS-микроорганизмы непатогенные, нетоксичные и в основном не образуют антибиотики, поэтому при разработке нового биотехнологического процесса следует ориентироваться на данные микроорганизмы, как базовые объекты биотехнологии. Микробиологическая промышленность сегодня использует тысячи штаммов из сотен видов микроорганизмов, которые первично были выделены из природных источников на основании их полезных свойств, а затем (в большинстве своем) улучшены с помощью различных методов. В связи с расширением производства и ассортимента выпускаемой продукции в микробиологическую промышленность вовлекаются все новые и новые представители мира микробов. Следует отдавать себе отчет, что в обозримом будущем ни один из них не будет изучен в той же степени, как *E.coli* и *Bac.subtilis*. И причина этого очень простая – колоссальная трудоемкость и высокая стоимость подобного рода исследований.

Следовательно, возникает проблема разработки стратегии и тактики исследований, которые обусловили бы с разумной затратой труда извлечь из потенциала новых микроорганизмов все наиболее ценное при создании промышленно важных штаммов-продуцентов, пригодных к использованию в биотехнологических процессах.

Классический подход заключается в выделении нужного микроорганизма из природных условий.

Из естественных мест обитания предполагаемого продуцента отбирают образцы материала (берут пробы материала) и производят посев в элективную среду, обеспечивающую преимущественное развитие интересующего микроорганизма, т. е. получают так называемые накопительные культуры.

Следующим этапом является выделение чистой культуры с дальнейшим дифференциально-диагностическим изучением изолированного микроорганизма и, в случае необходимости, ориентировочным определением его продукционной способности.

Существует и другой путь подбора микроорганизмов-продуцентов – это выбор нужного вида из имеющихся коллекций хорошо изученных и досконально охарактеризованных микроорганизмов. При этом, естественно, устраняется необходимость выполнения ряда трудоемких операций.

Главным критерием при выборе биотехнологического объекта (в нашем случае микроорганизма-продуцента) является способность синтезировать целевой продукт. Однако помимо этого, в технологии самого процесса могут накладываться дополнительные требования, которые порой бывают очень и очень важными, чтобы не сказать решающими. В общих словах микроорганизмы должны:

- обладать высокой скоростью роста;
- утилизировать необходимые для их жизнедеятельности дешевые субстраты;
- быть резистентными к посторонней микрофлоре, т. е. обладать высокой конкурентоспособностью.

Все вышеперечисленное обеспечивает значительное снижение затрат на производство целевого продукта. Конечно, в каждом конкретном случае ведущим является какой-то один из этих критериев, поскольку в природе устроено так, что во всем получить выигрыш не удастся никогда.

И это правило необходимо постоянно иметь в виду. Ниже приводятся примеры, имеющие своей целью проиллюстрировать ранее сказанное.

1. Одноклеточные организмы, как правило, характеризуются более высокими скоростями роста и синтетических процессов, чем высшие организмы. Тем не менее это присуще не всем микроорганизмам. Существуют такие из них (например, олиготрофные), которые растут крайне медленно, однако они представляют известный интерес, поскольку способны продуцировать различные очень ценные вещества.

2. Особое внимание как объекты биотехнологических разработок представляют фотосинтезирующие микроорганизмы, использующие в своей жизнедеятельности энергию солнечного света. Часть из них (цианобактерии и фотосинтезирующие эукариоты) в качестве источника углерода утилизуют CO₂, а некоторые представители цианобактерий, ко всему сказанному, обладают способностью усваивать атмосферный азот (т. е. являются крайне неприхотливыми к питательным веществам). Фотосинтезирующие микроорганизмы перспективны как продуценты аммиака, водорода, белка и ряда органических соединений. Однако прогресса в их использовании вследствие ограниченности фундаментальных знаний об их генетической организации и молекулярно-биологических механизмах жизнедеятельности, по всей видимости, следует ожидать не в скором будущем.

3. Определенное внимание уделяется таким объектам биотехнологии, как термофильные микроорганизмы, растущие при 60–80° С. Это их свойство является практически непреодолимым препятствием для развития посторонней микрофлоры при относительно нестерильном культивировании, т. е. является надежной защитой от загрязнений. Среди термофилов обнаружены продуценты спиртов, аминокислот, ферментов, молекулярного водорода. Кроме того, скорость их роста и метаболическая активность в 1,5–2 раза выше, чем у мезофилов.

Ферменты, синтезируемые термофилами, характеризуются повышенной устойчивостью к нагреванию, некоторым окислителям, детергентам, органическим растворителям и другим неблагоприятным факторам. В то же время они мало активны при обычных температурах. Так, протеазы одного из представителей термофильных микроорганизмов при 20°С в 100 раз менее активны, чем при 75°С. Последнее является очень важным свойством для некоторых промышленных производств. Например, широкое применение в генетической инженерии нашел фермент Taq-полимераза из термофильной бактерии *Thermus aquaticus*. Ранее уже упоминалось о еще одном весьма существенном свойстве этих организмов, а именно, что при их культивировании температура среды, в которой они пребывают, значительно превышает температуру окружающей среды. Данный высокий перепад температур обеспечивает быстрый и эффективный обмен тепла, что позволяет использовать биологические реакторы без громоздких охлаждающих устройств. А последнее, в свою очередь, облегчает перемешивание, аэрацию, пеногашение, что в совокупности значительно удешевляет процесс.

Селекция. Неотъемлемым компонентом в процессе создания наиболее ценных и активных продуцентов, т. е. при подборе объектов в биотехнологии, является их селекция. А генеральным путем селекции является сознательное конструирование геномов на каждом этапе отбора нужного продуцента. Такая ситуация не всегда могла быть реализована, вследствие отсутствия эффективных методов изменения геномов селективируемых организмов. В развитии микробных технологий в свое время сыграли (да и сейчас еще продолжают играть!) очень важную роль методы, базирующиеся на селекции спонтанно возникающих измененных вариантов, характеризующихся нужными полезными признаками. При таких методах обычно используется ступенчатая селекция: на каждом этапе отбора из популяции микроорганизмов отбираются наиболее активные варианты (спонтанные мутанты), из которых на следующем этапе отбирают новые, более эффективные штаммы. И так далее.

Несмотря на явную ограниченность данного метода (приема), заключающуюся в низкой частоте возникновения мутантов, возможности его рано считать полностью исчерпанными. Процесс селекции наиболее эффективных продуцентов значительно ускоряется при использовании метода индуцированного мутагенеза. В качестве мутагенных воздействий применяются УФ, рентгеновское и гамма-излучения, определенные химические вещества и др. Однако и этот прием также не лишен недостатков, главным из которых является его трудоемкость и отсутствие сведений о характере изменений, поскольку экспериментатор ведет отбор по конечному результату. Например, устойчивость организма к ионам тяжелых металлов может быть связана с подавлением системы поглощения данных катионов бактериальной клеткой, активацией процесса удаления катионов из клетки или перестройкой системы (систем), которая подвергается ингибирующему действию катиона в клетке. Естественно, знание механизмов повышения устойчивости позволит вести направленное воздействие с целью получения конечного результата за более короткое время, а также селективировать варианты, лучше подходящие к конкретным условиям производства. Таким образом, тенденцией сегодняшнего дня является сознательное конструирование штаммов микроорганизмов с заданными свойствами на основе фундаментальных знаний о генетической организации и молекулярно-биологических механизмах осуществления основных функций организма.

Короче говоря, применение перечисленных подходов в сочетании с приемами классической селекции является сутью современной селекции микроорганизмов-продуцентов. Селекция микроорганизмов для микробиологической промышленности и создание новых штаммов часто направлены на усиление их продукционной способности, т.е. образование того

или иного продукта. Решение этих задач в той или иной степени связано с изменением регуляторных процессов в клетке, поэтому в настоящем разделе имеет смысл несколько задержаться на возобновлении сведений о регуляции биохимической активности бактериальной клетки. Как известно, изменения скорости биохимических реакций у бактерий может осуществляться по крайней мере двумя путями. Один из них очень быстрый (реализующийся в течение секунд или минут) заключается в изменении каталитической активности индивидуальных молекул фермента. Второй, более медленный (реализуется в течение многих минут), состоит в изменении скоростей синтеза ферментов. В обоих механизмах используется единый принцип управления системами – принцип обратной связи, хотя существуют и более простые механизмы регуляции активности метаболизма клетки.

Самый простой способ регуляции любого метаболического пути основывается на доступности субстрата или наличии фермента. Действительно, снижение количества субстрата (его концентрации в среде) приводит к снижению скорости потока конкретного вещества через данный метаболический путь. С другой стороны, повышение концентрации субстрата приводит к стимулированию метаболического пути. Поэтому, независимо от каких-то иных факторов, наличие (доступность) субстрата следует рассматривать как потенциальный механизм любого метаболического пути. Иногда эффективным средством повышения выхода целевого продукта является увеличение концентрации в клетке какого-либо определенного предшественника. Аналогичный эффект может быть получен и в результате повышения концентрации ферментов, что достигается, например, амплификацией генов, контролирующих синтез соответствующего фермента. Наиболее распространенным способом регуляции активности метаболических реакций в клетке является регуляция по типу ретроингибирования. Биосинтез многих первичных метаболитов характеризуется тем, что при повышении концентрации конечного продукта данного биосинтетического пути угнетается активность одного из первых ферментов этого пути.

Впервые о наличии такого регуляторного механизма было сообщено в 1953 г. A. Novik и L. Szillard, исследовавшими биосинтез триптофана клетками *E. coli*. Заключительный этап биосинтеза данной ароматической аминокислоты состоит из нескольких, катализируемых индивидуальными ферментами стадий. Указанными авторами было обнаружено, что у одного из мутантов *E. coli* с нарушенным биосинтезом триптофана добавление данной аминокислоты (являющейся конечным продуктом этого биосинтетического пути) резко тормозит накопление одного из предшественников – индол глицерофосфата в клетках. Уже тогда было высказано предположение, что триптофан ингибирует активность какого-то фермента, катализирующего образование индол глицерофосфата.

Несколько позднее было четко установлено, что таким чувствительным к триптофану ферментом является антранилатсинтетаза, которая катализирует более раннюю реакцию триптофанового пути - образование антранилата из хоризмата и глутамината. Этот факт был экспериментально обоснован в опыте, когда добавление триптофана в клеточные экстракты *E. coli*, содержащие фермент антранилатсинтазу и его субстраты (хоризмат и глутамин), приводило к резкому ингибированию образования антранилата. Более того, было однозначно продемонстрировано, что активность антранилатсинтазы подавляется только триптофаном и никакие другие метаболиты клетки подобного действия не оказывают. Существует мнение, что регуляция по типу ретроингибирования является общим свойством клеточного метаболизма. Более тщательное изучения механизма ингибирования активности фермента метаболитами этого же пути, проведенное в условиях *in vitro*, показало, что метаболит, являющийся ингибитором, специфически связывается с участком молекулы фермента, обладающим высокой степенью сродства к данному ингибитору и абсолютно отличающимся от активного центра фермента (т. е. не перекрывающимся с каталитическим центром). Этот участок получил название аллостерического центра (от греч. "аллос" – другой, "стерос" – пространственный), а сами ферменты, обладающие подобным центром, стали называться аллостерическими ферментами. Аллостерические ферменты представляют собой олигомеры, состоящие из взаимодействующих между собой нескольких одинаковых или различающихся субъединиц. При взаимодействии фермента с ингибитором конформация его молекулы изменяется, активный центр при этом также претерпевает изменения, приводящие к утрате каталитической способности фермента. При мутационном изменении аллостерического центра (центра взаимодействия с ингибитором) чувствительность к ингибитору утрачивается и фермент сохраняет свою активность, обеспечивая требуемый для синтеза конечного продукта этап биосинтетического пути.

Зная точно механизм регуляции синтеза интересующего продукта, участвует ли в регуляции механизм ретроингибирования, можно пытаться получить более активный продуцент данного соединения. Для отбора таких продуцентов используют структурные аналоги метаболитов, по отношению к которым селективируют резистентные варианты. Например, 5-метилтриптофан, аналог триптофана, так же как и триптофан, ингибирует активность антранилатсинтазы, но не заменяет собой триптофан в клеточном метаболизме, т. е. не способен включаться в клеточные белки без потери последними биологической активности.

Вследствие этого данный структурный аналог необходимого метаболита задерживает рост бактерий, если он добавлен в питательную среду,

Некоторые мутанты, устойчивые к ингибирующему действию 5-метилтриптофана, способны синтезировать значительные количества триптофана и выделять его во внешнюю среду, а антранилатсинтетаза у них оказывается нечувствительной к триптофану, т. е. не подвержена ретроингибированию этой аминокислотой. Такой методический прием часто используется в селекции продуцентов аминокислот, нуклеотидов и витаминов.

Если же необходимо добиться накопления (продукции) какого-нибудь промежуточного продукта биосинтетического пути, то следует получить мутант с заблокированным за этим продуктом этапом. Такой мутант будет зависимым от наличия в среде выращиваемого вещества, являющегося продуктом заблокированного этапа, либо конечного продукта данного биосинтетического пути.

Давно установлено, что из тысяч ферментов, синтезируемых растущими клетками, одни образуются постоянно и независимо от состава питательной среды, в то время как другие появляются лишь тогда, когда в среде присутствует субстрат их действия. Первые называются конститутивными ферментами (это ферменты гликолиза и др.), вторые относятся к адаптивным или индуцибельным ферментам. Так, клетки *E.coli*, растущие на среде с глюкозой, обладают следовыми количествами ферментов метаболизма лактозы, а также многих других источников углерода, которые способны усваивать клетки данного микроорганизма.

Но если эти же клетки перенести на среду с лактозой, являющейся в данном случае единственным источником углерода и энергии, то уже через 1–2 минуты можно зарегистрировать повышение активности β -галактозидазы, ключевого фермента в утилизации лактозы. Этот фермент гидролизует лактозу до глюкозы и галактозы. В течение следующего непродолжительного периода (равного 20–180 минутам) активность β -галактозидазы повышается примерно в 1000 раз по сравнению с исходным уровнем. Иными словами, имеет место выраженная индукция фермента, которая может быть определена следующим образом:

Индукция фермента – это относительное увеличение скорости его синтеза в ответ на появление в среде культивирования определенного химического соединения, называемого индуктором. Часто великолепными индукторами являются не утилизируемые аналоги субстратов. Например, для β -галактозидазы таким веществом служит изопропил- β – D-тио-галактопиранозид (ИПТГ) неметаболизируемый аналог лактозы. С другой стороны, не всегда субстрат является индуктором синтеза соответствующего ему фермента. Так, лактоза, прежде чем выступить в роли индуктора, должна сначала превратиться в свой изомер аллолактозу (под действием β -галактозидазы).

Механизм генетической регуляции процесса индукции ферментов был расшифрован в экспериментах на кишечной палочке при изучении синтеза упоминавшегося фермента утилизации лактозы- β -галактозидазы.

В 1961 г. F. Jacob и J. Monod на основании результатов генетического и биохимического изучения процесса утилизации лактозы бактериями *E.coli* K 12 сформулировали концепцию, получившую широкую известность как "модель оперона". В соответствии с этой моделью данная система регуляции состоит из четырех компонентов: структурных генов (детерминирующих структуру ферментов), гена-регулятора, оператора и промотора. Ген-регулятор определяет структуру белка-репрессора, способного связываться с оператором, который, в свою очередь, контролирует функционирование прилежащих к нему структурных генов.

Промотор представляет собой область для связывания с ферментом транскрипции – РНК-полимеразой. Если белок-репрессор связан с оператором, то РНК-полимераза не может перемещаться на промотор и синтез информационной РНК не может осуществляться. Результатом является отсутствие синтеза соответствующих ферментов. Первым из подробно изученных оперонов является лактозный оперон кишечной палочки. Авторы концепции предположили, что репрессор является аллостерическим белком, обладающим двумя специфическими центрами один из которых характеризуется сродством к нуклеотидной последовательности области оператора, а другой – к молекуле индуктора.

Взаимодействие индуктора с репрессором снижает сродство последнего (вследствие изменения центра связывания с оператором) к оператору, результатом чего является освобождение оператора. Репрессор *lac*-оперона выделен в чистом виде и состоит из четырех идентичных субъединиц (общая молекулярная масса равна 150 000 дальтон). Каждая субъединица взаимодействует с одной молекулой индуктора (т. е. требуется четыре молекулы индуктора, чтобы инактивировать репрессор).

Репрессор в чистом виде характеризуется исключительно высоким сродством к оператору и эффективно связывается с нуклеотидной последовательностью *lac*-оператора в условиях *in vitro*. В присутствии индуктора связывание нарушается. Изложенные результаты выполненных экспериментов являются веским подтверждением гипотезы Jacob и Monod, которая в настоящее время считается полностью доказанной.

Известно, что мутации в последовательностях гена-регулятора или оператора приводят в определенных случаях к нарушению либо образования полноценного репрессора, либо к нарушению его сродства к оператору. И в том, и в другом случае потребность в индукторе для запуска синтеза информационной РНК, а следовательно, и соответствующих ферментов, исчезает. Подобные мутанты (или мутации) называются конститутивными, поскольку синтез ферментов осуществляется постоянно. Получение конститутивных мутантов имеет важное значение в селекции определенных штаммов промышленных микроорганизмов.

Концепция оперона применима и к процессу репрессии ферментов. Отличием от индуцибельных систем в данном случае является наличие в таких оперонах не активного репрессора (апререссора), который в одиночку не способен взаимодействовать с оператором, но может активироваться конечным продуктом (корепрессором) с образованием активного репрессора.

Уже отмечалось, что с помощью аналога триптофана (5-метилтриптофана) располагающийся на значительном расстоянии от контролируемых им генов триптофанового оперона. Такие мутанты являются конститутивными вследствие либо полного отсутствия репрессора, либо в результате невозможности последнего активироваться триптофаном.

Таким образом, изменяя регуляцию индуцибельных и репрессибельных оперонов, существует возможность повышать продукционную активность определенных промышленных штаммов-продуцентов. Уместно отметить, что структурные гены одного метаболического пути не всегда объединены в единый оперон (наподобие лактозного), однако это не мешает их регуляции с помощью индукции или репрессии. Так, например, гены *E.coli*, детерминирующие структуру ферментов, обеспечивающих биосинтез аргинина, располагаются в различных областях хромосомы, но все контролируются одним и тем же геном-регулятором. Такая система образует регулон. Другим показательным примером является SOS-регулон,

гены которого детерминируют структуру более десятка различных белков и ферментов, участвующих в репарации повреждений ДНК клетки. Все эти структурные гены регулируются одним репрессором – продуктом гена *lexA*. Опероны и регулоны, контролирующие взаимосвязанные физиологические функции обнаружены у всех генетически изученных видов бактерий. Очень важным регуляторным элементом любого оперона является область ДНК, именуемая промотором. Этот участок оперона обеспечивает взаимодействие (связывание) с РНК-полимеразой для начала транскрипции (т. е. синтеза молекулы информационной РНК). От особенностей промотора зависит эффективность транскрипции. Мутации в области промотора, изменяя его активность, могут повышать или понижать экспрессию оперона. Данное свойство промоторов также используется в создании более активных продуцентов.

Большие перспективы в селекции продуцентов открывает генетическая инженерия, методы которой позволяют заменять регуляторные области катаболических оперонов на более эффективные промоторы, повышающие продукцию клетками биологически активных веществ и обеспечивающие новые возможности контроля активности генов.

Само собой разумеется, что это не единственные способы повышения продуктивности бактерий за счет изменения регуляторных механизмов.

Характер биологической системы (микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы) исключительно важен для биотехнологического процесса. Во многих случаях именно генетически модифицированная самовоспроизводящаяся биологическая единица (микроорганизм, вирус, растение или животное) является конечным коммерческим продуктом.

Прокариоты и эукариоты. Все живые организмы принято делить на две основные группы: прокариоты и эукариоты. Приблизительно 1,5 млрд лет назад произошел переход от маленьких клеток со сравнительно простой внутренней структурой (так называемых прокариот, к которым относятся различные бактерии) к большим по размеру и значительно более сложно устроенным эукариотическим клеткам, подобным клеткам высших животных и растений.

Основные структурные различия про- и эукариот:

- наличие или отсутствие ядра, содержащего хромосомную ДНК;
- строение и химический состав клеточной стенки;
- наличие или отсутствие субклеточных цитоплазматических органелл.

В прокариотической бактериальной клетке хромосомная ДНК находится непосредственно в цитоплазме, клетка окружена ригидной клеточной стенкой. В клетке нет субклеточных цитоплазматических органелл. В оптимальных условиях прокариотическая клетка может делиться каждые 20 мин и таким образом давать жизнь более 10 млрд клеток менее чем за сутки.

В эукариотической клетке имеется ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной мембраной, хромосомная ДНК находится в ядре. В цитоплазме содержатся различные субклеточные органеллы: мембраны, окружающие ядро, митохондрии, образующие лабиринт эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где синтезируются липиды и мембранные белки. Мембраны формируют стопки уплощенных пузырьков, составляющих аппарат Гольджи, который участвует в синтезе и транспорте различных органических молекул. Мембраны окружают лизосомы (субклеточные структуры диаметром 0,20-0,5 мкм), содержащие гидролитические ферменты, необходимые для внутриклеточного пищеварения.

Мембраны, таким образом, защищают от действия этих ферментов белки и нуклеиновые кислоты самой клетки. Мембраны также окружают пероксисомы, содержащие окислительные ферменты, производящие и разрушающие опасные высокорекреационноспособные перекиси (пероксиды). Обмен между внутриклеточными, окруженными мембранами структурами и внеклеточной средой происходит с помощью эндоцитоза.

Различают две группы бактерий – зубактерии, населяющие почву, воду и другие организмы, и архебактерии, встречающиеся в таких средах обитания, как болота, океанские глубины, очень соленые воды и горячие кислые источники.

Исходя из температурного режима, который предпочитают те или иные микроорганизмы, их подразделяют на термофилы (от 45 до 90°C и выше), мезофилы (от 10 до 47°C) и психрофилы или психротрофы (от -5 до 35°C). Микроорганизмы, активно размножающиеся лишь в определенном диапазоне температур – полезный инструмент для решения различных биотехнологических задач. Например, термофилы часто служат источником генов, кодирующих термостабильные ферменты, а генетически видоизмененные психротрофы используются при пониженной температуре для биодegradации токсичных отходов, содержащихся в почве и воде.

Среди множества биологических объектов, используемых в биотехнологии, основными «рабочими лошадками» являются бактерии *Escherichia coli*, одноклеточные дрожжи *Sacharomyces cerevisiae* и различные клеточные линии животного происхождения. Все они играют важную роль в получении белков, кодируемых клонированными генами.

E. coli - грамотрицательная непатогенная подвижная палочка длиной менее 1 мкм. Традиционная среда ее обитания с кишечник человека, может также высеваться из почвы и воды. Штаммы *E. coli* культивируются на обогащенных жидких питательных средах, содержащих аминокислоты, витамины, соли, микроэлементы и источник углерода. *E. coli* можно культивировать в аэробных и анаэробных условиях, но для оптимальной продукции рекомбинантных белков *E. coli* и другие микроорганизмы обычно выращивают в аэробных условиях. Рост клеточной массы и продукция белка лимитируются содержанием в питательной среде растворенного кислорода, для этого в ферментерах создают условия аэрации.

Кроме *E. coli* в МБТ используют множество других микроорганизмов, которые подразделяют на две группы:

микроорганизмы как источники специфических генов (например, ген, кодирующий стабильную ДНК-полимеразу, которая используется в широко применяемой полимеразной цепной реакции - ПЦР; этот ген был выделен из термофильных бактерий и клонирован в *E. coli*).

микроорганизмы, созданные генноинженерными методами для решения определенных задач (например, различные штаммы *Corynebacterium glutamicum*, генетически модифицированные с целью повышения продукции промышленно важных аминокислот).

Saccharomyces cerevisiae - непатогенные одноклеточные организмы диаметром клетки около 5 мкм. Во многих отношениях представляют эукариотический аналог *E. coli*. *S. cerevisiae* размножаются почкованием, их способность к превращению сахара в этанол и углекислый газ издавна использовалась для изготовления напитков и хлеба. Клетки дрожжей делятся каждые 1,5-2 ч. *S. cerevisiae* является удобной моделью для исследования других эукариот, в т.ч. человека, так как многие гены, ответственные за регуляцию клеточного деления *S. cerevisiae*, сходны с таковыми у человека. Это способствовало идентификации и характеристике генов человека, отвечающих за развитие новообразований. Генетическая система дрожжей является неизменным участником всех исследований по изучению ДНК человека.

Синтезированный бактериальной клеткой эукариотический белок часто подвергают ферментативной модификации, присоединяя к белковой молекуле низкомолекулярные соединения, что необходимо для правильного функционирования белка. Однако *E. coli* и другие прокариоты способны осуществлять эту модификацию, поэтому для получения полноценных эукариотических белков используют *S. cerevisiae* и другие виды дрожжей.

В качестве биологических систем в МБТ используют культуру эукариотических клеток. Кусочек ткани определенного организма (насекомого, растения, млекопитающего) обрабатывают протеолитическими ферментами (трипсином), расщепляющими белки межклеточного материала; при работе с растительными клетками используют ферменты, разрушающие клеточную стенку. Высвободившиеся клетки помещают в питательную среду, содержащую аминокислоты, антибиотики, витамины, соли, глюкозу, факторы роста. В этих условиях (деление клеток млекопитающих происходит примерно раз в сутки) на стенке емкости с культурой образуется клеточный монослой. Если после этого не перенести клетки в емкость со свежей питательной средой, рост прекращается. Обычно удается переносить (перевивать, субкультивировать) и поддерживать до 50-100 клеточных поколений исходной (первичной) клеточной культуры, затем клетки начинают терять способность к делению и гибнут.

В биотехнологии устойчивые линии используют для крупномасштабного производства вакцин и рекомбинантных белков, для размножения вирусов и выявления белков, которые кодируются клонированными последовательностями ДНК

ТЕМА 3 СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИООБЪЕКТОВ МЕТОДАМИ МУТАГЕНЕЗА, КЛЕТОЧНОЙ И ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Биотехнология заинтересована в совершенствовании биообъекта независимо от того, на какой ступени «лестницы живых существ» находится этот биообъект. Если организм, выделенный из природной среды («дичок») не будет подвергнут совершенствованию, то производственный процесс образования целевого продукта или экономически нецелесообразен, или технически трудноосуществим.

Изменение биообъекта, благоприятное для его использования в производстве, должно передаваться по наследству и, соответственно, вызываться мутацией. На биохимическом уровне **мутация** - изменение первичной структуры ДНК в конкретном ее участке, что, в конечном счете, приводит к изменению фенотипа биообъекта. Меняется биосинтетическая способность биообъекта: изменяется либо набор его ферментов, либо активность некоторых из них. Мутации могут быть неконтролируемыми (спонтанными) и контролируемыми (индуцированными). Первые происходят с частотой $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ на одну генерацию для разных организмов; это значит, что за одну генерацию не направленно изменяется одна клетка из 100 000 или из 10^6 клеток. Частота индуцированных мутаций возрастает в десятки-тысячи раз. Спонтанные мутации встречаются, как правило, довольно редко. Разброс по степени выраженности признаков обычно невелик.

Факторы, вызывающие мутации, относят к разряду физических, химических или биологических, и называют мутагенами. Мутагены по действию подразделяют на два класса - прямого (на нуклеиновые кислоты) и непрямого, или опосредованного действия (преимущественно - через первичные метаболиты, или белки). В качестве физических мутагенов могут быть повышенная или пониженная температура, различного рода излучения (ультрафиолетовое, ионизирующее), ультразвук. При температурном воздействии на клетки более нестабильными в составе ДНК оказываются пуриновые основания, вследствие чего могут возникнуть апуриновые сайты (выпадение пуринов из ДНК). Так называемый «температурный шок» может приводить к существенным изменениям в различных клетках - возрастает частота летальных и видимых мутаций. Очевидно, что воздействие температуры, выходящей за пределы нормальной для данного организма, сильнее отражается на клетках гомойотермных видов (имеющих постоянную температуру тела) в сравнении с пойкилотермными видами, температура тела которых зависит от окружающей среды (от греч. *omoios* - одинаковый, похожий, *poikilos* - пестрый, разнообразный, *terme* - тепло).

Летальные мутации, получаемые при длительном воздействии умеренных температур, мало чем отличаются от мутаций, возникающих после температурного шока. Температурочувствительные мутанты являются важным инструментом при изучении генетики различных организмов.

Ультрафиолетовые лучи (УФЛ) имеют большую длину волн, чем ионизирующие излучения, и обладают меньшей энергией. Их мутагенное действие открыл А. А. Промптов в 1931г. УФЛ с длиной волны 260 нм поглощаются ДНК, при этом разрываются водородные связи между комплементарными нитями. В мутировавших клетках УФЛ вызывают в основном внутригенные перестройки.

В отличие от УФЛ, излучения типа быстрых электронов, позитронов, протонов, ос-частиц, нейтронов, рентгеновских и у-лучей относятся к ионизирующим, то есть их первичный биологический эффект связан с ионизацией в тканях высших эукариот; вторичный эффект является следствием теплового возбуждения молекул. Происходит окисление или передача энергии молекулам ДНК (РНК). Свободно-радикальные процессы могут завершиться дезаминированием и дегидроксилированием оснований, разрывом N-гликозидных связей между основаниями и пентозой, деструкцией пиримидинов, окислением пентозы, высвобождением пирофосфата. Вот почему различные излучения могут индуцировать самые разнообразные мутации. Применительно к ультразвуковым колебаниям (акустические колебания частотой свыше 2104 Герц) считают, что под их влиянием наблюдаются последовательные изменения вначале в пиримидинах, а затем в пуринах.

Становление и развитие работ по химическому мутагенезу связано с исследованиями отечественных генетиков: В. В. Сахарова (1933), М. Е. Лобашова (1934), И. А. Рапопорта (1938), а также зарубежных ученых: Ш. Ауэрбах (1940), Вестергаард (1959), Мандел и Гринберг (1960) и др. В 1966 г. И. А. Рапопорт предложил термин "супермутагены" для веществ, обладающих исключительно высокой мутагенностью и заметно не влияющих при этом на жизнеспособность клеток и организмов.

К химическим мутагенам относят: ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот (НК), аналоги азотистых оснований, алкилирующие соединения, окислители, восстановители, свободные радикалы, акридиновые красители, некоторые антибиотики.

К биологическим мутагенам относят вирусы (фаги), живые вакцины, некоторые биотоксины, образуемые грибами, простозоа и гельминтами. Так, изменения в хромосомах вызывают цитомегаловирус, вирус простого герпеса, герпетический вирус, вирус Сендай, вирус саркомы Роуса и др. Из грибных токсинов - мутагенов ранее был назван афлатоксин В. Можно назвать еще треморген, образуемый рядом аспергиллов и др. Фагоустойчивые мутанты актиномицетов и лактобактерий представляют интерес для соответствующих производств, например, антибиотиков и молочнокислых продуктов. Мутагены различных классов (физические, химические, биологические) используют в работе с биообъектами. При этом стремятся получить штаммы либо с какими-то маркерными признаками, важными для расшифровки механизмов мутагенеза, либо штаммы-суперпродуценты БАВ, существенно увеличивающие выход конечного продукта в сравнении с контролем. При целенаправленном получении мутантов необходим их отбор, или селекция, значение которой исключительно велико в выведении различных пород животных, многих сортов злаковых, декоративных и многих других растений, в получении микробов-суперпродуцентов БАВ (ряда антибиотиков, аминокислот, витаминов и других субстанций). Для сравнения можно указать на успехи с селекцией мутантов пеницилла, исходный штамм которого, выделенный из воздуха А. Флемингом в 1928 г., продуцировал лишь 50 единиц антибиотика пенициллина в 1 мл культуральной жидкости. Тяготы второй мировой войны 1939-1945 гг. вынудили ученых вернуться к этому виду гриба и заняться генетико-селекционной работой с ним. В 1951 г. путем рассева естественной популяции клеток, выросших в глубинных условиях культивирования *Penicillium chrysogenum*, был выделен штамм NQ 1951 с активностью 100 ЕД/мл. Его колония и стала родоначальницей всех производственных штаммов в различных странах мира. Используя селекцию и комбинированное воздействие различными мутагенами (преимущественно - УФЛ и алкилирующие агенты), уже в начале 60-х годов удалось передать в производство штамм, образующий пенициллин в количестве 5 000 ЕД и более в 1 мл культуральной жидкости. В настоящее время используются штаммы, продуцирующие десятки тысяч единиц антибиотика в 1 мл среды. Производственные штаммы (применительно к биотехнологическому производству) с такой высокой продуктивностью (это относится не только к пенициллину, но и к другим целевым продуктам) крайне нестабильны вследствие того, что многочисленные искусственные изменения в геноме клеток штамма сами по себе для жизнеспособности этих клеток положительного значения не имеют. Поэтому мутантные штаммы требуют постоянного контроля при хранении: популяцию клеток высеивают на твердую среду и полученные из отдельных колоний культуры проверяют на продуктивность, при этом ревертанты - культуры с пониженной активностью отбрасывают. Реверсия объясняется обратными спонтанными мутациями, ведущими к возвращению участка генома (конкретного фрагмента ДНК) в его первоначальное состояние.

Следует различать понятия "селекция" и "интродукция" (от лат. *introductio* - введение). При селекции используют методы выведения новых форм организмов, отличающихся по свойствам от исходных родительских организмов. При интродукции выделяют из естественных (природных) и искусственных (производственных) условий существующие организмы, наиболее пригодные для практических целей. В успехах селекции велика роль контролируемого мутагенеза, тогда как успехи интродукции опираются на генофонд, заведомо присущий организму. Селекция и интродукция животных и растений возникли раньше генетики. Основные подходы при этом концентрировались преимущественно на скрещивании организмов и отборе возникающего потомства.

Применительно к микробам сформировались четыре подхода, используемых в селекционной работе:

1. отбор естественных штаммов, обладающих ценными признаками, проявляющимися в конкретных условиях их существования (этот подход во многом аналогичен интродукции высших эукариот); при размножении такой культуры (с учетом частоты спонтанных мутаций) наступает популяционное давление, когда наиболее приспособленная форма вытесняет исходную в популяции. В анализе таких популяций полезны флуктуационный тест (от лат. *fluctuatio* - колебание) и метод отпечатков. С помощью первого доказывают спонтанность мутаций по маркерному признаку (от англ. *mark* - знак, метка), с помощью второго отбирают нужные колонии, вырастающие на селективной среде. Этот первый подход опирается на естественный ход событий у микроорганизмов в измененных условиях (естественный отбор); «метод отпечатков», разработанный Дж. Ледербергом и Э. Ледерберг. Популяцию микробных клеток разводят так, чтобы на чашке Петри с питательной средой выросло около ста колоний и они были бы четко разделены. Наметаллический цилиндр диаметром, близ-

ким к диаметру чашки Петри, надевают бархат; затем все стерилизуют, создавая, таким образом, «стерильное бархатное дно» цилиндра. Далее прикладывают это дно к поверхности среды в чашке с выросшими на ней колониями. При этом колонии как бы «отпечатываются» на бархате. Затем этот бархат прикладывают к поверхности сред разного состава. Таким образом, можно установить: какая из колоний в исходной чашке (на бархате расположение колоний отражает их расположение на поверхности твердой среды в исходной чашке) соответствует, например, мутанту, нуждающемуся в конкретном витамине, или конкретной аминокислоте; или какая колония состоит из мутантных клеток, способных к образованию фермента, окисляющего определенный субстрат; или какая колония состоит из клеток, получивших резистентность к тому или иному антибиотику и т.п.

2. искусственный отбор клонов микроорганизмов с полезными для человека признаками, возникшими на основе естественной изменчивости родительских форм. К такому отбору прибегают тогда, когда контролируемый признак биологически малоценен для микроба и поэтому трудно создать условия выращивания культуры, в которых относительно легко удавалось бы выделять нужные варианты. При этом необходимо проверять большое число клонов и субклонов. И если вариации между ними по контролируемому признаку невелики, то успех выборки оказывается маловероятным или небольшим;

3. ступенчатая селекция - эффективный метод искусственного отбора форм с применением мутагенов. С помощью мутагенов увеличивают изменчивость тест-культур, а среди последних отбирают наиболее перспективные; такой подход, как правило, используют многократно (ступенчато), добиваясь существенного возрастания контролируемого показателя (активность, продуктивность и др.); Потенциальные возможности мутагенеза (с последующей селекцией) обусловлены зависимостью биосинтеза целевого продукта от многих метаболических процессов в организме продуцента. Например, повышенную активность организма, образующего целевой продукт, можно ожидать, если мутация привела к дупликации (удвоению) или амплификации (умножению) структурных генов, включенных в систему синтеза целевого продукта. Далее активность можно повысить, если за счет разных типов мутаций будут подавлены функции репрессорных генов, регулирующих синтез целевого продукта. Весьма эффективный путь увеличения образования целевого продукта - нарушение системы ретроингибирования. Повысить активность продуцента можно также, изменив (за счет мутаций) систему транспорта предшественников целевого продукта в клетку. Наконец, иногда целевой продукт при резком увеличении его образования отрицательно влияет на жизнеспособность собственного продуцента (так называемый суицидный эффект). Повышение резистентности продуцента к образуемому им же веществу часто необходимо для получения, например, суперпродуцентов антибиотиков.

Помимо дупликации и амплификации структурных генов мутации могут носить характер делеции - «стирания», т.е. «выпадения» части генетического материала. Мутации могут быть обусловлены транспозицией (вставкой участка хромосомы в новое место) или инверсией (изменением порядка расположения генов в хромосоме). При этом геном мутантного организма претерпевает изменения, ведущие в одних случаях к потере мутантом определенного признака, а в других - к возникновению у него нового признака. Гены на новых местах оказываются под контролем иных регуляторных систем. Кроме того, в клетках мутанта могут появиться несвойственные исходному организму гибридные белки за счет того, что под контролем одного промотора оказываются полинуклеотидные цепи двух (или более) структурных генов, ранее отделенных один от другого.

Немалое значение для биотехнологического производства могут иметь и так называемые «точечные» мутации. В этом случае изменения происходят в пределах только одного гена. Например, выпадение или вставка одного или нескольких оснований. К «точечным» мутациям относятся трансверсия (когда происходит замена пурина на пиримидин) и транзигция (замена одного пурина на другой пурин или одного пиримидина на другой пиримидин). Замены в одной паре нуклеотидов (минимальные замены) при передаче генетического кода на стадии трансляции ведут к появлению в кодируемом белке вместо одной аминокислоты другой. Это может резко изменить конформацию данного белка и, соответственно, его функциональную активность, особенно в случае замены аминокислотного остатка в активном или аллостерическом центре.

4. гибридизация - как метод выведения полезных форм микроорганизмов. Здесь имеется аналогия с методом скрещивания у высших эукариот.

Из всего изложенного следует, что современный биообъект, используемый в биотехнологической промышленности, - это суперпродуцент, отличающийся от исходного природного штамма не по одному, а, как правило, по нескольким показателям. Хранение таких штаммов-суперпродуцентов представляет серьезную самостоятельную проблему. При всех способах хранения их необходимо периодически пересевать и проверять как на продуктивность, так и на другие важные для производства свойства.

В случае применения высших растений и животных в качестве биообъектов для получения лекарственных средств возможности использования мутагенеза и селекции для их совершенствования ограничены. Однако в принципе мутагенез и селекция здесь не исключены. Особенно это относится к растениям, образующим вторичные метаболиты, которые используются как лекарственные вещества.

Клеточная инженерия - это один из основных разделов современной биотехнологии, основанный на выделении и культивировании тканей и клеток высших многоклеточных организмов. Культивирование тканей и клеток происходит вне организма - *in vitro* («в пробирке, в колбе, в стеклянной посуде»), в специально подобранных условиях.

Возможности клеточной инженерии. Использование культур клеток позволяет преодолеть многие проблемы биотехники (биологической этики), связанные с умерщвлением животных. Кроме того, в культуре можно выращивать строго определенные клетки в неограниченном количестве. На культурах клеток получают вакцины, например, против кори, по-

лиомелита. Сохраняя культуры клеток, можно сохранять генотипы отдельных организмов и создавать банки генофондов целых видов.

Краткая история развития методов клеточной инженерии. Первые попытки вырастить изолированные кусочки растительных тканей на питательной среде относятся к концу XIX в. Однако первые культуры растительных тканей оказались неустойчивыми. В 1907 г. Р. Гаррисон выращивал клетки зачатка нервной системы зародыша лягушки в капле лимфы; эти клетки оставались живыми в течение нескольких недель, из них выросли нервные волокна. В первой четверти XX в. были получены первые устойчивые культуры тканей животных, выращиваемые на сыворотке крови. Успешное культивирование растительных тканей на синтетических питательных средах началось лишь в 1930-е гг. В 1958 г. Ф. Стюард установил, что, изменяя условия выращивания флоэмы моркови, можно либо поддерживать неорганизованную пролиферацию клеток в длительной пересадочной культуре, либо индуцировать эмбриоидогенез (эмбриод – зародыш, полученный из культуры соматических клеток). В 1960-е гг. были разработаны методы соматической гибридизации путем слияния протопластов с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ). В 1970-е гг. были разработаны методы электрослияния изолированных протопластов, а затем и переноса отдельных генов.

Создание клеточных культур растений. Основным типом культивируемой растительной клетки является каллусная. Каллус (или каллус) – это наименее дифференцированная ткань, возникающая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений. В обычных условиях каллус возникает при повреждениях и функционирует непродолжительное время. Однако в экспериментальных условиях каллус получают из апикальных меристем, из паренхимы корнеплодов, из флоэмы, из гаплоидных тканей пыльников. К образованию каллуса способны лишь крайне специализированные ткани, например, ксилема.

Культивирование клеток растений производят или поверхностным способом или в жидкой питательной среде. В любом случае необходимо подобрать определенное соотношение компонентов питательной среды. В состав питательной среды обязательно входят: углеводы (сахароза или глюкоза), минеральные соли, витамины, регуляторы роста; иногда добавляют дрожжевой экстракт или растительные экстракты. Поддерживается определенная температура, кислотность, газовый состав.

Создание клеточных культур животных. Основным типом культивируемой животной клетки являются опухолевые клетки миеломы или саркомы (раковые клетки). У мышей с генетической предрасположенностью к этому заболеванию индуцируют образование опухолей с помощью внутрибрюшинного введения минеральных масел или инертного твердого пластика. Культивирование клеток животных чаще производят поверхностным способом. Это позволяет получить однослойные пласты различных тканей (соединительной, эпителиальной).

Опухолевые клетки в искусственных условиях сливаются с другими клетками (например, с клетками селезенки, с фибробластами, с гепатоцитами), образуя *гибридомы* – клетки, несущие свойства двух разных типов клеток. Слияние клеток, принадлежащих к разным биологическим видам, называется соматической гибридизацией. Однако получить эмбриод из клеточных культур животных пока не удается.

Типы клеточных культур. Различают три основных типа клеточных культур: первичные, эмбриональные и перевиваемые. *Первичные культуры* можно получить из любого органа, но они обычно недолговечны и через 2...3 недели погибают. Диплоидные *эмбриональные культуры* получают из эмбриональных тканей; для сохранения этих культур их необходимо периодически пересевать на свежую питательную среду (такой пересев называется *пассажем*; эмбриональные культуры сохраняют свои свойства в течение 50 пассажей). Стабильные перевиваемые линии могут выдерживать практически неограниченное число пересевов; обычно это культуры опухолевых клеток.

Большой вклад в биологию клетки вносят методы клеточной инженерии.

Инженерия клеточная – область биотехнологии, основанная на культивировании растительных клеток и тканей, способных в свободном состоянии (вне организма) производить нужные человеку вещества, которые обычно получают от специально выращиваемых растений. Клеточная инженерия тесно связана с инженерией геной. Один из основных приемов клеточной инженерии – выращивание клеточных и тканевых культур для клонального (бесполого) размножения ценных растений (из культивируемых клеток можно вырастить целое растение), затем размножаемых обычными методами.

Было найдено, что различные живые клетки могут сливаться друг с другом, если специальными способами обработать их плазматические мембраны. Так можно слить эритроцит курицы и лимфоцит человека. При этом получается двуядерная клетка – гетерокарион, в котором происходит активация ядра куриного эритроцита. Если гетерокарион образуется из близкородственных клеток (например, мышцы и хомячки), то при вступлении их в митоз хромосомы могут объединиться в одну метафазную пластинку. После разделения такой клетки получится истинно гибридная клетка. Другие приемы позволяют конструировать клетки из разных по происхождению ядер и цитоплазмы. Так, разрушив актиновый компонент цитоскелета и подвергнув клетки центрифугированию, можно разделить клетку на две части: ядро с узким ободком цитоплазмы – кариопласт и на оставшуюся часть цитоплазмы – цитопласт. Затем, используя разные кариопласты и цитопласты, можно создавать разные комбинации реконструированных клеток.

Методы клеточной инженерии широко применяются не только в экспериментальной биологии, но и в биотехнологических целях. Например, при получении моноклональных антител используются клеточные гибриды между лимфоцитами иммунизированных животных и интенсивно размножающимися клетками миеломы. Полученные первичные дикарионы образуют истинные гибридные клетки, которые интенсивно размножаются за счет генома опухолевых миеломных клеток и одновременно выделяют большое количество антител, за счет работы генома иммунизированных лимфоцитов. Этот прием позволяет получать большое число гибридных клеток, вырабатывающих большие количества необходимых антител.

Введение в генетическую инженерию

Важной составной частью биотехнологии является генетическая инженерия. Родившись в начале 70-х годов, она добилась сегодня больших успехов. Методы генной инженерии преобразуют клетки бактерий, дрожжей и млекопитающих в "фабрики" для масштабного производства любого белка. Это дает возможность детально анализировать структуру и функции белков и использовать их в качестве лекарственных средств.

В настоящее время кишечная палочка (*E. coli*) стала поставщиком таких важных гормонов как инсулин и соматотропин. Ранее инсулин получали из клеток поджелудочной железы животных, поэтому стоимость его была очень высока. Для получения 100 г кристаллического инсулина требуется 800-1000 кг поджелудочной железы, а одна железа коровы весит 200 - 250 грамм. Это делало инсулин дорогим и труднодоступным для широкого круга диабетиков. В 1978 году исследователи из компании "Генентек" впервые получили инсулин в специально сконструированном штамме кишечной палочки. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей А и В длиной 20 и 30 аминокислот. При соединении их дисульфидными связями образуется нативный двухцепочечный инсулин. Было показано, что он не содержит белков *E. coli*, эндотоксинов и других примесей, не дает побочных эффектов, как инсулин животных, а по биологической активности от него не отличается. Впоследствии в клетках *E. coli* был осуществлен синтез проинсулина, для чего на матрице РНК с помощью обратной транскриптазы синтезировали ее ДНК-копию. После очистки полученного проинсулина его расщепили и получили нативный инсулин, при этом этапы экстракции и выделения гормона были сведены к минимуму. Из 1000 литров культуральной жидкости можно получать до 200 граммов гормона, что эквивалентно количеству инсулина, выделяемого из 1600 кг поджелудочной железы свиньи или коровы.

Соматотропин - гормон роста человека, секретируемый гипофизом. Недостаток этого гормона приводит к гипофизарной карликовости. Если вводить соматотропин в дозах 10 мг на кг веса три раза в неделю, то за год ребенок, страдающий от его недостатка, может подрасти на 6 см. Ранее его получали из трупного материала, из одного трупа: 4 - 6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат. Таким образом, доступные количества гормона были ограничены, кроме того, гормон, получаемый этим способом, был неоднороден и мог содержать медленно развивающиеся вирусы. Компания "Genentec" в 1980 году разработала технологию производства соматотропина с помощью бактерий, который был лишен перечисленных недостатков. В 1982 году гормон роста человека был получен в культуре *E. coli* и животных клеток в институте Пастера во Франции, а с 1984 года начато промышленное производство инсулина и в СССР. При производстве интерферона используют как *E. coli*, *S. cerevisiae* (дрожжи), так и культуру фибробластов или трансформированных лейкоцитов. Аналогичными методами получают также безопасные и дешевые вакцины.

На технологии рекомбинантных ДНК основано получение высокоспецифичных ДНК-зондов, с помощью которых изучают экспрессию генов в тканях, локализацию генов в хромосомах, выявляют гены, обладающие родственными функциями (например, у человека и курицы). ДНК-зонды также используются в диагностике различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК сделала возможным нетрадиционный подход "белок-ген", получивший название "обратная генетика". При таком подходе из клетки выделяют белок, клонируют ген этого белка, модифицируют его, создавая мутантный ген, кодирующий измененную форму белка. Полученный ген вводят в клетку. Если он экспрессируется, несущая его клетка и ее потомки будут синтезировать измененный белок. Таким образом можно исправлять дефектные гены и лечить наследственные заболевания.

Если гибридную ДНК ввести в оплодотворенную яйцеклетку, могут быть получены трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его потомками. Генетическая трансформация животных позволяет установить роль отдельных генов и их белковых продуктов как в регуляции активности других генов, так и при различных патологических процессах. С помощью генетической инженерии созданы линии животных, устойчивых к вирусным заболеваниям, а также породы животных с полезными для человека признаками. Например, микроинъекция рекомбинантной ДНК, содержащей ген соматотропина быка в зиготу кролика позволила получить трансгенное животное с гиперпродукцией этого гормона. Полученные животные обладали ярко выраженной акромегалией. Сейчас даже трудно предсказать все возможности, которые будут реализованы в ближайшие несколько десятков лет.

Методы генной инженерии

Генетическая инженерия - конструирование *in vitro* функционально активных генетических структур (рекомбинантных ДНК), или иначе - создание искусственных генетических программ (Баев А. А.). По Э. С. Пирузян генетическая инженерия - система экспериментальных приемов, позволяющих конструировать лабораторным путем (в пробирке) искусственные генетические структуры в виде так называемых рекомбинантных или гибридных молекул ДНК.

Генетическая инженерия - получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства. Речь идет о направленном, по заранее заданной программе конструировании молекулярных генетических систем вне организма с последующим введением их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства.

Цель прикладной генетической инженерии заключается в конструировании таких рекомбинантных молекул ДНК, которые при внедрении в генетический аппарат придавали бы организму свойства, полезные для человека. Например, получение «биологических реакторов» - микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с определенными ценными для человека признаками.

ками. Методы генной инженерии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

Технология рекомбинантных ДНК использует следующие методы:

- специфическое расщепление ДНК рестрицирующими нуклеазами, ускоряющее выделение и манипуляции с отдельными генами;
- быстрое секвенирование всех нуклеотидов очищенном фрагменте ДНК, что позволяет определить границы гена и аминокислотную последовательность, кодируемую им;
- конструирование рекомбинантной ДНК;
- гибридизация нуклеиновых кислот, позволяющая выявлять специфические последовательности РНК или ДНК с большей точностью и чувствительностью, основанную на их способности связывать комплементарные последовательности нуклеиновых кислот;
- клонирование ДНК: амплификация *in vitro* с помощью цепной полимеразной реакции или введение фрагмента ДНК в бактериальную клетку, которая после такой трансформации воспроизводит этот фрагмент в миллионах копий;
- введение рекомбинантной ДНК в клетки или организмы.

Введение гена в клетку

Селективные и репортерные гены

Ввести рекомбинантный ген в клетку можно 2 способами: используя вектора или путем прямого введения.

Требования к векторной ДНК, ее состав

Вектор - молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Задача вектора – донести выбранную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена.

Таким образом, вектор должен быть небольшим, способным поддерживаться в клетке-хозяине (реплицироваться), многократно копироваться (амплифицироваться), экспрессировать соответствующий ген (содержать соответствующие регуляторные последовательности), должен иметь маркерный ген, позволяющий различать гибридные клетки для эффективной селекции их; должен быть способен передаваться в клетку соответствующего организма.

Регуляторные последовательности, отвечающие за стабильную экспрессию гена, будут рассмотрены позднее.

Типы векторов для введения гена в клетку

Существует несколько типов векторов:

Бактериальные плазмиды

Основная масса клеточной ДНК бактерий содержится в хромосоме (в хромосоме *E. coli*, например, 4 млн. пар нуклеотидов). Однако кроме хромосом бактерии содержат большое количество очень маленьких кольцевых молекул ДНК плазмид длиной несколько тысяч пар оснований (молекулярная масса от 1,5 до 300 мегадальтон, 1 МД = 1500 п.о). Такие мини-хромосомы называют плазмидами.

Как правило, плазмиды имеют в своем составе гены устойчивости к антибиотикам, ионам тяжелых металлов (R-плазмиды), а также гены, контролирующие катаболизм некоторых органических соединений (плазмиды биодegradации, или D-плазмиды). Поскольку эти гены находятся в плазмидах, они представлены гораздо большим числом копий. Высокая копияность плазмид обеспечивает клетке синтез большого количества ферментов, химически нейтрализующих антибиотики или ксенобиотики, что и обеспечивает устойчивость к последним. Плазмиды, по-видимому, повсюду, так как их выделяют из разных штаммов и видов бактерий, но не являются обязательными компонентами генома, а в некоторых природных штаммах плазмиды не обнаружены вообще.

Поскольку плазмидная ДНК значительно меньше хромосомной, ее довольно легко выделить в чистом виде. В присутствии ионов кальция плазмиды легко поглощаются бактериями-реципиентами, даже если те их никогда не содержали, и в клетках бактериального потомства можно обнаружить много копий поглощенной плазмиды. Однако бактериальная клетка обычно может содержать в своем составе плазмиды одного типа. Это явление несовместимости плазмид. Существуют группы несовместимости – Inc-группы (от английского incompatibility – несовместимость). В такой группе может быть несколько плазмид, совместимых между собой, но не совместимых с другими плазмидами. У этих плазмид сходны многие признаки и часто значительна гомология ДНК.

Число копий плазмиды в клетке может существенно варьировать. Это зависит от генетических особенностей как клетки, так и плазмиды. Плазмиды, находящиеся "под ослабленным контролем", могут размножаться до тех пор, пока их количество не достигнет 10-200 копий на клетку. Если же плазмиды находятся "под строгим контролем", она реплицируется с той же скоростью, что и главная хромосома. Такие плазмиды содержатся в клетке в одной или в нескольких копиях. Естественно, что для клонирования рекомбинантных ДНК стараются использовать плазмиды первого типа. Но это не обязательно, так как плазмиды в присутствии хлорамфеникола могут умножаться независимо от деления хромосомы, и количество копий плазмиды может многократно увеличиваться.

Одна их наиболее часто употребляемых плазмид для клонирования pBR 322 создана на основе плазмид природного происхождения, выделенных из *E. coli*. Эта плаزمида содержит гены устойчивости к двум антибиотикам: ампициллину и тетрациклину, причем в генах устойчивости к этим антибиотикам имеются сайты рестрикции. Если фрагмент чужеродной ДНК встраивается в один из генов устойчивости, то последний инактивируется. Следовательно, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данно-

му антибиотику. Но при этом сохраняется устойчивость к другому антибиотику. Таким образом вектор дает возможность детектировать только те клоны бактерий, которые содержат рекомбинантную плазмиду.

Вирусы. Есть вирусы, которые не ведут к гибели клетки, но встраиваются в геном клетки-хозяина и размножаются вместе с ней, либо вызывают ее неконтролируемый рост, т.е. превращают в раковую. К таким относятся ДНК-вирусы SV-40 и вирус полиомы. Внедрение некоторых опухолевых РНК-вирусов ведет к отпочковыванию вирусных частиц от клетки без ее лизиса. К таким вирусам относятся, например, ретровирусы (вирус саркомы Рауса и СПИДа). Для бактериальных клеток в качестве вектора часто используют бактериофаги.

Вирусы являются одними из главных кандидатов на роль векторов для введения чужеродной ДНК. При вирусной инфекции каждая клетка может получить большое число копий чужеродного гена. ДНК можно встраивать так, чтобы она находилась под контролем сильных вирусных промоторов, что обеспечит высокий уровень экспрессии гена, и его продукты будут более доступны для исследования.

В последние годы сконструированы многочисленные "челночные" векторы и их рекомбинантные производные, способные к репликации в животной и бактериальной клетке и эффективно экспрессирующие клонируемый ген в животной клетке. Наиболее распространенные векторы состоят из плазмиды pBR322 и интактного раннего района транскрипции ДНК SV40, а нужный ген встраивается под контроль промотора поздних генов или дополнительного раннего промотора. Например, в ДНК SV40 был встроены ген β -глобина кролика, который экспрессировался в линии клеток обезьяны, зараженных рекомбинантным вирусом: в клетках синтезировались и мРНК гена глобина, и сам белок.

Вирус должен быть жизнеспособным после рекомбинирования его ДНК. Легче всего вирусы вводятся в бактерии. Недостатком вирусов как векторов является их небольшая емкость. Кроме того, вирусы заражают небольшой круг хозяев.

Существуют гибридные вектора, содержащие ДНК фага и плазмиды. К ним относятся, например, **космиды и фазмиды.**

Космиды – плазмидные вектора, в которые встроены участки генома фага λ , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Фаговые частицы обеспечивают хорошее проникновение гибридной ДНК в клетку (путем инъекции), после чего происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.

Фазмиды также являются гибридами между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды.

Вириоды. Из всех известных в настоящее время инфекционных агентов имеют ранг наиболее странных. Известно, что самые мелкие вирусы, способные к независимой репликации, имеют размеры генома, соответствующие молекулярной массе 1 М, то есть около 1500 тыс. пар оснований. Это считали минимальным количеством генетической информации, необходимой для кодирования вирусоспецифических продуктов и подавления метаболизма хозяйской клетки.

Однако в 1971 году были открыты инфекционные агенты, представляют собой очень короткую цепь 1 нитевой ковалентно связанной кольцевой РНК, состоящую из 270-300 нуклеотидов (на три порядка меньше самых минимальных вирусов), не заключенную в белковую оболочку. Это необычные патогены - самые простые и самые маленькие из всех известных.

Каким образом вириоды продуцируют симптомы болезни в инфицированных растениях, не известно до сих пор. Установлено, что они реплицируются ферментами клетки-хозяина, не транслируются в видоспецифичные полипептиды, интегрируются в геном клетки-хозяина.

Вириоды заражают персиситентно (не происходит выздоровления). Вызывают системную инфекцию, т.е. мигрируют из сайта внедрения в другие части растений, переносятся механически или через клеточный сок, через семена, пыльцу. Вириоды также связаны с ядерными фракциями растений и могут размножаться в ядрах.

При работе с вириодами получают 1-нитевую ДНК- копию РНК и достраивают комплементарную нить для получения 2-нитевой ДНК вириода. Такая 2-цепочечная ДНК встраивается в плазмиду и передается в клетки *E. coli* для клонирования. Считывание гена начинается с промотора, который узнается РНК-полимеразой, отвечающей за транскрипцию ДНК в матрицу РНК. Обычно это фрагмент ДНК из 41-44 пар оснований. Ген считывается слева направо, от 5' к 3' концу гена и заканчивается в терминальной области гена. За промотором начинается стартовый сайт транскрипции, за которым следует смысловая часть гена. Промоторная область гена содержит определенные короткие сочетания нуклеотидов, характерные для бактериальных генов, или для генов высших организмов. Такие сочетания служат сигналами для РНК-полимеразы, которая присоединяется к промоторной части гена и начинает его считывать.

Однонитевые и двунитевые ДНК способны инициировать репликацию вириода в механически инокулированных растениях табака. Энзиматически *in vitro* синтезированы также РНК вириодов, высокоинфекционные для растений. Векторные системы могут быть разработаны на основе самих РНК, на основе вириодоспецифичных ДНК, а также в комбинации вириодоспецифичных ДНК с *Ti*-плазмидами. Вириоды инфицируют своих хозяев в течение всего их жизненного цикла, поэтому в случае использования вириодных векторных систем можно ожидать постоянной экспрессии чужеродного гена в растении.

Плазмиды агробактерий

В качестве векторов могут использоваться опухолеобразующие плазмиды бактерий. Виды *Agrobacterium* эволюционно родственны клубеньковым бактериям, относящимся к роду *Rhizobium*, и имеют много общих с ними черт. Однако характер взаимодействия агробактерий с растением имеет своеобразные особенности.

Взаимодействие видов *Agrobacterium* с растениями представляет особый интерес, так как при этом виде паразитизма один из партнеров специфически видоизменяет свойства хозяина, встраивая свои гены в его геном. Кроме того, это служит уникальным примером миграции ДНК прокариот в эукариотическую клетку. ДНК митохондрий и хлоропластов Хлоропласты и митохондрии содержат полноценную генетическую систему, то есть все компоненты, необходимые для экспрессии генетической информации: ДНК, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы и белоксинтезирующий аппарат (рибосомы, т-РНК, аминоацил-т-РНК-синтетазы).

Хлоропластная и митохондриальная ДНК также привлекают внимание ученых в качестве возможных векторов для переноса генов в клетку. Структурная организация этих клеточных субгеномов существенно различается.

Хлоропласты и другие пластиды обладают одинаковой генетической информацией, так называемым пластомом. У высших растений он представляет собой замкнутую молекулу ДНК длиной 150 т. н. п., достаточную для кодирования примерно 100 белков. Для синтеза пластид необходимо значительно больше белков. Остальные белки кодируются ядром, синтезируются в цитоплазме и поступают в хлоропласты. Некоторые важнейшие белки хлоропластов состоят из нескольких субъединиц, часть из них синтезируется на рибосомах цитоплазмы и транспортируется в хлоропласт, где они объединяются с другими полипептидами, закодированными в самом хлоропласте и там же синтезируемыми. Таким образом, для биосинтеза функционально активного хлоропласта требуется согласованная экспрессия генома и пластома.

Различные типы пластид содержат неодинаковые количества идентичных копий пластома: от 10 – 20 копий в пластидах корней и зрелых хлоропластах до сотен копий в молодых хлоропластах картофеля. Такой уровень амплификации позволяет надеяться на надежную экспрессию чужеродной ДНК при использовании их в качестве векторов в генноинженерных экспериментах. Кроме того, гены рибосомальной РНК пластид и большой субъединицы РБФК кодируются геномом хлоропластов. Возможно, введение сильных промоторов в эти гены и дополнительная их модификация существенно повлияют на фотосинтетическую активность растительной ткани.

Гены растений также способны к экспрессии в клетках *E. coli*. Это гены большой субъединицы РБФК. Преимущество хлоропластных генов заключается в том, что их экспрессия в клетках кишечной палочки может быть достигнута путем простого объединения транскрибируемых последовательностей, т.к. в ДНК хлоропластов и бактерий до начала стартовых кодонов трансляции расположена одинаковая нуклеотидная последовательность. Это дает возможность синтезировать растительные экономически важные полипептиды с помощью клеток прокариот.

В отличие от хлоропластной, *ДНК митохондрий* характеризуются исключительным разнообразием и их величина колеблется от 200 до 2400 т. н. п.. Однако никакой корреляции между размером митохондриального генома и числом белковых продуктов, синтезируемых изолированными митохондриями, не наблюдается. Это явление, а также большие размеры митохондриальной ДНК, по-видимому, можно объяснить присутствием ДНК, бесполезной для функционирования митохондрий.

В составе митохондриальной ДНК имеются структурные гены, кодирующие полипептиды, гены рибосомных и транспортных РНК. Однако большая часть белков митохондрий, как и хлоропластов, кодируется ядерными генами. Но если геном хлоропластов представлен гомогенной популяцией крупных кольцевых молекул, то в митохондриях содержится несколько классов кольцевых молекул, не все функции которых еще ясны.

Митохондриальный геном животных организмов намного меньше, 15 – 19 т. н. п., и более консервативен по структуре. Гены митохондрий кодируют 2 группы признаков – работу дыхательных систем и устойчивость к антибиотикам и другим ядам. В митохондриальном геноме растений есть также гены, отвечающие за признак мужской стерильности цитоплазмы.

Транспозоны

Транспозоны - сегменты ДНК, которые контролируют собственную транспозицию (перемещение) из одного сайта ДНК в другой путем вырезания из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды. Впервые были открыты в 40-х годах американской ученой Барбарой Мак-Клинтон у кукурузы. Эти гены, идентифицированные по их способности подавлять экспрессию других генов кукурузы, находящихся рядом с ними, не имели фиксированного положения в хромосоме. Они как бы передвигались по всему геному растения. Регуляторные элементы могли встраиваться и выщепляться, причем после их выщепления зачастую начинали функционировать ранее молчащие гены.

Оказалось, что гены, ассоциированные с регуляторными элементами, становились нестабильными и часто мутировали из-за нестабильности самих этих элементов. В течение многих лет кукуруза оставалась единственной системой, в которой обнаруживались такие подвижные генетические элементы. Сейчас - и у бактерий, дрозофил и других организмов.

Механизм перемещения фрагментов ДНК по геному до конца не выяснен. ДНК переносится ферментом транспозазой. Фермент кодируется последовательность длиной около 20 нуклеотидов в середине транспозона. Он специфически взаимодействует с концевыми инвертированными повторами мобильного элемента и может вырезать его из хромосомы. Вырезание может происходить точно – с восстановлением исходной структуры участка ДНК, и неточно, то есть с делециями и вставками от одного до нескольких нуклеотидов. Это приводит к появлению стабильных мутаций и является одним из механизмов создания новых последовательностей ДНК.

Как правило, мобильные генетические элементы многократно повторены в геноме и образуют гетерогенные семейства, члены которых диспергированы по хромосомам. Большая часть членов каждого семейства являются дефектными копиями и не кодируют какой-либо функции, хотя сохраняют способность к перемещению. Поведение транспозонов можно расценить как паразитическое. Длина их от 2 до 10 тысяч нуклеотидных пар. У высших эукариот на долю транспозонов

приходится примерно 10% ДНК клетки. Большинство их перемещается изредка, но, так как их в клетке довольно много, транспозиция оказывает значительное влияние на разнообразие видов.

Биологический смысл перемещения отдельных сегментов ДНК:

- прерывание соответствующего гена, что ведет к эволюции;

- регуляция деятельности генов, так как транспозоны могут нести сигналы для начала считывания генов. В новых областях усиливают или запрещают работу гена.

Транспозоны также участвуют в *горизонтальном переносе генов*.

У бактерий были обнаружены 2 класса подвижных генов, различающихся по длине и сложности организации.

1. Инсерционные последовательности, или IS элементы, имеющие длину около тысячи пар нуклеотидов и содержащие только ген, отвечающий за их перемещение.

2. Транспозоны, длиной от 3 до 20 т. н. п., состоящие из ряда дополнительных генов, отвечающих за устойчивость бактерий к различным токсическим веществам.

Поскольку подвижные гены могут перемещаться в пределах генома с одного места на другое, то они могут быть весьма эффективными векторами для передачи рекомбинантной ДНК. Генетическая трансформация с помощью векторов на основе транспозонов была впервые осуществлена на дрозофиле. С помощью транспозуемого элемента Р дрозофиле был передан ген, обуславливающий коричневую окраску глаз. Перенос генов при помощи транспозонов имеет большие преимущества, так как он происходит с высокой частотой и не влечет значительных перестроек интегрируемой ДНК. Кроме того, этим методом можно переносить достаточно большие фрагменты ДНК.

Способы прямого введения генов в клетку

Прямое введение гена в клетку осуществляют несколькими способами:

Трансфекция

Микроинъекция

Электропорация

Метод «мини-клеток»

Упаковка в липосомы

Электронная пушка

При **трансфекции** ДНК адсорбируется на кристаллах фосфата кальция (Грэхем Ван дер Эб, 1973). Образуются частицы кальциевого преципитата. Они поглощаются клеткой путем фагоцитоза.

Для повышения эффективности трансформации к специфической ДНК, содержащей ген, по которому будет производится селекция, добавляется неспецифическая ДНК-носитель. Обычно для этой цели берут ДНК из тимуса теленка или спермы лосося. Часть ДНК связывается с мембраной и не попадает в клетки. ДНК акцептируют от 15 до 90% клеток. Через несколько суток после введения небольшая доля клеток способны экспрессировать чужеродные гены, но затем уровень экспрессии падает и более или менее стабильную трансформацию претерпевает 10^{-3} - 10^{-5} клеток.

Для трансфекции используется и ДЭАЭ-декстран, полимер, адсорбирующий ДНК. Эффект вхождения в клетки и время экспрессии высоки, но частота стабильной трансформации ниже, чем при использовании преципитата кальция. Частоту трансфекции увеличивает глицериновый шок (4 минуты в 15% растворе глицерина в HEPES-буфере).

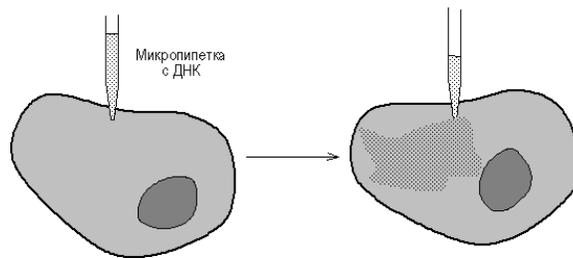
В клетки можно вводить любой ген, если заранее лигировать его с клонированным селективным маркером. Однако дальнейшие исследования показали, что лигирование вне клетки не обязательно. Клетки, поглощающие селективный ген, вместе с ним поглощают и другую ДНК, имеющуюся в кальциевом преципитате. Таким образом, пользуясь методом *ко-трансформации*, практически любой клонированный сегмент ДНК можно ввести в культивируемые клетки эукариот, если включить эту ДНК вместе с селективным маркером в состав смеси для образования кальциевого преципитата.

Для трансфекции можно использовать хромосомы или фрагменты хромосом. Клетки-доноры блокируются на стадии митоза. Митотические хромосомы высвобождаются под воздействием осмотического шока и гомогенизации. Их очищают путем дифференциального центрифугирования. Хромосомы осаждают на поверхности клеток хлористым кальцием, а через несколько часов обрабатывают реагентом, способным перфорировать мембраны (например, глицерином).

Для обработки клеток-реципиентов используются грубо очищенные препараты хромосом, так как хромосомы при этом разрушаются меньше всего. Количество хромосом для обработки 1 клетки ограничено. Лучше использовать не более 20 хромосом на 1 клетку-реципиент, так как при высоких концентрациях хромосом в суспензии они агглютинируют. Реципиентная клетка содержит фрагменты донорных хромосом, которые могут встраиваться в геном, могут реплицироваться самостоятельно. Во введенных фрагментах часто наблюдаются делеции.

Не все клетки способны к трансформации геномной ДНК с высокой частотой. Человеческие фибробласты эффективно включают плазмидную ДНК и почти не включают геномную.

Микроинъекция ДНК в клетки млекопитающих стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора. Так, плазмиды, содержащие фрагмент вируса герпеса с геном тимидинкиназы (ТК) и плазмиду rBR322, были инъецированы в ТК-клетки и было показано, что ТК-ген проник в ядра и нормально в них реплицировался. Метод введения ДНК с помощью микроинъекций был разработан в начале 70-х годов Андерсоном и Диакумакосом. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500-1000 клеток, причем в лучших экспериментах в 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия инъецированных генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.



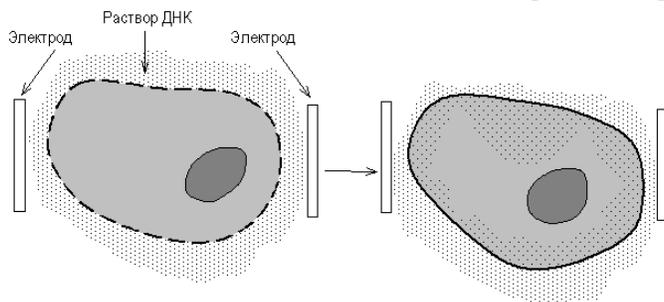
Введение ДНК путем микроинъекции

Электропорация основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют клетки и фрагменты ДНК, которые необходимо ввести в клетки (рис. 46). Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200 - 350 В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы, как ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается.

Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток.

Электропорация — физический, а не биохимический метод, и это, по-видимому, обуславливает его широкое применение. Многочисленные исследования продемонстрировали, что электропорация может успешно использоваться для введения молекул ДНК в разные типы клеток, такие как культивируемые клетки животных, простейшие, дрожжи, бактерии и протопласты растений. Электропорирующий эффект высоковольтного разряда на бислойную липидную мембрану, по-видимому, зависит от радиуса ее кривизны. Поэтому мелкие бактериальные клетки эффективно поглощают ДНК при значительно большей напряженности (10 кВ/см и более), чем крупные животные и растительные клетки, эффективно поглощающие ДНК при напряженности поля 1—2 кВ/см.

Электропорация — наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки. Однако до недавнего времени этот метод использовался в ограниченном числе лабораторий в связи с отсутствием серийных приборов — электропораторов. Появление и совершенствование таких приборов в ближайшие годы приведет к широкому применению данного подхода в генетической инженерии самых разных типов клеток.



Метод электропорации

«**Мини-клетки**» получают путем блокирования донорных клеток митозе коллемецидом. При продолжительной обработке клеток коллемецидом в них вокруг каждой хромосомы формируется новая ядерная мембрана. Обработка цитохалазином В и центрифугирование приводит к образованию мини-клеток, представляющих микроядра, инкапсулированные в цитоплазматическую мембрану.

Полученные мини-клетки очень чувствительны к разного рода воздействиям, поэтому для слияния подбирают специальные мягкие условия. Метод трудный, капризный, эффективность низкая — 10^{-6} — 10^{-7} .

Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз.

Липосомы - сферические оболочки, состоящие из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и липидов, либо обрабатывая ультразвуком водные эмульсии фосфолипидов. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина наиболее пригодны для введения ДНК в клетки животных и растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

Метод биологической баллистики (биолистики) является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов трансформации растений, особенно однодольных.

Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь биолистической пушки. Каллус или суспензия клеток наносится в чашку Петри с агаризированной средой и помещается под биолистическую пушку на расстоянии 10—15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с

огромной скоростью выбрасываются из биолиственной пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.

Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления вольфрамовых частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

С помощью биолиственной пушки были протрансформированы однодольные растения, такие, как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом были получены стабильные растения-трансформанты. Кроме успехов в получении трансгенных однодольных, биолиственная трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбрионную пыльцу и дальнейшего быстрого получения трансгенных дигиплоидных растений, которые являются важным этапом в селекционной работе. В настоящее время этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаплоидных растений получены стабильные трансформанты.

Ферменты генетической инженерии

Основные ферменты: рестриктазы, лигазы, полимеразы

Генетическая инженерия - потомок молекулярной генетики, но своим рождением обязана успехам генетической энзимологии и химии нуклеиновых кислот, так как инструментами молекулярного манипулирования являются ферменты. Если с клетками и клеточными органеллами мы подчас можем работать с микроманипуляторами, то никакие, даже самые мелкие хирургические инструменты не помогут при работе с макромолекулами ДНК и РНК. Что же делать? В роли "скальпеля", "ножниц" и "ниток для сшивания" выступают **ферменты**.

Только они могут найти определенные последовательности нуклеотидов, "разрезать" там молекулу или, наоборот, "заштопать" дырку в цепи ДНК. Эти ферменты издавна работают в клетке, выполняя работы по репликации (удвоению) ДНК при делении клетки, репарации повреждений (восстановлению целостности молекулы), в процессах считывания и переноса генетической информации из клетки в клетку или в пределах клетки. Задача генного инженера - подобрать фермент, который выполнит бы поставленные задачи, то есть смог бы работать с определенным участком нуклеиновой кислоты.

Следует отметить, что ферменты, применяемые в генной инженерии, лишены видовой специфичности, поэтому экспериментатор может сочетать в единое целое фрагменты ДНК любого происхождения в избранной им последовательности. Это позволяет генной инженерии преодолевать установленные природой видовые барьеры и осуществлять межвидовое скрещивание.

Ферменты, применяемые при конструировании рекомбинантных ДНК, можно разделить на несколько групп:

- ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы

Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы, эндонуклеазы рестрикции) - это ферменты, узнающие и атакующие определенные последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК (сайты рестрикции).

Еще в 1953 году было обнаружено, что ДНК определенного штамма *E. coli*, введенная в клетки другого штамма (например, ДНК штамма В - в клетки штамма С) не проявляет, как правило, генетической активности, так как быстро расщепляется на мелкие фрагменты.

В 1966 году было показано, что это явление связано со специфической модификацией хозяйской ДНК - она содержит несколько метилированных оснований, отсутствующих в немодифицированной ДНК, причем метилирование (добавление к основанию метильной группы) происходит уже после завершения репликации. Бактерия способна отличить свою собственную ДНК от любой вторгающейся «чужеродной» именно по типу ее модификации. За «метку» отвечают метилирующие ферменты модификации, так называемые ДНК-метилазы. Различие в модификации делает чужеродную ДНК чувствительной к действию рестрицирующих ферментов, которые узнают отсутствие метильных групп в соответствующих сайтах.

Системы рестрикции и модификации широко распространены у бактерий; их существование играет важную роль в защите резидентной ДНК от загрязнения последовательностями чужеродного происхождения.

Рестриктаза, которая расщепляла неметилированную ДНК была выделена в 1968 г. Мезельсоном и Юанем. Этот фермент был высокоспецифичен по отношению к определенной последовательности ДНК, но расщеплял молекулы неспецифически, в другом месте, на некотором удалении от участка узнавания. Вскоре, в 1970 г. Смит и Вилькоккс выделили из *Haemophilus influenzae* первую рестриктазу, которая расщепляла строго определенную последовательность ДНК (Hind III). Поскольку разные бактерии по-разному метят свою ДНК, то и рестриктазы должны узнавать разные последовательности. И действительно, с тех пор выделены рестриктазы, узнающие более 150 сайтов рестрикции (мест расщепления ДНК).

Полимеразы

Впервые ДНК-полимераза была выделена Корнбергом с сотрудниками в 1958 году из *E. coli*.

ДНК-полимераза I *E. coli* (Pol I) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК. Однако, если такие молекулы денатурировать и получить одноцепочечные формы, то с последними полимеразы связывается в количествах, пропорциональных длине этих участков — примерно одна молекула на 300 нуклеотидных остатков. Pol I связывается с одноцепочечными участками двойной спирали ДНК, в местах одноцепочечных разрывов с 3'-гидроксильной и 5'-фосфатом, а также с концами двухцепочечных молекул ДНК.

Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5' - 3' полимеразной, 3' - 5' экзонуклеазной, 5' - 3' экзонуклеазной.

1. 5'— 3' полимеразная активность. Для реакции необходимо наличие одноцепочечной ДНК-матрицы и комплементарного участку этой цепи фрагмента — праймера (затравки) с 3'-ОН концом.

2. 3'- 5' экзонуклеазная активность. Гидролизует одноцепочечную или двухцепочечную ДНК с 3'-ОН конца. 3'—5' нуклеаза расщепляет диэфирную связь только в неспаренных участках ДНК. Известно, что при полимеразной реакции с определенной частотой возможно включение в растущую цепь некомплемментарного нуклеотида. Однако полимеразы не может присоединять нуклеотид к неправильно спаренному концу, образовавшемуся при ее участии. На помощь приходит 3'—5' экзонуклеаза, убирающая ошибочный нуклеотид, на место которого затем присоединяется правильный нуклеотид-предшественник. 3'—5' экзонуклеолитическая активность проявляется в направлении, обратном синтезу ДНК. Таким образом, 3'—5' экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы играет важную роль в точности полимеризации, направляемой матрицей. Эффективность, или число оборотов, данной экзонуклеазы в оптимальных условиях составляет 2% от числа оборотов субъединицы с полимеразной активностью.

3. 5'— 3' экзонуклеазная активность. Деградирует одну цепь двухцепочечной ДНК, начиная со свободного 5'-конца. В отличие от 3'—5' экзонуклеазы 5'—3' экзонуклеаза расщепляет диэфирную связь только в спаренных участках двухцепочечной молекулы ДНК. Более того, в то время как 3'—5' нуклеаза отщепляет одномоментно только один нуклеотид, 5'—3' нуклеаза может вырезать с 5'- конца олигонуклеотиды длиной до десяти остатков (около 20% продуктов гидролиза): Скорость нуклеазного отщепления увеличивается на порядок при одновременно протекающей реакции полимеризации. При этом увеличивается относительное количество олигонуклеотидов в продуктах гидролиза ДНК.

Такое сочетание ферментативных активностей позволяет ДНК-полимеразе *E. coli* играть активную роль в репарации повреждений ДНК *in vivo*. N - концевой домен соединен с соседним петлей из аминокислотных остатков и легко отделяется с помощью протеолитических ферментов. Оставшаяся часть бифункциональна, так как состоит из полимеразы и 3' - 5' экзонуклеазы. Она названа фрагментом Кленова (по фамилии одного из авторов, описавших ее). Фрагмент Кленова (Pol IK) обычно используют для достройки одноцепочечных 5'-концов на двухцепочечной ДНК, часто генерируемых рестриктазами, до тупых; для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК, а также для гидролиза одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК.

Обратная транскриптаза

Обратная транскриптаза используется для транскрипции м-РНК в комплементарную цепь ДНК. При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития ретровирус проходит стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Темин выдвинул гипотезу о существовании вирусспецифического фермента, способного синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. Усилия, направленные на выделение такого фермента, увенчались успехом, и в 1970 г. Темин с Мизутани, а также независимо от них Балтимор открыли искомым фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название обратная транскриптаза, или ревертаза.

Наиболее детально изучена ревертаза ретровирусов птиц. Каждый вирион содержит около 50 молекул этого фермента. Обратная транскриптаза состоит из двух субъединиц — а (65 кДа) и b (95 кДа), присутствующих в эквимолярном количестве. Обратная транскриптаза обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК - ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Первые две активности необходимы для синтеза вирусной ДНК, а эндонуклеаза, по-видимому, важна для интеграции вирусной ДНК в геном клетки-хозяина. Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах. Чтобы начать синтез, ревертазе, как и другим полимеразам, необходим короткий двухцепочечный участок (праймер). Праймером может служить одноцепочечный сегмент как РНК, так и ДНК, которые в процессе реакции оказываются ковалентно связанными с новосинтезированной цепью ДНК.

Обратную транскриптазу преимущественно используют для транскрипции матричной РНК в комплементарную ДНК (кДНК). Реакцию обратной транскрипции проводят в специально подобранных условиях с использованием сильных ингибиторов РНКазной активности. При этом удается получать полноразмерные ДНК-копии целевых молекул РНК. В качестве праймера при обратной транскрипции поли (А)-содержащих мРНК используют олиго (dT), а для молекул РНК, не имеющих 3'-поли (А) концов, — химически синтезированные олигонуклеотиды, комплементарные 3'-концу изучаемой РНК. После синтеза на мРНК комплементарной цепи ДНК и разрушения РНК (обычно применяют обработку щелочью) осуществляют синтез второй цепи ДНК. При этом используют способность ревертазы образовывать на 3'-концах одноцепочечных кДНК самокомплемментарные шпильки, которые могут выполнять функции праймера.

Матрицей служит первая цепь кДНК. Данная реакция может катализироваться как ревертазой, так и ДНК-полимеразой *E. coli*. Показано, что сочетание этих двух ферментов позволяет повысить выход полноценных двухцепочечных молекул кДНК. По окончании синтеза первая и вторая цепи кДНК остаются ковалентно связанными петлей шпильки, служившей праймером при синтезе второй цепи. Эту петлю расщепляют эндонуклеазой S1, специфически разрушающей одноцепочечные участки нуклеиновых кислот. Образующиеся при этом концы не всегда оказываются тупыми, и для повы-

шения эффективности последующего клонирования их репарируют до тупых с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Полученную двухцепочечную кДНК можно затем встраивать в клонирующие векторы, размножить в составе гибридных молекул ДНК и использовать для дальнейших исследований.

Лигазы

В 1961 г. Мезельсон и Вейгл на примере фага I показали, что рекомбинация включает разрыв и последующее воссоединение молекул ДНК. Это положило начало поискам фермента, участвующего в сшивании фрагментов ДНК. В 1967 году такой фермент был найден и получил название ДНК-лигаза. Он катализирует синтез фосфодиэфирной связи в 2-х цепочечной молекуле нуклеиновой кислоты.

Иными словами, ДНК-лигазы сшивают рядом расположенные нуклеотиды, образуя связь между остатками сахаров. ДНК-лигазы абсолютно необходимы в процессах репарации ДНК, в процессах репликации - при удвоении цепи ДНК.

В генной инженерии используются 2 типа ДНК-лигаз, отличающихся по потребностям в кофакторах и способу действия. ДНК-лигаза *E. coli* в качестве кофактора использует дифосфопиридиннуклеотид, а лигаза фага T4 - АТФ в присутствии Mg^{2+} . Лигаза фага T4 более универсальна, так как помимо лигирования липких концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с тупыми концами. Она используется чаще.

Терминальная трансфераза, поли-А - полимераз

Терминальная трансфераза (концевая дезоксирибонуклеотидилтрансфераза) была обнаружена Боллумом в 1962 году в тимусе теленка.

Субстратом терминальной трансферазы при использовании в качестве кофактора ионов Mg^{2+} является одноцепочечная ДНК с 3'-ОН концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одноцепочечным 3'-ОН концом. Если в качестве кофактора используются Co^{2+} , этот фермент может катализировать присоединение дезоксирибонуклеотидов к 3'-ОН концу двухцепочечной ДНК с тупыми концами.

При введении в реакцию, направляемую терминальной трансферазой, лишь одного типа дезоксирибонуклеотидов образуются молекулы ДНК, имеющие гомополимерные 1-цепочечные 3'-концы. Таким же образом можно достроить другим молекулам ДНК гомополимерные 3'-концы, комплементарные первым. Смешение полученных препаратов ДНК при определенных условиях может приводить к формированию гибридных молекул ДНК.

Именно с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы в 1972 г. был выполнен первый эксперимент по рекомбинации молекул ДНК *in vitro*.

Поли (А) - полимераз *E. coli* была открыта Сиппелом в 1973 году. Она катализирует присоединение к 3'-ОН концу одноцепочечных молекул РНК поли (А) последовательностей. Применяется при подготовке молекул РНК к копированию с них комплементарной ДНК для введения радиоактивной метки в 3'-конец РНК.

Классификация рестрицирующих эндонуклеаз

Общепринято термины "рестриктаза", "эндонуклеаза рестрикции" и "сайт специфическая эндодезоксирибонуклеаза" считать синонимами.

Все рестрикционные эндонуклеазы бактерий узнают специфические, довольно короткие последовательности ДНК и связываются с ними. Этот процесс сопровождается разрезанием молекулы ДНК либо в самом сайте узнавания, либо в каком-то другом, что определяется типом фермента. Наряду с рестрикционной активностью бактериальный штамм обладает способностью метилировать ДНК; для этого процесса характерна такая же специфичность в отношении последовательностей ДНК, как и для рестрикции. Метилаза добавляет метильные группы к адениновым или цитозиновым остаткам в том же сайте, в котором связывается рестрикционный фермент. В результате метилирования сайт становится устойчивым к рестрикции. Следовательно, метилирование защищает ДНК от разрезания.

Различают 3 основных класса рестриктаз.

Все рестриктазы узнают на двуспиральной ДНК строго определенные последовательности, но рестриктазы 1-го класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, а рестриктазы 2-го и 3-го классов узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии.

Ферменты типов 1 и 3 имеют сложную субъединичную структуру и обладают двумя типами активностей - модифицирующей (метилирующей) и АТФ-зависимой эндонуклеазной.

Ферменты второго класса состоят из 2 отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы, поэтому в генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса 2, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары или группы называют изошизомерами. Различают истинную изошизомерию, когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрезают ДНК в одних и тех же точках, и ложную, когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта.

Большинство рестриктаз класса 2 узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупноцепящие. Мелкоцепящие рестриктазы узнают тетра- и пента-нуклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупноцепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов. Например, в ДНК бактериофага T7, состоящей из 40000 пар оснований, отсутствует последовательность, узнаваемая рестриктазой R1 из *E. coli*.

К мелкощепящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупнощепящим - Eco R I (из *Escherichia coli*) и Hind III. Если предположить, что участки узнавания рестриктаз распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов, узнающих последовательность (сайт) из четырех нуклеотидов, должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 пар оснований, а для ферментов, узнающих шесть нуклеотидов, - через 4096 пар оснований. Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК-рестриктазой приведет к его инактивации. Вероятность такого события очень велика при обработке мелкощепящими рестриктазами и незначительна при применении крупнощепящих эндонуклеаз. Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами, либо применяют прием "недорестрикции", т.е. рестрикцию проводят в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте.

Номенклатура и характеристика рестриктаз

В 1973 году Смит и Натанс предложили номенклатуру рестриктаз, включающую следующие пункты:

1. Аббревиатура названия каждого фермента является производной от бинарного названия микроорганизма, содержащего данную метилазно-рестриктазную систему. Составляют по правилу: к первой прописной букве названия рода добавляют две первые строчные буквы вида.

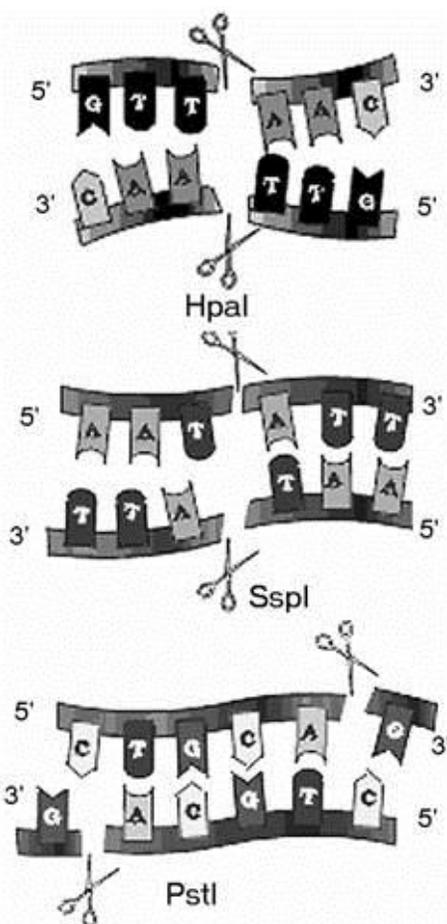
Streptomyces albus - **Sal**, *Escherichia coli* - **Eco**

2. В случае необходимости добавляют обозначение серотипа или штамма, например, Eco B.

3. Различные системы рестрикции - модификации, кодируемые одной бактериальной клеткой, обозначают римскими цифрами: Hind II, Hind I, Hind III (*Haemophilus influenzae*).

4. Рестриктазы обозначают буквой R (R Hind III), метилазы - M (M Hind III).

Открытие новых рестриктаз заставило Робертса в 1978 году внести дополнения в систему рациональных обозначений ферментов: если сокращенное название совпадает для нескольких ферментов, то 2 первые буквы аббревиатуры остаются неизменными, а третья берется из последующих букв видового названия: *Haemophilus parainfluenzae* - Hpa I, *Haemophilus parahaemolyticus* - Hph I.



Рестриктазы по-разному расщепляют ДНК (рис. 36).

Одни вносят разрывы по оси симметрии узнаваемой последовательности (Hpa I, Ssp I).

Другие - со сдвигом, со "ступенькой" (Pst I).

В первом случае образуются так называемые "тупые" концы, а во втором - "липкие", то есть фрагменты имеют на своих концах одонитевые взаимно комплементарные участки длиной в четыре нуклеотида. Такие фрагменты особенно удобны для создания рекомбинантных ДНК.

Механизм действия рестриктаз, системы метилирования ДНК

В качестве мишеней (мест узнавания) часто выступают палиндромы из 4-6 пар оснований - сайты рестрикции. Точки узнавания рестриктазами симметричны относительно поворота на 180°С, то есть последовательность нуклеотидов слева направо в одной нити такая же, как справа налево в другой. Симметрия подразумевает, что те из них, которые должны быть метилированы, встречаются на обеих цепях ДНК. В результате сайт-мишень может быть полностью метилирован (обе цепи модифицированы), полуметилирован (только одна цепь метилирована) или не метилирован.

Полностью метилированный сайт не подвержен ни рестрикции, ни модификации. Полуметилированный сайт не узнается ферментом рестрикции, но может быть превращен с помощью метилазы в полностью метилированный. У бактерий метилирование, как правило, связано с сохранением имеющегося состояния модификации. Репликация полностью метилированной ДНК ведет к образованию полуметилированной ДНК. Вероятно узнавание полуметилированных сайтов представляет собой обычный этап функционирования метилазы in vivo.

Неметилированный сайт-мишень представляет собой субстрат либо для рестрикции, либо для модификации in vitro. В клетке немодифицированная ДНК с большей вероятностью рестрицируется. Реакция разрезания осуществляется в две ступени. Сначала разрезается одна цепь ДНК, а затем рядом разрезается другая. В областях, прилегающих с каждой стороны к сайту разрезания, может иметь место экзонуклеотическая деградация. Происходит эффективный гидролиз АТФ, роль которого еще не выяснена.

Каким образом фермент узнает один сайт, а разрезает другой, достаточно удаленный? Важно отметить, что белок никогда не отделяется от молекулы ДНК, с которой он первоначально связался. Если фермент инкубировать со смесью модифицированной и немодифицированной ДНК, он предпочтительно разрезает немодифицированную ДНК. Следовательно, узнавая сайт связывания, белок не отделяется от неметилированной ДНК для того, чтобы найти сайт разрезания.

Существуют две альтернативные модели, объясняющие взаимосвязь между сайтами узнавания и разрезания: в соответствии с одной из них движется фермент, согласно другой модели, перемещается ДНК. Если движется фермент, то его

перемещение вдоль ДНК будет продолжаться до тех пор, пока он не сделает выбор сайта разрезания. Если же движется ДНК, то фермент остается прикрепленным в сайте узнавания, а ДНК протаскивается через второй сайт связывания на ферменте, и это продолжается до тех пор, пока фермент не достигает области разрезания (пока не охарактеризованной). Получены электронно-микроскопические данные, свидетельствующие, что фермент вызывает образование петли в ДНК и остается, по-видимому, связанным с сайтом узнавания после разрезания; эти данные подтверждают вторую модель.

Конструирование рекомбинантных ДНК

Под рекомбинантными понимают ДНК, образованные объединением *in vitro* (в пробирке) двух или более фрагментов ДНК, выделенных из различных биологических источников. Ключевыми в этом определении являются слова "фрагмент ДНК" и "объединение *in vitro*", что указывает на сущность генетической инженерии и ее отличие от всех остальных методов получения гибридных (или химерных) организмов, таких как генетическая селекция, эмбриональная инженерия и т.д.

Фрагменты ДНК, в том числе и фрагменты, содержащие гены, получают с использованием ферментов рестриктаз. Рестриктазы могут образовывать фрагменты как с тупыми, так и с липкими концами. Сшивка фрагментов ДНК производится тремя основными методами, зависящими от того, какие концы имеют фрагменты сшиваемых ДНК.

Сшивка по одноименным "липким" концам (рестриктазно лигазный метод). Этот метод является самым распространенным и популярным. Впервые этим способом гибридная ДНК была получена С. Коэном с сотрудниками в 1973 году. Некоторые рестриктазы, например Pst I, внося в цепи ДНК симметричные, расположенные наискось друг от друга разрывы на равных расстояниях от центра сайта узнавания и образующие "ступеньку". Эти комплементарные друг другу участки имеют тенденцию к ассоциации за счет спаривания оснований, и поэтому их называют комплементарными или липкими концами. Спаривание оснований происходит только между комплементарными последовательностями, поэтому ААТТ-концы, образуемые Eco RI, не будут спариваться, например, с АГЦТ-концами, образуемыми Hind III. Но любые два фрагмента (независимо от их происхождения), образовавшиеся под действием одной и той же рестриктазы, могут слипаться за счет образования водородных связей между одонитевыми участками комплементарных нуклеотидов.

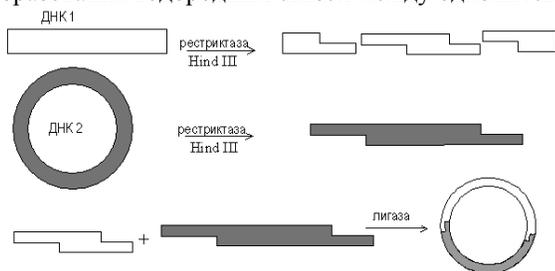


Схема рестриктазно - лигазного метода

Однако после такого спаривания полной целостности двойной спирали не восстановится, поскольку останется два разрыва в фосфодиэфирном остове. Для его восстановления, то есть сшивания, или лигирования нитей используют фермент ДНК-лигазу. Этот фермент в живой клетке выполняет ту же функцию - сшивание фрагментов ДНК, синтезирующихся при репликации.

Сшивка по "тупым" концам (коннекторный метод). Липкие концы не абсолютно необходимы для связывания фрагментов ДНК. Тупые концы также могут быть соединены за счет действия ДНК-лигазы, если и лигаза, и тупые концы присутствуют в реакционной смеси в высоких концентрациях. В этом случае реакция лигирования имеет свои особенности и ее эффективность ниже, чем при сшивке по липким концам. Впервые такие эксперименты были выполнены в 1972 году Полем Бергом в Стенфордском университете, США. Липкие концы также можно ферментативным путем присоединить к молекулам ДНК с тупыми концами. Для этого используют фермент - концевую трансферазу из тимуса теленка, которая присоединяет нуклеотиды к 3'-концам цепей ДНК. Если к 3'-концам одного из рекомбинируемых *in vitro* фрагментов ДНК с помощью концевой дезоксирибонуклеотидилтрансферазы достроить одноцепочечные олиго (dA)-сегменты определенной длины, а к концам другого фрагмента — олиго (dT)-сегменты примерно такой же длины, то при смешении полученных таким образом фрагментов происходит спаривание за счет образования водородных связей между олиго (dA)- и олиго (dT) - последовательностями (рис. 40). Для ковалентного соединения двух фрагментов используется ДНК-лигаза. Эти процедуры составляют основу для второго общего метода получения рекомбинантных молекул ДНК.



Пришивание «липких» концов и сшивка фрагментов ДНК

Поскольку можно формировать достаточно длинные взаимоклементарные одноцепочечные концы, гибридные молекулы образуются с высокой эффективностью. В частности, поэтому при клонировании ДНК-копий матричных РНК, которые доступны в ограниченных количествах, обычно используют коннекторный метод. При таком способе соединения между фрагментами встраиваются участки ААААА. Такие дополнительные последовательности ТТТТТ могут влиять на функции соединяемых молекул и поэтому всегда, когда только возможно, для получения рекомбинантных молекул ДНК пользуются липкими концами, образовавшимися в результате действия рестриктаз.

Сшивка фрагментов с разноименными липкими концами. В ситуации, когда необходимо сшить фрагменты, образованные разными эндонуклеазами рестрикции, и имеющие разные, то есть некомплементарные друг другу липкие концы, применяют так называемые линкеры (или "переходники"). Линкеры - это химически синтезированные олигонуклеотиды, представляющие собой сайты рестрикции или их комбинацию. Впервые эту идею предложил Шеллер с сотрудниками в 1977 году.

Существуют большие наборы таких генных "переходников". Естественно, что при использовании линкеров должна учитываться необходимость соблюдения правил экспрессии генетической информации. Часто в середину линкера помещают какой-либо регуляторный генетический элемент, например, промотор или участок, связанный с рибосомой. В этом случае линкеры обеспечивают не только объединение генов, но и обуславливают их экспрессию. Существуют линкеры "тупой конец - липкий конец".

При необходимости липкие концы можно превратить в тупые. Это достигается либо отщеплением липких концов с помощью фермента - эндонуклеазы S1, которая разрушает только одноцепочечную ДНК, либо липкие концы "защипывают", то есть с помощью ДНК-полимеразы I на однонитевых липких концах синтезируют вторую нить.

Определение нуклеотидной последовательности (секвенирование) ДНК

Описанные методы, позволившие идентифицировать генетически важные участки ДНК, имели большое значение сами по себе. Но они также проложили путь к разработке исключительно эффективных методов секвенирования ДНК и создания рекомбинантных молекул. Секвенирование позволяет довольно быстро определить полную нуклеотидную последовательность сегмента длиной 100 - 500 нуклеотидных пар, образующегося при расщеплении ДНК рестрикционными эндонуклеазами.

Метод Маскама и Гилберта (химический)

Один из методов основан на химической деградации ДНК. Он был предложен в 1976 году Максамом и Гилбертом и назван их именем. Суть метода сводится к следующему: один из концов фрагмента ДНК метят с помощью изотопа фосфора ^{32}P . В последнее время вместо радиоактивной вводят флюоресцирующую метку. Ее можно «цеплять» и к нуклеотидам, причем для каждого типа нуклеотидов подбирать различную окраску. Препарат меченой ДНК делят на четыре порции и каждую из них обрабатывают реагентом, специфически разрушающим одно или два из четырех оснований, причем условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую молекулу ДНК приходилось лишь несколько повреждений.

Разрушение идет в 2 этапа. На первом этапе происходит модификация азотистого основания и последующее выщепление его. На втором этапе производят гидролиз ДНК в местах выщепления оснований. Пуриновые основания модифицируются диметилсульфатом. Адениновые остатки метилируются по третьему атому азота, гуаниновые – по положению N7. Если такую модификацию обработать 0,1 М HCl при 0°C, то выщепляется метиладенин. При последующей инкубации в щелочной среде (0,1 М NaOH) при температуре +90°C происходит разрушение сахаро-фосфатной связи в местах выщепления оснований. Обработка поврежденных молекул пиперидином приводит к гидролизу ДНК по остаткам метилгуанина. Пиримидиновые основания модифицируются гидразином. В бессолевой среде модифицируется и цитозин, и тимин, в присутствии 2 М NaCl модифицируется только цитозин. При дальнейшей обработке пиперидином происходит расщепление ДНК по точкам модификации. Можно использовать и другие реакции химической модификации оснований и расщепления по ним молекул ДНК. В результате получается набор меченых фрагментов, длины которых определяются расстоянием от разрушенного основания до конца молекулы. Фрагменты, образовавшиеся во всех четырех реакциях, подвергают электрофорезу в четырех соседних дорожках; затем проводят радиоавтографию, и те фрагменты, которые содержат радиоактивную метку, оставляют "отпечатки" на рентгеновской пленке. По положению отпечатков можно определить, на каком расстоянии от меченого конца находилось разрушенное основание, а зная это основание - его положение. Так набор полос на рентгеновской пленке определяет нуклеотидную последовательность ДНК. Аналогично наблюдают флюоресцентное окрашивание. Если для каждого из четырех нуклеотидов был подобран свой цвет флюоресцентной метки, то при электрофорезе их наносят на 1 дорожку. Тогда расположение нуклеотидов отмечено штрихами разного цвета, а процедуру считывания легко автоматизировать.

Метод Сэнгера (ферментативный)

Другой метод, разработанный Сэнгером и носящий его имя, основан не на химическом, а на ферментативном подходе. Сэнгер использовал ДНК-полимеразу I. В клетке этот фермент участвует в процессе репликации, заполняя пробелы между вновь синтезированными фрагментами ДНК (фрагментами Оказаки). Для работы фермента в пробирке требуются предшественники ДНК - дезоксирибонуклеотидтрифосфаты (dNTP), а также одноцепочечная матрица, на которой должен быть небольшой двухцепочечный участок - затравка, с которого начинается синтез. Были также синтезированы модифицированные дидезоксирибонуклеотиды, в которых дезоксирибоза 3'-ОН отсутствует, для каждого из четырех оснований ДНК. ДНК-полимераза включает эти предшественники в ДНК. Однако, включившись в ДНК, модифицированное основание не может образовать фосфодиэфирную связь со следующим дезоксирибонуклеотидом. В результате рост (элонгация) данной цепи останавливается (терминируется) в том месте, где в ДНК включился дидезоксирибонуклеотид (ddNTP). Поэтому их называют терминаторами элонгации.

Реакционная смесь по Сэнгеру состоит из цепи ДНК, нуклеотидную последовательность которой надо определить, короткого фрагмента "меченой" ДНК, комплементарной концевому отрезку этой цепи (затравка), одного из четырех ddNTP и соответствующего dNTP в строго определенном соотношении (чтобы они конкурировали), а также остальных трех dNTP. Готовят четыре смеси, каждая из которых содержит один из четырех ddNTP. В каждой из пробирок образуется набор меченых фрагментов разной длины. Длина их зависит от того, в каком месте в цепь включен дефектный нуклеотид. Полученные

меченые фрагменты ДНК разделяют в полиакриламидном геле (с точностью до одного нуклеотида), проводят радиоавтографию и по картине распределения фрагментов в четырех пробах устанавливают нуклеотидную последовательность ДНК (рис. 41).

В настоящее время определение точной нуклеотидной последовательности любого сегмента ДНК умеренной длины - вполне разрешимая задача. Уже определена последовательность нескольких сотен генов про- и эукариот. Зная последовательность гена и генетический код, легко определить аминокислотную последовательность кодируемого им белка. Раньше для определения структуры белка приходилось делать тщательный и весьма трудоемкий анализ выделенного и очищенного белка. Сейчас часто бывает проще определить структуру белка через нуклеотидную последовательность, чем с помощью прямого секвенирования. Если секвенирование белка занимает месяцы и даже годы, то ДНК удается секвенировать за несколько недель.

Определение последовательности ДНК привело также к тому, что были обнаружены области, которые не кодируют белки, но принимают участие в регуляции экспрессии генов и репликации ДНК. В 1996 году был секвенирован геном дрожжей, в 1998 г. - геном арабидопсиса, в 2000 году - геном человека, однако в данном случае речь идет только об установлении последовательности нуклеотидов, так как генетическая структура и функции отдельных участков генома еще не идентифицированы, это более сложная задача.

Сразу вслед за разработкой быстрых методов секвенирования появились столь же быстрые и простые методы синтеза сравнительно длинных олигонуклеотидов с определенной, заранее заданной последовательностью. Теперь за три-четыре дня можно синтезировать последовательность из 12 - 20 нуклеотидов. Автоматизация этой процедуры еще более облегчает и ускоряет синтез. Появились приборы - ДНК-синтезаторы, которые выполняют эту работу за несколько часов.

Гибридизация как высокочувствительный метод выявления специфических последовательностей нуклеотидов

Если водный раствор ДНК нагреть до 100°C и повысить pH до 13, то ДНК диссоциирует на 2 цепи (денатурирует), так как комплементарные связи между основаниями разрушаются. В 1961 году было обнаружено, что этот процесс обратим: выдерживание ДНК при температуре 65°C вело к восстановлению структуры двойной спирали. Этот процесс называется ренатурация или гибридизация. Процессы гибридизации происходят между любыми одинарными цепями, если они комплементарны: ДНК - ДНК, РНК - РНК, ДНК - РНК.

Для теста необходимо иметь чистый одноцепочечный фрагмент ДНК, комплементарный той последовательности, которую хотим обнаружить. Этот фрагмент получают либо клонированием, либо путем химического синтеза. Одноцепочечная ДНК, используемая в качестве индикатора, называется ДНК-зонд. Она может содержать от 15 до 1000 нуклеотидов. ДНК-зонды применяются в различных целях. Гибридизация ДНК-зонда с РНК, выделенной из анализируемой клетки, может выявить наличие или отсутствие экспрессии гена. Если гибридизации не происходит, значит ген молчит, не работает. ДНК-зонды также позволяют проводить диагностику наследственных болезней.

В большинстве случаев мутации, ведущие к наследственным болезням, рецессивны, то есть болезнь развивается, если человек получает дефектные гены от обоих родителей. Аномальные эмбрионы лучше выявлять до рождения. Например, для серповидноклеточной анемии в мутантном гене, кодирующем бета-цепь гемоглобина, последовательность ГАГ заменена на ГТГ. В этом случае синтезируют олигонуклеотид длиной около 20 оснований, метят радиоактивной меткой. Из эмбриональных клеток, содержащихся в амниотической жидкости, выделяют ДНК и используют ее для гибридизации. Если эмбрион дефектен, то тест будет положительным.

Анализ проводят по следующей схеме (рис. 42): исследуемую ДНК гидролизуют рестриктазами, фракционируют электрофорезом, переносят разделенные фрагменты на нитроцеллюлозный фильтр и проводят реакцию гибридизации с мечеными олигонуклеотидами. Этот метод был разработан Саузерном в 1975 году. В отечественной литературе его принято называть «южный блоттинг». «Блоттинг» - в переводе с английского означает «промокашка», «саузерн» - «южный», в данном случае игра слов: фамилия ученого переводится как географическое направление.

Молекулы ДНК разгоняют в агарозном геле электрофорезом. ДНК в геле денатурируют щелочью. Щелочь нейтрализуют и пластину геля покрывают листом нитроцеллюлозы. Сверху на нитроцеллюлозу помещают стопку листов фильтровальной бумаги, обеспечивая медленный ток буферного раствора через гель в направлении, перпендикулярном направлению электрофореза. ДНК диффундирует из геля и связывается с нитроцеллюлозным фильтром. После прогревания фильтра при 80°C в вакууме ДНК необратимо связывается с нитроцеллюлозой. Расположение полос иммобилизованной ДНК точно соответствует их расположению в геле.

ДНК, связанную с нитроцеллюлозным фильтром, можно гибридизовать с радиоактивно меченой ДНК. Блоттинг по Саузерну является исключительно полезным также и для локализации изучаемых генов в определенных фрагментах, полученных в результате гидролиза различными рестриктазами гибридных молекул ДНК.

Аналогичным методом на нитроцеллюлозу переносят молекулы РНК (Северный блоттинг) и белка (Западный блоттинг). Из частей света осталась свободной только западная, хотя вакантными остались 2 класса макромолекул - углеводы и липиды.

Одним из наиболее точных и современных методов анализа является использование чипов. Они представляют собой пластинки с иммобилизованными мечеными ДНК-зондами. Каждая такая пластинка может содержать несколько десятков тысяч зондов, расположенных в определенной последовательности. Метка проявляется только в спаренных двухцепочечных фрагментах. Если в исследуемом образце есть последовательности, комплементарные последовательностям зон-

да, то гибридизацию можно определить визуально или с помощью специальных приборов. Как правило, детекторы соединены с компьютером, то есть процедура считывания и обработки информации автоматизирована.

Такие ДНК-чипы можно применять для комплексной диагностики инфекционных заболеваний, наследственных дефектов, установления экспрессии тех или иных генов (в этом случае идет гибридизация с мРНК), то есть отслеживания нарушений обмена веществ. Они дешевы, очень надежны, просты в обращении и могут многократно использоваться. Недостаток – дорогая аппаратура для детекции

Тема 4

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Индукция и репрессия синтеза ферментов

В соответствии со своей специализацией любая клетка (микробная, растительная, животная) поддерживает гомеостаз и совершает свой цикл развития, обслуживая те или иные потребности многоклеточного организма. Биотехнолог, преследуя задачу максимальной наработки целевого продукта, воздействует на эти процессы в соответствии с интересами производства. Современное биотехнологическое производство лекарственных средств наряду с совершенствованием производителя требует и постоянной оптимизации условий самого процесса ферментации.

Известно, что микробная клетка как продуцент лекарственных веществ содержит несколько тысяч ферментов и часто используется как основа создания продуцентов-рекомбинантов.

Значительную часть ферментов микробной клетки составляют конститутивные ферменты, которые всегда присутствуют в ней в строго определенной концентрации, характерной для каждого отдельного фермента, например фермента гликолиза. Однако эволюция жизни на Земле и необходимость приспособления организмов (микроорганизмов) к разнообразным и часто меняющимся условиям внешней среды привели к возникновению так называемых адаптивных или индуцибельных ферментов. Гены, кодирующие такого рода ферментные белки, экспрессируются лишь, когда в среде появляется относительно редкий субстрат, который может быть использован как источник энергии. Индуцибельные ферменты довольно часто образуются в клетке при появлении в среде антимикробных веществ, структура которых может подвергаться ферментативной инактивации.

Индукция фермента — резкое увеличение скорости его синтеза (в миллионы раз за несколько секунд) в ответ на появление индуктора.

Схематически механизм индукции может быть представлен, исходя из предложенной в 1960-х гг. Ф. Жакобом и Ж. Моно концепции регуляции индукции и репрессии синтеза ферментов (рис.). Одновременно авторами концепции была разработана и «модель оперона», в соответствии с которой в систему регуляции синтеза ферментов на генетическом уровне входит несколько компонентов.

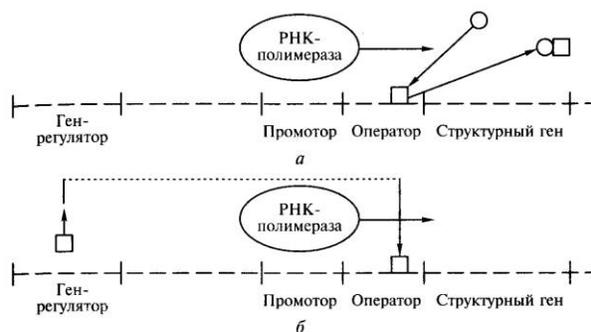


Рис. Схема индукции (а) и репрессии (б) фермента

Первым следует назвать структурный ген, кодирующий структуру ферментного белка; иногда это могут быть несколько последовательно расположенных структурных генов, которые кодируют участвующие в общем метаболическом процессе ферменты.

В опероне структурному гену предшествует участок ДНК, именуемый оператором, который контролирует работу структурных генов. Именно с этим участком связывается белок-репрессор, структуру которого определяет ген-регулятор, который локализован вне оперона и может находиться даже в другой хромосоме, например, если это — клетка эукариота. Принципиально важно, что оператор располагается между участком, именуемым промотором и структурным геном. Молекула РНК-полимеразы «садится» на промоторный участок, чтобы затем двигаться по структурному гену, транскрибируя его последовательность в информационную РНК. Последняя служит в рибосомной системе матрицей для конкретного белка.

Если на операторном участке находится белок-репрессор, движение РНК-полимеразы тормозится и структурный ген (или последовательно расположенные структурные гены) не считывается. Возникает явление репрессии.

Для того чтобы репрессия сменилась индукцией, белок-репрессор должен быть убран с операторного участка. Тогда РНК-полимераза получает возможность двигаться с промотора через этот участок, а затем — по структурному гену (или нескольким структурным генам).

Удаление репрессора осуществляется инактивацией репрессора индуктором. Вместе с тем индукцию можно рассматривать и как предотвращение связывания репрессора с оператором.

В целом механизмы индукции и репрессии синтеза ферментов сложны и разнообразны. Важно, что использование механизмов индукции и репрессии синтеза ферментов помогает биотехнологам в решении самых разных задач, например, позволяет поддерживать оптимальный уровень ферментных систем клетки, включенных в биосинтез целевого продукта и корректировать его в течение всего цикла ферментации.

Представляет интерес конструирование продуцентов-рекомбинантов, активность которых повышается за счет использования явления индукции. Например, в геноме микроорганизма — кишечной палочки создается оперон с общим промотором и операторным участком для двух структурных генов: гена индуцибельной бетагалактозидазы и расположенного за ним гена цепи А или цепи В человеческого инсулина. Продуцент-рекомбинант культивируется на ферментационной среде с лактозой, утилизация которой требует быстрого синтеза бетагалактозидазы. Образующаяся (быстро и в большом количестве) аминокислотная последовательность вначале соответствует бетагалактозидазе, а затем цепи А (или В) инсулина. После выделения этого гибридного белка фрагмент инсулина отделяют от фермента и используют для построения полной молекулы гормона.

Ретроингибирование и преодоление этого явления

Метаболические пути, ведущие к синтезу в клетке низкомолекулярных соединений — как первичных, так и вторичных метаболитов, включают, как правило, по несколько ферментов, участвующих в сборке углеродного скелета метаболита.

Перечень метаболитов и их соотношение во внутриклеточном фонде строго сбалансированы, но в случае изменения условий культивирования клетки эти параметры будут меняться на разных циклах развития клетки. Все это соответствует интересам клетки, но не всегда совпадает с интересами и целями биотехнолога, в соответствии с которыми необходимо добиться максимального синтеза конкретного метаболита. Иногда этот метаболит является целевым продуктом, иногда — его предшественником. Чтобы добиться поставленной цели, следует преодолеть тот механизм внутриклеточной регуляции, который препятствует работе продуцента в интересах биотехнолога. Таким выработанным эволюцией механизмом является ретроингибирование, т.е. подавление конечным продуктом активности первого фермента метаболического процесса.

Анализируя явление ретроингибирования, можно сказать, что эволюция привела к логическому решению жизненно необходимой для клетки задачи. Например, как только концентрация конечного метаболита становится достаточной для удовлетворения нужд клетки, метаболит начинает отрицательно влиять на свой собственный биосинтез. В результате подавляется активность первого фермента, что влечет прекращение образования не только метаболита, но и всех его промежуточных предшественников.

Таким образом, этот механизм регуляции срабатывает очень четко: если клетке в данный момент конечный метаболит не нужен, то не нужны и его предшественники. Поскольку конечный метаболит уже прекратил свое образование, но продолжает расходоваться, естественно, что концентрация его в клетке понижается. Как только она достигает соответствующего нижнего предела, синтез метаболита быстро начинается вновь из-за того, что метаболит как ингибитор своего биосинтеза взаимодействует (за счет водородных связей) с аллостерическим центром начального фермента метаболической цепочки. Поэтому фермент сохраняет потенциальную способность вновь быстро перейти в активное состояние, что и происходит после освобождения аллостерического центра от ингибитора, вследствие понижения его концентрации.

Биотехнолог может преодолеть механизм ретроингибирования и заставить клетку непрерывно нарабатывать метаболит. Во-первых, можно непрерывно удалять образующийся метаболит из питательной среды и таким образом снижать его внутриклеточную концентрацию. Это достигается внесением в среду сорбента: в результате концентрация растворенного метаболита (целевого продукта) снижается, и механизм ретроингибирования не включается. Во-вторых, можно использовать генно-инженерные методы — сконструировать продуцент с мутацией в аллостерическом центре начального фермента метаболической цепочки. При этом изменения в конформации аллостерического центра должны не меняться под действием ингибитора. В этом случае ретроингибирование уже не будет ограничивать синтез данного метаболита. В-третьих, необходим специальный контроль за составом сред, используемых при ферментации. В них должно быть ограничено количество метаболита (целевого продукта), что предотвратит возможность его отрицательного влияния на собственный биосинтез в клетках продуцента.

Весьма иллюстративен пример неудачи при биосинтезе пенициллина (продуцент *Penicillium chrysogenum*) на комплексной, богатой лизином среде, используемой в качестве добавки к некоторым дешевым и недефицитным комплексным средам. Лизин является первичным метаболитом, пенициллин — вторичным. Одним из предшественников лизина является аминокислота, входящая в состав так называемого LLD-трипептида, из которого в результате ряда последующих реакций формируется молекула пенициллина. Поэтому лизин, подавляя собственный биосинтез по механизму ретроингибирования, одновременно подавляет и биосинтез аминокислоты, а, следовательно, и пенициллина (рис.). Таким образом, для биотехнологов, работающих в антибиотической промышленности, возникает актуальная задача по подбору сред с ограниченным количеством лизина или создания производственных штаммов *Penicillium chrysogenum* с нарушенным механизмом ретроингибирования по лизину.

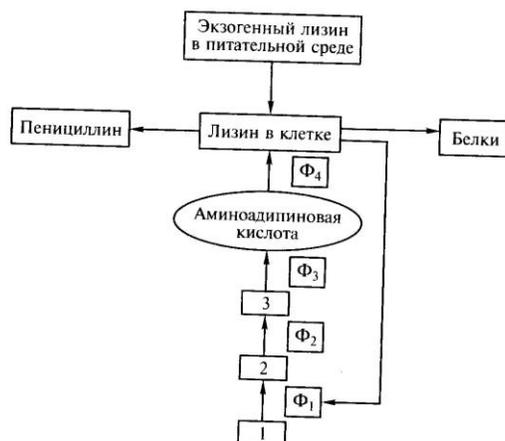


Рис. Схема подавления лизином образования пенициллина: Φ_1 — начальный фермент метаболической цепочки; Φ_2 , Φ_3 , Φ_4 — ферменты, включенные в метаболическую цепочку; 1, 2, 3 — предшественники аминокадипиновой кислоты

Строгий аминокислотный контроль метаболизма микроорганизмов и его значение при получении лекарственных средств

С одной стороны, структура многих лекарственных препаратов включает модификации отдельных аминокислот. С другой стороны, эти препараты можно рассматривать как производные пуринов и пиримидинов, т.е. азотистых оснований нуклеиновых кислот.

Все чаще в биотехнологическом производстве используются сконструированные методами генетической инженерии микроорганизмы — рекомбинанты, продуцирующие видоспецифические для человека белки, играющие роль биорегуляторов, факторов неспецифического иммунитета и т.д.

Поэтому при биосинтезе вышеперечисленных лекарственных препаратов биотехнологу приходится учитывать явление так называемого строгого аминокислотного контроля метаболизма клетки и уметь использовать его в своих целях.

Строгий аминокислотный контроль метаболизма клетки позволяет ей быстро приспосабливаться к меняющимся внешним условиям: или выживать, или не только выживать, но и быстро размножаться (накапливать биомассу культуры). Строгий аминокислотный контроль осуществляется с участием рибосомы, но уже не как «машины» для синтеза белка, а как своеобразной «сенсорной органеллы» и многофункционального биорегулятора гуанозин-тетрафосфата, играющего здесь ключевую роль. В молекуле этого, образно говоря, «перифосфорилированного» гуанозина два гидроксильных в рибозе: 5-ОН и 3-ОН замещены дифосфатными остатками.

Гуанозин-тетрафосфат выполняет принципиальную роль при переключении метаболизма клетки, переносимой, например, с бедной питательной среды на богатую, и наоборот.

Перенос клеток с бедной среды на богатую обеспечивает быстрый рост культуры и быстрое накопление ее биомассы, а перенос клеток с богатой среды на бедную приводит к условиям, когда не может поддерживаться ни быстрое размножение культуры, ни накопление биомассы. На биохимическом уровне при замене бедной среды богатой в клетках уже за несколько минут резко усиливается синтез рибосомальной РНК, формируются рибосомы и после этого возрастает суммарный синтез белка. Растет биомасса, начинается быстрое деление клеток. С биологической точки зрения это целесообразно, так как соблюдается нормальный баланс макромолекул.

При переносе клеток с богатой среды на бедную сразу же резко сокращается синтез РНК. Прекращается образование рибосом, а затем и синтез белка. Клетка как бы «застывает» в покоящемся, но при этом жизнеспособном состоянии и относительно благополучно переносит условия голодания: баланс макромолекул сохраняется на таком уровне, при котором хаотических нарушений метаболизма не происходит. Это обеспечивается именно за счет механизма строгого аминокислотного контроля. На бедной среде в рибосомно-матричную систему поступают молекулы не аминокислот-ацил тРНК, а «пустые» или не загруженные молекулы тРНК, поскольку среда бедная и аминокислот во внутриклеточном фонде клетки начинает не хватать. «Пустые» молекулы тРНК реагируют с акцепторным местом, однако синтеза полипептидной цепи не происходит, и синтез белка прерывается.

У нормальных клеток (имеющих ген *rel A*), происходит превращение рибосомы в сенсорную органеллу, т.е. активируется ассоциированный с рибосомой белковый (продукт гена *rel A*) фактор строгого «контроля», который является пирофосфат-трансферазой.

Как отмечалось, гуанозин-тетрафосфат может функционировать как биорегулятор. Установлено, что он связывается с РНК-полимеразой и при этом, что принципиально важно, по-разному изменяет ее сродство к промоторам различных генов. Экспрессия одних генов усиливается, других — подавляется. Подавляются гены, включенные в синтез рибосомной РНК, и как следствие — резко падает количество РНК в клетке на бедной среде, а затем и количество белков. Наряду с «негативным» гуанозин-тетрафосфат способен и к «позитивному» контролю, в рамках которого активируются, в частности, триптофановый, гистидиновый, треониновый опероны: клетки под влиянием голодания по аминокислотам, используя гуанозин-тетрафосфат, мобилизуют свои возможности синтеза аминокислот. Биотехнолог обязательно должен учитывать это

обстоятельство при получении лекарственных агентов на основе аминокислот.

Помимо падения синтеза РНК под влиянием гуанозин-тетра-фосфата подавляется активность некоторых ферментов, участвующих в синтезе нуклеотидов, а также в транспорте нуклеотидов в клетку. При этом в клетке не только не образуется рибосомальная РНК, но уменьшается и содержание ее предшественников. Иначе говоря, происходит координированное многостороннее изменение клеточного метаболизма, которое имеет приспособительный характер. Поэтому роль гуанозин-тетрафосфата в нормальных клетках, которые биотехнолог стремится сделать сверхпродуцентами аминокислот, становится еще более «позитивной».

Если целью биотехнолога является наработка нуклеотидов (пуринов и пиримидинов), производными которых являются многие лекарственные агенты, например, противоопухолевые антибиотики, то роль гуанозин-тетрафосфата должна рассматриваться в целом как негативная. В данном случае одним из подходов к решению этого вопроса может быть получение ЯеГ-клеток продуцента с уменьшенным количеством фактора строгого аминокислотного контроля или полным его отсутствием.

При конструировании микробных продуцентов чужеродного белка также необходимо учитывать роль гуанозин-тетрафосфата. Целевой белок должен быть стабилен и не подвергаться в клетке действию протеолитических ферментов, активность которых должна быть ограничена. Если же целевым продуктом является цик-лопептид и тем более если часть его аминокислотных остатков находится в D-форме, как, например, у широко известного им-мунодепрессанта циклоспорина А, опасность внутриклеточного протеолитического расщепления резко падает и в этом случае большое значение будет иметь «позитивный» эффект гуанозин-тетрафосфата — активация оперонов некоторых аминокислот.

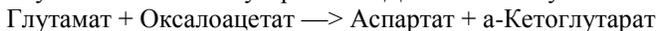
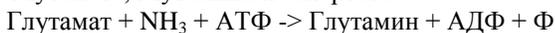
Естественно, чтобы использовать механизмы внутриклеточной регуляции для производственных целей, необходимо знать их действие на генетическом, биохимическом и физиологическом уровнях. Необходимо также знание видовых особенностей продуцента и особенностей его штамма. Но даже при наличии последних прогнозировать конечный результат при вмешательстве в регуляционные процессы, учитывая их многочисленность и взаимозависимость, очень и очень сложно. Поэтому, несмотря на быстрые успехи фундаментальных наук, подбор сред и условий ферментации все еще нередко носит эмпирический характер.

Регуляция усвоения азотсодержащих соединений

Известно, что в земной атмосфере количественно явно доминирует азот, однако эволюция жизни на нашей планете не пошла по прямому усвоению его клетками млекопитающих, растений и большинства микроорганизмов. Азот воздуха могут использовать только клубеньковые бактерии, развивающиеся в ризосфере бобовых растений, и некоторые свободно живущие азотфиксаторы, что, в свою очередь, обуславливает появление в почве аммонийных солей и оксидов азота.

Многие микроорганизмы усваивают органические соединения азота, однако из широкого многообразия таких соединений наиболее легко и быстро микроорганизмами усваиваются хлорид и сульфат аммония.

Центральными при синтезе азотсодержащих веществ являются реакции метаболизма с участием доноров аминокислот: глутамата, глутамина и аспартата:



где Ф — фосфор неорганический.

На примере глутаминсинтетазы — важнейшего начального фермента азотного метаболизма, катализирующего переход аммиака в амидную группу (первая реакция), можно показать всю сложность регуляторных взаимодействий в сильно разветвленном метаболическом пути. Амидная группа глутамина является источником азота при биосинтезе соединений: двух ароматических аминокислот — триптофана и гистидина, а также АМФ, ЦТФ, глюкозамина-6-фосфата и карбамилфосфата. В опытах на клетках микроорганизма *E. coli* показано, что любой из конечных метаболитов, находясь в насыщающей концентрации (имеются в виду потребности микроорганизма), может действовать по принципу ретроингибирования. Однако, вызываемое при этом ингибирование неполно. Вместе с тем при росте числа метаболитов (в насыщающей концентрации) проявляется аддитивность, т.е. ингибирование фермента усиливается почти до полного исчезновения его активности, что получило название кумулятивного ретроингибирования. Также установлено, что все метаболиты-ингибиторы глутаминсинтетазы связываются с ферментом в своем определенном месте. Таким образом, при связывании они не мешают один другому, что имеет принципиальное значение для регуляции активности глутаминсинтетазы.

Однако существует и другой механизм регуляции этого сложного, состоящего из 12 субъединиц (молекулярная масса 12 кДа у каждой), фермента. С одной стороны, если культура микроорганизма оказывается в среде крайне бедной источниками углерода и энергии, но с избытком ионов аммония и глутамина, то активность глутаминсинтетазы резко снижается за счет более радикального механизма. Каждая из 12 субъединиц аденилируется, ковалентно связывая по одному остатку АМФ. Активность фермента практически полностью исчезает, что благоприятно для выживания микроорганизма. С другой стороны, при переносе микроорганизма на среду, обедненную легко усваиваемым источником азота, глутаминсинтетаза деаденилируется и «мобилизует» свою активность.

У некоторых микроорганизмов система регуляции глутаминсинтетазы усложняется за счет того, что этот фермент существует в двух изоформах: в случае одной изоформы в систему регуляции включаются аденилирование — деаденилирование, в случае другой — обратимая избытком аммиака инактивация.

Наряду с перечисленными механизмами регуляции активности глутаминсинтетазы существует также еще один механизм внутриклеточной регуляции, позволяющий некоторым микроорганизмам бороться с недостатком азота в питатель-

ной среде за счет усиления экспрессии гена глутаминсинтетазы.

Ферменты, участвующие в усвоении азотсодержащих соединений, в большинстве случаев индуцибельны и подвержены закономерностям азотной репрессии, которая проявляется после превращения этих соединений в глутамин. При синтезе глицина и аланина α -аминогруппа глутамина реализуется с участием транс-аминаз. При этом степень обеспеченности клетки азотом определяется соотношением глутамина с ос-кетоглутаратом. Также на разных клетках эукариот было показано, что дефицит источников углерода и энергии в питательной среде ведет к заметной протео-литической деградации ферментов, включенных в использование азотсодержащих соединений.

Регуляция усвоения азотсодержащих соединений у эукариот, прежде всего грибов, включая дрожжи, имеет много общего с прокариотами, хотя есть и отличия. Например, для грибов предпочтительнее использовать в качестве источника азота соли аммония и глутамин.

В задачи биотехнолога входит интенсификация реакций биосинтеза глутамина, глутамата и аспартата, что достигается генетическими методами или подбором питательных сред. При получении ряда первичных метаболитов, предшественниками которых и являются указанные вещества, интенсификация этих реакций благоприятно сказывается на производственных процессах. Известно, что первичные метаболиты составляют основу разнообразных классов лекарственных агентов. Вместе с тем, так как вторичные метаболиты, как правило, являются модификацией первичных, интенсификация биосинтеза последних положительно сказывается и на биосинтезе вторичных метаболитов, например, многих антибиотиков, особенно тех, в структуру которых входят пептиды.

Катаболическая репрессия в создании и производстве лекарственных средств

Быстро усваиваемые источники углерода и энергии (прежде всего глюкоза) вызывают значительное и быстрое накопление биомассы у микроорганизмов. Однако биосинтез многих целевых продуктов биотехнологического производства, таких как вторичные метаболиты и ряд ферментов, при этом резко снижается. Явление, вначале называвшееся «глюкозным эффектом», в дальнейшем получило название катаболической репрессии.

Применительно к этому явлению введено понятие транзиторной репрессии, когда при внесении глюкозы в микробную культуру, растущую на источнике углерода и энергии, который ассимилируется медленнее глюкозы, происходит временное, но резкое подавление синтеза соответствующего катаболического фермента. Позднее, поскольку в среде присутствует глюкоза, фермент снова начинает синтезироваться, но с невысокой скоростью.

Другое понятие, которым оперируют применительно к катаболической репрессии, — исключение индуктора. Глюкоза предотвращает поступление индуктора (менее эффективно используемого субстрата) в клетку. Еще одно понятие — катаболическое ингибирование, которое относится к подавлению активности ряда ферментов продуктами быстрого катаболизма глюкозы.

Установлено, что катаболическая репрессия наступает в результате быстрого снижения в клетках содержания циклического 3,5-аденозинмонофосфата (цАМФ) под влиянием внесения глюкозы в среду. И, наоборот, при удалении глюкозы из среды количество цАМФ в клетках увеличивается. Поскольку образование цАМФ из АТФ катализируется ферментом аденилатциклазой, поэтому для того чтобы изменить активность этого фермента, необходимо получить мутации в гене, кодирующем данный фермент.

Катаболическая репрессия — неблагоприятное явление, с которым приходится считаться биотехнологам, работающим в антибиотической промышленности, при получении методом микробиологического синтеза ферментов медицинского назначения, некоторых рекомбинантных белков. Несмотря на обилие накопленных фактов, связь катаболической репрессии со многими метаболическими процессами, в частности, транспортом углеводов в клетку и экскрецией их из клетки, до конца не изучена. Поэтому помимо подбора сред с ограниченным содержанием глюкозы много внимания уделяется работе с продуцентами, когда, используя методы мутагенеза, селекции и генетической инженерии, получают мутанты, нечувствительные к катаболической репрессии.

Транспорт веществ через мембранные структуры клетки и его регуляция

Наиболее общим компонентом клеточной оболочки, присущим клеткам микроорганизмов, растений и животных, является цитоплазматическая мембрана — двухслойная фосфолипидная субклеточная структура с включенными в нее разнообразными по функциям белками. У микроорганизмов (как и у растений) над цитоплазматической мембраной клетки располагается клеточная стенка, представляющая жесткий полимер, состоящий у высших растений из целлюлозы, у эубактерий и актиномицетов из пептидогликана, а у грибов из слоев хитина, глюкана и маннопротеина (т. е. из разных полимеров).

У грамотрицательных бактерий помимо цитоплазматической мембраны имеется и другая мембрана, называемая внешней, так как она располагается над клеточной стенкой. Внешняя мембрана имеет иную структуру, чем цитоплазматическая, которую в случае наличия внешней мембраны называют внутренней. Внешняя мембрана асимметрична, ее наружная поверхность, обращенная в среду, состоит в основном из липополисахаридов, молекулы которых координируются ионами магния; поверхность, обращенная к клеточной стенке, состоит из фосфолипидов. Внешнюю мембрану пересекают белки-порины. Их тримеры формируют через нее сквозные водные каналы.

Пространство между внешней и внутренней мембранами, в котором находится клеточная стенка, имеет структуру геля и называется периплазматическим.

Животные клетки имеют только цитоплазматическую мембрану. Так как цитоплазматическая мембрана присуща всем клеткам, то из этого следует, что системы регуляции транспорта из среды в клетку необходимых клетке веществ и системы выброса ненужных веществ из клетки в среду обязательно связаны с цитоплазматической мембраной. Клеточная

стенка не играет существенной роли ни в транспорте низкомолекулярных метаболитов, ни в регуляции этого процесса. Однако внешняя мембрана грамотрицательных бактерий и, особенно, периплазматическое пространство содержат ряд ферментов, участвующих в процессах транспорта низкомолекулярных соединений.

Процессы транспорта через клеточную оболочку подразделяют на пассивную диффузию, облегченную диффузию и активный транспорт.

При пассивной диффузии, т.е. в соответствии с градиентом концентрации, когда в среде концентрация выше, чем внутри клетки, в клетку проникают вода, углеводороды, молекулы кислорода, азота, водорода.

В случае облегченной диффузии необходимые клетке вещества переносятся из среды в клетку с помощью пермеаз — особого класса белков, содержащихся в мембране. Переносимое вещество реагирует с пермеазой на наружной стороне мембраны и освобождается после переноса через мембрану внутри клетки. При облегченной диффузии проникающее в клетку вещество продвигается по градиенту концентрации. Затрат энергии на этот процесс не требуется, как и при пассивной диффузии.

При активном транспорте вещества в клетку, требующем затраты энергии, движение переносимого вещества может происходить против градиента концентрации. При этом концентрация накапливающегося в клетке соединения может превышать в сотни и тысячи раз его концентрацию в среде в связи с тем, что когда мембранный переносчик обращен к наружной поверхности мембраны, он высокоспецифичен к переносимому им субстрату, когда же он обращен внутрь клетки, сродство резко снижается в результате диссоциации субстрата и переносчика. Если энергозатражающие реакции блокируются, например ферментными ядами, реагирующими с функциональными группами белковой части ферментов, то активный транспорт в клетку низкомолекулярных веществ прекращается.

Источником энергии для активного транспорта очень часто является трансмембранный электрохимический потенциал ионов водорода. Переносчики, имеющие места связывания протонов и молекул субстрата, используют мембранный потенциал для переноса внутрь клетки ионов водорода и питательных веществ. Переносчик, связавшись с протоном, повышает свое сродство к субстрату. Освободившись от протона на поверхности мембраны, обращенной внутрь клетки, переносчик снижает сродство к субстрату. Таким образом, фактически здесь происходит перенос двух субстратов в одном направлении. Подобного рода транспорт получил название «симпорт». Если переносчик осуществляет перенос только одного субстрата, используется термин «унипорт». Наконец, механизм транспорта одним и тем же переносчиком двух субстратов, но в противоположных направлениях, именуется «антипорт».

АТФ-зависимые системы активного транспорта используют энергию АТФ. В такие системы входят расположенные в периплазматическом пространстве белки с высоким сродством к ряду метаболитов, принадлежащим к пептидам, аминокислотам, сахарам и др. Они препятствуют выходу в среду ряда метаболитов из цитоплазмы. С их помощью в периплазматическом пространстве накапливаются определенные питательные соединения из среды. Говоря об активном транспорте веществ в клетку, нельзя не упомянуть о системах транслокации (переноса) групп. Их функционирование приводит к транспорту в клетку, например, углеводов в виде фосфатных эфиров, а внутриклеточная концентрация оказывается гораздо выше, чем в среде.

Фосфотрансферазы, участвующие в работе таких систем, инициируют и ряд других реакций в клетке. Вообще транспорт многих субстратов в клетку подвержен регуляции на уровне как биосинтеза компонентов этих систем, так и функциональной активности уже синтезированных компонентов.

Самостоятельный интерес представляет выведение из клетки избыточных продуктов метаболизма, в частности защитных ферментов, антибиотиков и экзоферментов, позволяющих утилизировать находящиеся в среде полимеры. Низкомолекулярные вещества могут выводиться путем пассивной или облегченной диффузии. Однако существуют и энергозависимые системы. Особый интерес у биотехнологов, в том числе работающих в области получения рекомбинантных белков, вызывает проблема выведения из клетки белка, синтезируемого в цитоплазме, включая чужеродный белок, являющийся целевым продуктом. В данном случае биотехнолог идет по пути повторения выработанного эволюцией механизма секреции таких белков, как внеклеточные ферменты.

Когда синтезируется такого рода белок, которому предстоит пересечь цитоплазматическую мембрану и выйти из клетки в среду, то, во-первых, его синтез происходит на рибосомах, связанных с обращенной в цитоплазму поверхностью цитоплазматической мембраны, во-вторых, покидающая рибосому полипептидная цепь на своем N-терминальном конце содержит сигнальный или лидерный пептид (15 — 30 аминокислотных остатков). Этот дополнительный участок в полипептидной цепи временно нужен для выведения внеклеточного белка из клетки и имеет свои особенности: конечный аминокислотный остаток, положительно заряженный (облегчается взаимодействие с поверхностью мембраны, имеющей отрицательный заряд); протяженный участок гидрофобных аминокислотных остатков, облегчающий прохождение через липидные слои мембраны; наличие специфического участка для действия так называемой сигнальной протеазы (или пептидазы) — мембранного фермента, катализирующего отщепление лидерного пептида от основной полипептидной цепи после выполнения функции своеобразного проводника новой белковой молекулы из клетки в среду.

Таким образом, рекомбинантный белок, например, видоспецифичный белковый гормон человека, синтезируемый в цитоплазме микробной клетки и не имеющий специфической лидерной последовательности, можно с помощью методов генетической инженерии снабдить лидерной последовательностью с условием, чтобы она могла быть субстратом для микробной сигнальной пептидазы. Отсюда следует проблема создания гибридных (химерных) белков с лидерной последовательностью, принадлежащей, например, к внеклеточной пенициллиназе.

Разумеется, проблема выведения чужеродных белков не решается однозначно и только за счет присоединения ли-

дерной последовательности, так как существует много других факторов, влияющих на экскрецию белков.

В заключение этого краткого рассмотрения проблем транспорта веществ в клетку и из клетки обратим особое внимание на мутации, которые могут затрагивать ферментные системы транспорта, молекулы переносчиков, структурные компоненты цито-плазматической и внешней мембран, что дает биотехнологу богатый набор мутантов с самыми разнообразными изменениями физиологических и биохимических свойств.

Особенности транспортных систем у некоторых биообъектов определяют их способность воздействовать на окружающую среду в нужном для человека аспекте.

Например, ряд представителей микроорганизмов рода *Pseudo-monas* и целенаправленно полученных от природных культур мутантов обезвреживают самые разнообразные химические соединения (кольчатые углеводороды и др.), попадание которых в окружающую среду приводит к нарушению экологии в обширных географических регионах. Причем способность вышеуказанных микроорганизмов обезвреживать загрязнения обусловлена не только набором ферментов, утилизирующих экзотические вещества, но и особенностями транспортных систем, начиная с режима осцилляции пориновых каналов внешней мембраны.

Молекулярные механизмы защиты продуцентов от веществ с «суицидным эффектом»

Биотехнологам, создающим суперпродуценты биологически активных веществ, как правило, приходится сталкиваться с проблемой защиты продуцента от вырабатываемого в большом количестве целевого продукта. Особенно наглядно это демонстрируется при создании суперпродуцентов вторичных микробных метаболитов. С одной стороны, образуемые в почвенных биоценозах микробные метаболиты нередко выполняют функцию «оружия в борьбе за существование». С другой стороны, за счет мутаций, клеточной и геномной инженерии, а также подбора специальных питательных сред такие вещества начинают вырабатываться клеткой в неестественно больших для нее количествах.

С позиций биотехнологии проблему защиты продуцентов от образуемых ими веществ нельзя рассматривать только применительно к антибиотикам. Однако последние являются наиболее показательным примером защиты клетки от потенциально «суицидных» собственных-веществ, способных вызывать ее гибель. Механизмы защиты продуцента от собственной сверхпродуктивности могут быть разными.

В случае антибиотиков таких механизмов несколько. Роль каждого механизма защиты зависит в свою очередь от механизма биологической активности конкретного антибиотика. Известно, что наиболее распространенную группу антибиотиков, применяемых в клинике, если не считать беталактамов, составляют ингибиторы синтеза белка у бактерий на рибосомном уровне: тетра-циклины, аминогликозиды, макролиды и некоторые другие. Их продуцентами являются актиномицеты, т.е. многоклеточные бактерии, способность которых выдерживать высокие концентрации собственных антибиотиков объясняется несколькими причинами. Из них главной является особенность биосинтеза их молекул (точнее сборки углеродного скелета), который происходит особенно интенсивно и достигает максимума, когда культура продуцента замедляет скорость размножения своих клеток и переходит из тро-фо- в идиофазу. Иными словами, несмотря на потенциальную способность тормозить синтез белка, накопившийся антибиотик не способен причинить вред своим клеткам, в которых синтез белка уже почти прекратился.

Другие причины, наблюдаемые на примере некоторых групп антибиотиков — ингибиторов белкового синтеза, носят более частный характер. Исследования с антибиотиками — аминогликозидами на примере наиболее подробно изученного неомицина (продуцент *Actinomyces fridae*) показали, что в процессе или после сборки молекулы антибиотика он подвергается временной обратимой инактивации.

Рибосомы продуцента неомицина, как показывают опыты с бесклеточной синтезирующей белок системой, чувствительны к антибиотику. Соответственно возникает вопрос о совмещении в одной и той же клетке эндогенного ингибитора (каковым в данном случае является неомицин) с работающими рибосомами. Частично ответить на этот вопрос можно, исходя из вышеуказанной общезнающей физиологической закономерности, характеризующей биосинтез антибиотиков: максимум биосинтеза антибиотика не совпадает по времени с максимальной скоростью синтеза белка (цикл развития культуры уже завершен).

Существует и специфический механизм защиты клетки продуцента от неомицина, который может быть обратимо инактивирован за счет фосфорилирования одной из многочисленных в ами-ногликозидной структуре амино- или гидроксильных групп. Источником переносимого на антибиотик фосфатного остатка является АТФ. Обратимость инактивации обусловлена существованием в клетке продуцента локализованной в клеточной мембране щелочной фосфатазы. Этот фермент на последнем этапе выброса антибиотика в среду осуществляет его реактивацию, т.е. дефосфо-рилирование, после которого антибиотик уже в активном состоянии направляется в среду в силу односторонней проницаемости мембраны. Причем иногда реактивирующий фермент не справляется со своими функциями, и в среду антибиотик выделяется в неактивном виде. Если его сконцентрировать и обработать щелочной фосфатазой, можно получить дополнительное количество антибиотика из, казалось бы, неактивной культуральной жидкости.

Небезынтересно, что ген фосфорилирующего фермента находится в кластере генов биосинтеза неомицина, наглядно демонстрируя генетическую близость защитной аминогликозид-фосфо-трансферазы у продуцента с ферментами биосинтеза аминогли-козида, т. е. подчинение функций генов кластера единой цели — образованию антибиотика, эффективного против микроорганизмов-конкурентов, но безвредного для своего продуцента.

Однако помимо выполнения защитной функции фосфотранс-фераза может воздействовать и на фрагменты собираемой ами-ногликозидной молекулы, активируя их, т.е. выполнять двойную Функцию (при биосинтезе — как фактор защиты от суицидного агента). Кроме фосфорилирования-дефосфорилирования существуют и другие механизмы инактивации-

реактивации аминокислот, например ацетилирование-деацетилирование.

Защита от собственных антибиотиков у актиномицетов — продуцентов макролидов обусловлена наличием в клетке специфической метилазы, метилирующей определенный адениновый остаток в S рибосомальной РНК. В результате S субъединица рибосомы продуцента антибиотика имеет конфигурацию, при которой реагирование антибиотика с пептидилтрансферазным центром рибосомы, как это происходит в случае эубактерий, невозможно.

Для характеристики системы защиты продуцента от некоторых циклопептидных антибиотиков (например, грамицидина С) используется термин «компартиментация». Место биосинтеза этого антибиотика изолировано от чувствительных к нему метаболических реакций продуцирующей его клетки. Молекула антибиотика (ее углеродный скелет) собирается в мультиферментных комплексах, обеспечивающих упорядоченную последовательность реакций сборки. Взаиморасположение ферментов в комплексе координируется за счет дисульфидных и водородных связей. Мультиферментные комплексы локализируются на периферии клетки продуцента. Также компартиментация играет роль в защите клеток продуцентов (как правило, это актиномицеты) в случае образования ими ДНК-тропных антибиотиков (последние применяются в онкологической клинике). В то же время антибиотики семейства рифамицинов, ингибируя синтез РНК в клетках путем взаимодействия с РНК полимеразой, не действуют на синтез РНК в клетке своего собственного продуцента.

Интересно, что проблема защиты продуцента от потенциального суицидного агента отсутствует в случае продуцента пенициллина *Penicillium chrysogenum* даже при повышении продуктивности штамма гриба во много тысяч раз. Пенициллин проявляет антимикробный эффект, подавляя синтез пептидогликана клеточной стенки бактерий. У грибов пептидогликана как полимера клеточной стенки нет. Соответственно у них нет и фермента синтеза пептидогликана — D-аланин-транспептидазы, который является мишенью действия пенициллина при его контакте с бактериальной клеткой.

ТЕМА 5 БИОТЕХНОЛОГИЯ АМИНОКИСЛОТ, ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ

Получение аминокислот возможно несколькими путями: химическим синтезом, гидролизом природного белкового сырья и в биотехнологических процессах. Химический синтез дает рацемат — продукт, содержащий как L-, так и D-формы аминокислот. За исключением глицина, который не имеет оптически активных изомеров, и метионина, усвояемого организмами в обеих формах, D-изомеры обладают токсичностью. Получение оптически активных L-изомеров аминокислот из гидролизатов природных материалов растительного и животного происхождения связано с многоступенчатой и дорогостоящей очисткой. Биотехнологическое получение аминокислот включает в себя прямую микробную ферментацию, а также микробиологический или ферментативный синтез из предшественников.

Микробиологический метод получения аминокислот, наиболее распространенный в настоящее время, основан на способности микроорганизмов синтезировать все L-аминокислоты, а в определенных условиях — обеспечивать их сверхсинтез. Биосинтез аминокислот в микробных клетках протекает в виде так называемых свободных аминокислот или «пула аминокислот», из которого в процессах конструктивного метаболизма синтезируются клеточные макромолекулы. Для синтеза всех белков требуется 20 аминокислот.

Пути синтеза большинства аминокислот взаимосвязаны. При этом одни аминокислоты являются предшественниками для биосинтеза других. Пируват является предшественником аланина, валина, лейцина; 3-фосфоглицерат — серина, глицина, цистеина; щавелево-уксусная кислота — аспартата, аспарагина, метионина, лизина, треонина, изолейцина; α -кетоглутаровая кислота — глутамата, глутамина, аргинина, пролина; фосфоэнолпируват+эритрозо-4-фосфат — фенилаланина, тирозина, триптофана; 5-фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ — гистидина. Синтез каждой аминокислоты в микробных клетках реализуется в строго определенных количествах, обеспечивающих образование последующих аминокислот, и находится под строгим генетическим контролем. Контроль осуществляется по принципу обратной связи на уровне генов, ответственных за синтез соответствующих ферментов (репрессия), и на уровне самих ферментов, которые в результате избытка образующихся аминокислот могут изменять свою активность (ретроингибирование). Данный механизм контроля исключает перепроизводство аминокислот и также препятствует их выделению из клеток в окружающую среду. Чтобы добиться сверхсинтеза отдельных аминокислот, нужно обойти или изменить данный контрольный механизм их синтеза. Для первого пути возможно использование природных «диких» штаммов; очень существенны при этом условия ферментации, так как добиться дисбаланса в системе синтеза аминокислот можно путем изменения ряда основных факторов среды (концентрация основного субстрата, pH, соотношение макро- и микроэлементов в среде и др.). Изменение контрольного механизма синтеза аминокислот осуществляется генетическими методами. При этом получают мутантные организмы: ауксотрофные и регуляторные мутанты. Ауксотрофные мутанты — это организмы, утратившие способность к синтезу одной или нескольких аминокислот.

Среди продуцентов аминокислот — различные микроорганизмы, представители родов *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Microbacterium*, *Escherichia*. Используемые в промышленности микроорганизмы можно подразделить на несколько классов: дикие штаммы, ауксотрофные мутанты, регуляторные мутанты и ауксотрофные регуляторные мутанты. Промышленные штаммы, как правило, несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее предшественников.

Для получения таких аминокислот, как L-глутамата, L-валина, L-аланина, L-глутамина и L-пролина возможно применение природных штаммов и усиление у них продукции аминокислот условиями ферментации. Например, высокий, до 30 г/л, выход глутамата возможен при полном или частичном подавлении активности α -кетоглутаратдегидрогеназы, добавках

в среду ПАВ и антибиотиков (пенициллина, цефалоспорины) для увеличения проницаемости клеточных мембран для глутамата. Синтез L-глутамата можно переключить на образование L-глутамина или L-пролина, изменяя условия ферментации. При повышении концентрации ионов аммония и биотина в среде стимулируется образование L-пролина; слабо кислая среда и ионы цинка при избытке аммония усиливают синтез L-глутамата.

Ауксотрофные мутанты используют в тех случаях, когда необходимо синтезировать аминокислоты, являющиеся конечными продуктами разветвленных цепей метаболических реакций аминокислот. Например, для получения L-лизина, L-треонина, L-метионина или L-изолейцина, для которых общим предшественником является L-аспарат, применяют мутанты, ауксотрофные по гомосерину или треонину и гомосерину. Ауксотрофные мутанты не способны образовывать ингибиторы соответствующего метаболического пути, работающие по принципу отрицательной обратной связи из-за отсутствия определенной ключевой ферментативной реакции. Поэтому при выращивании такого штамма в среде с минимальной концентрацией необходимого ингредиента (аминокислоты) они способны на суперпродукцию аминокислоты-предшественника. Ауксотрофные мутанты, способные накапливать конечные продукты неразветвленных цепей биосинтеза, например L-аргинина, невозможны. В данной ситуации приходится получать мутанты с частично нарушенной регуляцией биосинтеза, так как это позволяет повысить выход целевого продукта. Такие организмы являются регуляторными мутантами. Регуляторные мутанты отбирают по устойчивости к аналогам аминокислот либо среди ревертантов ауксотрофов. Аналоги аминокислот выступают в роли искусственных ингибиторов ферментов, работающих по принципу обратной связи, одновременно обеспечивая биосинтез требуемых аминокислот и подавляя процесс их включения в белки. Так, серусодержащий аналог лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеин является у *Brevibacterium flavum* ложным и действует ингибитором аспартакиназы по принципу обратной связи. Поэтому устойчивые к его действию мутанты, у которых выход лизина достигает 33 г/л, синтезируют фермент, в 100 раз менее чувствительный к ингибированию по механизму обратной связи, по сравнению с исходным штаммом. Регуляторные мутанты получают путем трансдукции, проводя при этом отбор сначала отдельных мутаций, вызывающих полное рассогласование механизмов регуляции, а затем объединяя данные признаки путем ко-трансдукции. В результате этого, у одного штамма можно последовательно закрепить устойчивость к нескольким аналогам.

В последние годы для получения новых эффективных штаммов-продуцентов аминокислот стали применять новейшие методы биотехнологии. Методы генетической инженерии позволяют повышать количество генов биосинтеза путем их клонирования на плазидах. Это приводит к увеличению количества ферментов, ответственных за синтез аминокислот, следовательно, повышает выход целевого продукта. Клонирование генов системы синтеза аминокислот в клетки микроорганизмов с иным, по сравнению с донорским организмом, типом питания позволяет расширять сырьевую базу и заменять дорогостоящие сахаросодержащие субстраты более дешевыми. Производственные биотехнологические процессы получения аминокислот реализуются в условиях глубоководной аэробной периодической ферментации. Скорость синтеза аминокислот не совпадает во времени со скоростью роста производственной культуры (рис.).

Максимальная продукция аминокислоты наступает, как правило, когда прирост биомассы практически прекращается. Поэтому питательная среда на первом этапе ферментации должна обеспечивать сбалансированный рост клеток; а на втором – условия для сверхсинтеза целевой аминокислоты. В качестве источника углерода и энергии используют богатые сахаросодержащие субстраты, главным образом, мелассу. Возможно также привлечение более доступных субстратов (ацетат, сульфитный щелок, углеводороды). В зависимости от таксономического положения и физиологических потребностей микроорганизмов в качестве источника азота используют соли аммония, нитраты, а также аминокислоты и молекулярный азот. В состав среды вносят необходимые количества углерода и азота, фосфатов и других солей, а также стимуляторы роста (витамины, дрожжевой экстракт), ПАВ, антибиотики. Периодический режим ферментации и богатая по составу среда требуют соблюдения строгой стерильности в ходе получения инокулята и на ферментационной стадии. Стерилизации подвергают питательная среда, воздух и все технологическое оборудование. После стадии ферментации в процессе обработки культуральной жидкости клетки отделяют от раствора, который далее подвергают очистке от окрашенных примесей и взвешенных частиц с помощью сорбционных методов. Далее процесс проводится с использованием различных методов выделения и очистки в зависимости от сферы применения конечного продукта. Для фармакологии и пищевой промышленности аминокислоты выпускают в виде высушенных чистых кристаллических препаратов; для кормовых и технических целей – используют стабилизированную и сконцентрированную культуральную жидкость.

Технология получения глутаминовой кислоты

L-глутаминовая кислота (α -аминоглутаровая) – первая аминокислота, полученная на основе промышленного микробиологического синтеза: $\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2\text{CH} - \text{COOH}$

Глутаминовая кислота является важнейшей аминокислотой растительных и животных белков, не будучи незаменимой. Синтез глутаминовой кислоты происходит в цикле трикарбоновых кислот (рис.) в результате ферментативного восстановительного аминирования 2-кетоглутаровой кислоты НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназой: $\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CO} - \text{COOH} + \text{НАД(Ф)H}_2 + \text{NH}_3 \rightarrow \text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2\text{CH} - \text{COOH} + \text{НАД(Ф)}$. 2-кетоглутаровая кислота образуется в свою очередь из изолимонной кислоты под воздействием изоцитратдегидрогеназы. Необходимый для синтеза глутаминовой кислоты НАД(Ф)Н постоянно регенерируется в процессе окисления изолимонной кислоты в 2-кетоглутаровую. Возможность получения глутаминовой кислоты из углеводов на основе микроорганизмов впервые была продемонстрирована в 1957 г. японскими исследователями Киносита, Асаи и др. Производить глутаминовую кислоту способны дрожжи, микроскопические грибы, бактерии. Бактерии обеспечивают наибольший выход по отношению к использованному углеродному субстрату (не менее 40–50 %).



Схема синтеза глутаминовой кислоты *C. glutamicum*

Промышленное значение имеют бактериальные культуры (*Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*). Сверхсинтез кислоты у диких штаммов возможен в специальных физиологических условиях при торможении скорости роста и увеличении проницаемости клеточной мембраны для глутаминовой кислоты. Такие условия обеспечивает определенная концентрация биотина в среде (1–5 мкг/л), а также присутствие некоторых антибиотиков. Внутриклеточная концентрация глутаминовой кислоты снижается в результате экскреции продукта в околоклеточную среду, поэтому регуляция синтеза конечным продуктом ослабевает. Сверхпродукция глутаминовой кислоты связана также с высокой концентрацией аммония в среде, высокой активностью НАД(Ф)Н-зависимой глутаматдегидрогеназы и отсутствием или дефектом α -кетоглутаратдегидрогеназы, катализирующей превращение 2-кетоглутарата в янтарную кислоту.

Глутаминовая кислота в основном используется в фармакологии и пищевой промышленности, поэтому задача постферментационной стадии – получение высокоочищенных препаратов. Для этого на первом этапе обработки культуральной жидкости в нее добавляют негашеную известь или известковое молоко. После этого избыток ионов осаждают кислотой, осадок удаляют центрифугированием. Фильтрат после осветления активированным углем и сорбции на ионообменных смолах концентрируют вакуум-выпариванием при 40–60°C. Осаждение кристаллов глутаминовой кислоты проводят в изоэлектрической точке (рН 3.2 при 4–15°C). В результате перекристаллизации чистота продукта достигает 99.6 %. Кристаллы кислоты отделяют от маточника центрифугированием, промывают и высушивают. Если нужно получить глутамат натрия, кристаллы глутаминовой кислоты обрабатывают гидроокисью натрия. Для этого влажные кристаллы растворяют в воде, нейтрализуют 50 % раствором едкого натра.

Полученный раствор фильтруют, упаривают под вакуумом до содержания сухих веществ 60 % и направляют на перекристаллизацию. Полученные кристаллы глутамата натрия выделяют из маточного раствора центрифугированием и высушивают током горячего воздуха.

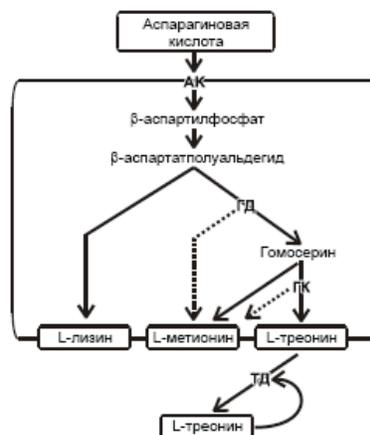
Глутамат натрия усиливает вкус многих пищевых продуктов, способствует длительному сохранению вкусовых качеств консервированных продуктов (овощей, рыбы, мясных продуктов). За рубежом глутамат натрия добавляют во все продукты не только при консервировании, но и при замораживании и просто хранении. В Японии, США и других странах глутамат натрия является обязательной принадлежностью стола аналогично соли, перцу, горчице. Глутаминовая кислота не только повышает вкусовую ценность пищи, но также стимулирует пищеварение. Важные свойства глутаминовой кислоты – служить защитным фактором при отравлениях внутренних органов (печени, почек), ослаблять действие токсинов и усиливать ряд фармакологических препаратов. В настоящее время производство глутаминовой кислоты является крупнотоннажным биотехнологическим производством (около 400 000 т/г), объемы ее производства возрастают с каждым годом. Ведущими странами – производителями глутаминовой кислоты и глутамата натрия являются Япония и США.

Технология получения лизина

L-Лизин (α , ϵ -аминокапроновая кислота) $\text{CH}_2\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}_2\text{CH} - \text{COOH}$ в организме высших животных и человека определяет биологическую ценность перевариваемого белка. Данная аминокислота выполняет также много других важнейших биохимических функций – способствует секреции пищеварительных ферментов и транспорту кальция в клетки, улучшает общий азотный баланс в организме. Добавление лизина в состав комбикормов увеличивает усвояемость белка животными и снижает расход кормов на производство животноводческой продукции.

Синтез L-лизина у микроорганизмов осуществляется различными путями. Дрожжи, грибы и микроводоросли синтезируют лизин из α -кетоглутаровой кислоты через α -аминоадипиновую кислоту. Вследствие малой изученности этого биосинтетического пути получение мутантов – суперпродуцентов лизина через аминокислотный путь представляется проблематичным. Высшие растения и бактерии синтезируют лизин по другой схеме – через α -диаминопимелиновую кислоту. По этой разветвленной схеме биосинтез L-лизина (диаминопимелиновый путь) синтез начинается с аспарагиновой кислоты и проходит через диаминопимелиновую кислоту. Помимо L-лизина, аспарагиновая кислота является также предшественником для L-метионина, L-треонина и L-изолейцина (рис.). Ключевым местом в синтезе лизина является аспаратки-

наза; она ингибируется треонином. Присутствие лизина этот эффект усиливает.



Диаминопимелиновый путь синтеза лизина

Треонин ингибирует дегидрогеназу полуальдегида аспарагиновой кислоты, а также гомосериндегидрогеназу. Метионин является репрессором по отношению к гомосериндегидрогеназе, а изолейцин ингибирует треониндегидрогеназу. Продукты обмена, угнетающие различные ферменты и участвующие в синтезе лизина, следует вывести из реакции. Именно поэтому для производства L-лизина используют различные ауксотрофные мутанты. Производственные штаммы-продуценты лизина – это ауксотрофные штаммы глутаматпродуцирующих коринебактерий (*Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*). Применяют три типа ауксотрофных мутантов: ауксотрофы по гомосерину или треонину с подавленной гомосеринкиназой; метионин- и треонинчувствительные штаммы с существенно сниженной активностью гомосериндегидрогеназы; аналогорезистентные прототрофные продуценты лизина, устойчивые к треонину и аминокотициллицистеину, с аспартаткиназой, нечувствительной к согласованному ингибированию лизином и треонином.

Получены штаммы, обеспечивающие 40 % конверсию углеродного субстрата в аминокислоту и выходы лизина на сахарах до 40, уксусной кислоте – до 70 г/л.

Микробиологический процесс производства лизина аналогичен схеме получения глутаминовой кислоты, однако использование ауксотрофных микроорганизмов требует специального состава питательных сред, которые подбираются индивидуально для каждого штамма. Очень важно также осуществлять на стадии ферментации стабилизацию основных параметров культуры в строгом соответствии с технологическим регламентом данного производства, так как выход лизина зависит от температуры среды, концентрации кислорода, длительности ферментации, дозы и возраста посевного материала. Помимо сахаров (7–12 % по объему), сульфата аммония и фосфатов калия, в среду вносят кукурузный экстракт в качестве источника биологически активных веществ (1.2–1.5 % по содержанию сухих веществ), а также мел и синтетический пеногаситель. Среда должна содержать (в л): 200 мг метионина, 800 мг треонина, 15–20 мкг биотина (при меньших концентрациях биотина синтезируется глутаминовая кислота, при 2.5 мг – молочная кислота, как механизм обратного действия). Соотношение углерода и азота в среде оптимально как 11:1 (при его увеличении выход лизина падает, при уменьшении – накапливается аланин). Культивирование осуществляется в строго стерильной глубинной аэробной периодической культуре в аппаратах объемом 50 и 100 м³ при коэффициенте заполнения 0.75. Процесс длится 48–72 ч при 29–30°C, контролируемом рН 7.0–7.5, непрерывном перемешивании и избыточном давлении 20–30 кПа. Уровень аэрации составляет 1 м³ воздуха/м³ среды в минуту. При ухудшении условий аэрации происходит образование молочной кислоты.

Для пеногашения используют кашалотовый жир или синтетические масла (0.5 % от объема среды). В первые сутки потребляется около 25 % сахаров и почти все аминокислоты, при этом образуется практически вся биомасса. Далее на фоне резкого снижения скорости роста клеток наблюдается самая высокая скорость синтеза лизина (до 1.0 г/л ч). Для стабилизации рН периодически проводят под титровку культуры 25 % раствором аммиака. При дополнительном дробном введении в аппарат углеводов и азота выход лизина можно повысить. Конечная концентрация кислоты достигает 40 г/л при остаточной концентрации сахаров около 0.5–1.0 г/л. Эффективный процесс получения лизина реализован на более доступном субстрате – уксусной кислоте. Токсичность данного субстрата делает необходимой дробную подачу ацетата; его концентрация в среде не должна превышать 2 %. Небольшие добавки сахара в среду (около 1 %) повышают выход лизина на 30–50 %. Экономический коэффициент по потребляемому ацетату при этом составляет 27 %. Конечная концентрация лизина в среде достигает 40–50 г/л. В последние годы получены мутантные штаммы *B. flavum*, обеспечивающие на ацетатной среде выход лизина до 73 г/л. Практически весь производимый микробиологическим способом L-лизин используется в кормопроизводстве для повышения усвояемости и питательности кормов. Поэтому выпускается лизин, главным образом, в виде кормовых препаратов – жидкого концентрата лизина (ЖКЛ) и кормового концентрата лизина (ККЛ). При производстве ЖКЛ культуральную жидкость, предварительно стабилизированную 25 % раствором гидросульфита натрия, подкисляют соляной кислотой до рН 4.5–5.0. Образующийся при этом термостабильный монохлорид лизина упаривают в вакуумно-выпарных аппаратах до 40 % содержания сухих веществ. Готовый препарат ЖКЛ не замерзает при температуре до –18°C и сохраняет свои свойства в течение 3 месяцев. ККЛ получают на основе ЖКЛ, высушивая жидкий концентрат в распылительных сушилках

при температуре не более 90°C до остаточной влажности 4–8 %. Сухой препарат лизина гигроскопичен и в процессе хранения подвержен порче. Для устранения данного нежелательного явления в концентрат перед высушиванием вводят наполнители в виде костной муки, бентонита, негашеной извести, пшеничных отрубей. Высушивание полученной пасты проводят конвективным способом на вальцево-ленточных сушилках. Препарат по составу близок к жидкому концентрату лизина и содержит (в %): 7–10 лизина, 15–17 белка, до 14 других аминокислот, 10–13 бетаина и 20–25 зольных веществ. Препарат сыпуч и негигроскопичен. Срок его хранения возрастает до 1 года.

Технология получения триптофана

L-Триптофан (α -амино- β -индолилпропионовая кислота) относится к незаменимым аминокислотам: $\text{CH}_2 - \text{NH}_2\text{CH} - \text{COOH}$

Триптофан, наряду с другими ароматическими аминокислотами, фелилаланином и тирозином, в последние годы находит все большее применение. Отсутствие или дефицит триптофана в организме приводит к ряду тяжелых заболеваний (диабет, туберкулез, пеллагра). Используется триптофан в биохимических исследованиях, в небольших количествах – в животноводстве. В общем виде последовательность биосинтетических реакций образования триптофана следующая:

эритрозо-4-фосфат + фосфоеноилпирувиноградная кислота \rightarrow
 \rightarrow 7-фосфо-3-дезоксид-арабиногептулозная кислота \rightarrow
 \rightarrow 5-дегидрошикимовая кислота \rightarrow шикимовая кислота \rightarrow
 \rightarrow хоризмовая кислота \rightarrow анраниловая кислота \rightarrow триптофан.

Шикимовая кислота является основным промежуточным продуктом, из которого через 5-фосфо-3-енолпирувилшикимовую кислоту образуется хоризмовая кислота. Данная стадия является ключевой для синтеза ароматических аминокислот.

Микробиологический синтез L-триптофана осуществляют на основе мутантных штаммов дрожжей (*Candida*) и бактерий (*E. coli*, *Bacillus subtilis*), дефицитных по тирозину и фенилаланину. Промышленный синтез L-триптофана осуществляется на основе сахаров. Исходная питательная среда для стерильного периодического выращивания дрожжей содержит (в %): сахара 10, мочевины 0.5, кукурузный экстракт 2.0, а также хлорид кальция, калий фосфорнокислый и сульфат магния. Продолжительность периодической ферментации при 37°C не превышает 48 ч. В ходе постферментационной стадии триптофан выделяют из культуры по обычным схемам. Для получения очищенного кристаллического препарата работают с культуральной жидкостью. Для получения кормового концентрата используют и биомассу клеток.

Двухступенчатое получение аминокислот из биосинтетических предшественников выбирают в тех случаях, когда предшественник недорог, а прямая микробная ферментация недостаточно экономична или разработана. При микробиологическом синтезе аминокислот из предшественников удается значительно понизить репрессию или ретроингибирование, так как в результате внесения в среду готового интермедиата снимаются проблемы, связанные с наличием генетического контроля в системе синтеза аминокислот.

При двухступенчатом способе получения глутаминовой кислоты из α -кетоглутаровой, играющей роль предшественника, необходим источник данного предшественника и ферментная система, катализирующая превращение кетоглутарата в целевую аминокислоту. Кетоглутарат получают микробиологическим синтезом на основе бактерий (*Pseudomonas*, *Escherichia*) или дрожжей (*Candida*) – I ступень. На II ступени можно получить L-глутаминовую кислоту в реакции восстановительного аминирования с помощью культуры *Pseudomonas*, имеющей сильную глутаматдегидрогеназу:

α -кетоглутаровая кислота + NH_4^+ НАДН \rightarrow
 \rightarrow L-глутаминовая кислота + H_2O + НАД $^+$.

L-глутаминовая кислота также может быть получена из кетоглутарата через переаминирование последней с участием трансаминазы:

α -кетоглутаровая кислота + аминокислота \rightarrow
 \rightarrow L-глутаминовая кислота + α -кетокислота;

II ступень по данной схеме может быть реализована культурой *E. coli*, в качестве донора аминогрупп могут выступать аланин или аспарагиновая кислота.

Комбинированный, принципиально новый способ получения L-лизина в 1973 г. был предложен японской фирмой «Тойо Рейон» («Торей»). Конечный продукт, получаемый по данной технологии, отличается высокой концентрацией и чистотой. На первой стадии циклогексан в результате химических реакций превращается в циклический ангидрид лизина (D, L- α -амино- ϵ -капролактамы). На второй стадии осуществляют разделение оптических изомеров с помощью ферментов; происходящий при этом асимметрический гидролиз с участием гидролазы аминокпролактама приводит к образованию L-лизина. Гидролазу L- α -амино- ϵ -капролактама синтезируют дрожжи (*Candida*, *Trichospora*, *Cryptococcus*), фермент стимулируется ионами марганца, магния и цинка. Источником рацемазы аминокпролактама могут служить бактерии (*Flavobacterium*, *Achromobacter*). Оба эти фермента, обладающие рацемазной и гидролазной активностями, в виде определенного количества биомассы вводят на II ступени в водный раствор предшественника – DL-аминокпролактама. В ходе ферментативных реакций из предшественника образуется L-лизин, чистота препарата – выше 99 %. Помимо микробной биомассы, источником превращений DL-аминокпролактама в лизин могут служить изолированные иммобилизованные ферменты. Раствор предшественника пропускают через колонку, содержащую оба иммобилизованных фермента: один из них (гидролаза) гидролизует амидную связь в L-аминокпролактаме, не затрагивая D-формы предшественника; второй (рацемаз) – превращает D-изомер в рацемат с высокой скоростью. Выход L-лизина может составлять до 95 %. L-триптафан также можно получать из предшественника – анраниловой кислоты. На первом этапе по традиционной микробиологиче-

ской схеме с использованием дрожжей *Candida utilis* в течение 20–24 ч проводят процесс ферментации в условиях интенсивной (около 7 г O₂/л.ч) аэрации. Среда содержит мелассу (10.4 %), мочевины, сульфат магния, фосфаты калия. Для пеногашения используют кашалотовый жир и синтетические кремнеорганические соединения. Далее интенсивность аэрации снижают вдвое, в культуру периодически вносят растворы мочевины, мелассы и антраниловой кислоты. В течение 22–24 ч наращивают биомассу – источник ферментов; затем, в течение последующих 120 ч происходит собственно трансформация антраниловой кислоты в аминокислоту. Общее время процесса составляет около 140 ч, выход триптофана – 60 г/л. Большие успехи в биотехнологии аминокислот были достигнуты с формированием методов инженерной энзимологии, в частности, с развитием техники иммобилизации ферментов. Первым процессом промышленного использования иммобилизованных ферментов был процесс для разделения химически синтезированных рацемических смесей D- и L-форм аминокислот, разработанный в Японии в 1969 г. (предыдущие 15 лет процесс проводился компанией «Танабе Сейяку» с применением растворимых ферментов – аминоксилаз). В качестве исходного материала используют раствор ацилпроизводных синтезированных химическим путем LD-форм аминокислот, который пропускают через колонку с иммобилизованной L-аминоксилазой. Последняя гидролизует только ацил-L-изомеры, отщепляя от них объемную ацильную группу и тем самым резко увеличивает растворимость образующейся L-аминокислоты по сравнению с присутствующими в реакционной смеси ацил-D-изомерами. Далее смесь легко разделяется обычными физико-химическими методами. Компанией на промышленном уровне по данной технологии реализован синтез нескольких L-аминокислот, в том числе метионина, валина, фенилаланина, триптофана. Представляет интерес процесс получения аспарагиновой кислоты из химических предшественников (фумаровой кислоты и аммиака) на основе фермента аспартазы, разработанный японской фирмой «Танабе Сейяку». Фермент в одну стадию присоединяет молекулу аммиака к двойной связи фумаровой кислоты с образованием оптически активной L-аспарагиновой кислоты. Выход продукта составляет 99 %, процесс реализуется непрерывно в колонке объемом 1 м³. Производительность достигает 1700 кг чистой L-аспарагиновой кислоты в день на один реактор. Дегидрогеназы аминокислот (лейцин- и аланиндегидрогеназы), катализирующие обратимые реакции дезаминирования, применяют в непрерывных процессах синтеза аминокислот из соответствующих кето-аналогов. Глутаматсинтетаза, катализирующая АТФ-зависимую реакцию аминирования глутамата, используется для получения глутамина с 92 % выходом. L-тирозин-фенол-лиаза, катализирующая реакцию элиминации, в которой тирозин распадается с образованием фенола, аммиака и пирувата, используется для энзиматического получения последнего. L-триптофан-индоллиаза может быть использована для получения L-триптофана из индола, пирувата и аммиака.

Высокая потребность в аминокислотах непрерывно стимулирует разработку принципиально новых и более эффективных биотехнологических способов их получения при наращивании темпов и объемов промышленного производства.

ПОЛУЧЕНИЕ ВИТАМИНОВ И КОФЕРМЕНТОВ.

Витамины - это низкомолекулярные органические вещества, способные в очень низких концентрациях оказывать сильное и разнообразное действие. Природным источником многих витаминов являются растения и микроорганизмы. В настоящее время в производстве многих витаминов ведущие позиции принадлежат химическому синтезу, однако при производстве отдельных витаминов микробный синтез имеет огромное значение, например при производстве кормовых препаратов витаминов. Отдельные витамины, кобаламины, менахины продуцируются только мик-процессами метаболизма человека и высших животных (процессы цикла трикарбоновых кислот, распад и синтез жирных кислот, синтез аминокислот и др.), оказывая влияние на разнообразные физиологические процессы.

Микробиологическим путем получают некоторые витамины группы B, а также эргостерин и каротин, являющиеся, соответственно, предшественниками витаминов D₂ и провитамина A.

Витамин B₁₂ – (α-5,6-диметилбензимидазол)-цианкобаламин – полимер сложного строения, являющийся гемато-поэтическим и ростовым фактором для многих животных и микроорганизмов. Микробиологический синтез является единственным способом получения данного витамина. Способность к синтезу данного витамина широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Активно продуцируют витамин B₁₂ *Propionibacterium*, а также *Pseudomonas* и смешанные культуры матанообразующих бактерий. Получение витамина на основе пропионовокислых бактерий, способных к самостоятельному синтезу аденозилкобаламина 5,6 ДМБ (коэнзима B₁₂), осуществляется в две стадии в двух последовательных аппаратах объемом 500 л при коэффициенте заполнения 0.65–0.70. Первую стадию культивирования проводят в течение 80 ч и слабом перемешивании в анаэробных условиях до полной утилизации сахара; полученную биомассу центрифугируют. Сгущенную суспензию инкубируют во втором аппарате еще в течение 88 ч, аэрируя культуру воздухом (2 м³/ч). Среда содержит сахара (обычно глюкозу 1–10 %), добавки солей железа, марганца, магния и кобальта (10–100 мг/л), кукурузный экстракт (3–7 %). В качестве источника азота принят (NH₄)₂SO₄. Ферментацию проводят при 30°C, pH стабилизируют на уровне 6.5–7.0 подтитровкой культуры раствором (NH₄)OH. На второй стадии происходит образование ДМБ. После завершения ферментации витамин экстрагируют из клеток, нагреванием в течение 10–30 минут при 80–120°C. При последующей обработке горячей клеточной суспензии цианидом происходит образование CN-кобаламина; продукт сорбируют, пропуская раствор через активированный уголь и окислы алюминия; затем элюируют водным спиртом или хлороформом. После выпаривания растворителя получают кристаллический витамин. Выход B₁₂ составляет до 40 мг/л. Активными продуцентами B₁₂ являются бактерии рода *Pseudomonas*. Разработаны эффективные технологии на основе термофильных бацилл *Bacillus circulans*, в течение 18 ч при 65–75°C в нестерильных условиях. Выход витамина составляет от 2.0 до 6.0 мг/л. Бактерии выращивают на богатых средах, приготовленных на основе соевой и рыбной муки, мясного и кукурузного экстракта. Продукция B₁₂ для медицины составляет около 12 т/г; форма выпуска – стерильный раствор CN-B₁₂ на основе 0.95-гоаствора NaCl и таблетки витамина в смеси с фолиевой кислотой или другими витаминами. Для нужд живот-

новодства витамин В12 получают на основе смешанной ассоциации термофильных метаногенных бактерий. Ассоциация состоит из 4-х культур, взаимосвязанно расщепляющих органический субстрат до CO₂ и CH₄: углеводсбраживающих, аммонифицирующих, сульфатовосстанавливающих и собственно метанобразующих бактерий. В качестве субстрата используют декантированную ацетонобутиловую барду, содержащую 2.0–2.5 % сухих веществ. Брожение проходит при 55–57°C в нестерильной культуре в две фазы: на первой образуются жирные кислоты и метан, на второй – метан, углекислота и витамин В12. Длительность процесса в одном аппарате составляет 2.5–3.5 суток, в двух последовательных – 2–2.5 суток. Концентрация витамина в бражке достигает 850 мкг/л. Параллельно в значительных количествах, до 20 м³/м³ образуется газ (65 % метана и 30 % углекислоты). Бражка имеет слабощелочную реакцию. Для стабилизации витамина ее подкисляют соляной или фосфорной кислотой, затем в выпарном аппарате сгущают до 20 % содержания сухих веществ и высушивают в распылительной сушилке. Содержание В12 в сухом препарате – до 100 мкг/г.

Витамин В2 (рибофлавин) получил свое название от сахара рибозы, входящего в состав молекулы витамина в виде многоатомного спирта D-рибита. Широко распространен в природе и в значительных количествах синтезируется растениями, дрожжами, грибами, бактериями. Животные, не синтезирующие этот витамин, должны получать его в составе комбикормов. При дефиците рибофлавина в организме нарушаются процессы белкового обмена, замедляется рост. Препараты рибофлавина используют в медицине для лечения ряда заболеваний, а в животноводстве – в качестве добавки в корма. Микроорганизмы синтезируют рибофлавин и две его коферментные формы – ФАД и ФМН. Продуцентами витамина являются бактерии (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дрожжи (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), микроскопические (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) и плесневые грибы (*Aspergillus niger*). Промышленное получение рибофлавина осуществляется химическим синтезом, микробиологическим и комбинированным: при этом синтезированная микроорганизмами рибоза химически трансформируется в В2. Для медицинских целей микробиологический рибофлавин получают на основе гриба *Aspergillus*. Для высоких выходов витамина (до 7 г/л) используют усовершенствованные штаммы и оптимизированные среды, содержащие (в %): кукурузный экстракт – 2.25, пептон – 3.5, соевое масло – 4.5 и стимуляторы (пептоны, глицин). Используют активный инокулят, которым засевают стерильную среду. Ферментацию проводят в течение 7 суток при 28°C и хорошей аэрации (0,3 м³/м³-мин.). Исходный pH составляет около 7.0, в ходе ферментации в связи с выделением кислот среда подкисляется до pH 4.0–4.5. После утилизации углеродного субстрата продуцент начинает утилизировать кислоты; pH повышается и после этого начинается образование витамина В2. При этом кристаллы рибофлавина накапливаются в гифах и вне мицелия. На постферментационной стадии для выделения витамина мицелий нагревают в течение 1 ч при 120°C. В ряде стран для получения кормовых препаратов витамина В2 используют достаточно простой способ на основе микроскопического гриба *Eremothecium ashbyii*, который выращивают в глубинной культуре в течение 80–84 ч при 28–30°C на среде с глюкозой или мальтозой (2.5 %), источником азота в виде NH₄NO₃ и карбонатом кальция (0.5 %). Выход рибофлавина составляет 1250 мкг/мл. Культуральная жидкость концентрируется в вакуумной выпарке до содержания сухих веществ 30–40 % и высушивается в распылительной сушилке. Товарная форма продукта – порошок с содержанием рибофлавина не менее 10 мг/г и 20 % сырого протеина, в препарате присутствуют никотиновая кислота и витамины В1, В3, В6 и В12. Полученный генноинженерным методом штамм *Bacillus subtilis* образует за 35 суток ферментации до 4 г/л рибофлавина.

Витамин D – это группа родственных соединений, в основе которых находится эргостерин, который обнаружен в клеточных мембранах эукариот. Поэтому, например, пекарские или пивные дрожжи применяют для получения эргостерина, как провитамина, обладающего антирахитическим действием. Содержание эргостерина в дрожжевых клетках колеблется в пределах 0,2–11%.

При недостатке в организме гормона 1,25-дигидроксихолекальциферола, предшественником которого является витамин D₂ у детей развивается рахит (аналог рахита у взрослых – остеомаляция).

Трансформация эргостерина в витамин D₂ (кальциферол) происходит под влиянием ультрафиолетового облучения. При этом разрывается связь в кольце (позиции 9,10) и образуется двойная связь в боковой цепочке (позиции 22, 23). Эта последняя гидрирована в витамине D₃ (холекальциферол). Физиологическая активность обоих витаминов (D₂ и D₃) равна.

Наиболее активные продуценты эргостерина – *Saccharomyces*, *Rhodotoryla*, *Candida*. В промышленных масштабах эргостерин получают при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах с избытком сахаров при дефиците азота, высокой температуре и хорошей аэрации. Более интенсивно эргостерин образуют дрожжи рода *Candida* на средах с углеводородами. При получении кристаллического препарата витамина D₂ культивируют плесневые грибы (*Penicillium*, *Aspergillus*). Для получения кормовых препаратов облучают суспензию или сухие дрожжи (*Candida*). Облучают тонкий слой 5 % суспензии дрожжей ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280–300 нм. Кормовые препараты дрожжей содержат в 1 г АСВ 5000 Е витамина D₂ и не менее 46 % сырого белка. Для получения кристаллического препарата витамина дрожжи или грибной мицелий подвергают кислотному гидролизу при 110°C. Витамин экстрагируют спиртом, фильтруют, далее фильтрат упаривают, несколько раз промывают спиртом. Спиртовый экстракт сгущают до 50 % концентрации сухих веществ, омыляют щелочью. Полученные кристаллы витамина очищают перекристаллизацией и сушат в эфире, отгоняя последний. Кристаллический осадок растворяют в масле. Данный препарат используют в медицинских целях. Эргостерин является также исходным продуктом для получения ряда стероидных гормонов, пищевых и лекарственных препаратов.

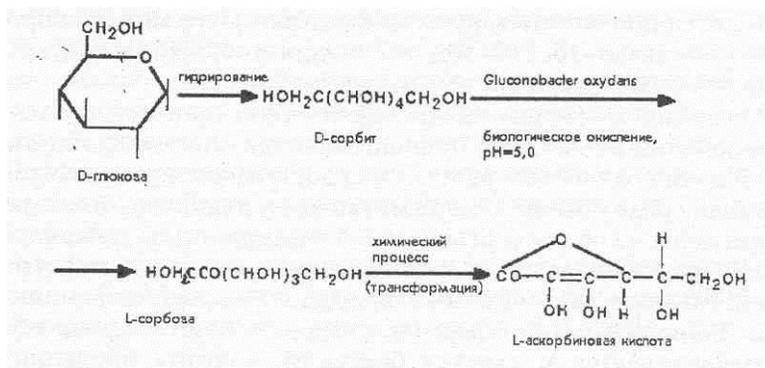
Получение эргостерина в производственных условиях можно подразделить на следующие этапы: размножения исходной культуры и накопление инокулюма, ферментация, сепарирование клеток, облучение клеток ультрафиолетовыми лучами, высушивание и упаковка целевого продукта.

Так, применительно к дрожжам, инокулюм получают на средах, обеспечивающих полноценное развитие клеток, после чего основную среду с ацетатом (активатором биосинтеза стерина), обогащенную источником углерода и содержащую пониженное количество азота (высокое значение C/N), засевают сравнительно большим объемом инокулята. Культивирование дрожжей (ферментацию) проводят при температуре, близкой к максимальной для конкретного штамма, и выраженной аэрации (2% O₂ в газовой фазе). Спустя 3-4 суток, в зависимости от ростовых характеристик и биосинтетической активности культуры, клетки сепарируют и подвергают вакуум-высушиванию. Затем сухие дрожжи облучают ультрафиолетовыми лучами - УФЛ (длина волны 280-300 нм) в течение оптимального по продолжительности времени, при требуемой температуре и с учетом примесных веществ. Эти контролируемые показатели, установленные опытным путем, указываются в регламентной документации. Облучение дрожжей можно проводить до сепарирования клеток в тонком слое 5% суспензии, учитывая малую проникающую способность УФЛ.

Облученные сухие дрожжи применяют в животноводстве; в промышленности их выпускают под названием "кормовые гидролизные дрожжи, обогащенные витамином D₂". В таком препарате содержится не менее 46% сырого белка, незаменимые аминокислоты (лизин, метионин, триптофан) и 5000 МЕ витамина D₂.

В случае получения кристаллического витамина D₂ клетки продуцента гидролизуют соляной кислотой при 110°C, затем температуру снижают до 75-78°C и добавляют этанол. Смесь фильтруют при 10-15°C, оставшуюся после фильтрации массу промывают водой, высушивают, измельчают, нагревают до 78°C и дважды обрабатывают тройным объемом этанола. Спиртовые экстракты объединяют и упаривают до 70%-го содержания сухих веществ. Полученный "липидный концентрат" обрабатывают раствором едкого натра. Эргостерин кристаллизуется из неомыленной фракции концентрата при 0°C. Его очищают повторной перекристаллизацией. Кристаллы высушивают, растворяют в серном эфире, облучают УФЛ, эфир отгоняют, раствор витамина D₂ концентрируют и кристаллизуют. "Кислотный фильтрат" обычно упаривают до 50%-го содержания сухих веществ и применяют как концентрат витаминов. Производят также масляный концентрат витамина D₂.

Аскорбиновая кислота, или витамин С - это противоязвенный витамин, имеющийся у всех высших растений и животных; только человек и микробы не синтезируют ее, но людям она неотложно необходима, а микробы не нуждаются в ней. И, тем не менее, определенные виды уксуснокислых бактерий причастны к биосинтезу полупродукта этой кислоты - L-сорбозы. Таким образом, весь процесс получения аскорбиновой кислоты является смешанным, то есть химико-ферментативным.



Биологическая стадия процесса катализируется мембраносвязанной полиолдегидрогеназой, а последняя (химическая) включает последовательно следующие этапы: конденсация сорбозы с диацетон-тоном и получение диацетон - L-сорбозы, окисление диацетон --L-сорбозы до диацетон-2-кето-β-гулоновой кислоты, подвергаемой затем гидролизу с получением 2-кето-1,-гулоновой кислоты; последнюю подвергают энолизации с последующей трансформацией в L-аскорбиновую кислоту.

Ферментацию *G. oxydans* проводят на средах, содержащих сорбит (20%), кукурузный или дрожжевой экстракт, при интенсивной аэрации (8-10 г O₂/л/ч). Выход L-сорбозы может достигнуть 98% за одни-двое суток. При достижении культурой log-фазы можно дополнительно внести в среду сорбит, доводя его концентрацию до 25%. Также установлено, что *G. oxydans* может окислять и более высокие концентрации полиспирта (30-50%), создаваемые на последних стадиях процесса. Это происходит благодаря полиолде-гидрогеназы, содержащейся в клеточной биомассе. Ферментацию бактерий проводят в периодическом или непрерывном режиме. Принципиально доказана возможность получения L-сорбозы из сорбита с помощью иммобилизованных клеток в ПААГ.

Каротиноиды - это изопrenoидные соединения, синтезирующиеся многими пигментными микроорганизмами из рода *Aleuria*, *Blakeslea*, *Corynebacterium*, *Flexibacter*, *Fusarium*, *Halobacterium*, *Phycomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Sarcina*, *Sporobolomyces* и др. Всего описано около 500 каротиноидов.

Из одной молекулы -каротина при гидролизе образуются две молекулы витамина А. Это имеет место, например, в кишечнике человека.

Каротиноиды локализуются в виде сложных эфиров и гликозидов в клеточной мембране микроорганизмов, либо в свободном состоянии - в липидных гранулах в цитоплазме. Каротиноид "ретиаль" у галофильного вида - *Halobacterium halobium* - соединен с белком через остаток лизина (опсинопо-добный белок); он участвует в синтезе АТФ благодаря генерации транс мембранного потенциала. В целом, основная функция каротиноидов - защитная. Их биосинтезу в клетках способствует свет.

В качестве продуцентов каротиноидов можно использовать бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы. Более часто применяют зигомицеты *Blakeslea trispora* и *Choanephora conjuncta*. Спаривающиеся (+) и (-) штаммы этих видов при совместном культивировании могут образовать 3-4 г каротина на 1 л среды.

Питательные среды для производства витаминов сложные и включают источники углерода, азота, витаминов, микроэлементов, специальных стимуляторов (гидрол, кукурузно-соевая мука, растительные масла, керосин, -ионон или изопреновые димеры).

Вначале штаммы выращивают отдельно, а затем - совместно при 26°C и усиленной аэрации с последующим переносом в основной ферментатор. Длительность ферментации - 6-7 дней. Каротиноиды извлекают ацетоном (или другим полярным растворителем), переводят в неполярный растворитель. В случаях извлечения белково-каротиноидных комплексов, применяют поверхностно-активные вещества в концентрации 1-2%. В целях очистки и более тонкого разделения можно прибегать к методам хроматографии или к смене растворителей. Витамин А из (3-каротина сравнительно легко можно получить при гидролизе.

В случае изготовления каротинсодержащей биомассы для скормливания животным и птицам возможно ее сочетанное применение с витамином А или без него. В медицинских целях витамин А изготавливают в капсулах для приема через рот.

Пантотеновая кислота (витамин В5)



Пантотеновая кислота - один из витаминов группы В, молекулярная масса 219,24. Неустойчивое, гигроскопичное, светло-желтое, вязкое, маслообразное вещество; $[\alpha]_D^{25} +37,5^\circ$ (вода); хорошо растворим в воде, метаноле, этаноле, этилацетате, диоксане, пиридине, плохо - в диэтиловом эфире и высших спиртах, практически не растворим в бензоле и хлороформе. Для Са- и Na-солей пантотеновая кислоты тпл. 193,5-195 и 122-124°C, $[\alpha]_D^{20} +25-28,5$ и $+27-29^\circ$ (вода) соответственно. Соли пантотеновой кислоты - бесцветные кристаллы; хорошо растворимы в воде, хуже - в метаноле и этаноле, практически не растворимы в ацетоне, диэтиловом эфире и хлороформе; устойчивы на воздухе и в водных растворах в интервале pH 5,5-7,0, в кислой или щелочной среде гидролизуются до б-аланина $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ и пантолактона или пантоевой кислоты $\text{HOCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ (2,4-дигид-рокси-3,3-диметилмасляная кислота).

Пантотеновая кислота по химическим свойствам - типичный представитель гидроксикислот, может образовывать различные производные как по карбоксильной группе (сложные эфиры, амиды, хлорангидрид, азид, соли), так и по гидроксильной группе (сложные и простые эфиры).

Витамин синтезируется зелеными растениями, микроорганизмами, в т.ч. микрофлорой млекопитающих (авитаминозы, связанные с отсутствием пантотеновой кислоты, у человека поэтому обычно не наблюдаются). Особенно богаты пантотеновой кислотой печень (7-11 мг в 100 г) и почки (3,4-4,7 мг) высших животных, эмбриональные клетки (желток 2,7-7,0 мг), злаки (1,0-2,6 мг). В процессе хранения продуктов и их обработки потери витамина составляют 25-50%. Потребность в пантотеновой кислоте у высших животных составляет 0,1-2,5 мг/кг массы. Признаки дефицита пантотеновой кислоты у человека неспецифичны. У животных отмечается задержка роста, дерматит, выпадение шерсти, поражение желудочно-кишечного тракта, адреналовой системы (вырабатывает и выделяет в кровь катехоламины) и др.

Биологическая роль пантотеновой кислоты обусловлена её участием в биосинтезе кофермента А (КоА) - молекулярная масса 767,54; бесцветные кристаллы; хорошо растворим в воде; $\lambda_{\text{макс}} 260 \text{ нм}$ (pH 2); $\epsilon 14,6 \cdot 10^3$.

Пантотеновая кислота в виде КоА участвует в углеводном и жировом обмене, в синтезе ацетилхолина, в коре надпочечников стимулирует образование кортикостероидов.

Биосинтез пантотеновой кислоты осуществляется из пантоевой кислоты (она синтезируется из 2-оксоизовалериановой кислоты) и р-аланина. Биосинтез КоА из пантотеновой кислоты происходит в различных органах в тканях и включает образование промежуточного 4'-фосфопантетеина.

Катаболизм КоА у высших животных на первых стадиях осуществляется неспецифическими деацилазами и фосфатазами до 4'-фосфопантетеина или пантетеина. Пантетеиназа, активность которой особенно высока в почечной ткани, гидролизует эти катаболиты до 4'-фосфопантотеновой кислоты, пантотеновой кислоты и цистеина $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$, являющихся конечными продуктами в катаболизме КоА у животных.

Большинство микроорганизмов являются пантотенатпрототрофными, т. е. осуществляют биосинтез пантотеновой кислоты. Её катаболизм у микроорганизмов начинается с гидролиза витамина до D-пантоевой кислоты и б-аланина; D-пантоевая кислота в последовательных реакциях превращается в D-4-оксопантоевую, D-3,3-диметилаллоичную и далее в 2-оксоизовалериановую кислоту.

Промышленное получение пантотеновой кислоты в форме её солей осуществляют через D-пантолактон или D-пантамид. Выход конечного продукта около 80%. Химические методы синтеза КоА не нашли практического применения из-за их многостадийности и низкого выхода. Разработан микробиологический синтез кофермента из пантотеновой кислоты с использованием бревибактерий (*Brevibacterium*).

Определение свободной пантотеновой кислоты и её солей осуществляют колориметрическими методами, основанными на цветных реакциях продуктов их гидролитического расщепления в кислой или щелочной среде, методом газожидкостной хроматографии производных пантотеновой кислоты и продуктов её распада или микробиологическими методами с тест-культурами. КоА определяют спектральным методом при λ 260 нм, посредством колориметрических реакций на группы SH, с помощью ферментного анализа (с использованием 2-оксоглутаратдегидрогеназы, фосфотрансацетилазы и др.). Эффективное разделение и анализ пантотеновой кислоты, предшественников биосинтеза КоА, самого КоА и ацил-КоА осуществляют с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Пантотеновую кислоту применяют как лекарственное средство в виде Са или Na-соли и пантенола (действующее начало этого препарата - пантотениловый спирт). Потребность взрослого человека в пантотеновой кислоте 10-15 мг/сут, в период беременности и лактации, тяжелом физическом труде, гипертермии существенно увеличивается. Препараты пантотеновой кислоты используют внутрь, парентерально и местно при заболеваниях кожи (экзема, дерматозы и др.), интоксикациях (алкоголизм, осложнения при терапии антибиотиками), заболеваниях желудочно-кишечного тракта и др., а также как добавка к кормам животных.

Убихиноны

Жирорастворимые коферменты, представленные преимущественно в митохондриях эукариотических клеток. Убихинон — является компонентом цепи переноса электронов и принимает участие в окислительном фосфорилировании. Максимальное содержание убихинона в органах с наибольшими энергетическими потребностями, например, в сердце и печени.

История. В 1955 году был впервые употреблен термин кофермент Q для обозначения вещества, содержащегося практически во всех живых клетках. В 1957-58 годах учеными Фредериком Крейном и Карлом Фолкерсом были получены препараты убихинона и была установлена его химическая структура. В 1965 году Ямамура с сотрудниками впервые применили кофермент Q для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В 1978 году за описание процессов хемиосмотического фосфорилирования Питер Митчелл удостоен Нобелевской премии в области химии. В 1997 году основан Международный центр по изучению убихинона.

Физико-химические свойства. По химической природе кофермент Q имеет сходство в строении молекулы с витаминами E и K и представляет собой 2,3-диметокси-5-метил-1,4-бензохинон с изопреновой цепью в 6-м положении. Число остатков изопрена в боковой цепи убихинон в разных организмах варьируется от 6 до 10. Такие варианты кофермента Q обозначают как Co Q₆, Co Q₇ и т. д.

В клетках Saccharomyces cerevisiae содержится Co Q₆, Escherichia coli — Co Q₈, грызунов — Co Q₉. В митохондриях клеток большинства млекопитающих, включая человека, встречается убихинон только с 10 изопреновыми звеньями.^[1]

Кофермент Q представляет собой желто-оранжевые кристаллы без вкуса и запаха. Температура плавления 49-51° С. Растворим в диэтиловом эфире, очень слабо растворим в этаноле, практически нерастворим в воде. На свету постепенно разлагается и окрашивается. С водой образует эмульсию с концентрацией 10 %, 20 % и 40 %.

Биосинтез убихинона. В организме человека кофермент Q синтезируется из меваляновой кислоты и производных тирозина и фенилаланина.

Биохимическая роль. Кофермент Q принимает участие в реакциях окислительного фосфорилирования, является компонентом цепи переноса электронов в митохондриях. Ингибиторы работы убихинона останавливают реакции окислительного фосфорилирования.

Кофермент Q является компонентом цепи переноса электронов, принимает участие в переносе электронов с NADH-дегидрогеназного комплекса (комплекс I) и сукцинатдегидрогеназного комплекса (II) на комплекс III, и участвует таким образом в синтезе АТФ.

Также кофермент Q является антиоксидантом и, в отличие от других антиоксидантов, регенерируется организмом. Кроме того, кофермент Q восстанавливает антиоксидантную активность витамина E — α-токоферола.

Антиоксидантное действие кофермента Q обусловлено главным образом его восстановленной формой (Co QH₂). Активность восстановленной формы кофермента Q на три порядка выше невосстановленной. Реакцию нейтрализации свободных радикалов восстановленным коферментом Q можно записать следующим образом $2\text{LOO}\cdot + \text{Co QH}_2 \rightarrow 2\text{LOOH} + \text{Co Q}$.

Содержание в различных тканях организма. Кофермент Q необходим для нормальной жизнедеятельности живых организмов и, прежде всего, для функционирования тканей с высоким уровнем энергетического обмена. Наибольшая концентрация кофермента Q — в тканях сердечной мышцы. Естественный уровень кофермента Q в крови человека составляет около 1 мг/мл.

Дефицит. Существует мнение, что старение (снижение функциональных возможностей сердца и других органов) связано со снижением концентрации кофермента Q. Например, миокард людей старше 60 лет содержит на 40-60 % меньше кофермента Q, чем миокард молодых людей. Показано, что двадцати годам концентрация кофермента Q в миокарде достигает максимума, к сорока годам содержание падает на 30 %, а к 60 годам — на 50 % от максимального значения.

С другой стороны, возраст не является единственной причиной снижения содержания кофермента Q в организме. Снижение концентрации кофермента Q в организме *может происходить* и при различных заболеваниях. Некоторые исследователи связывают дегенеративные заболевания (атеросклероз, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера) с недостатком естественного синтеза кофермента Q. Дефицит кофермента Q может также возникать при гипертиреозе, гепатитах, бронхиальной астме.

Применение в медицине.

Препараты на основе кофермента Q применяют для профилактики и терапии заболеваний сердечно-сосудистой си-

стемы. Было показано, что кофермент Q эффективен в комплексной терапии:

- сердечной недостаточности;
- ишемической болезни сердца (стенокардия, инфаркт миокарда, постинфарктный кардиосклероз);
- атеросклероза;
- артериальной гипертонии;
- кардиомиопатии;
- диастолической дисфункции миокарда;
- миокардиодистрофий различного происхождения;
- нарушениях сердечного ритма и проводимости.

За последние 20 лет проведены десятки клинических исследований с участием тысяч больных с различными формами сердечно-сосудистых заболеваний. Большинство больных кофермент Q в составе комплексной терапии сразу после выявления диагноза. У некоторых больных улучшение состояния было поразительным: сердце восстанавливало нормальные размеры и сократительную функцию. В более развитых формах заболевания полного восстановления не происходило, однако наблюдалось явное улучшение состояния.

Большинство исследований по клиническому применению кофермента Q₁₀ было проведено именно при сердечной недостаточности. Также было показано, что тяжесть сердечной недостаточности коррелирует с низким уровнем кофермента Q.

Наиболее масштабное исследование было проведено в 1994 году в Италии: в исследовании приняли участие 2 664 человека с сердечной недостаточностью.^[14] За три месяца лечения у значительной части больных наблюдалось заметное улучшение состояния. При этом нормализовались следующие показатели: цианоз (у 78,1 %), отеки (у 78,6 %), субъективное ощущение больными аритмии (у 63,4 %), бессонница (у 66,28 %), головокружение (у 73,1 %). Побочные явления наблюдались у 36 больных (1,5 %), из которых только у двадцати человек они были связаны с применением кофермента Q.

Эффективность применения препаратов кофермента Q при ишемической болезни сердца подтверждена клиническими исследованиями. В одном из исследований 73 пациента после острого инфаркта миокарда наряду со стандартной терапией получали кофермент Q, участники контрольной группы (71 пациент) продолжали стандартную терапию. Через двенадцать месяцев применения было выявлено, что в группе, принимавшей препараты кофермента Q в 2 раза реже случались сердечно-сосудистые события (24 % против 45 %), нефатальные инфаркты миокарда (13,7 % против 25 %) и кардиальная смерть. При этом тошнота намного чаще отмечалась у больных контрольной группы (40,8 % против 6,8 %), что свидетельствует об отсутствии побочных эффектов.

Выявлен возможный механизм положительного действия кофермента Q — предотвращение развития синдрома удлинённого QT. Как известно, данный синдром связан с более частой кардиальной смертью, особенно у больных инфарктом миокарда. Исследователи в течение 1 года наблюдали больных с острым инфарктом миокарда. Через 6 часов после начала острого инфаркта миокарда больные на фоне одинакового лечения, применяемого в постинфарктном периоде, получали либо плацебо, либо комплекс антиоксидантов, состоящий из кофермента Q и селена. У 40 % больных контрольной группы наблюдалось удлинение интервала QT > 440 мсек., в группе, получавшей антиоксиданты, удлинения интервала не наблюдалось. В течение года умерло от повторных инфарктов шесть больных контрольной группы и ни одного пациента из основной группы (за исключением одной смерти от некардиальной причины).

При атеросклерозе важную роль в патологии заболеваний играет перекисное окисление липидов. В норме данное состояние предотвращается за счет работы антиоксидантной системы (помимо кофермента Q в нее входят: витамин С, бета-каротин, альфа-токоферол и другие). С возрастом концентрация кофермента Q в тканях падает, в связи с чем возрастает риск возникновения и прогрессирования атеросклероза. К настоящему моменту показано положительное влияние приема кофермента Q на жировые отложения в дуге аорты у животных с моделированным атеросклерозом.

Другой причиной атеросклероза является нарушение целостности эндотелия сосудов. Было показано, что кофермент Q улучшает эндотелиальную дисфункцию плечевой артерии у больных сахарным диабетом второго типа.

Было показано гипотензивное действие кофермента Q. Были проанализированы 12 клинических исследований применения кофермента Q при артериальной гипертонии. Прием кофермента Q при артериальной гипертонии приводил к снижению систолического артериального давления в среднем на 16 мм рт. ст., а диастолического — на 10 мм рт. ст. Таким образом, кофермент Q может быть альтернативой лекарственным средствам, снижающим давление, либо усиливать эффект таких средств.

В педиатрии кофермент Q применяют как для улучшения энергообмена в клетках, так и в качестве антиоксиданта.

В 2003 году были опубликованы результаты небольшой работы, показавшей эффективность применения кофермента Q при идиопатической дилатационной кардиомиопатии у детей в возрасте от двух месяцев до одиннадцати лет.^[15] Дети после стабилизации состояния в дополнение к традиционной терапии получали кофермент Q в дозе 10 мг/кг в сутки. В результате проводимого лечения было зафиксировано достоверное улучшение сердечной функции. У 5 из 6 детей отмечено уменьшение класса сердечной недостаточности на 2 класса, у шестого ребёнка — на 1 класс. Также было отмечено улучшение фракции укорочения (на 17-30 %), увеличение фракции выброса (на 40-60 %).

Опубликованы результаты более крупного исследования эффективности и безопасности препаратов кофермента Q для лечения идиопатической хронической дилатационной кардиомиопатии у детей.^[16] Пятнадцать детей в возрасте от шести месяцев до шестнадцати лет получали 3 мг/кг в сутки кофермента Q в дополнение к обычной терапии на протяжении по

меньшей мере девяти месяцев. По результатам исследования было отмечено улучшение класса сердечной недостаточности, что свидетельствует об улучшении сердечной функции.

Показана роль дегенеративно-дистрофических и свободнорадикальных процессов в патогенезе нарушений сердечного ритма и проводимости у детей. Эффективность кофермента Q изучали в комплексной терапии детей с нарушениями сердечного ритма. При экстрасистолии II—III функционального класса кофермент Q оказывал общее противоаритмическое действие в 63 % случаев, вызывая у четверти больных полное подавление аритмии. У детей с рефрактерными желудочковыми и суправентрикулярными тахикардиями препараты кофермента Q увеличивают эффективность традиционных противоаритмических препаратов и предупреждают возникновение осложнений.

Также показана эффективность применения препаратов кофермента Q у детей с нарушенными процессами реполяризации (хронические тахикардии, синдром удлиненного интервала Q-T, кардиомиопатии, экстрасистолии, синдром слабости синусового узла).

По мнению некоторых ученых одним из факторов риска попадания ребенка в группу «часто болеющих детей» является дефицит энергии. Поэтому таким детям целесообразно применять препараты, улучшающие процессы энергетического обмена. Применение препаратов кофермента Q позволяет существенно улучшить состояние здоровья часто болеющих детей, стабилизируя в том числе механизмы вегетативной регуляции и клеточного энергообмена.

Прием препаратов кофермента Q помогает корректировать дисфункции миокарда у детей с вегетативной дистонией, способствует уменьшению других ее клинических проявлений (нарушения сна, утомляемость, головные боли, кардиалгии).

Многие заболевания почек сопровождаются значительной активацией перекисного окисления липидов и снижением содержания антиоксидантов в крови. В связи с этим при некоторых воспалительных заболеваниях неспецифической этиологии, наряду с общепринятым медикаментозным лечением оправдано назначение антиоксидантов. Применение кофермента Q в комплексной терапии пиелонефрита у детей в период стихания заболевания способствует снижению активности перекисного окисления липидов, повышению активности внутриклеточных ферментов и АОА-плазмы в целом, способствует детоксикации и улучшению аппетита.

Таким образом, препараты кофермента Q эффективны в комплексной терапии заболеваний различной этиологии. Прием препаратов кофермента Q способствует также улучшению сна, повышает уровень восприятия физических и интеллектуальных нагрузок, нормализует механизмы вегетативной регуляции.

ТЕМА 6.

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ. ИНСУЛИНЫ. ИНТЕРФЕРОНЫ. СТЕРОИДЫ.

Первое поколение таких препаратов составляли продукты животного и растительного происхождения — бычий инсулин, стрептокиназа, стафилокиназа и др. Вслед за ними стали производить продукты человеческого происхождения, такие как гормон роста или антигемофильный фактор VIII. В последние десятилетия получены человеческие рекомбинантные продукты дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК-продукты) — интерфероны γ , α и β , эритропоэтин (ЭПО), инсулин, гранулоцитостимулирующий фактор, гормон роста и ряд других. Первый человеческий белок (соматостатин), произведенный методом генной инженерии с использованием микроорганизмов (*E. coli*), был получен в 1977 г. Этот белок — гормон роста — предназначался для детей с его дефицитом. В 1978 г. создан рекомбинантный человеческий инсулин; в 1982 г. он стал первым биофармацевтическим препаратом, выпущенным на рынок. В 1981 г. разработан рекомбинантный интерферон γ , противовирусный препарат; в 1985–1986 гг. на рынок выведен рекомбинантный интерферон α — эффективное средство против вирусных инфекций, в частности хронических гепатитов (его также применяют в онкологии в качестве дополнительной терапии). В 1989 г. на фармацевтическом рынке появился первый препарат ЭПО для лечения ренальной анемии и анемии в онкологии, производимый в необходимых количествах овариальными клетками китайского хомячка. Таким образом, подавляющее большинство применяемых сегодня БЛС представляют собой рекомбинантные белки, полученные методом генной инженерии с помощью прокариотических клеток бактерий либо эукариотических клеток млекопитающих.

Истечение сроков патентной защиты оригинальных эпоэтинов стимулировали разработку новых версий этих продуктов, что способствует росту конкуренции и снижению цен. Окончание сроков действия патентов может стимулировать производителей инновационных продуктов на разработку и производство препаратов следующих поколений, но при этом существует опасность падения интереса к новаторству из-за возможного снижения прибыльности на фоне обостряющейся конкуренции. Появление аналогов БЛС ставит перед регуляторными органами задачу их контроля. Когда речь идет о традиционных фармпрепаратах, для вывода на рынок непатентованных дженерических лекарственных средств (ЛС) по упрощенной процедуре регистрации достаточно продемонстрировать их физико-химическое подобие и биологическую равноценность с помощью фармакокинетических и фармакодинамических исследований, проводимых на здоровых добровольцах. Такая концепция не применима по отношению к аналогам БЛС из-за трудности воспроизводства сложных белков, например таких, как ЭПО. Молекулы биологических ЛС отличаются значительно большими размерами по сравнению с веществами, полученными методом химического синтеза, и приобретают после трансляции третичную структуру. Такая молекулярная структура определяет функции этих веществ. В среднем молекулярная масса БЛС превосходит молекулярную массу химических препаратов в 100–1000 раз. У химических соединений конечный продукт представлен единой молекулой (или несколькими, но в очень небольшом числе), в то время как биопрепарат состоит из огромного числа смеси разных молекул. Такая смесь может быть высоковоспроизводимой при использовании мощной стандартизации и контроля на всех этапах производственного процесса, в то же время из-за сложности строения воссоздать точную копию биологическо-

го препарата практически невозможно, поскольку они не могут быть полностью «биотождественными», а только лишь «биоаналогичными». По тем же причинам невозможна адекватная характеристика биофармацевтических препаратов: невозможно адекватно охарактеризовать их с помощью существующих методов анализа.

Тем не менее в российском законодательстве до настоящего времени отсутствуют такие понятия, как «биофармацевтические» или «биологические» лекарственные средства и их «биоаналоги», что не может не вызывать определенного беспокойства.

ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

ИНСУЛИН. Инсулин синтезируется клетками островков Лангерганса поджелудочной железы; 70% мРНК, выделенных из этих клеток, кодируют именно этот белок.

Человеческий инсулин - полипептид с м.м. 5808, состоящий из 51-й аминокислоты, которые образуют две соединенные дисульфидными мостиками полипептидные цепи (одна цепь состоит из 21 аминокислоты, так называемая цепь А; другая - из 30 аминокислотных остатков, так называемая цепь В). Аминокислотный состав цепей видоспецифичен. Предшественник инсулина продуцируется внутри клеток посредством ДНК- и РНК-управляемого синтеза. Длинная цепь проинсулина в аппарате Гольджи упаковывается в гранулы, где в результате гидролиза удаляются четыре аминокислоты с образованием инсулина и связывающего пигмента, называемого С-пептидом. Инсулин и С-пептид в эквивалентных концентрациях секретируются в ответ на все стимуляторы секреции инсулина (глюкозу, маннозу и некоторые аминокислоты - лейцин, аргинин). Выделяется также небольшое количество нативного или частично гидролизованного проинсулина, который оказывает некоторое гипогликемическое действие. В гранулах клеток инсулин депонируется в виде кристаллов, состоящих из двух атомов цинка и шести молекул инсулина. В целом, человеческая поджелудочная железа содержит до 8 мг инсулина, что составляет приблизительно 200 биологических «единиц» (количество единиц определяют по массе препарата; существующий инсулиновый стандарт, используемый в аналитических целях, составляет 28 ЕД/мг).

Инсулин обладает мощным действием, охватывающим биосинтез нуклеиновых кислот, белков, обмен углеводов, липидов, продукцию высокоэнергетических соединений. Инсулин регулирует углеводный обмен, усиливает усвоение тканями глюкозы и способствует превращению ее в гликоген, облегчает проникновение глюкозы в клетки тканей. Будучи специфическим средством терапии сахарного диабета, инсулин снижает гипергликемию и глюкозурию, пополняет депо гликогена в мышцах и печени, уменьшает образование глюкозы, снимает диабетическую липемию, улучшает общее состояние больного. Единственное отличие больного человека от здорового в том, что здоровые получают этот гормон благодаря собственной поджелудочной железе, больные – из рук Государства.

Сахарным диабетом I типа - инсулинзависимым диабетом (ИЗСД) официально больны свыше 3 млн российских граждан, «неофициально» - до 10 млн. Известно, что ИЗСД (тяжелая форма, при отсутствии лечения приводящая к кетозу), наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями занимает одно из ведущих мест по медико-социальной значимости и является причиной ранней инвалидности и высокой смертности. Диабет II типа - инсулиннезависимый (ИНЗСД) включает более легкие формы диабета. Диабетом этого типа чаще болеют тучные люди.

История открытия инсулина связана с именем русского врача И.М. Соболева (вторая половина 19 в.), доказавшего, что уровень сахара в крови человека регулируется специальным гормоном поджелудочной железы.

В 1922 г. инсулин, выделенный из поджелудочной железы животного, был впервые введен 10-летнему мальчику (Торонто), больному диабетом. Результат превзошел все ожидания, и уже через год выпустили первый препарат животного инсулина. Поджелудочная железа крупного рогатого скота (КРС) и свиней поставляется бойнями, где опытный персонал по разработанной методике извлекает железы из туш, их быстро замораживают (оптимальная температура - 70°C) и в вагонах-рефрижераторах направляют на фармацевтические предприятия, где экстрагируют гормон. Масса поджелудочной железы КРС составляет в среднем 200-250 г, для получения 100 г кристаллического инсулина требуется 1000-1200 кг исходного сырья. Бычий (говяжий) гормон, в отличие от свиного, обладает несколько большей антигенностью для человека. После получения первой промышленной партии инсулина в последующие несколько лет пройден огромный путь его выделения и очистки, в результате гормон стал доступен для лечения больных сахарным диабетом I типа, для адекватного контроля уровня глюкозы в крови инсулин нужно было вводить подкожно 4 раза в сутки.

В 1935 г. датский исследователь Хагедорн оптимизировал действие инсулина в организме, предложив пролонгированный препарат протамин-цинк-инсулин (вводили один раз в сутки).

Первые кристаллы инсулина были получены в 1952 г.; развитие методов очистки гормона (иммуноэлектрофорез) от других гормональных веществ (глюкагона - антагониста инсулина и соматостатина, последний подавляет выделение инсулина и глюкагона) и продуктов деградации инсулина позволили получить гомогенный инсулин, называемый однокомпонентным.

В 1954 г. английский биохимик Г. Сенджер получил Нобелевскую премию за расшифровку структуры инсулина.

Синтез обеих цепей инсулина и соединение их дисульфидными связями был проведен в 1963-1965 гг. В начале 70-х гг. советскими учеными А. Юдаевым и С. Швачкиным был предложен химический синтез инсулина. Осуществить в промышленном масштабе столь дорогостоящими и сложный синтез полипептидного гормона, состоящего из десятков аминокислотных остатков, нерентабельно, в том числе и по причине малого выхода.

В 70-е гг. 20 в. шло прогрессирующее улучшение степени очистки инсулинов, что уменьшило проблемы, обусловленные инсулиновой аллергией, нарушениями работы почек, расстройством зрения и иммунной резистентностью к инсулину. Со времени открытия и до начала 80-х гг. использовали инсулин, получаемый из поджелудочной железы КРС и свиней. Инсулин КРС отличается тремя аминокислотами, свиней – одной аминокислотой от инсулина человека. Наиболее эф-

фактивный гормон для заместительной терапии при сахарном диабете – гомологичный инсулин, т.е. инсулин человека.

В 1980 г. датская фармацевтическая компания «Novo» разработала метод превращения инсулина свиньи в инсулин человека ферментативным замещением аланина, последний является 30-й аминокислотой в цепи В, на остаток треонина с последующей хроматографической очисткой продукта, в результате был получен однокомпонентный инсулин человека 99% чистоты.

Достижения молекулярной биологии позволили установить, что биосинтез инсулина в клетках островковой ткани происходит по следующим основным этапам:

закодированная информация о структуре гормона содержится в инсулиновом гене (участок ДНК) 11-й хромосомы; в результате стимулирующего действия, прежде всего глюкозы и некоторых других веществ, эта информация списывается РНК-полимеразой с инсулинового гена в виде мРНК на рибосомах, в которых осуществляется соединение аминокислот с образованием белков. На рибосомах происходит сборка полипептидной цепи из 109 аминокислот с образованием препроинсулина под влиянием рестриктаз, в результате образуются фрагменты от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидов;

при синтезе препроинсулина в клетках поджелудочной железы первые 23 аминокислоты «проводят» молекулу через мембрану клетки. Эти аминокислоты отщепляются рестриктазами и образуется пептид проинсулин, состоящий из 86 аминокислот. Молекула проинсулина сворачивается таким образом, что начальный и конечный её сегменты сближаются, а центральная часть молекулы удаляется под влиянием ферментов рестрикции; роль центральной части сводится к правильному взаимному расположению двух цепей инсулина.

В Великобритании с помощью *E. coli* синтезированы обе цепи человеческого инсулина, которые затем были соединены в молекулу биологически активного гормона. Чтобы одноклеточный организм мог синтезировать на своих рибосомах молекулы инсулина, необходимо снабдить его нужной программой, т.е. ввести ему ген гормона. Химическим способом (операцию проводят специалисты биохимики) получают ген, программирующий биосинтез предшественника инсулина или два гена, программирующие в отдельности биосинтез цепей А и В инсулина. Следующий этап - включение гена предшественника инсулина (или гены цепей инсулина порознь) в геном *E. coli* - особого штамма кишечной палочки, выращенного в лабораторных условиях; эту задачу выполняет генная инженерия. Из *E. coli* вычлениют плазмиду соответствующей рестриктазой. Синтетический ген встраивается в плазмиду (клонированием с функционально активной С-концевой частью β -галактозидазы *E. coli*). В результате *E. coli* приобретает способность синтезировать белковую цепь, состоящую из β -галактозидазы и инсулина. Синтезированные полипептиды отщепляют от фермента химическим путём, затем проводят их очистку. В бактериях синтезируется около 100000 молекул инсулина на бактериальную клетку.

Природа гормонального вещества, продуцируемого *E. coli*, обусловлена тем, какой ген встраивается в геном одноклеточного организма. Если клонирован ген предшественника инсулина, бактерия синтезирует предшественник инсулина, который подвергается затем обработке рестриктазами для отщепления препептида с вычлениением С-пептида, вследствие чего получается биологически активный инсулин. Для получения очищенного инсулина человека выделенный из биомассы гибридный белок подвергают химико-ферментативной трансформации и соответствующей хроматографической очистке (фронтальной, гель-проникающей, анионообменной).

В Институте биоорганической химии РАН получен рекомбинантный инсулин с использованием генно-инженерных штаммов *E. coli*. Из выращенной биомассы выделяется предшественник, гибридный белок, экспрессируемый в количестве 40% от всего клеточного белка, содержащий препроинсулин. Превращение его в инсулин *in vitro* осуществляется в той же последовательности, что и *in vivo* - отщепляется лидирующий полипептид, препроинсулин превращается в инсулин через стадии окислительного сульфитолиза с последующим восстановительным замыканием трёх дисульфидных связей и ферментативным вычлениением связывающего С-пептида. После ряда хроматографических очисток, включающих ионообменные, гелевые, получают человеческий инсулин высокой чистоты и природной активности.

Использование аффинной хроматографии значительно снизило содержание в препарате загрязняющих белков с более высокой М.м., чем у инсулина. К таким белкам относятся проинсулин и частично расщепленные проинсулины, которые способны индуцировать выработку антиинсулиновых антител. Стандартизация инсулина по загрязнению классифицирует препараты на обычные, содержащие про инсулина более 1 %, монопиковые - менее 0,3% п, улучшенные монопиковые - менее 0,005% и монокомпонентные, содержащие менее 0,001% проинсулина. Использование человеческого инсулина с самого начала терапии сводит к минимуму возникновение аллергических реакций. Наиболее частые осложнения инсулиновой терапии - гипогликемические состояния, основными признаками избытка инсулина являются нарушения функции ЦНС (спутанность сознания, странное поведение, кома).

В массовом производстве человеческого инсулина использует технологию рекомбинантных ДНК, помещая к ДНК гена человеческого проинсулина в *E. coli* или *S. cerevisiae* и гидролизую наработанный проинсулин до молекулы инсулина. Человеческие инсулины этой фирмы носят название «Хумулин». В медицинской практике используют рекомбинантные человеческие инсулины из серии Хумулин - регулярный, НПХ, ленте, ультраленте и их комбинированные составы. Человеческий инсулин быстрее абсорбируется и независимо от формы препарата имеет более короткую длительность действия, чем животные инсулины. Человеческие инсулины менее иммуногенны, чем свиные, особенно смешанные бычьи и свиные инсулины.

В молекуле инсулина обнаружены области, играющие повышенную роль в его физико-химических и биологических свойствах. При внесении мутационных изменений в аминокислотную последовательность этих областей, существенным образом изменяются свойства молекулы в целом. Удалось получить аналоги с модификацией В-цепи, что привело к значи-

тельному увеличению гормональной активности по сравнению с природным инсулином.

Контроль качества генно-инженерного инсулина предполагает контроль дополнительных показателей, характеризующих стабильность рекомбинантного штамма и плазмиды, отсутствие постороннего генетического материала в препарате, идентичность экспрессируемого гена и др. (всего 22 показателя).

В настоящее время в медицинской практике используют инсулины трех типов:

короткодействующие с быстрым началом эффекта;

средней продолжительности действия;

длительного действия с медленным проявлением эффекта.

Инсулин короткого действия - регулярный инсулин - представляет собой короткодействующий растворимый при нейтральном значении pH кристаллический цинк-инсулин, эффект которого развивается в течение 15 мин после подкожного введения и продолжается 5-7 ч.

С целью увеличения длительности действия все другие препараты инсулина модифицированы и при растворении в нейтральной среде образуют суспензию. Они содержат протамин в фосфатном буфере - протамин-цинк-инсулин и НПХ (нейтральный протамин Хагедорна) - НПХ-инсулин или различные концентрации цинка в ацетатном буфере - инсулины ультраленте, ленте, семиленте.

Препараты инсулина средней длительности действия содержат протамин, представляющий белок средней м.м. 4400, богатый аргинином и получаемый из молок радужной форели. Для образования комплекса требуется соотношение протамин и инсулина 1:10. После подкожного введения протеолитические ферменты разрушают протамин, позволяя инсулину всасываться.

НПХ-инсулин не изменяет фармакокинетический профиль смешиваемого с ним регулярного инсулина. НПХ-инсулин предпочтительнее инсулина ленте в качестве компонента средней длительности действия в терапевтических смесях, содержащих регулярный инсулин.

В фосфатном буфере все инсулины (свиной, бычий, человеческий) легко образуют кристаллы с цинком, но только кристаллы бычьего инсулина обладают достаточной гидрофобностью, чтобы обеспечить замедленное и стабильное высвобождение инсулина, характерного для ультраленте. Цинковые кристаллы свиного инсулина растворяются быстрее, эффект наступает раньше, длительность действия короче. Поэтому не существует препарата ультраленте, содержащего только свиной инсулин. Монокомпонентный свиной инсулин выпускают под названием инсулин-суспензия, инсулин-нейтрал, инсулин-изофан, инсулин-аминохинурид.

Инсулин ленте - это смесь 30% инсулина семиленте (аморфный преципитат инсулина с ионами цинка в ацетатном буфере, эффект которого развивается относительно быстро) с 70% инсулина ультраленте (плохо растворимый кристаллический цинк-инсулин, имеющий замедленное начало и пролонгированное действие). Эти два компонента обеспечивают комбинацию с относительно быстрой абсорбцией и стабильным длительным действием, делая инсулин-ленте удобным терапевтическим средством.

При введении инсулина в виде аэрозоля на слизистую оболочку носа эффективный уровень препарата в плазме достигается быстро, однако, длительное интраназальное введение инсулина оказывает токсическое действие на слизистую оболочку.

СОМАТОТРОПНЫЙ ГОРМОН (СТГ) ИЛИ ГОРМОН РОСТА ЧЕЛОВЕКА. СТГ - пептидный гормон, состоящий из 191 аминокислоты, секретируется передней долей гипофиза. Впервые гормон был выделен и очищен в 1963 г. из гипофиза, полученного из трупного материала. Дефицит этого гормона приводит к гипофизарной карликовости, частота встречаемости которой оценивается от 7 до 10 случаев на миллион человек (среди детей западных стран она составляет 1 на 5000 человек). Гормон видоспецифичен и является единственным средством лечения детей, страдающих от его недостатка; внутримышечное введение СТГ 10 мг/кг в течение года по три инъекции в неделю, увеличивает рост в течение первого года лечения более чем на 6 см. Для достижения более ощутимых результатов введение гормона необходимо продолжать от возраста 4-5 лет до половой зрелости и даже далее. Из одного трупа удаётся получить 4-6 мг соматотропина в пересчете на конечный фармацевтический препарат.

Общего количества фармацевтического препарата, выпускаемого компаниями крупных производителей СТГ, хватало для лечения лишь одной трети случаев гипофизарной карликовости в развитых странах; недостаток соматотропина оказался ещё более острым с учетом других случаев его применения (незаживающие переломы, ожоги, язвы, нарушение гемопоэза).

К тому же возникли проблемы, связанные с гетерогенностью гормона, выделяемого из трупного материала. Несмотря на совершенствование выделения и очистки гормона, у 5% больных, получавших препарат, вырабатывались антитела, которые сводили на нет его биологическую активность. Кроме того, гипофизарный материал заражён нейротоксическим вирусом с, необычайно длительным инкубационным периодом, поэтому дети, получавшие СТГ, нуждались в многолетнем медицинском наблюдении. Вирус, содержащийся в препаратах СТГ, нередко приводил к летальному исходу. С 1985 г. ВОЗ запрещено применение гормона, выделяемого из человеческих гипофизов.

Рекомбинантный соматотропин, получивший название соматрем, стал вторым (после человеческого инсулина) биосинтетическим фармацевтическим препаратом. СТГ, биологически чистый и свободный от вирусных загрязнений, впервые был получен в 1980 г. Гормон, синтезированный в генетически сконструированных клетках кишечной палочки, отличается от гормона, выделенного из гипофиза, дополнительным остатком метионина на NH₂-конце молекулы (гормон обладает биологической активностью нативного гормона и даже большим эффектом, чем гормон роста из гипофиза, по-видимому,

по причине большей чистоты). У детей, страдающих гипопизарной карликовостью, зарегистрирован прирост 8-18 см в год, что несколько больше эффекта гормона, полученного из гипофиза. На первом этапе клонировали двунитевую ДНК-копию мРНК и расщеплением рестрикционными эндонуклеазами получили последовательность, которая кодирует всю аминокислотную последовательность гормона, за исключением первых 23 аминокислот. Затем клонировали синтетический полипептид, соответствующий аминокислотам от 1-й до 23-й. Далее два фрагмента объединяли, затем «подстроили к паре промоторов (промотор - специфическая последовательность в ДНК, необходимая для инициации транскрипции РНК-полимеразы) и участку связывания рибосом. Конечный выход гормона составил 2,4 мкг на 1 мл культуры E. coli (100000 молекул гормона на клетку). СТГ, синтезированный в бактериях, обладал нужной М.м. и не связан с каким-либо бактериальным белком, от которого его необходимо было бы отщеплять.

Изменяя аминокислотную последовательность СТГ, т.е. его первичную структуру, посредством модификации кодирующего его гена, в бактериальных клетках можно синтезировать аналоги гормона, очень важные для изучения активных участков молекулы (например, участков, которые стимулируют рост или оказывают действие на неогликогенез) и этиологии карликовости на молекулярном уровне.

Используя методы рекомбинантных ДНК, можно синтезировать и другие факторы роста и факторы дифференцировки тканей, выделив вначале их мРНК, затем получив соответствующие гены. Это относится к соматомедину А, стимулирующему фиксацию серы в хряще, образование которого индуцируется соматотропином.

В 1982 г. выделен и синтезирован полипептид, содержащий из 44 аминокислотных остатков, обладающий полной биологической активностью гипоталамического рилизинг-фактора соматотропина (СТГ-РФ). Введение СТГ-РФ способно компенсировать недостаток соматотропина. Применение СТГ-РФ возможно не только для лечения гипопизарной карликовости, но и при некоторых формах диабета и для ускорения регенерации тканей у людей, получивших сильные ожоги.

ИНТЕРФЕРОНЫ

Цитокинами называют эндогенные вещества с помощью которых клетки могут обмениваться друг с другом информацией и осуществлять координацию действий. Говоря иначе, цитокины действуют как апокринные или паракринные факторы, осуществляющие информационный обмен и, таким образом, во многом реализуют взаимодействие клеточных элементов на тканевом, органном и даже системном уровнях. Цитокины продуцируются различными клетками: эндотелиоцитами, кератиноцитами, фибробластами, макрофагами, нейтрофилами, лимфоцитами, тромбоцитами, стромальными и другими клетками.

Со второй половины прошлого столетия обнаружено более сотни таких «локальных гормонов» - это низкомолекулярные пептиды, которые секретируются неэндокринными клетками локально и непостоянно.

Биологическая активность цитокинов проявляется в пиколярных концентрациях через взаимодействие со специфическими рецепторами. Существенное значение имеет баланс самих цитокинов и их рецепторов, количество и качество которых меняется в зависимости от зрелости и функциональной активности клетки. Набор и количества (спектр) цитокинов и рецепторов различных типов клеток, представляют собой матрицу взаимодействующих и часто меняющихся сигналов. Важно подчеркнуть, что передаваемая информация содержится не в индивидуальном пептиде, а в целом наборе этих регуляторных молекул. Цитокины индуцируют синтез друг друга, модулируют соответствующие клеточные рецепторы, взаимодействуя как синергисты или антагонисты, в том числе с другими регуляторными молекулами, например, гормонами.

Эту систему регуляции жизнедеятельности как информационную систему часто называют «цитокиновая сеть», биологическим (биохимическим) выражением которой является «цитокиновая среда».

В иммунной системе важнейшую роль играют интерлейкины, интерфероны, фактор некроза опухоли и др.

Интерферон – полипептид, вырабатывающийся и накапливающийся во всех ядросодержащих клетках крови и эпителиальных клетках слизистых оболочек. Он является основным звеном противомикробной защиты человека. Интерфероны вырабатываются и выделяются местно, в околклеточное пространство. Действуют преимущественно на близлежащие клетки.

В зависимости от типа клеток-продуцентов все интерфероны можно разделить на:

- α-интерфероны.
- β-интерфероны.
- γ-интерфероны.

По способу получения интерфероны делятся на:

1. Природные, получаемые из культуры клеток лейкоцитов человека, стимулированных вирусами.
2. Рекомбинантные, продуцируемые бактериями со встроенным геном интерферона в их геном.

Основные эффекты интерферонов.	α-интерфероны	β-интерфероны	γ-интерфероны
Противоопухолевое действие	сильное	сильное	умеренное
Противовирусная активность	сильная	сильная	слабая
Иммуномодулирующая активность	умеренная	умеренная	сильная
Индукторы	вирусы	вирусы	антигены
Основные клетки-продуценты	МФ	Эпителий, фибробласты	Т-лф, НК

Задолго до открытия интерферона вирусологи столкнулись с малопонятным феноменом интерференции (взаимного подавления) вирусов. В случае заражения животных вирусом одного типа они становились невосприимчивыми к вирусам другого типа.

В 1957 году английский ученый Алик Айзеке и швейцарский Джин Линден-ман впервые получили белок, определяющий феномен интерференции, и назвали его «интерферон». Это открытие послужило толчком к развитию самостоятельного направления в медицинской науке на стыке вирусологии и иммунологии — интерферонологии. Об интенсивности исследований в этой области свидетельствует тот факт, что в день выходит около 1200 научных и медицинских публикаций, связанных с проблемой интерферона.

Было установлено, что интерфероны (ИФН) — это белки, которые могут вырабатываться практически всеми клетками организма в любой момент в ответ на внедрение чужеродной информации вне зависимости от ее природы (вирусы, бактерии, грибы, онкогены).

Главный биологический смысл ИФН — участие в процессах распознавания и удаления чужеродной информации. Уникальность свойств интерферона состоит в сочетании антивирусной, иммуномодулирующей и антипролиферативной активности. Исходя из этого было сформулировано понятие системы интерферона.

Система интерферона включает механизмы индукции и продукции различных белков, отличных по аминокислотной последовательности, молекулярной массе и осуществляемым ими в организме функциям в нескольких наиболее изученных направлениях: формировании противовирусной и антибактериальной защиты, поддержании устойчивости клеток к внедрению микроорганизмов, воздействию на систему клеточного иммунитета. Даже простое перечисление эффектов интерферона свидетельствует о том, что по весомости эта система сравнима с системой иммунитета, а по универсальности — даже превосходит ее.

В начале в медицинскую практику нашей страны были внедрены природные интерфероны. Эта работа проводилась под руководством академика Соловьева В.Д. Первое производство лейкоцитарного интерферона было организовано на базе НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМЫ, его возглавил академик РАЕН Кузнецов В.П. В середине семидесятых годов в целях укрупнения масштабов производства и исключения использования в качестве сырья донорской крови были разработаны способы получения ИФНов генно-инженерным путем. В результате совместной работы институтов АН И АМН СССР под руководством Ю.А. Овчинникова во ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Главмикробиопрома СССР был создан штамм-продуцент рекомбинантного интерферона a_2 . В восьмидесятых годах в системе Главмикробиопрома СССР было организовано производство a_2 интерферона.

Рекомбинантные интерфероны по составу и происхождению делятся на три основных типа: а-ИФН, р-ИФН и у-ИФН.

Схематически действие ИФН можно представить следующим образом: ИФНы индуцируют синтез протеинкиназы, которая фосфорилирует один из иницирующих факторов трансляции. В результате не образуется иницирующий комплекс для начала процесса трансляции. Избирательное подавление трансляции вирусных матриц обусловлено либо большей чувствительностью вирусной системы трансляции к фосфорилированию иницирующего фактора, либо специфическим выключением трансляции зараженной клетки.

Кроме того, активируется специфическая внутриклеточная рибонуклеаза, приводящая к быстрой деградации матричных РНК вируса.

С этих позиций легко объяснить антивирусный и антипролиферативный эффекты ИФН: ингибирование процессов транскрипции и трансляции обуславливает прекращение репликации вирусов (антивирусный эффект) или торможение размножения клеток (антипролиферативный эффект).

Было установлено, что рекомбинантные интерфероны активируют лизис и переваривание золотистого стафилококка, хламидий, легионелл, токсоплазм, листерий и кандид. Механизм бактерицидной и фунгицидной активности аналогов природного интерферона состоит в активации трансмембранного и цитозольного потока ионов Ca^{2+} , в дозозависимом усилении фагосомальной активности и фагоцитоза, стимуляции респираторного взрыва.

Перечисленные эффекты, присущие ИФН, делают их универсальным фактором неспецифической резистентности, обеспечивающим защиту организма от чужеродной информации (вирусы, бактерии, хламидий, микоплазмы, патогенные грибы).

Кроме непосредственного действия на системы репродукции вирусов, ИФНы являются важными медиаторами иммунитета, что позволяет отнести их к семейству регуляторных цитокинов.

Среди проявлений иммуномедиаторных свойств ИФНов особо стоит выделить следующие:

1. Под действием ИФНа увеличивается число Fc-рецепторов к IgG на мембранах макрофагов, что способствует выполнению ими таких важных функций как фагоцитоз и антителозависимую цитотоксичность (Vogel J. et al., 1983).
2. ИФН-р является мощным ингибитором Т-супрессоров, а ИФН-у — активирует их и инициирует синтез растворимого фактора супрессии иммунного ответа (Mota T., Dorf M., 1985).
3. ИФНы являются основными модуляторами системы естественной цито-токсичности, воздействуя на активность естественных киллеров (Herberman R. et al., 1982).
4. Усиливается экспрессия на поверхности клеток антигенов гистосовместимости I класса под действием ИФН-а и ИФН-р" (Zinkernagel R., Doherty P., 1974).
5. Усиливается экспрессия антигенов гистосовместимости II класса под действием ИФН-у (Вазпат Т.У., Merigan Т.С., 1983), что приводит к увеличению функциональной активности антиген-презентирующих клеток, усилению сенсibilизации Т-

хелперов, увеличению цитотоксичности моноцитов, повышению секреции других лимфокинов, таких как фактор некроза опухоли и интерлейкин-2 (Blackman M., Morris A., 1985).

Биологическое действие интерферонов характеризуется:

- универсальностью (ИФН активен против многих ДНК- и РНК-содержащих вирусов);
- выраженной тканевой специфичностью (ИФН высокоактивен в гомологичных системах, мало или неактивен в гетерологичных);
- последствием (даже после удаления ИФНа в обработанных клетках сохраняется способность подавлять размножение вирусов);
- внутриклеточной активностью (ИФН действует на вирусы лишь в процессе их репродукции);
- необходимостью полноценного метаболизма клеток (действие ИФНа снимается ингибиторами синтеза белка и нуклеиновых кислот);
- дискретностью (ИФНы не чувствительны к антителам против вирусов, его индуцирующих).

Многообразие обнаруженных и изученных к настоящему времени функций и свойств ИФНа указывает на их контрольно-регуляторную роль в сохранении гомеостаза.

Выявлены прямые и обратные связи системы интерферона с системой иммунитета и нейроэндокринной системой.

В настоящее время производятся следующие генно-инженерные препараты интерферонов: отечественные препараты Реаферон, Реальдирон, Реколин, а также зарубежные — Интрон А, Роферон, Инрек.

Определены показания и противопоказания для клинического применения ИФНов.

ИФНы вводили подкожно, внутримышечно, внутривенно в больших дозах — до 10×10^6 МЕ в сутки, в основном при онкологических заболеваниях и вирусных гепатитах. Наряду с высокой клинической эффективностью ИФНов при их применении часто наблюдаются побочные эффекты в виде гриппоподобного синдрома, артралгии, депрессивных состояний, диареи. У 30% больных при длительном применении больших доз рекомбинантных ИФНов образовывались нейтрализующие антивирусную активность ИФНа антитела, что сопровождалось развитием резистентности к рекомбинантным ИФНам.

В 60-х годах были опубликованы работы д-ра Грессера, в которых обосновывались необходимость тщательного исследования и длительного клинического наблюдения применения интерферонов у детей, особо в период новорожденности.

Введение одинаковой дозы интерферона на единицу массы тела, безопасной для половозрелых животных (крысы, мыши), приводило к диффузным некрозам печени, гломерулонефритам (как отсроченный эффект) и гибели новорожденных животных. Такая же картина наблюдалась и при индукции эндогенного интерферона. Антитела к интерферонам снимали этот эффект. Механизм патологического действия интерферона на развивающийся организм был неизвестен. Применение препаратов ИФНа у детей, особенно в период новорожденное, составляло один из наименее изученных разделов интерферонологии.

ПРЕПАРАТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА

Интерферон - альфа

Это белок растворимый в воде с молекулярной массой 19.300 дальтон. Активность измеряют в международных единицах (МЕ) в 1 мг рекомбинантного интерферона альфа-2б содержится 2×10^8 МЕ. Тормозит вирусную репликацию - *in vitro* и *in vivo*. Биологическая активность интерферонов проявляется за счет связывания со специфическими рецепторами мембраны клетки. Считается, что ряд функций клетки обусловлен взаимодействием ее с интерфероном, в частности, подавление репликации вируса в инфицированной клетке, супрессией пролиферации клеток, такие иммуномодулирующие процессы, как усиление фагоцитарной активности макрофагов и увеличение специфической цитотоксичности лимфоцитов к клеткам-мишеням.

Лечение гепатита И. приводит к нормализации уровня АЛТ, исчезновению HCV-РНК из сыворотки и улучшению гистологической картины печени.

Показан для применения при хроническом гепатите В, С и Дельта, лечении подростков и взрослых пациентов с компенсированным заболеванием печени, у которых обнаруживаются маркеры репликации вируса гепатита В в сыворотке не менее 6 мес. До начала терапии рекомендуется провести биопсию печени (помимо лабораторного обследования), чтобы убедиться в наличии хронического гепатита и установить степень поражения печени. Терапия показана больным с репликацией вируса гепатита С, независимо от уровня аминотрансфераз.

Хронический гепатит В. Рекомендуются дозы подросткам и взрослым: п/к или в/м 5 млн. МЕ ежедневно или 10 млн. МЕ 3 раза в нед. (т.е. 30-35 млн. МЕ в нед.) в течение 6 мес. У детей показанием для назначения И. является уровень ДНК HBV в сыворотке крови 105 копий и более. При повышении АЛТ более чем в 2 раза по сравнению с нормой. Стандартная схема лечения детей с хроническим гепатитом В включает назначение 5 МЕ/м² поверхности тела в/м или п/к 3 раза в нед. в течение 6 мес. Оценку эффективности терапии проводят через 3 мес. после её начала. При сохранении высокого уровня ДНК HBV в крови терапию прекращают, а при снижении уровня ДНК HBV терапию продолжают до 6 мес.

Хронический гепатит С. Рекомендуются дозы: подросткам и взрослым 3 млн. МЕ 3 раза в нед. п/к или в/м в течение 12-18 мес. и более. Большинство пациентов отвечают на терапию снижением уровня трансаминаз через 12 недель от начала лечения. Некоторым больным, не ответившим на введение препарата в дозе 3 млн. МЕ через день, можно рекомендовать повышение дозы до 5-6 млн. МЕ 3 раза в нед. Пациентам, у которых развился рецидив после прекращения терапии,

можно повторно назначить препарат в тех же дозах, которые использовались ранее. Рекомендуемые дозы для детей старшего возраста 3 млн. МЕ 3 раза в нед. в течение 6-12 мес.

Хронический гепатит дельта. Назначают п/к или в/м в начальной дозе 5 млн. МЕ/м² поверхности кожи ежедневно или 10 млн. МЕ/ м² 3 раза в нед. в течение 12 мес. При необходимости период терапии может быть продлен. Дозы можно корректировать в зависимости от переносимости.

Так же применяют при

- волосатоклеточном лейкозе,
- хроническом миелолейкозе,
- первичном и вторичный тромбоцитозе,
- переходной форме хронического гранулоцитарного лейкоза и миелофиброза,
- множественной миеломе,
- раке почки;
- связанной с ВИЧ/СПИД саркомой Капоши,
- грибовидном микозе,
- ретикулосаркоме,
- рассеянном склерозе,
- профилактике и лечении гриппа и острой респираторной вирусной инфекции.

Противоказан при повышенной чувствительности к рекомбинантному интерферону альфа-2б или к компонентам препарата.

Побочные действия Может нарушать репродуктивную функцию. В исследованиях на приматах доказано, что нарушает менструальный цикл. У женщин, получавших лейкоцитарный И., регистрировали сниженные уровни эстрогена и прогестерона в сыворотке. Женщинам детородного возраста рекомендуется во время лечения применять контрацептивы. Мужчин репродуктивного возраста следует информировать о возможных нежелательных явлениях. Препарат следует использовать во время беременности, если потенциальная польза терапии для матери будет превосходить риск развития побочных эффектов и вредное воздействие на плод. Возможность экскреции компонентов рекомбинантного И. с молоком не исключается. В связи с потенциальным риском воздействия на плод через молоко, не назначать кормящим матерям или отказаться от вскармливания во время терапии, принимая во внимание при этом необходимость лечения для женщины. Для смягчения побочного действия (гриппоподобных симптомов) рекомендуется одновременное назначение парацетамола. Опыт применения у пациентов моложе 18 лет ограничен. Поэтому при назначении препарата детям следует определить, будет ли положительный эффект преобладать над нежелательными явлениями.

Особые указания. Выраженные аллергические реакции (крапивница, ангионевротический отек, бронхоспазм, анафилактический шок) очень редки. Если развивается аллергическая реакция, следует немедленно прекратить введение препарата и начать соответствующую терапию. Транзиторные высыпания на коже не являются противопоказанием для продолжения введения препарата. Препарат следует с осторожностью назначать пациентам с тяжелыми заболеваниями в анамнезе, такими как хронические обструктивные заболевания легких или сахарный диабет с эпизодами кетоацидоза.

Особое внимание следует уделять пациентам с нарушением коагуляции (например, если в анамнезе были тромбозы, эмболии легочных артерий или тяжелая миелосупрессия). Температурная реакция может явиться реакцией на введение И., однако, необходимо исключить все возможные причины лихорадки. Не назначают больным аутоиммунным гепатитом и другими аутоиммунными заболеваниями в анамнезе, лицам, получавшим иммуносупрессивную терапию после трансплантации, так как введение И. может ухудшить функцию печени у этих больных. У всех пациентов необходимо тщательно контролировать показатели, характеризующие функцию печени (сывороточный альбумин, протромбиновое время). При снижении этих показателей необходимо сразу прекратить введение препарата.

Случаи поражения ЦНС, развития депрессии редки. Они регистрируются как при введении стандартных доз, так и при терапии высокими дозами. При дисфункции щитовидной железы терапию не следует начинать или продолжать.

Пациентам с псориазическими высыпаниями необходимо сопоставить риск с пользой от терапии. Больным с саркомой Капоши, вследствие ВИЧ-инфекции, И. показан только в том случае, если нет тяжелых висцеральных нарушений. Вводить одноразовыми пластиковыми шприцами. Препараты для парентерального введения следует визуально проверить на бесцветность перед введением.

Интерферон альфа-2b

В клинике применяется в виде препаратов для наружного применения, представляющее собой сорбированный на геле гидроокиси алюминия рекомбинантный интерферон альфа-2. Входящий в состав мази Вирогель рекомбинантный интерферон альфа-2 обладает широким спектром противовирусной активности, бактериостатическим и противовоспалительным действием, а также противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. Поливиниловый спирт создает необходимую консистенцию препарата и способствует пленкообразованию при высыхании на коже. После нанесения на пораженный участок препарат при высыхании создает защитную пленку, которая удерживается в течение 12 ч. Вирогель не впитывается одеждой и не требует нанесения под повязку. Используется при герпетических поражениях кожи и слизистых — простом и опоясывающем герпесе, рецидивирующем герпесе лица, гениталий, герпетическом стоматите. Мазь наносится на пораженные участки кожи или слизистых тонким слоем 2 раза в сутки с интервалом 12 ч и подсушивается в течение 10–15 мин для образования защитной пленки. Длительность курса лечения составляет 5–7 дней. Противопоказан при аллергических заболеваниях в стадии обострения.

ВИФЕРОН

Состоит из человеческого рекомбинантного интерферона $\alpha 2\beta$, α -токоферола ацетата (витамин Е), аскорбиновой кислоты (витамин С), масла какао.

Виферон обладает иммуномодулирующим (стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов в очагах поражения), противовирусным и противоопухолевым действием. При комбинированном применении человеческого рекомбинантного интерферона $\alpha 2\beta$ с токоферола ацетатом его противовирусная активность возрастает в 4-6 раз.

Показания к применению:

- у беременных: ОРВИ, негоспитальная атипичная пневмония, пиелонефрит, гломерулонефрит, инфекции мочеполового тракта, вирусные гепатиты В, С;
- у новорожденных (недоношенных детей): ОРВИ, атипичная пневмония, сепсис, цитомегалия, СМ V -гепатит, кишечный дисбактериоз, энтеровирусные инфекции, уреаплазмоз, микоплазмоз, менингит;
- для лечения онкологических заболеваний: волосато-клеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, лимфогрануломатоз, неходжкинская лимфома, солидные опухоли;
- для лечения острых и хронических вирусных гепатитов В, С и Д;
- для лечения герпеса, уреаплазмоза, хламидиоза, микоплазмоза, цитамегаловирусной инфекции, трихомониаз, гарднереллез, папилломавирусная инфекция, бактериальный вагиноз, рецидивирующий влагалищный кандидоз;
- ювенильный ревматоидный артрит;
- локализованные формы дифтерии;
- вирусассоциированный гломерулонефрит;
- бронхиальная астма;
- гнойно-септические состояния.

Схемы применения виферона разрабатываются с учетом различных нозологических форм.

Противопоказанием к применению виферона является повышенная индивидуальная чувствительность к маслу какао, являющимся основой суппозитория.

Реаферон.

Состоит из человеческого рекомбинантного интерферона $\alpha 2\beta$, стабилизированного человеческим сывороточным альбумином.

Особенности препарата Реаферон-ЕС

Препарат интерферона альфа-2 рекомбинантный человеческий - Реаферон ЕС - получают путем биосинтеза в процессе культивирования штаммов-продуцентов бактерий (соответственно *Pseudomonas putida* и *E.coli*), в генетический аппарат которых встроены гены человеческого лейкоцитарного интерферона альфа-2. Из полученной биомассы, содержащей белок, выделяют интерферон альфа-2 рекомбинантный, который очищают путем переосаждения, центрифугирования, хроматографии с применением эффективных адсорбентов и конечной стерилизующей фильтрации с использованием мембранной технологии. На всех стадиях получения осуществляется контроль современными физико-химическими методами. Конечный продукт (субстанция) представляет собой высокоочищенный интерферон альфа-2 (не менее 95% по мономеру) в растворе натрия хлорида 0,9% с активностью не менее $1,7 \cdot 10^7$ МЕ/мл.

Реаферон ЕС - сухой препарат для инъекций, получают лиофильным высушиванием субстанции с определенной активностью, к которой в качестве стабилизатора биологической активности добавляют альбумин человеческий в количестве не более 5 мг/мл, выдержавший контроль иммуноферментным методом (чувствительность 0,5-1,0 нг) на отсутствие НВс антигена и антител к вирусу СПИД, и фосфатно-солевой буфер.

Реаферон-ЕС-Липинт единственный в мире пероральный интерферон-альфа-2. Интерферон в чистом виде не может приниматься внутрь, так как легко распадается под действием ферментов еще в желудке. Реаферон-ЕС-Липинт заключен в липосомы, которые защищают его от разрушения в организме.

Реаферон-ЕС-Липинт попадает в организм самым естественным способом – через рот. Нетравматичное введение препарата очень важно при лечении детей. Обеспечивает долгое нахождение интерферона в крови. Оболочка липосомы устойчива к воздействию агрессивной среды желудка и желудочно-кишечного тракта. Заключенный в липосому интерферон практически в полном объеме проходит через ЖКТ, попадает в печень, там всасывается в кровь, и начинает медленно, постепенно высвобождаться. При приеме Липинта содержание собственного интерферона в организме на 100% выше, чем при введении инъекционного Реаферона-ЕС. Максимально подходит для экстренной профилактики простуды и гриппа. Профилактический прием Липинта в более чем 2 раза снижает вероятность заболевания. Нет риска передачи с иглой опасных вирусных инфекций (СПИД, гепатит).

В состав Реаферон-ЕС Липинта входят антиоксиданты - витамины Е и С. Установлено, что применение интерферона совместно с витаминами Е и С усиливает противовирусное действие интерферона в 14 раз. При совместном использовании интерферона и антиоксидантов (витаминов Е и С) в терапии детей токсическое действие ИФН на растущий организм нейтрализуется.

Фармакологическое действие. Обладает противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью.

Показания. Применяют Реаферон при вирусных и опухолевых заболеваниях. Препарат эффективен при вирусном гепатите. Назначают взрослым в комплексной терапии острого вирусного гепатита В. Препарат наиболее эффективен в начале желтушного периода до 5-го дня болезни. При развившейся печеночной коме и холестатическом течении гепатита,

препарат мало эффективен. Применяют при вирусном конъюнктивите, кератоконъюнктивите, кератите, увеите, а также при волосато-клеточном лейкозе, хроническом миелолейкозе, раке почки. Имеются также данные о применении реаферона в комплексной терапии рассеянного склероза.

Противопоказания. Аллергические заболевания, беременность (недостаточное количество наблюдений). У больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями необходим гемодинамический контроль (периодическая регистрация ЭКГ). Индивидуальная непереносимость интерферонов.

Особые указания

Как и все интерфероны, у отдельных лиц при длительном применении препарат может вызывать появление антител к интерферону, что и приводит к снижению терапевтического эффекта. Применение препарата при вирусном гепатите В в более поздние сроки менее эффективно. Не эффективен при развивающейся печеночной коме и холестатическом течении заболевания. У больных эритродермической стадией грибовидного микоза при повышении температуры свыше 39 град.С и в случае обострения процесса введение Реаферона-ЕС следует прекратить. У лиц с высокой пирогенной реакцией (39 град.С и выше) на введение Реаферона-ЕС рекомендуется одновременное применение индометацина. В случае хранения раствора для местного применения необходимо, соблюдая правила асептики и антисептики, перенести содержимое ампулы в стерильный флакон и хранить раствор в холодильнике при 4-10 град.С не более 12 ч. В случае развития лейко- и тромбоцитопении необходимо проведение анализа крови 2-3 раза в неделю. При резко выраженных местных и общих побочных реакциях введение Реаферона-ЕС следует прекратить.

Гриппферон.

Состоит из человеческого рекомбинантного интерферона $\alpha 2$.

ПРЕПАРАТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕТА-ИНТЕРФЕРОНА

Интерферон бета

Фибробластный человеческий бета-интерферон. Обладает противовирусной активностью, препятствует нормальной репродукции вируса и его освобождению. Представляет собой нативную аминокислотную последовательность, идентичную природному человеческому интерферону бета. Получают с использованием клеток яичников китайского хомяка. Иммуномодулирующее действие связано с активацией фагоцитоза, стимуляцией образования антител, НК клеток и лимфокинов. Оказывает антипролиферативное действие на опухолевые клетки. Применяют при хроническом активном гепатите В (при наличии серологических маркеров этой вирусной инфекции), хроническом активном гепатите С (при высоком уровне трансаминаз без признаков печеночной недостаточности). При острых и хронических рецидивирующих вирусных инфекциях, герпетических инфекциях. Показан так же при острых, рецидивирующие и хронических кератоконъюнктивитах, вызванных аденовирусами и вирусами герпеса, карциноме молочной железы, новообразованиях шейки матки, волосатоклеточном лейкозе. При глиобластоме, злокачественной меланоме, папилломатозе гортани, почечной карциноме, хроническом миелолейкозе. Показан к применению в лечении больных с рассеянным склерозом с рецидивирующе-ремиттирующим типом течения, который характеризуется не менее чем двумя обострениями на протяжении предшествующих 2 лет. Снижает частоту и тяжесть рецидивов заболевания, замедляет его прогрессирование и наступление инвалидности. Нет данных о применении у больных с непрерывно прогрессирующим течением рассеянного склероза, поэтому пациентам, у которых развивается эта форма заболевания, лечение следует прекратить.

Противопоказания: тяжелые заболевания сердца, выраженные нарушения функции печени и/или почек, заболевания нервной системы, эпилепсия, хронический гепатит с развитием прогрессирующего цирроза печени, хронический гепатит на фоне терапии иммунодепрессантами (во время назначения И. или незадолго до его назначения, за исключением кратковременного курса стероидной терапии), аутоиммунный гепатит, предшествующие заболевания щитовидной железы; беременность.

Побочные действия. Возможны (особенно при применении высоких доз препарата) — повышение температуры тела, утомляемость, миалгии, эпизодические головные боли, тошнота, рвота. При длительном лечении — лейкопения, тромбоцитопения, анемия; транзиторное повышение активности печеночных трансаминаз в плазме крови; анорексия, диарея; боли в костях и суставах; снижение АД, одышка; повышение протромбинового времени, алопеция, сонливость. В период лечения показан систематический контроль показателей электролитного баланса и картины периферической крови. При пограничных значениях числа лейкоцитов, тромбоцитов и содержания гемоглобина эти показатели определяют 1-2 раза в нед. В случае увеличения протромбинового времени этот показатель контролируют ежедневно. Побочные эффекты, возникающие во время лечения препаратом обратимы даже при длительном его применении. Совместное применение с препаратами, нарушающими синтез простагландинов (в том числе с НПВС и ГКС), может привести к ослаблению биологической активности И. Препарат может уменьшать клиренс и увеличивать период полувыведения теофиллина из плазмы.

С осторожностью назначают больным с депрессией. Известно, что частота депрессивных состояний и навязчивых суицидальных идей повышена в популяции больных с рассеянным склерозом, а также при применении интерферона. Больные с проявлениями депрессии должны находиться под наблюдением, им следует проводить соответствующую терапию. При необходимости терапию интерфероном бета-1а прекращают.

Проявлять осторожность при лечении интерфероном бета-1а больных, у которых раньше наблюдались судорожные припадки. У больных, у которых эпилептические припадки впервые появились во время терапии интерфероном бета-1а, нужно выяснить их этиологию и назначить противосудорожную терапию, прежде чем возобновить терапию интерфероном бета-1а.

Пациенты с ИБС, застойной сердечной недостаточностью или аритмией должны находиться под наблюдением врача во избежание ухудшения клинического состояния в начале терапии интерфероном бета-1а. Иногда отмечается некроз в месте инъекции. Для снижения риска его развития следует использовать асептическую технику инъекций, каждый раз изменять места инъекций. Процедуру самовведения препарата больными необходимо периодически проверять, особенно, если развиваются местные реакции. Если у пациента отмечаются множественные кожные повреждения, применение следует прекратить до их заживления. Пациенты, имеющие единичные повреждения, могут продолжать лечение, при условии, что размер некроза незначительный. Больных следует предупредить о способности интерферона бета вызывать аборт. Рекомендуется определять количество лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови, лейкоцитарную формулу, биохимические показатели, в частности функциональные печеночные тесты. В начале лечения Ребифом 44 мкг эти исследования нужно проводить чаще. При введении интерферона бета-1а больным с тяжелой печеночной или почечной недостаточностью, а также с тяжелой миелосупрессией следует соблюдать особую осторожность и проводить тщательный мониторинг. К интерферону бета-1а могут вырабатываться антитела. Результаты клинических исследований свидетельствуют, что у 13–14% больных постоянно определяются сывороточные антитела к интерферону бета-1а. Установлено, что наличие антител снижает фармакодинамические эффекты интерферона бета-1а (уровни бета-2 микроглобулина и неоптерина). Хотя клиническое значение индукции антителообразования окончательно не выяснено, развитие нейтрализующих антител может сопровождаться снижением клинического эффекта лечения. Если пациент слабо реагирует на терапию и при этом у него определяются нейтрализующие антитела, следует решить вопрос о целесообразности продолжения терапии. Некоторые обусловленные применением интерферона бета неблагоприятные эффекты со стороны ЦНС могут влиять на способность пациентов к управлению транспортными средствами и работе с потенциально опасными механизмами.

Следует соблюдать осторожность при одновременном применении с препаратами, которые имеют узкий терапевтический индекс и клиренс которых значительно зависит от цитохрома P450, например антиэпилептические препараты и антидепрессанты некоторых классов.

Бетаферон.

Рекомбинантный интерферон бета - 1β

ПРЕПАРАТЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ГАММА-ИНТЕРФЕРОНА

Анаферон. Рекомбинантный интерферон-гамма.

ИНДУКТОРЫ СИНТЕЗА ИНТЕРФЕРОНА

Открытие системы интерферона (ИФН) в 1957 г. А. Айзексом и Ж. Линдемманом - семейства белков с универсально широким спектром противовирусной активности, образующихся в организме многих позвоночных (от рыб до человека), можно по значимости сравнить с открытием в конце 19 века вирусов. Система ИФН сравнима с системой иммунитета, значительно опережая по времени, формирование иммунного ответа, она играет важнейшую контрольно-регуляторную роль в сохранении гомеостаза за счет распознавания и элиминации чужеродной генетической информации, что делает ее одним из основных факторов врожденного (естественного) иммунитета. Доказано, что система ИФН представлена практически в каждой клетке организма. Интерфероны действуют не на геном клетки, а через мембрано-рецепторные механизмы, не спасая зараженные вирусом клетки, но индуцируя механизмы противовирусной защиты в окружающих здоровых клетках. В свете современных данных интерфероны относят к цитокинам, обладающим противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью.

В настоящее время более всего изучены три класса интерферонов: ИФН-α, ИФН-β и ИФН-γ. ИФН-α, ИФН-β относят к интерферонам 1 типа. При всех вирусных инфекциях происходит продукция ИФН-α, ИФН-β, как первый этап «ранней цитокиновой реакции» (РЦР) на вирусное инфицирование. В результате в месте вирусной инфекции происходит:

- внутриклеточная ингибция репродукции вирусов;
- элиминация при участии НК-клеток (естественных киллеров) и ЦТЛ (цитотоксических лимфоцитов) зараженных вирусами измененных клеток;
- индукция противовирусного состояния вновь образованными циркулирующими ИФН-α, и ИФН-β окружающих незараженных клеток от возможного заражения вирусами.

При высокой множественности вирусной инфекции, сниженной резистентности организма, дефектах системы ИФН и иммунитета, неблагоприятном действии факторов окружающей среды наступает второй этап РЦР, характеризующийся активацией CD4+ и CD8+ Т-клеток с формированием Т-клеточного и В-клеточного иммунного ответа и синтезом таких цитокинов как ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-15, ИЛ-18 и фактор некроза опухолей (ФНО), усиливающий, зависимую от ИЛ-12 продукцию γ-ИФН. ФНО и γ-ИФН, продуцируемый НК-клетками, активируют макрофаги, мигрирующие в очаг вирусной инфекции и участвующие в противовирусной защите. Под действием ИФН-α, ИФН-β увеличивается количество CD4+, экспрессирующих ИФН-γ. ИФН-γ относят к интерферонам 2 типа (иммунным интерферонам) вследствие его вовлечения в развитие адаптивного (специфического) иммунного ответа.

Идеи использования собственной системы ИФН в организме за счет индукции ИФН для профилактики и лечения вирусных инфекций были использованы для создания лекарственных препаратов-индукторов эндогенного (аутологичного) интерферона. Накопленный опыт их применения позволяет рассматривать индукторы эндогенного интерферона в качестве эффективных противовирусных препаратов. В связи с тем, что механизм противовирусного действия ИФН более универсален и не интерферирует с механизмом действия других известных противовирусных препаратов, специфически ингибирующих вирусные ферменты (например: ДНК-полимеразу вируса простого герпеса – ацикловир, валацикловир, фамцикловир;

нейраминидазу вирусов гриппа – озельтамивир), имеющиеся данные о сочетанном их применении свидетельствует об аддитивном и даже синергидном эффекте.

Механизм противовирусного действия. Полимерные соединения (двухспиральные РНК) способны стимулировать синтез интерферонов в различных клетках, включая клетки мононуклеарно-фагоцитарной системы, гранулоциты, нейтрофилы, клетки эндотелия и фибробласты. При этом лимфоциты (за исключением В-лимфоцитов) продуцируют преимущественно альфа-интерфероны, а фибробласты – бета-интерфероны. Двухспиральные индукторы интерферонов усиливают гуморальный иммунитет, повышая титр сывороточных антител при первичном иммунном ответе, сокращают индуктивный период антителообразования и увеличивают время циркуляции антител. Количество антителообразующих комплексов (АОК) при этом не увеличивается. Двухспиральные индукторы интерферонов оказывают также влияние на клеточный иммунитет, ускоряя РБТЛ, синтез ДНК Т-клетками и образование цитотоксических Т-лимфоцитов и стимулируя активность естественных киллеров. Кроме того, они стимулируют синтез цитокинов, в частности, интерлейкина-1 (ИЛ-1) и, возможно, других факторов роста и дифференцировки клеток.

Флуореноны обладают высокой интерферониндуцирующей активностью. При этом синтез интерферонов Т-клетками осуществляется без помощи макрофагов (в отличие от их синтеза на фоне применения двухспиральных РНК).

Многие полифенолы, содержащие альдегидные группы, эффективно подавляют репликацию вирусов. Они способны взаимодействовать с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых соединений нуклеиновых кислот вирусов. Среди ЛС этой группы выделяются производные госсипола, которые характеризуются низкой токсичностью и относительно высокой интерферониндуцирующей способностью, ускоряя синтез альфа- и бета-интерферонов в различных клетках.

Место в клинической практике

Показания

1. ВИЧ-инфекция.
2. Герпетическая инфекция (генитальный герпес, опоясывающий лишай, герпетический гингивостоматит, герпетическая офтальмопатия).
3. Нейровирусная инфекция (рассеянный склероз, энцефалиты различной этиологии, в т.ч. вызванные вирусами кори и эпидемического паротита).
4. Гепатиты В, С и D.
5. Грипп, парагрипп.
6. ОРВИ, вызванные рино-, корона- и аденовирусами.
7. Арбовирусные инфекции (клещевой энцефалит, лихорадка Денге, вирусы лесов Семлики и Восточного энцефаломиелита).
8. Респираторно-синтициальная инфекция.
9. Цитомегаловирусная инфекция.
10. Профилактика гриппа и других ОРВИ, вызванных вирусами парагриппа, риновирусами, РС-вирусом и аденовирусами; профилактика арбовирусных инфекций.

Индукторы интерферонов имеют ряд преимуществ, по сравнению с интерферонами:

1. не оказывают антигенного действия (в отличие от рекомбинантных интерферонов);
2. способствуют синтезу сбалансированного количества эндогенных интерферонов (что предотвращает развитие побочных эффектов, обусловленных введением избыточных доз экзогенных интерферонов);
3. их однократное введение приводит к длительной продукции эндогенных интерферонов в терапевтических дозах (для достижения аналогичного эффекта экзогенные интерфероны необходимо вводить многократно);
4. некоторые индукторы интерферона обладают уникальной способностью стимулировать синтез эндогенных интерферонов в определенных органах и популяциях клеток, что в ряде случаев имеет определенные преимущества перед поликлональной стимуляцией иммуноцитов экзогенными интерферонами;
5. низкая токсичность кагоцела и циклоферона, широкий спектр их биологической активности, наличие иммуномодулирующих свойств, хорошая растворимость в биологических жидкостях и способность легко выводиться из организма.

Основным *недостатком* индукторов интерферона является то, что в некоторых случаях их применение не сопровождается синтезом эндогенного продукта вследствие гипореактивности организма. При этом повторное введение того же ЛС считается нецелесообразным.

К недостаткам отдельных ЛС следует отнести:

1. Амиксин – относительно высокая токсичность, образование устойчивых молекулярных комплексов с ДНК, что представляет опасность при длительном введении.
2. Ларифан, Ридостин – невозможность преодоления ГЭБ; неспособность индуцировать синтез интерферона при пероральном применении (из-за быстрой инактивации данных препаратов ферментами ЖКТ).

Противопоказания

1. Беременность и лактация.
2. Тяжелые заболевания печени, почек и крови.
3. Аутоиммунные заболевания.
4. Аллергические заболевания.

Побочные эффекты

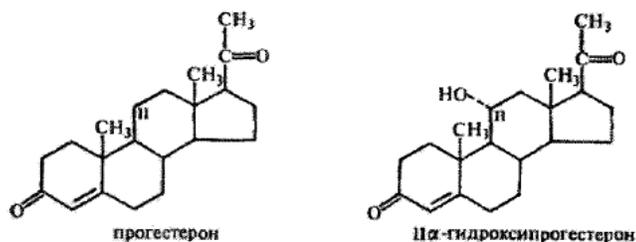
К возможным побочным эффектам индукторов интерферонов относятся:

1. повышение температуры тела и артралгия;
2. диспепсия;
3. снижение артериального давления;
4. лейкопения, тромбоцитопения, анемия (не требуют специфического лечения);
5. повышение уровня печеночных трансаминаз в сыворотке крови.

БИОТЕХНОЛОГИЯ СТЕРОИДОВ

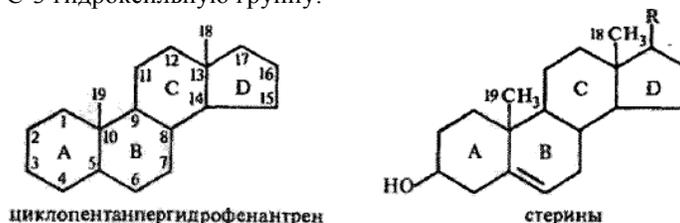
В области превращений стероидных соединений достоинства биологических катализаторов проявляются наиболее ярко. Долгое время микробиологическая трансформация считалась специфическим методом химии стероидов.

Первые сообщения о трансформации стероидов микроорганизмами появились задолго до того, как было установлено строение основных представителей стероидов. Еще в конце XIX в. Было известно, что бактериальная флора кишечника млекопитающих превращает холестерин в копростерин, а холевую кислоту - 13 дезоксихолевую. К 1913 г. относится открытие полного расщепления холестерина микобактериями. И лишь в 30-х годах, когда была установлена структура основных стероидных гормонов, известных к тому времени, начались попытки применять трансформирующую способность микроорганизмов для препаративного получения этих соединений. В 1948 г. впервые осуществлено введение гидроксильной группы в молекулу стероида микробиологическим путем. Но только после получения 11 α -гидроксипрогестерона из прогестерона при ферментации последнего с культурой *Rhizopus nigricans* микробиологические трансформации стероидов привлекли широкое внимание:



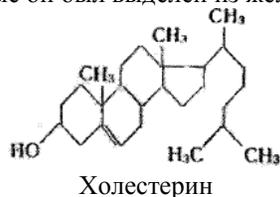
Данная трансформация ярко продемонстрировала преимущество микробиологических методов перед химическими: введение кислородной функции в определенное положение молекулы стероида в случае химического синтеза представляло необычайно трудную задачу и требовало многочисленных химических операций, здесь же оно заменялось единственной стадией ферментационного гидроксирования. Открытие в эти же годы терапевтической ценности кортизона наряду с указанными успехами микробиологического процесса гидроксирования привлекло огромное внимание микробиологов, химиков и врачей к данной области. Внедрение микробиологического синтеза в процессы получения стероидных гормональных препаратов вызвало переворот в фармацевтической промышленности, позволив сразу во много раз удешевить ценные препараты. Природные стерины - сырье для получения ценных препаратов.

Большой класс стероидов характеризуется наличием в молекуле специфического циклического скелета - циклопентаперигидрофенантрена, построенного из четырех колец, три из которых шестичленные (A, B и C) и одно – пятичленное. Для обозначения различных положений этого кольца принята следующая нумерация. К стеринам (стеролам) относятся стероиды, несущие в положении C-3 гидроксильную группу:



Одним из наиболее важных и хорошо изученных стерина является холестерина (класс зоостерина), имеющий брутто-формулу $C_{27}H_{46}O$. Он обнаруживается почти во всех органах животных и человека. Холестерин принимает участие в физиологических процессах, происходящих в живой клетке,

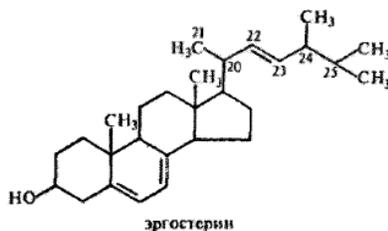
Без его участия не может развиваться растущий организм. Желчные камни человека на 99% состоят из холестерина, богаты этим соединением надпочечники и другие органы. Спинной мозг и мозг рогатого скота представляет собой наилучший материал для промышленного получения холестерина. Он считался специфическим животным стеринам до тех пор, пока он не был обнаружен в некоторых растениях и в морских красных водорослях. Точная структурная формула этого соединения была установлена в 1932 г., хотя впервые он был выделен из желчных камней в 1782 г.



Другие стерины встречающиеся в природе, отличаются от холестерина или по длине боковой цепи, или по степени насыщенности.

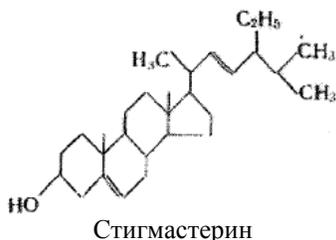
Стерины растений (фитостерины). Очень важный класс соединений, они служат Источником получения многих ценных стероидных препаратов. Эргостерин по структуре отличается от холестерина дополнительной метильной группой в боковой цепи при C₂₄, а также имеет две дополнительные двойные связи: одна из них при C-7, другая в боковой цепи при 22- и 23- углеродных атомах.

Строение эргостерина было установлено в 1934 г.:

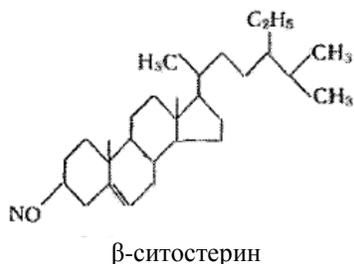


Он встречается у многочисленных представителей растительного мира, а также у грибов, микроорганизмов и других представителей живого мира. Особенно велико содержание эргостерина у дрожжевых микроорганизмов. Для промышленного получения эргостерина чаще всего используются пекарские дрожжи, содержание эргостерина в них колеблется в зависимости от питательной среды и культивирования от 0,2 до 15% на сухую массу.

Стигмастерин – один из наиболее распространенных фитостеринов, он содержится в большом количестве в соевом масле и сахарном тростнике. По структуре стигмастерин отличается от холестерина наличием двойной связи между углеродными атомами и наличием этильной группы в положении 24:



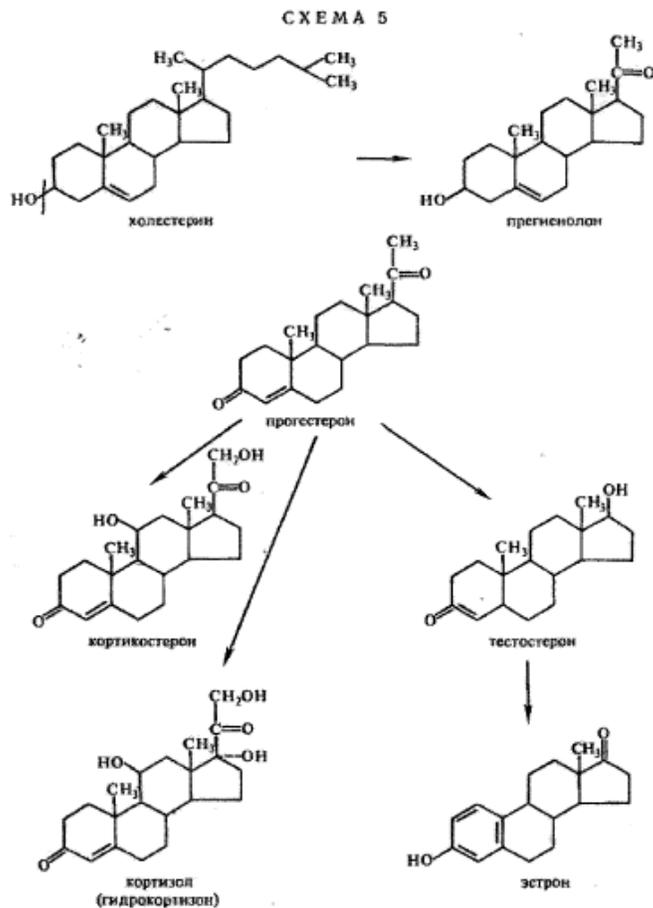
Другим широко распространенным растительным стеринном является β-ситостерин C₂₉H₅₀O. по строению он сходен со стигмастерином, отличаясь лишь отсутствием двойной связи в боковой цепи:



Ситостерины встречаются в хлопковом и таловом маслах, в зародышах пшеницы и натуральном каучуке, в сахарном тростнике и другом растительном материале. Коммерческим источником ситостеринов чаще всего являются тростник и хлопковое масло. Ситостерины и стигмастерин - наиболее перспективные и дешевые исходные продукты для получения стероидных гормонов.

Стерины необходимы для осуществления физиологических и биохимических функций живого организма. Предполагается, что стерины требуются для образования мембранных систем, клеточных оболочек и других структурных образований. Есть данные о том, что стерины являются защитным фактором против токсического действия многих природных соединений.

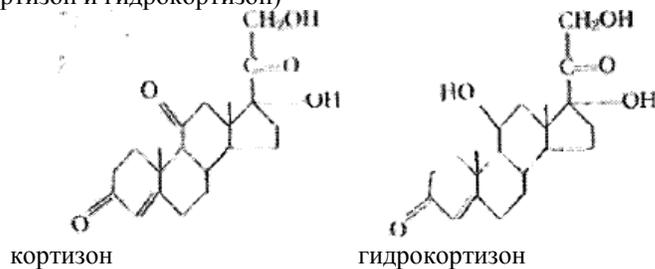
Основные пути биосинтеза стероидных гормонов и холестерина. В организме животных и человека из холестерина образуются три важные группы гормонов: прогестины, половые гормоны и гормоны коры надпочечников (кортикостероиды). Основные пути биосинтеза показаны на схеме.



При образовании стероидных гормонов из холестерина сначала образуется прегненолон – основной промежуточный продукт биосинтеза стероидов и кортикостероидов. Окисление 3ОН-группы прегненолона в С=О сопровождается перемещением двойной связи; продуктом этой кетостероидизомеразной реакции является прогестерон - гормон плаценты и желтого тела.

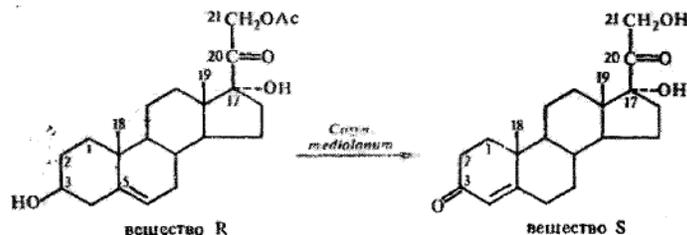
Прегненолон является также предшественником мужских половых гормонов (тестостерона) и женских половых гормонов (эстрогенов – эстрона и эстрадиола). В коре надпочечников прогестерон превращается в кортикостерон и кортизол (гидрокортизон); секреция кортизола достигает у взрослого человека 15--30 мг в день. Эти вещества были первоначально выделены из коры надпочечников в кристаллическом виде.

Кортизол и его синтетические аналоги такие, как преднизолон или дексаметазон, принадлежит к числу современных средств экстренной терапии благодаря их уникальному противовоспалительному, десенсибилизирующему и противошоковому действию. По своему химическому строению они могут быть разделены на 11-дезоксистероиды, 11-гидроксистероиды, 11,17-дигидроксистероиды (кортизон и гидрокортизон)



Основные микробиологические превращения стероидов. Промышленный синтез названных выше ценных лекарственных препаратов стал возможен только с развитием микробиологической химии и, в частности, метода микробиологической трансформации. В качестве сырья для получения указанных лекарственных средств используется диосгенин. В последние годы изучается β-ситостерин как потенциально дешевый и доступный источник.

Модифицированные тем или иным способом стероиды сами могут служить субстратами проведения соответствующих целенаправленных трансформаций. Так, например, ключевым веществом в синтезе гидрокортизона, кортизона и преднизолона служит вещество S. Оно, в свою очередь, является модифицированным продуктом биотрансформации моноацетата «вещества R» с помощью культуры *Corynebacterium mediolatum*:



Процесс ферментативного превращения моноацетата вещества R в вещество S с помощью культуры *Coryn. mediolatum* состоит из гидролиза 21-ацетогруппы и окисления 3β-оксигруппы в 3-кетогруппу с одновременной миграцией двойной связи. Трансформация заканчивается практически количественным выходом вещества S, поскольку для культуры *Coryn. mediolatum* нехарактерны реакции расщепления стероидной молекулы имеет принципиальное значение в производстве кортикостероидных препаратов, поскольку стадия получения вещества S является ключевой и в значительной степени определяет конечный выход готовых продуктов следующих трансформаций.

Введение гидроксильной группы. Микробиологическое гидроксирование – это наиболее важный и часто применяемый метод. Наличие гидроксильных групп в 3, 11, 16, 11 положениях молекулы стероида, как правило, обуславливают физиологическую активность большинства гормональных стероидных препаратов.

Гидроксирование стероидов осуществляется очень многими микроорганизмами, чаще всего грибами, даже некоторые грибы обладают гидроксилирующей активностью. Гидроксирование стероидов при помощи гриба *Rh. nigricans* – яркий пример сочетания, специфичности и разнообразия.

11β-Гидроксирование как один из важнейших путей получения кортизона изучено более детально и давно применяется в промышленности, выходы продуктов трансформации очень высоки. Многие микроорганизмы образуют смесь 11α- и 11β-эпимеров, соотношение которых существенно зависит от фазы развития культуры.

Наличие в молекуле стероидов 11β-гидроксильной группы обуславливает физиологическую активность гидрокортизона (кортизона) и преднизолон. Гидроксированию подвергаются субстраты самого различного строения – от производных эстрана до сложных молекул стероидов, сапогенинов. Причина этого – очень широкая субстратная специфичность гидроксилаз, которую демонстрируют многие микроорганизмы.

Получение 14α-гидроксипрогестерона при помощи *Bacillus cereus* является одним из немногих примеров гидроксирования при помощи бактерий. 15α-гидроксирование осуществляется также многими микроорганизмами, основное место среди которых занимает *Penicillium*.

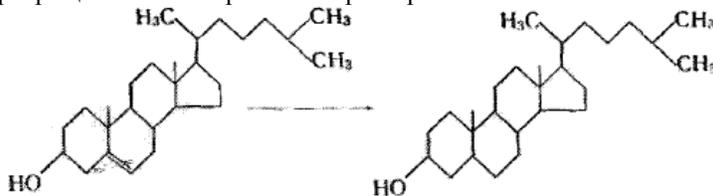
Главным препятствием, стоящим на пути дальнейшего развития микробиологического гидроксирования стероидов, так же как и вообще микробиологических трансформаций этих соединений, является низкая производительность ферментаций, несмотря на высокий процентный выход по субстрату. Это обусловлено, с одной стороны, нерастворимостью стероидных субстратов в воде, с другой токсичностью растворителей, применяемых при внесении стероида и невозможностью использования высоких концентрации субстрата.

Дегидрогенизация стероидов. Наличие двойных связей коренным образом влияет на физиологическую активность препаратов. Используя эту реакцию, получают такие эффективные препараты, как преднизолон. Чаще всего микроорганизмы дегидрируют положения 1, 2 и 4, 5, но описано и введение двойной связи в положения 7, 8; 8, 9; 9, 11; 16, 17; 17, 20. Реакции дегидрогенизации осуществляют бактерии и актиномицеты, особенно часто это *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*. Широкая субстратная специфичность дегидрогеназ показана на большом экспериментальном материале; она позволяет использовать в качестве субстратов ацетаты стероидов, которые являются полупродуктами во многих технологических схемах получения стероидов. Например, *Mycobacterium globiforme* 193, дегидрирующая 1,2-связь в кортизоне, так же эффективно превращает и кортизоацетат в преднизонацетат с выходом 86%. Исследование показало, что для этой культуры характерна максимальная удельная трансформирующая активность в период снижения удельной скорости роста.

Реакция гидрогенизации позволяет получать преднизолон из кортизона, дианабол из метилгестостерона, преднизолон из гидрокортизона. Продукты 1,2-дегидрирования образуются с высокими выходами - до 86%. Распространенность этой реакции объясняется не только наличием соответствующих дегидрогеназ у большого числа микроорганизмов, но и химическими свойствами

данного участка стероидной молекулы, ее нестабильностью, особенно при наличии кетогруппы в 3-м положении (или) двойной связи 4,5. Этими свойствами стероидной молекулы объясняется и доступность связи 1,2 для микробных оксидоредуктаз. Во многих случаях показана обратимость реакций дегидрогенизации и восстановления.

Микробиологическое восстановление. Этот процесс используется в меньшей степени, чем дегидрирование. Он осуществляется главным образом дрожжами и анаэробными бактериями, представителями микрофлоры кишечника млекопитающих, осуществляющими превращение холестерина в копростерин:



холестерин

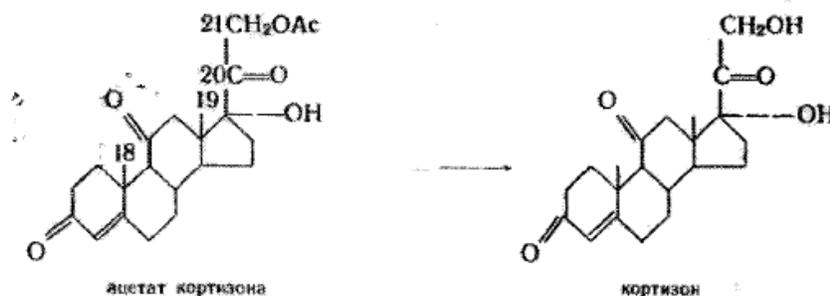
копростерин

Описаны процессы насыщения двойных связей также и аэробными культурами, широко известными как окислители актиномицетами, микроформами и даже грибами. Например, культура *Aspergillus flavus* восстанавливает ароматическое кольцо некоторых стероидов:



Окисление гидроксильной группы в кетогруппу - одна из наиболее частых реакций, осуществляемых микроорганизмами (бактериями, актиномицетами, грибами). Наибольший практический интерес представляют окислительные превращения гидроксильных групп у 3, 17 и 20-го атомов стероидной молекулы. Окисление гидроксила в 3-м положении легко осуществляется у соединений с ненасыщенным кольцом А, а также при наличии двойной связи в положении 4. К этому же типу окислительных превращений относят введение кетогруппы в молекулу стероида.

Гидролиз эфиров стероидов. Проводится с помощью микроорганизмов. Имеет практическую значимость. Ацилированные стероиды являются обычными промежуточными продуктами химического синтеза, в котором используется ацильная защита функциональных групп. Хотя гидролиз осуществим химическим путем, он часто приводит к нежелательным продуктам. Микробиологическое расщепление эфирной связи осуществляется представителями различных таксономических групп, в частности флавобактериями. Культура *Vac. megaterium* обладает специфической активностью по отношению к 21-ацетатам стероидов с диоксиацетоновой цепочкой:



Дезацилирующая способность часто встречается среди микроформ, мукоровых и несовершенных грибов, актиномицетов. Особенность приведенной реакции состоит в том, что она проводится обычно одновременно с другими процессами – гидроксигированием и дегидрогенизацией. Ценность представляют как культуры, избирательно отщепляющие ацильную группу, так и микроорганизмы, способные наряду с гидролизом эфирной связи осуществлять еще какую-либо практически важную реакцию.

Отщепление боковых цепей стероидов. Представляет огромный интерес как путь получения ценных продуктов из относительно дешевых природных стероидов животного и растительного происхождения - стероидов, желчных кислот, сапогенинов.

Возрастающая потребность в производстве стероидных препаратов, а также истощение сырьевой базы делает все более актуальным поиск новых источников сырья. Стоимость диосгенина, получаемого из различных видов диоскореи, за последние годы возросла более чем в 10 раз в результате истощения запасов этих растений. В связи с этим возрос интерес к более доступным стеринам.

Основная трудность при использовании фитостероидов заключается в необходимости селективного удаления насыщенной алифатической боковой цепи с сохранением целостности стероидного скелета. Удовлетворительных методов химического расщепления до сих пор не удалось разработать, перспективными считаются лишь микробиологические способы. Однако промышленный интерес представляют только процессы расщепления боковой цепи, не затрагивающие стероидного ядра.

Проблема расщепления боковой цепи стероидов с сохранением скелета может быть решена следующими способами: 1) синтезом модифицированных стероидов, заместители в кольце А или В которых не позволяют микроорганизмам осуществлять 1,2-дегидрирование или 9 α -гидроксигирование; 2) инкубацией стероидов в присутствии соединений, ингибирующих действие ферментов 9 α -гидроксигилазы или 1,2-дегидрогеназы, 3) получением мутантных штаммов, не способных осуществлять определенные стадии расщепления самого стероидного ядра. Эти три способа, а иногда и их комбинации в сочетании с оптимальными условиями режима ферментации позволили получить из ряда стероидов большой спектр промежуточных соединений, применяемых для химического синтеза высокоактивных стероидных препаратов.

ТЕМА 7

АНТИБИОТИКИ КАК БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ

Антибиотики - специфические продукты жизнедеятельности различных групп микроорганизмов, низших и высших растений и Животных или их модификаций, обладающие высокой физиологической активностью в Отношении определённых групп микроорганизмов или злокачественных опухолей, избирательно задерживающие их рост или подавляющие развитие.

Образование антибиотиков - наследственно закреплённая особенность метаболизма организмов. Это проявляется в том, что каждый вид (или даже штамм) способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. Вместе с тем одинаковые антибиотики могут образовываться несколькими видами организмов (это свидетельство того, что данные микроорганизмы имеют общего предка). Образование антибиотика обусловлено определённым характером обмена веществ, возникающим и закреплённым в процессе эволюции организма. Эволюционное значение антибиотиков подчёркивается тем; что в антибиотикообразование может быть включено около 1 %, генов продуцента (род *Streptomyces*) и эта часть ДНК, несмотря на энергетические затраты при её репликации, не теряется во время селекции в естественных условиях.

Образование антибиотиков - фактор биологический, имеющий адаптационное значение. Для продуцента способность образовывать антибиотики важна не постоянно, а лишь в неблагоприятных условиях, например, при истощении среды питательными компонентами, при контакте со специфическими Продуктами жизнедеятельности другого организма.

Формы взаимодействия между организмами весьма разнообразны от мирного сожительства до явного антагонизма. Типы связей внутри микробиологических сообществ подразделяют на трофические и метаболические. Трофические связи характерны для метабиоза (последовательное использование субстрата), когда продукты жизнедеятельности одного микроорганизма, содержащие значительное количество энергии, потребляют другие виды микроорганизмов в качестве питательного материала. Метаболические связи выстраиваются, когда одни микроорганизмы могут потреблять отдельные продукты метаболизма других микроорганизмов или продукты метаболизма являются их ингибиторами.

Тип связи определяет специфику взаимодействия организмов. Симбиотические взаимоотношения характеризуются тем, что различные виды микроорганизмов создают для себя взаимовыгодные условия. Например, совместное развитие аэробных и анаэробных микроорганизмов: развиваясь в аэробных условиях, микробы поглощают кислород, создавая благоприятные условия для развития анаэробов. Паразитизм - форма взаимоотношений, при которой некоторые микробы развиваются за счет веществ клетки других организмов, например бактерии. Паразиты бывают внеклеточные (риккетсии) и внутриклеточные (вирусы). Хищничество имеет место, когда некоторые микробы поглощают клетки организмов других видов, используя их в качестве источника питания (преимущественно продукты лизиса живых клеток других бактерий). К числу микроорганизмов-хищников относятся, главным образом, миксоформы (миксобактерии, миксоамебы, миксомицеты). Антагонизм - это условия, при которых один вид микроорганизмов угнетает или полностью подавляет рост и развитие других видов. Явление антагонизма широко распространено среди бактерий, актиномицетов, грибов и других микроорганизмов. Образование антибиотических веществ специфическая особенность вида или даже штамма микроорганизмов, возникающая в результате их эволюционного развития как одна из приспособительных особенностей.

В естественных условиях четко ограниченных форм взаимоотношений не наблюдается. В процессе эволюции на разных этапах роста организмов и в зависимости от условий их развития один тип взаимодействия может смениться другим. Так, ряд бактерий (*E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* и др.) образуют фермент пенициллиназу, разрушающий пенициллин, выделяемый *Penicillium notatum*, *P. chrisogenum* и мицелиальными грибами других видов.

Антибиотики - первые лекарственные средства, полученные биотехнологическим способом. С антибиотиками человечество сталкивается с древних времён. Уже в Библии упоминается использование травы иссоп для лечения кожных заболеваний. Эта трава, как известно, поражается плесенью рода *Penicillium* или *Aspergillus* и может быть насыщена метаболитами грибов антибиотического характера.

Основные этапы развития производства антибиотиков:

1870 г. - обнаружено, что в среде, содержащей плесень, бактерии не развиваются (Д. Сандерсон);

1872 г. - доказана способность *Penicillium glaucum* подавлять рост бактерий (Д. Листер);

1871-1872 гг. - показано, что молодая культура зеленой плесени - грибы рода *Penicillium* - способна задерживать развитие возбудителей ряда кожных заболеваний человека (В.А Манассеин, АГ. Полотебнов);

1877 г. - опубликовано сообщение о подавлении роста *Vacillus anthracis* аэробными бактериями (Л. Пастер и С. Джебарт, АГ. Лебединский);

1929 г. - обнаружены антибиотические свойства грибов *Penicillium* (А Флеминг);

1940 г. - выделена субстанция пенициллина (Х. Флори, Е. Чейн);

1942-1956 ГГ. - коллектив ученых и практиков во главе с академиками Л.А Зильбером и З.В. Ермольевой провели поиск и отбор штаммов-продуцентов; разработали ферментационные среды и первые регламенты промышленного производства бензилпенициллина.

Сравнение двух штаммов (советского и английского) показало, что советский штамм образует 28 ед/мл, английский - 20 ед/мл. Открытие и изучение свойств нового антибиотика, применяемого в медицинской или сельскохозяйственной практике - это огромный труд ученых различных направлений (микробиологов, биохимиков, микологов, химиков, генетиков, фармакологов, биотехнологов, врачей). Со времени открытия пенициллина из разных микроорганизмов были выделены более 6000 антибиотиков, обладающих разной специфичностью и разным механизмом действия. Их широкое применение

для лечения инфекционных заболеваний помогло сохранить миллионы жизней.

Основные причины быстрого роста числа антибиотиков:

1. многие антибиотические вещества или продукты их модификации являются незаменимыми ЛП при инфекционных заболеваниях, ранее считавшихся неизлечимыми;
2. изменилась этиологическая структура инфекционных заболеваний, возросло число видов бактерий, их индуцирующих; широкое распространение получили инфекции, вызываемые грамотрицательными инфекциями, оттеснив стафилококковые заболевания;
3. как лечебные средства антибиотики применяют в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве, растениеводстве; отдельные антибиотики являются стимуляторами роста животных;
4. проблема резистентности микроорганизмов предполагает замену одних антибиотиков другими, более эффективными; некоторые антибиотики применяют в качестве консервантов в пищевой промышленности;
5. развитие химии природных соединений (изучение структуры, их модификация и синтез) способствует появлению новых знаний об антибиотиках;
6. антибиотики используют при изучении отдельных сторон метаболизма организмов, расшифровке тонких молекулярных механизмов биосинтеза белка, механизма функционирования мембран, специфических ингибиторов ферментов, в первую очередь, инактивирующие антибиотики.

Подавляющее большинство основных антибиотиков было выделено из грамотрицательной почвенной бактерии *Streptomyces*, хотя их продуцируют также грибы и другие грамположительные и грамотрицательные бактерии. Ежегодно во всем мире производится 100000 т. антибиотиков на сумму около 5 млрд. долларов, в том числе более 10 млн. долларов приходится на долю антибиотиков, добавляемых в корм скоту в качестве пищевых добавок или ускорителей роста.

По оценкам ВОЗ каждый год ученые обнаруживают от 100 до 200 новых антибиотиков, прежде всего, в рамках обширных исследовательских программ по поиску среди тысяч различных микроорганизмов таких, которые синтезировали бы уникальные антибиотики. Получение, лабораторные и клинические испытания новых лекарственных средств обходятся дорого, до применения доходят только те из них, которые имеют большую терапевтическую ценность и представляют экономический интерес; на их долю приходится 1-2% всех обнаруживаемых антибиотиков.

Образование антибиотиков - наследственно закреплённая особенность метаболизма микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (или даже штамм) способен продуцировать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ, что обусловлено определенным характером обмена, возникающим и закреплённым в процессе эволюции микроорганизма. Метаболиты являются промежуточными продуктами обмена веществ, результатом катаболических и анаболических реакций; конечный продукт обмена - антибиотики - синтезируются из первичных метаболитов.

Специфичность антибиотиков характеризуется:

- высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним организмов, т.е. способностью проявлять эффект даже в очень низких концентрациях;
- избирательностью действия, т.е. способностью конкретного антибиотика проявлять свое действие лишь в отношении определенных организмов или групп организмов, не оказывая заметного эффекта на другие формы живых существ.

Величину биологической активности антибиотиков выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл (ед/мл) или в 1 мг (ед/мг) препарата. За единицу антибиотической активности принято минимальное количество антибиотика, способное подавить развитие или задержать рост определенного числа клеток стандартного штамма тест-микроба в единице объема питательной среды. Так, за единицу активности пенициллина принято минимальное количество препарата, способное задерживать рост золотистого стафилококка (штамм 209) в 50 мл питательного бульона; для стрептомицина единица активности минимальное количество антибиотика, задерживающее рост *E. coli* в 1 мл питательного бульона.

Угнетение роста микроорганизмов антибиотиками может осуществляться только при наличии трех условий:

- биологически важная для жизнедеятельности бактерий система должна реагировать на воздействие низких концентраций препарата через определенную точку приложения;
- препараты должны обладать способностью проникать в бактериальную клетку и воздействовать на точку приложения;
- препарат не должен инактивироваться раньше, чем вступит во взаимодействие с биологически активной системой бактерии.

Точки приложения действия антибактериальных препаратов в бактериях различны - большая часть их находится в клеточной мембране и внутри клетки. Для достижения этих точек антибиотики сначала должны проникнуть через поверхностные слои клетки, находящиеся снаружи от цитоплазматической мембраны. Главным барьером на этом пути препарата является клеточная стенка. В клеточной стенке грамположительных бактерий содержится большое количество мукопептидов, являющихся основной мишенью для антибиотиков. Клеточная стенка грамотрицательных бактерий содержит большое количество липидов, в силу чего она менее проницаема и является надежным барьером для многих антибактериальных средств. Это обстоятельство служит причиной поиска новых антибиотиков (полусинтетические пенициллины и цефалоспорины), которые обладают хорошей проникающей способностью через липополисахаридный слой грамотрицательных бактерий и имеют высокую активность против большинства из них.

Классификация антибиотиков

Сложилось несколько подходов к классификации антибиотиков:

по принципу биологического происхождения (предпочтительна для биологов, изучающих организмы-продуценты

антибиотических веществ);

по химическому строению (удобна для химиков, занимающихся изучением строения молекул антибиотиков и путей из синтеза);

по типу и механизму биологического действия (принята в медицинской практике).

Тип действия антибиотиков бывает цидным (бактерицидным, фунгицидным, вирицидным, протозооцидным), под ним понимают необратимое нарушение жизнедеятельности (гибель) инфекционного агента, и статическим (бактериостатическим, фунгистатическим, виристатическим, протозоостатическим), при котором прекращается или приостанавливается размножение возбудителя. Такая градация имеет основное практическое значение при лечении тяжелых инфекций, особенно у пациентов с нарушениями иммунитета, когда обязательно назначение «цидных» препаратов.

Связь антимикробного препарата с точками приложения в микробной клетке может быть прочной или непрочной, что, в той или иной мере, определяет степень активности данного препарата. Антибиотики должны обладать высокой избирательной токсичностью, т.е. они должны быть активны по отношению к микробным клеткам и безвредны для клеток больного организма. Подобная избирательная токсичность может быть реализована лишь в том случае, если активные биохимические системы микробных клеток - мишени антибиотиков - отличны от подобных систем клеток макроорганизма. Селективная токсичность может носить пограничный характер, когда отличия в биохимических структурах клеток организма человека и бактерии заключаются в различном положении фосфолипидов в цитоплазматической мембране. Проблема селективности антибиотиков сложнее по причине того, что для репликации вирусы используют ферменты клеток хозяина.

В зависимости от точки приложения и механизма биологического действия антибиотики делят на:

I. Специфические ингибиторы биосинтеза клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины и цефамицины, ванкомицин, ристомин, циклосерин, бацитрацин, тиенамицины и др.)

II. Препараты, нарушающие молекулярную организацию и функции клеточных мембран (полимиксины, полиены).

III. Препараты, подавляющие синтез белка на уровне рибосом (макролиды, линкомицины, аминогликозиды, тетрациклины, левомицетин, фузидин).

IV. Ингибиторы синтеза РНК на уровне РНК-полимеразы и ингибиторы, действующие на метаболизм фолиевой кислоты (рифампицины).

V. Ингибиторы синтеза РНК на уровне ДНК-матрицы (актиномицины, антибиотики группы ауреоловой кислоты).

VI. Ингибиторы синтеза ДНК на уровне ДНК-матрицы (митомин С, антрациклины, нитрофураны, налидиксовая кислота).

Общая стратегия рекомбинантных микроорганизмов, способных синтезировать антибиотики, состоит во введении в организм хозяина специфических генов. Клонированных в подходящем векторе, которые кодируют один или несколько ферментов, катализирующих не свойственные микроорганизму метаболические реакции, или генов, влияющих на осуществляемый им в норме биосинтез определенных соединений.

При создании рекомбинантных штаммов *Streptomyces* - основного микроорганизма, используемого для получения антибиотиков, важно, чтобы трансформация и отбор трансформированных клеток не должны быть слишком сложны. В отличие от *E. coli*, *Streptomyces* существуют не в виде изолированных клеток, а в виде протяженных мицелл, поэтому перед трансформацией необходимо ферментативное разрушение клеточной стенки мицелл и высвобождение отдельных протопластов. Без этого невозможно отличить трансформированные клетки от нетрансформированных, поскольку видимые колонии на твердой среде будут образовываться из группы клеток, а не из индивидуальной клетки. Соответственно колонии, растущие в присутствии селективного антибиотика, будут представлять собой смесь трансформированных и нетрансформированных клеток. Проникновение плазмидной ДНК в протопласты *Streptomyces* облегчается в присутствии ПЭГ. После трансформации протопласты высевают на твердую среду, чтобы образовалась клеточная стенка, а затем для отбора трансформированных клеток переносят на селективную среду, обычно содержащую неомицин, где образуется колония, выросшая из трансформированных клеток, способных синтезировать антибиотик.

С помощью генетических или биохимических экспериментов можно идентифицировать, затем выделить один или несколько ключевых ферментов биосинтеза антибиотиков, определить их N-концевые аминокислотные последовательности и, исходя из этих данных, синтезировать олигонуклеотидные комплементарные последовательности.

Биосинтез антибиотика осуществляется микроорганизмами на определенном этапе их развития. Эта закономерность характерна для бактерий, мицелиальных грибов (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* и др.) и для большинства актиномицетов, образующих такие антибиотики, как стрептомицин, хлортетрациклин, окситетрациклин и другие. Максимально высокую активность штамма-продуцента способна обеспечить технология рекомбинантных ДНК, так как можно создавать новые антибиотики с уникальной структурой, оказывающие более мощное воздействие на определенные микроорганизмы и обладающие минимальными побочными эффектами. Генно-инженерные подходы используются для увеличения выхода антибиотиков и соответственно снижения стоимости их производства.

При проведении первой стадии технологического процесса применяют натуральные среды неопределенного состава, к числу которых относят продукты крахмалопаточного производства, агар, желатин, отруби, зерно. Композиция натуральных сред неопределенного состава не является постоянной. Например, агар, получаемый из разных видов морских водорослей, по химическому составу - сложный эфирный комплекс полисахарида с серной кислотой и разнообразными микроэлементами. Агар содержит также жирные кислоты, биотин, тиамин или его компоненты. В картофельной среде с глюкозой и пептоном, при одной и той же партии пептона и химически чистой глюкозы, состав картофельного экстракта зависит от

сорта картофеля, места его произрастания, времени уборки, срока и режима хранения и других причин. Поэтому для получения сопоставимых результатов, особенно при изучении физиологических и биохимических особенностей микроорганизма, с накоплением определенной концентрации антибиотика рост микроорганизмов прекращается (например, *Streptomyces griseus* прекращает свой рост при концентрации в среде стрептомицина сульфата 0,5%). Из культуральной среды антибиотика выделяют экстракцией органическими растворителями, осаждением, адсорбцией.

Очистку антибиотиков проводят повторной заменой растворителя, адсорбционно-хроматографическими методами. От степени чистоты препарата, влажности, температуры, pH растворителя зависит стабильность антибиотика.

Затем оценивают антимикробный спектр, стерильность, токсичность, пирогенность, действие на лейкоциты крови и другие показатели. На всех стадиях получения антибиотика строго соблюдается технологическая дисциплина, все процессы осуществляются в асептических условиях.

Частная технология антибиотиков

Пенициллины и цефалоспорины - большая группа лекарственных препаратов, имеющих определенное строение химического строения, механизмов действия, фармакологических, клинических эффектов. Эти препараты называют β -лактамами антибиотиками, что обусловлено наличием в их структуре общего для всей группы четырехчленного лактамного кольца.

Все *пенициллины* имеют одинаковое строение основной группы, которая представлена тиазолидиновым кольцом, соединенным с β -лактамым кольцом, и имеющим аминогруппу - 6-аминопеницилановая кислота (6-АПК).

Различные пенициллины (G, X, P, K и др.) отличаются строением радикала молекулы боковой цепи, активностью и спектром действия. Важные, с точки зрения клинического использования, представители пенициллинов можно разделить на несколько групп:

- обладающие наивысшей активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и слабой в отношении грамотрицательных видов, а также гидролизуются β -лактамазами (пенициллин G);
- относительно резистентные к действию β -лактамаз стафилококков, но с более низкой активностью в отношении грамположительных микроорганизмов и не действующие на грамотрицательные (нафициллин, метациллин);
- относительно высокоактивные против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, но разрушаемых β -лактамазами (карбенициллин, тикарциллин);
- препараты с относительной кислотоустойчивостью и пригодные для перорального применения (пенициллин V, ампициллин, клоксациллин).

Структурное единство ядра- 6-АПК существенно для проявления биологической активности молекул. При ферментативном расщеплении β -лактамого кольца бактериальными β -лактамазами (пенициллиназами) с образованием неактивной пенициллановой кислоты антибиотик лишается своих антимикробных свойств. Задачей получения новых пенициллинов является разработка препаратов, устойчивых к β -лактамазам или со сниженной способностью к индукции синтеза β -лактамаз. Для предотвращения возникновения резистентных форм бактерий к β -лактамам антибиотикам получены липосомальные формы этих антибиотиков (защита антибиотика происходит в результате включения лактама в положительно заряженные липосомы). Комплекс антибиотик-липосома обладает рядом преимуществ:

- снижается токсичность препарата за счет направленного транспорта;
- повышается проникновение антибиотиков через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий;
- антибиотик, включенный в липосомы, защищен от действия β -лактамаз;
- повышается химическая стабильность антибиотика

Для промышленного производства антибиотика используют культуру *Penicillium chrysogenum* и среду, содержащую кукурузный экстракт, гидролат, лактозу и минеральные соли.

Вместо кукурузного экстракта может быть применена арахисовая мука, жмыхи, мука, из хлопковых семян и другие источники; возможность широкого использования продуктов растительного происхождения обусловлена тем, что у *P. chrysogenum* имеются сильные протеолитические ферменты. В качестве углеводов часто используют сахарозу или смесь лактозы с глюкозой в соотношении 1:1. Глюкоза может снижать биосинтез антибиотика; на средах, содержащих лактозу или сахарозу (в условиях депрессии), биосинтез антибиотика идет активнее. Важную роль в процессе биосинтеза пенициллина играет сера, которая содержится в структуре антибиотика. В качестве источников серы используются натрия сульфат и натрия тиосульфат. Избыток ионов меди не влияет на рост гриба, но подавляет биосинтез пенициллина. Эффект торможения биосинтеза снимается добавлением в среду ионов железа. *P. chrysogenum* в качестве источника фосфора может использовать не только фосфаты, но и фитаты (соли инозитфосфорных кислот): этот продуцент содержит фермент, разрушающий фитин с освобождением неорганического фосфора.

Температура в период первой фазы должна быть 30°C, во вторую фазу 20°C, pH в период роста гриба - ниже 7,0, потребление углеводов должно быть медленным, что достигается использованием лактозы, либо дробным внесением глюкозы.

Синтез того или иного пенициллина зависит от наличия специфического вещества в среде, иначе говоря, предшественника, который микроорганизм включает в молекулу антибиотика без предварительного расщепления. Следует отметить, что предшественники биосинтеза пенициллина (фенилуксусная кислота, фенилацетамид, феноксиуксусная кислота) при определенных - концентрациях и pH среды оказывают токсическое влияние на продуцента. Фенилуксусная кислота наименее токсична. Добавление её в среду в концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия, особенно в первые 24 ч его развития. Фенилуксусная кислота добавляется в концентрации от 100 до 500 мкг/мл через 24 ч развития *P. chrysogenum*.

При таких условиях обеспечивается наибольший выход бензилпенициллина, который через 72 ч развития может достигать 500-1000 мкг/мл.

При развитии гриба без внесения предшественника образуется около 45% бензилпенициллина (пенициллин G) и около 53% пенициллина K (радикал - n-гептилпенициллин). При добавлении к среде фенилуксусной кислоты ($C_6H_5CH_2COOH$) меняется соотношение образующихся компонентов в сторону резкого увеличения бензилпенициллина, количество которого в зависимости от возраста достигает 75-99% от смеси пенициллинов. В процессе культивирования *P. chrysogenum* в среде, не содержащей фенилуксусной кислоты, в ней накапливаются серосодержащие соединения не β -лактаманного характера, близкие к цистеину и метионину. Добавление в среду фенилуксусной кислоты способствует более интенсивному метаболизму серосодержащих компонентов в соединения β -лактаманного характера.

При развитии продуцента пенициллинов - гриба *P. chrysogenum* на кукурузно-лактозной среде выделяют три фазы. Первая фаза - рост мицелия, выход антибиотика низок. Всегда присутствующая в кукурузном экстракте молочная кислота потребляется продуцентом с максимальной скоростью, лактоза используется медленно. Потребление кислорода высокое. Усиливается азотный обмен, в результате в среде появляется аммиак и резко поднимается значение pH. Вторая фаза - максимальное образование пенициллина, это связано с быстрым потреблением лактозы и аммонийного азота. pH среды остаётся почти без изменений, увеличение массы мицелия незначительное, потребление кислорода снижается. Третья фаза - снижение концентрации антибиотика в среде в связи с начавшимся автолизом мицелия и выделением в результате этого процесса аммиака, что сопровождается повышением pH среды.

В настоящее время описано шесть условно выраженных возрастных фаз продуцента пенициллина. Заметное количество пенициллина начинает образовываться с IV возрастной фазы гриба, максимум накопления приходится на VI фазу - в период автолиза.

Определение возрастных фаз путём микроскопического контроля позволяет установить: 1) ход общего темпа развития гриба, его состояние, пригодное для использования посевного материала, контроль за ходом образования антибиотиков; 2) дефекты развития и возможные причины этих дефектов; 3) момент окончания развития гриба в реакторе.

По мере развития гриба меняется и химический состав мицелия. Количество общего азота и белка в мицелии уменьшается, содержание моносахаров в период максимального биосинтеза пенициллина (96 ч) увеличивается почти в 6 раз по сравнению с начальным периодом, количество дисахаридов уменьшается. Изменяется количество отдельных аминокислот.

Процесс биосинтеза пенициллина ведётся при самом тщательном соблюдении стерильности всех операций, так как загрязнение культур посторонней микрофлорой резко снижает накопление антибиотика. Это связано с тем, что многие бактерии воздуха способны образовывать пенициллиназу. Особенно активно продуцируют этот фермент *B. subtilis* и *B. cereus*. Одним из активных продуцентов пенициллиназы является туберкулёзная палочка (*Mycob. tuberculosis*). Предположительно именно с этим свойством связана резистентность этого микроорганизма к пенициллину. Современная промышленная микробиология получает культуральные жидкости, содержащие свыше 55 тыс. ед/мл. Выделение пенициллина начинается с фильтрации или центрифугирования (отделения мицелия гриба).

Из культуральной жидкости антибиотик, где он находится в виде кислоты, выделяют путём экстракции неполярными органическими растворителями (амилацетатом, хлороформом, бутилацетатом, бутанолом и др.). Очистку антибиотика проводят путём замены растворителей, поскольку соли пенициллина плохо растворимы в органических растворителях. Экстрагированный пенициллин в виде кислоты переводят в водный раствор в виде соли, добавляя щёлочь. Повторяя эти операции, пенициллин концентрируют и очищают. Большинство пенициллинов производят в виде натриевых или калиевых солей. Новокаиновые и бензатиновые соли являются основой пролонгированных препаратов пенициллина для внутримышечного введения.

Механизм биосинтеза молекулы пенициллина.

Кетоглутарат + Ацетил-КоА

Гомоцитрат

α -кетoadипиновая кислота

L- α -аминоадипиновая кислота

L-цистеин

L- α -аминоадипиновая кислота-L-цистеин

L-валин

L- α -аминоадипиновая кислота-L-цистеин-D-валин

Моноциклический β -лактам

Изопенициллин N (L- α -аминоадипиновая кислота- β -аминопенициллановая кислота)



Бензилпенициллин ($C_6H_5CH_2CO$ -6-аминопенициллановая кислота)

В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли достаточно стабильны в течение длительного времени при температуре 4°C. Растворы быстро теряют активность (в течение 24 часов при температуре 20°C), их готовят непосредственно перед введением.

В настоящее время большое практическое значение имеет полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина. Исходным продуктом служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК).

6-АПК получают в результате биосинтеза при развитии *P. chrysogenum* при отсутствии предшественника в среде или путём ферментативного дезацилирования бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина при участии фермента пенициллинацилазы (пенициллинамидазы). Второй способ наиболее перспективен. Используется иммобилизованная пенициллинацилаза, которая гидролизует бензилпенициллин с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты. Пенициллинацилаза образуется различными группами микроорганизмов, в том числе она образуется всеми продуцирующими пенициллин грибами. В настоящее время предложен способ получения иммобилизованных клеток *E. coli* с высокой пенициллинацилазной активностью, пригодных для многократного применения.

Сама по себе 6-АПК не активна. Её подвергают химическому ацилированию и получают аналоги пенициллина с улучшенными или новыми свойствами; некоторые из них: оксациллин, ампициллин, метициллин, амоксициллин и другие: Всего в настоящее время используется порядка четырёх десятков таких препаратов.

В настоящее время бензилпенициллин необходим не только как медицинский препарат, но и как вещество, являющееся исходным продуктом для получения 6-АПК и в дальнейшем полусинтетических пенициллинов. Из общего количества природных пенициллинов примерно 35% используется как медицинские препараты, а 65% - для получения 6-АПК.

В начале 60-х гг. были предприняты попытки химического синтеза пенициллинов, в частности был синтезирован феноксиметилпенициллин, но практического значения эти попытки не имели.

Большинство пенициллинов производят в виде натриевых и калиевых солей. Новокаиновые и бензокаиновые соли являются пролонгированными формами для внутримышечного введения. В сухой кристаллической форме пенициллиновые соли достаточно стабильны при температуре 4°C. Растворы быстро теряют активность (в течение 24 ч при температуре 20°C), их готовят непосредственно перед введением. Пероральные пенициллины применяют за 1 ч до или через 2 ч после приема пищи, чтобы снизить связывание компонентами пищи и кислотную инактивацию препаратов.

Цефалоспорин - антибиотик из грибов рода *Cephalosporium*. Основным продуцентом является *C. acremonium*.

Впервые сообщение было сделано Джузеппе Бротцу в 1948 г. В культуральной жидкости было обнаружено несколько цефалоспоринов, основной из которых - цефалоспорин С. На основе этого антибиотика в дальнейшем были созданы многочисленные полусинтетические цефалоспорины с ценными свойствами.

По химическому строению цефалоспорин принадлежит к β -лактамным соединениям, но β -лактамное кольцо конденсировано не с пяти, а с шестичленным гетероциклом. Цефалоспорины в отличие от пенициллинов устойчивы к β -лактамазе, подавляют развитие и грамположительных и грамотрицательных бактерий, но активность этого антибиотика ниже пенициллина.

Цефалоспорин не инактивируется пенициллиназой. Но имеется аналогичный фермент, гидролизующий β -лактамное кольцо цефалоспорина- цефалоспориназа.

В процессе развития *S. acremonium* наряду с цефалоспорином С синтезируется и пенициллин N. Его образование идёт тем же путём, что и образование изопенициллина N в процессе биосинтеза бензилпенициллина. Через ряд стадий из изопенициллина N образуется цефалоспорин С.

Все пенициллины и цефалоспорины являются селективными ингибиторами синтеза клеточной стенки. Первый этап действия препаратов заключается в их связывании с клеточными рецепторами; такими рецепторами являются пенициллинсвязывающие протеины (ПСП), количество которых составляет от 3 до 6 тыс. у различных бактерий. Отдельные ПСП могут иметь неодинаковый аффинитет к препарату, и каждый из них может опосредовать различное действие. Так, присоединение пенициллина к одному ПСП может вызывать аномальное увеличение клетки, присоединение к другому - приводить к дефекту на поверхности клеточной стенки без последующего лизиса клетки. ПСП контролируется хромосомами, мутации могут изменить их количества и аффинитет к отдельным β -лактамным препаратам. После связывания β -лактамного препарата с рецепторами ПСП ингибируется реакция транспептидирования и останавливается синтез пептидогликана. Следующий этап - устранение или инактивация ингибитора аутолитических энзимов (гидролаз) в клеточной стенке, что сопровождается активизацией литического фермента у некоторых микроорганизмов и может привести к лизису клетки.

В последние годы методом смешанного (биологического и химического) синтеза удалось получить около 50 тыс. аналогов цефалоспорина. Примерно 50 антибиотиков имеет практическое клиническое значение. Цефалоспорины традиционно делят на четыре поколения по спектру действия и антимикробной активности.

Стрептомицин принадлежит к группе аминогликозидных антибиотиков. Актиномицет, синтезирующий стрептомицин *Streptomyces griseus* впервые был выделен в лаборатории микробиологии Ратжерского университета в 1943 г. С появлением стрептомицина медицина получила мощное оружие для борьбы с таким тяжёлым и достаточно широко распространённым заболеванием, как туберкулёз. Поэтому детально разрабатывались вопросы применения стрептомицина в терапии

различных инфекционных заболеваний и его промышленного производства.

Стрептомицин продуцируют ряд видов актиномицетов рода *Streptomyces*. Однако основным продуцентом стрептомицина признан *S. griseus*, способный синтезировать до 10-20 тыс. мкг/мл антибиотика. Культуры актиномицетов весьма переменчивы и каждому штамму должна соответствовать определённая среда и свой режим для развития микроорганизма. На их изменчивость влияют условия культивирования и особенно состав сред (на более богатых по составу средах наблюдается и более быстрая изменчивость). Изменчивость продуцентов стрептомицина - результат генетической нестабильности этих микроорганизмов, обусловленный существенными перестройками ДНК, которые затрагивают многие гены, в том числе и гены биосинтеза антибиотиков и гены устойчивости к ним.

Для стабилизации признаков, связанных с антибиотикообразованием, при хранении и поддержании штамма иногда в среды добавляют антимуагены - вещества, способные стабилизировать процессы, приводящие к хромосомным перестройкам и регуляции экспрессии генов. Среди антимуагенов - пуриновые нуклеотиды, ионы марганца, L-метионин, гистидин, полиамины, кофеин и другие соединения. В контроле биосинтеза стрептомицина *S. griseus* принимает участие плазмидная ДНК, в процессе биосинтеза - 20-30 генов.

При промышленном производстве стрептомицина используются штаммы, хорошо развивающиеся на соевых средах, их основными компонентами является соевая мука, гидролат, аммонийные соли. Существенную роль в биосинтезе стрептомицина играют жиры соевой муки и её минеральный состав. Белок сои и его кислотный гидролизат мало пригодны для биосинтеза антибиотика.

Аэрация среды имеет существенное значение, так как *S. Griseus* высокоаэробный организм и поглощает значительное количество кислорода, которое зависит от состава среды и стадии развития продуцента. В ранний период развития актиномицета потребление кислорода воздуха более интенсивное, а затем оно падает до нуля. Увеличение степени аэрации повышает выход стрептомицина. В анаэробных условиях продуцент стрептомицина развивается слабо. Мицелий, выращенный в аэробных условиях и перенесённый затем в анаэробные, стрептомицина не образует. Для максимального накопления антибиотика культура должна находиться в условиях непрерывной аэрации.

Оптимальная температура для развития антибиотика 27-29°C. Повышение её до 30°C и выше резко снижает и даже прекращает его образование. Оптимальную температуру меняют в зависимости от штамма продуцента и состава среды.

Лучшим начальным рН для развития актиномицета является 7,0. Стрептомицин образуется при значении рН от 7,5 до 8,5. В кислых средах активность стрептомицина снижается, в щелочных - максимальная. Так, активность стрептомицина при рН 5,8 в 20-80 раз меньше, чем при рН 8,0. Для проявления максимальной антимикробной активности стрептомицина оптимальное значение рН 7,5-8,0.

Наличие некоторых веществ в среде влияет на антибиотическую активность стрептомицина. Если к этой среде прибавить 0,5-3% натрия хлорида, калия хлорида или натрия сульфата, *E. coli* развивается в присутствии 10 мкг/мл стрептомицина. Имеется два объяснения этому факту: в присутствии натрия хлорида уменьшается скорость и степень диффузии стрептомицина, или натрий хлорид снижает адсорбцию антибиотика бактериальной клеткой. При концентрации пировиноградной, фумаровой кислот до 1 % продуцент развивается в присутствии 10 мкг/мл стрептомицина, если концентрацию солей повысить до 3%, рост бактерий наблюдается при концентрации антибиотика 150 мкг/мл. Защитные свойства этих кислот по-разному проявляются по отношению к различным микроорганизмам. В отношении *E. coli* защитные свойства проявляются в большей степени, в отношении *Staph.aureus* защитных свойств не наблюдается. Сильно снижается активность стрептомицина в присутствии цистеина и гидроксиламина (цистеин полностью инактивирует антибиотик в течение нескольких часов).

При развитии продуцента различают две основные стадии. На первой стадии идёт быстрый рост и развитие микроорганизма с энергичным использованием основных компонентов субстрата, максимальное потребление кислорода. В цитоплазме высокое содержание РНК, ДНК вначале отсутствует и обнаруживается только через 12 ч развития. В среде происходит некоторое увеличение аммонийного азота, связанное с разложением белков соевой муки. рН вначале несколько снижается, затем повышается с 6,8 до 7,9. Образование стрептомицина незначительное.

Через 28 ч масса мицелия прекращает увеличиваться, начинается вторая стадия - процесс образования стрептомицина. На третьи сутки рН с 7,9 падает до 6,7, а на четвёртые и пятые - вновь возрастает до 7,7. Вторая стадия характеризуется медленным потреблением оставшихся в среде питательных веществ, замедлением роста актиномицета, снижением потребления кислорода, автолизом мицелия, максимальным образованием стрептомицина. Максимальное накопление стрептомицина наблюдается, когда автолитические процессы начинают преобладать над процессами роста. Количество аммонийного азота продолжает возрастать, что, по всей вероятности, связано с разложением белков соевой муки и автолизом мицелия. В культуральной жидкости находятся минеральные вещества, белки, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, полисахариды, жиры, стрептомицин и другие вещества.

S. griseus при определённых условиях развития культуры образует ещё один антибиотик - маннозидострептомицин (стрептомицин Б), в чистом виде выделенный в 1947 г. из культуры актиномицета методом противоточной хроматографии. Маннозидострептомицин отличается от стрептомицина наличием в молекуле маннозы. Он менее активен, чем стрептомицин. Культуры *S. griseus* содержат фермент, превращающий маннозидострептомицин в стрептомицин. При соответствующем контроле развития культуры актиномицета можно добиться минимального образования маннозидострептомицина.

Основная часть стрептомицина выделяется в культуральную среду, но часть его остаётся в мицелии и на его поверхности. С целью извлечения стрептомицина из микроорганизма культуральную жидкость вместе с биомассой обрабатывают минеральной кислотой. При этом весь антибиотик переходит в раствор. Мицелий отделяют прессованием или центрифуги-

рованием. Свободную от мицелия культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой. Этим достигается удаление белков и органических оснований, ионов металлов (кальция, магния, железа), далее ведётся выделение стрептомицина в чистом виде.

Стрептомицин - сильно полярное соединение и его основание и соли неорганических кислот хорошо растворимы в воде. Соли же органических кислот стрептомицина нерастворимы почти во всех органических растворителях.

Для выделения стрептомицина из культуральной жидкости в чистом виде используются методы адсорбции на активированном угле и метод ионообменной хроматографии.

В основу первого метода положена адсорбция стрептомицина на активированном угле при нейтральном или слабощелочном pH среды. При pH 2-4 стрептомицин остаётся в растворе, в то время как примеси адсорбируются на сорбент. После удаления примесей на активированный уголь адсорбируют из подщелоченной среды антибиотик, его десорбцию осуществляют этанолом, подкисленным кислотой хлороводородной. Далее в раствор добавляется диэтиловый эфир - стрептомицин выпадает в осадок.

Стабильность стрептомицина имеет значение для производства и хранения антибиотика. Она зависит от чистоты препарата, влажности, температуры, pH растворителя. Химически чистый стрептомицин устойчив в сухом состоянии и в виде растворов. Соли стрептомицина при хранении при комнатной температуре инактивируются лишь в незначительной степени на протяжении нескольких лет. Максимальная стабильность растворов стрептомицина сульфата и гидрохлорида находится при pH от 3,0 до 7,0 при температуре от 7 до 25°C.

По отношению к стрептомицину микроорганизмы условно делятся на 3 группы: 1. Чувствительные, рост которых подавляется при концентрации стрептомицина 10 мкг/мл, это роды *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* и некоторые другие.

2. Умеренно чувствительные, для подавления которых *in vitro* необходима концентрация антибиотика от 10 до 100 мкг/мл, сюда относят многие бактерии из родов *Enterobacter*, *Corinebacterium*, *Diplococcus*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Vibrio*.

3. Устойчивые, для подавления которых необходима концентрация стрептомицина, превышающая 100 мкг/мл. К этой группе относят роды *Bacteroides*, *Clostridium*, некоторые виды *Proteus*, многие виды грибов, дрожжей, риккетсии, вирусы.

К стрептомицину легко возникает вторичная резистентность. Повышение устойчивости к нему в 1000 раз возникает у золотистого стафилококка всего лишь через три пассажа на бульоне с возрастающими концентрациями антибиотика, а у *Salmonella typhi* повышение устойчивости после 14 пассажей наблюдается в 22 600 раз.

При лечении стрептомицином необходимо учитывать его побочные эффекты, могут появиться глухота, вестибулярные и другие нарушения функций. Их развитие определяется длительностью периода лечения, дозой антибиотика, методами введения, степенью очистки. Токсичность менее очищенных препаратов стрептомицина первого периода получения и применения стрептомицина была более высокой, что связано с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ, которые сами достаточно токсичны.

Грамицидин С. Продуцент *Bacillus brevis* способен синтезировать полипептидные антибиотики, к числу которых относят грамицидины А, В, С_D, D, С. Последний иногда обозначают как грамицидин S (советский грамицидин). Все они отличаются как по аминокислотному составу, так и по пространственной структуре молекулы.

Для производства грамицидина С (S) предложены среды на основе мясного и дрожжевого гидролизатов, содержащие сбалансированный набор минеральных и органических солей.

В процессе культивирования необходимо подобрать сбалансированное сочетание интенсивности аэрации среды (от 0,38 до 4,38 г O₂/(л/ч)) и концентрации входящих в неё веществ. Температура культивирования 40°C. Развитие продуцента и синтез антибиотика может идти и при температуре 28°C, но в этом случае максимальный биосинтез антибиотика наблюдается в первые 24 ч, в то время, как при температуре 40°C между 24 и 48 ч.

При выделении грамицидина С культуральную жидкость подкисляют кислотой хлороводородной до pH 4,5-5,0. В осадок выпадает дихлоргидрат грамицидина С вместе с бактериальными клетками продуцента. Из осадка антибиотик экстрагируют этанолом. Концентрат, содержащий 4 % грамицидина, используется в медицинской практике.

Неомицины. В 1949 г. З. Ваксман и Х. Лешевалье из культуры *Streptomyces fradiae* выделили неомицин. В дальнейшем было установлено, что это комплекс, состоящий из семи антибиотиков аминокликозидного строения.

На синтетической среде актиномицет развивается лучше, чем на среде с соевой мукой, но биосинтез неомицина на синтетической среде почти в 8 раз ниже, чем на натуральной среде неопределённого состава. Некоторые вещества способствуют повышению выхода неомицина на 50%. К ним относятся ауксин, α -нафтилуксусная кислота. Наиболее эффективная доза ауксинов - семь частей на миллион, внесённая в среду перед стерилизацией. Стимулирующий эффект ауксинов проявляется при продолжительности процесса 138-162 ч, в ранние сроки развития культуры эффект отсутствует.

В процессе образования антибиотика существенную роль играет цинк. Степень аэрации культуры должна быть несколько ниже, чем при выработке стрептомицина.

Неомицины - основания, хорошо растворимые в воде и нерастворимые в органических растворителях, наибольшая их антибиотическая активность проявляется в щелочной среде.

Неомициновый комплекс не теряет антимикробных свойств при длительном хранении (до 2-х лет) как в виде растворов, так и в твёрдом состоянии.

Антимикробный спектр сходен со спектром стрептомицина. Но неомицин подавляет развитие устойчивых к стрептомицину штаммов *Mycobacterium tuberculosis*. Он малоактивен в отношении большинства видов *Clostridium*, *Streptococcus*,

грибов, а также против вирусов и простозоа.

Чувствительные к неомичину микроорганизмы приобретают устойчивость к нему в меньшей степени, чем к стрептомицину.

При использовании неомичина следует учитывать его токсичность. Для человека неомичин более токсичен, чем стрептомицин. Степень токсичности колеблется в зависимости от состава неомичинового комплекса и чистоты препарата.

ТЕМА 8 ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Иммунобиотехнология - это раздел современной биотехнологии, представленной как научными достижениями, так и динамично развивающимся технологическим производством диагностических, профилактических и лекарственных средств с применением в качестве действующего начала разных агентов и процессов иммунной системы. Известно, что человек обладает иммунной системой для защиты от воздействия внешних неблагоприятных факторов, биологически активных агентов. В качестве таких агентов выступают клетки микроорганизмов, вирусы, белки, нуклеиновые кислоты, антибиотики, пестициды, объединенные под общим названием антигенов. Понятие «антиген» является общим, так как обозначает определенную химическую структуру, против которой могут быть получены антитела.

На самом деле антитела образуются не против всей молекулы белка или бактериальной клетки, а только к небольшим участкам на их поверхности, получившим название антигенных детерминант (эпитопов). Например, в случае белковых молекул антигенными детерминантами являются участки поверхности, содержащие всего около пяти аминокислотных остатков. В случае бактериальных клеток в качестве антигенных детерминант часто выступают короткие цепочки из трех-пяти остатков сахаров, образующих стенку бактерий.

Что касается низкомолекулярных соединений, например некоторых лекарств, то сами по себе они не могут вызывать образование антител. Их называют гаптенами. Однако после присоединения гаптенных к поверхности какой-либо макромолекулы организм начинает вырабатывать антитела. Причем даже малые размеры гаптена по отношению к объему полости активного центра антитела не являются препятствием для образования высокоспецифических антител, хотя гаптен в этом случае связывается лишь с частью специфических участков активного центра антитела. В качестве примера можно привести молекулы двух гормонов – тироксина и тиронина, структура которых отличается всего лишь одним атомом йода, а вырабатываемые антитела против них разнятся по константам связывания более чем в 1 000 раз.

Антигены внешней среды поступают в организм человека с воздухом, водой, пищей, через слизистые и кожные покровы. Часть антигенов может попадать к человеку в виде вакцин и иммуномодулирующих лекарственных средств (агентов). Иммуномодуляторы либо усиливают, либо ослабляют иммунный ответ организма, поэтому в зависимости от свойств их подразделяют на иммуностимуляторы и иммуносупрессоры. Иммунный ответ - сложный процесс межклеточного взаимодействия лимфоидных клеток разных типов с участием специфических гормонов, в результате чего так называемые В-клетки активно синтезируют специфические антитела против данного антигена. Антитела, однородные по структуре и специфичности, производимые в неограниченных количествах, называются моноклональными антителами.

Способы усиления иммунного ответа по типу воздействия подразделяют на активные и пассивные, последние - на специфические и неспецифические (табл.).

К группе активных специфических препаратов можно отнести вакцины, полученные на основе либо рекомбинантных, протективных антигенов, либо живых гибридных носителей. К группе препаратов для образования пассивного иммунитета (неспецифической иммуностимуляции) относят рекомбинантные интерлейкины, интерфероны и другие цитокины.

Таблица

Способы усиления иммунного ответа с помощью иммунобиопрепаратов

Активное воздействие	Пассивное воздействие	
	специфическое	неспецифическое
Вакцины на основе рекомбинантных протективных антигенов, живые гибридные носители	Поликлональные антитела - на инфекционных агентов, микробных токсинов	Рекомбинантные интер лейкины, интерфероны и другие цитокины. Тимические факторы. Трансплантация костного мозга

Таблица

Способы усиления иммунного ответа с помощью иммунобиопрепаратов

Специфическое воздействие		Неспецифическое воздействие
Активное	Пассивное	
Рекомбинантные антигены, IgE-связывающие молекулы и созданные на их основе толерогены	Иммунотоксины, антиидиотипические антитела в качестве мишени для ауто-антител. специфическая плазмоиммуносорбция	Моноклональные антитела против цитокинов. Неспецифическая гемосорбция и иммуноплазмаферез

Вместе с тем существует группа препаратов с иммуносупрессивной активностью, появление которых в клинической практике в 1960-х гг. было связано с необходимостью подавления реакции отторжения тканей при трансплантации

органов и лечения аутоиммунных заболеваний (табл.). Как видно из табл., к препаратам, вызывающим супрессию специфического иммунного ответа к какому-либо аутоантигену относятся толерогены. Их получают, конструируя комплекс из рекомбинантных антигенов и неиммуногенных носителей, подавляющий специфический LgE-ответ на аллерген. При конъюгации цитостатика или токсина с антителами (иммунотоксинами) можно осуществить направленный транспорт лекарственного средства к определенному рецептору клетки, к конкретной субпопуляции клеток, например к Т-лимфоцитам (Т-хелперам). Кроме того, антиидиотипические антитела (образующиеся против антиген-связывающих центров) могут быть мишенью для аутоантител, с помощью которых можно влиять на течение аутоиммунного заболевания, нивелируя его симптомы, корректируя, например, нарушения системы свертывания крови и Т.д.

Методы пассивной иммуносупрессии включают специфическую плазмоиммуносорбцию, которая используется при тяжелых формах аллергических заболеваний. С помощью этого метода можно удалять из крови больного глобулины и аллергеноспецифические антитела.

В современной фармацевтической биотехнологии кроме иммуномодуляторов и иммуносупрессоров значительное место отводится лекарственным и диагностическим препаратам, получаемым на основе медиаторов иммунной системы.

Медиаторы иммунологических процессов, являющиеся в обобщенном виде полипептидными факторами факторами неиммуноглобулиновой природы, называются цитокинами. Белки, синтезируемые лимфоцитами, называют лимфокинами, а синтезируемые макрофагами и моноцитами - монокинами. Иммуномедиаторы - это единая функциональная совокупность, обеспечивающая в гомеостазе созревание и дифференцировку Т- и В-клеток путем регулирования их пролиферативной активности. Как правило, количество медиаторов в организме невелико и они быстро инактивируются. С помощью биоинженерии удалось решить проблему получения интерлейкина-1 и -2 для группы Т-клеточных лимфокинов, а также медиаторов семейства интерферонов.

Показанием к терапии служит эндогенный дефицит интерлейкина-2, возникающий, например, после трансплантации костного мозга, а также при цитостатической терапии. В настоящее время методами генной инженерии можно получать препараты интерферонов всех классов, положительные результаты применения которых были получены при лечении вирусных заболеваний и отдельных видов опухолей (в онкологии).

Лекарственные вещества, проявляющие высокую активность при тестировании *in vitro* (обычно в культуре клеток), зачастую оказываются значительно менее эффективными *in vivo*. Кажущееся снижение их активности объясняется тем, что они не достигают органа или клетки-мишени в нужной концентрации. Увеличение дозы принимаемого препарата не решает проблему, поскольку при этом часто возникают побочные эффекты. Более того, чтобы избежать этих эффектов многие терапевтические средства заведомо вводят в дозах, не достигающих оптимальных, что дополнительно снижает их эффективность. Для облегчения доставки лекарственного вещества к месту его действия используют несколько приемов:

- заключают его в липосомы, липидная оболочка которых имеет высокое сродство к нужным органам;
- встраивают гены специфических токсинов в инфильтрующую опухоль лимфоциты, которые высвобождают эти токсины непосредственно в опухоли;
- присоединяют молекулы лекарственных веществ к моноклональным антителам, специфичным по отношению к белкам, находящимся на поверхности строго определенных клеток, например, опухолевых;
- используют лекарственные вещества в неактивной форме, переводя их в активное состояние при помощи ферментов. Чтобы такое превращение происходило только вблизи клетки-мишени, фермент присоединяют к моноклональному антителу, специфичному к поверхностному антигену этой клетки.

Несмотря на весьма существенные достижения применения моноклональных антител в терапии разных заболеваний, имеются все-таки и некоторые ограничения их использования в клиниках. Прежде всего, они как гибридные продукты могут быть контаминированы генетическим материалом ретровирусов, так как все миеломы как опухолевые партнеры гибридизации имеют в геноме гены ретровирусов, являющиеся онкогенными и соответственно опасными для человека. Поэтому все препараты моноклональных антител обязательно тестируются на отсутствие вирусного генетического материала.

Для получения антител используют мышей, морских свинок, кроликов, кур, овец, коз, лошадей, которым делают инъекции антигена. В присутствии стимуляторов иммунного ответа в сыворотке крови накапливаются специфические антитела. Обычно антитела выделяют из сыворотки крови сульфатом аммония, спиртом или полиэтиленгликолем. Эти антитела имеют много примесей белков. Высокоочищенные антитела выделяют с помощью ионообменной и аффинной хроматографии на иммуносорбентах.

Для организации масштабного производства моноклональных антител ключевую роль сыграл метод гибридомной технологии. Хорошо известно, что в результате иммунного ответа на какой-либо антиген образуется высокогетерогенный продукт - антисыворотка со смесью антител, продуцируемых разными линиями В-лимфоцитов и направленных к разным антигенным детерминантам антигена. Проблема получения определенной линии лимфоцитов, которые не растут на искусственной среде *in vitro* в культуре, была решена, как только стало возможным получение соматических гибридов. Известно, что миеломы (злокачественные опухоли костного мозга, клетки которых обладают способностью к неограниченному росту) продуцируют большое количество аномальных иммуноглобулинов.

В 1975 г. Г. Келер и К. Мильштейн сумели впервые выделить клоны клеток, способные секретировать только один тип молекул антигенов и в то же время расти в культуре. Эти клоны клеток были получены слиянием антителообразующих и опухолевых клеток - клеток-химер, названных гибридомами, так как, с одной стороны, они наследовали способность к практически неограниченному росту в культуре, а с другой стороны, способность к продукции антител определенной спе-

цифичности (моноклональных антител).

Весьма существенно для биотехнолога то, что отобранные клоны могут длительно храниться в замороженном состоянии, поэтому в случае необходимости можно взять определенную дозу такого клона и ввести животному. У которого будет развиваться опухоль, продуцирующая моноклональные антитела заданной специфичности. Вскоре в сыворотке животного будут обнаружены антитела в очень высокой концентрации от 10 до 30 мг/мл. Клетки такого клона можно также выращивать либо *in vitro*, а секретлируемые ими антитела получать из культуральной жидкости. В настоящее время гибридная технология получила широкое применение. Создание гибридом, которые можно хранить в замороженном состоянии (криоконсервирование), позволило организовать целые гибридомные банки, что в свою очередь открыло большие перспективы по применению моноклональных антител. Сфера их применения помимо количественного определения разных веществ включает самую разнообразную диагностику, например идентификацию определенного гормона, вирусных или бактериальных антигенов, антигенов группы крови и тканевых антигенов (табл.).

Только благодаря использованию моноклональных антител, полученных в результате иммунизации животных лекарствами, стало возможно определение дозы этих лекарств. Такая «иммуно-дозировка» надежна и экономична. В 1990-х гг. в США «Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств» (FDA) впервые утвердило к продаже коммерческий набор для диагностического скрининга на основе гибридом, предназначенный для установления аллергии.

С помощью моноклональных антител возможно выделение биологически активных веществ (белков, гормонов, токсинов) из сложных смесей. Например, при использовании иммуноадсорбции для очистки интерферона был получен препарат высочайшей степени очистки (до 9900). Только после одного пассажа через колонку с иммобилизованными моноклональными антителами препарат очищался в 5 000 раз.

Можно использовать моноклональные антитела и в качестве меток для точной идентификации специализированных клеток, например нейронов. Существует также технология использования моноклональных антител для изучения клеточных мембран, позволяющая выделять мембранные белки в чистом виде и измерять их биологическую активность.

Моноклональные антитела можно использовать как в качестве стандартного реагента для обнаружения определенных молекул на клеточной мембране, так и для разделения популяции клеток, несущих на поверхности разные антигены.

Кроме того, с помощью моноклональных антител можно создавать высокоспецифичные вакцины, особенно против определенных вирусных штаммов и паразитов. Моноклональные антитела способны также к нейтрализации лимфоцитов, ответственных за отторжение трансплантата и аутоантител, образующихся при аутоиммунных заболеваниях (некоторые формы диабета, рассеянный склероз, ревматические болезни). В сочетании с лекарственными средствами они могут значительно усилить эффективность действия последних на клетки-мишени, позволяя избегать серьезных побочных явлений, весьма обычных, например при химиотерапии рака.

Некоторое время назад считалось, что геном эмбриональных клеток в процессе дифференцировки соматических клеток (стадия образования разных тканей организма) не изменяется, а все разнообразие форм и функций дифференцированных клеток относится к различиям в экспрессии одних и тех же генов. Однако в дальнейшем было показано, что разнообразие молекул антител, которые образуются зрелыми лимфоцитами, связано с так называемой «активной перетасовкой» нескольких сотен генов в клетках-предшественниках лимфоцитов. Причем именно степень активности этой «перетасовки» и обуславливает широчайшее разнообразие антител.

Было также показано, что рекомбинация ДНК позволяет изменять геном клетки, направляя ее метаболизм (клеточную специализацию) на увеличение генетического разнообразия. Как известно, молекула антитела является результатом сборки из нескольких белковых цепей, а синтез любого белка определяется соответствующим геном. Соответственно предполагалось, что должны существовать миллионы генов, кодирующих синтез определенных молекул антител, вырабатываемых организмом млекопитающих.

Однако было установлено, что в геноме клеток последних из сотен тысяч генов только незначительная их часть вызывает синтез антител в результате того, что так называемые стволовые (эмбриональные) клетки не содержат полного набора генов всех антител, а обладают лишь набором генетических элементов, которые способны очень быстро перестраиваться в процессе дифференцировки и созревания клеток иммунной системы (В-лимфоцитов), что, собственно, и приводит к образованию миллионов клеточных линий, вырабатывающих разные антитела.

Что касается молекулы самого антитела (иммуноглобулина), то она состоит из двух «легких» (L) и двух «тяжелых» (H) белковых цепей, которые соединены расположенными в строго определенных местах дисульфидными мостиками и водородными связями. Каждая цепь имеет постоянную (константную) и переменную области. N-концевые участки (L) и (H) цепей образуют антигенсвязывающий сайт. Отдельные домены (области) молекулы антитела выполняют разные функции, что облегчает манипуляции с генами антител. Антигенсвязывающие сайты состоят из трех участков CDR complementarity-determining regions, определяющих комплементарность антител к антигену и образующих переменные (V_H и V_L) области на N-концах (H) и (L) цепей. Для CDR характерна очень высокая изменчивость последовательности аминокислот, поэтому их называют еще гипервариабельными.

Легкие цепи идентичны у всех видов животных, а тяжелые цепи представлены пятью типами, которые и определяют пять классов иммуноглобулинов, обнаруженных у млекопитающих: IgM, IgD, IgG, IgE и IgA.

При контролируемом ферментативном гидролизе иммуноглобулинов образуются фрагменты двух типов: Fab и Fc, причем N-концевая часть Fab фрагмента, называемая Fy-фрагментом, обладает антигенсвязывающей активностью, присущей интактной молекуле антитела. Существуют около миллиона разных специфических антител, что обеспечивает опреде-

ление практически любых биологически активных веществ как природного, так и синтетического происхождения. Например, в антителах класса IgM все тяжелые цепи имеют одинаковую постоянную область μ , переменные же области у разных молекул антител различны и отражают их антигенные свойства. Таким образом, константная (постоянная) область тяжелых цепей определяет способ действия антитела в организме: если она, например, δ -типа, т.е. антитело принадлежит к классу IgD, то оно является связанным с поверхностью синтезирующей его клетки; если же тяжелая цепь, например δ -типа, то соответствующее антитело IgE может связываться с поверхностью специализированной клетки, способной выделять гистамин, что приводит к появлению симптомов астмы или лихорадки, когда антитело взаимодействует с антигеном (например, с пылью какого-либо растения).

Моноклональные антитела с успехом применяются для дифференциальной диагностики многих инфекционных и неинфекционных заболеваний, а также для стандартизации определения групп крови путем иммунохимического анализа. Именно с помощью моноклональных антител были идентифицированы индивидуальные маркеры многих возбудителей инфекционных заболеваний как вирусной, так и бактериальной природы. Изучение генетических механизмов многих заболеваний стало возможным благодаря уникальной специфичности моноклональных антител. Так, методом иммуносцинтиграфии опухолей можно идентифицировать локализацию опухоли с ее метастазами размером 0,5-1,0 см.

Самыми важными областями использования иммунохимического анализа являются:

- контроль банков крови и продуктов из донорской крови;
- обнаружение возбудителей в объектах внешней среды;
- диагностика инфекционных заболеваний;
- диагностика диабета.

Сегодня количество проводимых иммунохимических анализов в мире растет настолько стремительно, что производство иммунодиагностикомов совместно с приборами и вспомогательными материалами можно рассматривать уже как отдельную, самостоятельную область биотехнологической промышленности.

Принципы иммунохимического анализа можно представить реакцией растворимого антигена (АГ) с антителом (АТ), зная о двухвалентности АТ и поливалентности АГ. Антитело, образуя комплекс с антигеном, обеспечивает уникальное по специфичности узнавание определяемого вещества в любых сложных многокомпонентных системах.

Этот процесс описывается системой уравнений двух стадий:



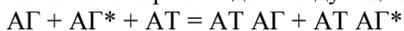
Первая стадия характеризует взаимодействие активного центра антител с антигенной детерминантой, которая представляет участок молекулы АГ, способного связываться с активным центром специфического АТ. Здесь проявляется свойство АТ «склеивать» антигены (АГ). Причем размеры антигенных детерминант (эпитопов), например, для белковых антигенов составляют всего несколько аминокислот.

Вторая стадия характеризуется образованием комплексов сложного состава, когда двухвалентная молекула АТ способна связаться лишь с двумя молекулами АГ в комплекс, который в свою очередь может связать еще одно АТ и т.д. Образующиеся агрегаты таких комплексов обнаруживаются либо по возникающей мутности раствора, либо по выпадению в осадок.

Такая реакция взаимодействия белковых антигенов с антителами лежит в основе определения групп крови, когда происходит «склеивание» эритроцитов антителами той или иной специфичности. Эта реакция получила название геммагглютинации и очень широко используется на практике. Этот метод также широко применяется при определении белков плазмы крови в концентрации до 1 мг/л. Однако методы агглютинации вследствие довольно низкой точности относятся только к качественным или полуколичественным методам анализа.

Для расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов в один из компонентов системы вводят маркер, концентрацию которого можно легко определять. После отделения продуктов реакции от исходных компонентов находят концентрацию АГАТ и по калибровочному графику рассчитывают содержание АГ.

Концентрацию антигена определяют из принципа конкурентного связывания антителами меченого и немеченого антигенов. Происходит следующая реакция:



где АГ и АГ* - определяемый антиген без метки и с меткой; АТ - антитела; АТ АГ и АТ АГ* - соответствующие комплексы.

Итак, если в пробирку с раствором, содержащим постоянную концентрацию антител и меченого антигена, добавить разные количества немеченого антигена, то концентрация комплекса АТ АГ* (с меткой) будет обратно пропорциональна концентрации немеченого антигена. Для того чтобы отделить комплексы АГАТ от не связавшихся компонентов анализируемой смеси, АТ или АГ ковалентно связывают с твердой фазой, например с полистероловыми шариками. После промывки твердой фазы отделяют связавшиеся и не связавшиеся компоненты. Такой тип анализа называют гетерогенным (принцип двух фаз: твердой и жидкой).

С большим успехом в гинекологическую практику вошел экспресс-метод определения беременности по уровню хорионического гонадотропина в моче. Тесты таких типов можно проводить не только в специальных лабораториях, но и в домашних условиях. В качестве практического примера использования твердофазного иммуноферментного анализа ELISA можно рассмотреть метод определения хорионического гонадотропина. В этом методе на полистирольные шарики сорбируются моноклональные антитела к хорионическому гонадотропину. К сенсibilизированным шарикам добавляют исследуемую пробу (мочу) и конъюгат, состоящий из маркера и моноклональных антител, меченных пероксидазой. В ре-

зультате иммунологической реакции хорионический гонадотропин связывается одной детерминантой с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности шариков, а другой - с моноклональными антителами конъюгата с маркером. Затем шарики отмывают от всех не связавшихся компонентов мочи и определяют активность фермента в составе иммунных комплексов с помощью субстрат-хромогенной смеси. При этом степень окраски раствора будет прямо пропорциональна количеству хорионического гонадотропина в образце мочи.

Лекарственный мониторинг также осуществляется посредством использования методов иммунохимического анализа. Необходимость контроля за концентрацией лекарственного препарата в процессе терапии у больного возникает при следующих ситуациях:

- длительных курсовых приемах лекарственных средств;
- низком терапевтическом эффекте или полном его отсутствии;
- возникновении побочных явлений в случае превышения терапевтической дозы препарата;
- трудно определяемом фармакологическом эффекте;
- особых обстоятельствах (например, при лечении новорожденных).

Лекарственный мониторинг может применяться, например, при терапии такими препаратами, как бронхолитик теofilлин, сердечный гликозид дигоксин и т.д. Известно, что успешный клинический результат зависит не от дозы препарата, а от его концентрации в плазме крови. Поэтому при достижении одного и того же лечебного эффекта уязвимых больных лекарственная дозировка препарата может различаться в десятки раз. Совершенно очевидно, что в этих случаях необходим индивидуальный подбор доз для каждого пациента. Кроме того, мониторинг лекарственных средств исключает передозировку лекарственного препарата и, соответственно, проявления токсических эффектов.

Рентабельными, экспрессными методами определения низкомолекулярных соединений в плазме крови являются иммуноаналитические методы, которые отличаются универсальностью (применимы к любому веществу, способному к индукции антител), высокой селективностью и чувствительностью; не требуют предварительной обработки образцов и имеют сравнительно низкую стоимость.

Известно, что иммунизация низкомолекулярными веществами не может вызывать иммунный ответ, поэтому для получения антител нужно предварительно лекарственный препарат ковалентно связать с иммуногенным высокомолекулярным носителем. Сначала лекарственное вещество делают реакционноспособным, вводя разные функциональные группы, которые затем взаимодействуют с соответствующими функциональными группами белка и образуют так называемый синтетический конъюгированный антиген. При иммунизации животного таким комплексным антигеном будут образовываться поликлональные антитела, т.е. антитела к антигенным детерминантам самого белка и к антигенным детерминантам лекарственного средства.

В настоящее время иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для всех лекарственных препаратов. При проведении лекарственного мониторинга с использованием методов иммунохимического анализа в качестве «маркеров» применяются:

- радиоактивные метки (радиоиммунный анализ с использованием радиоактивных атомов - трития, радиоактивного йода и др.);
- ферментные метки (если ферменты стабильны, активны и действуют в минимальных концентрациях);
- субстратные метки (АТФ и НАД), которые «пришиваются» к молекуле антигена через адениновый остаток и сохраняют способность взаимодействия с ферментом.

В качестве примера можно привести радиоиммунный метод количественного определения инсулина, основные принципы которого рассмотрим более подробно.

Общеизвестно, что инсулин влияет на концентрацию глюкозы в крови. В лабораторных условиях при наличии животных можно по снижению уровня глюкозы в крови сравнивать отдельные препараты инсулина. Но этот путь совершенно неприемлем для определения инсулина в крови больных, учитывая, что в контроле фактически нуждается если не миллионный, то многотысячный контингент больных. Клиническая лаборатория обязана определять количество эндогенного инсулина в крови больных, которым предписано введение инсулина извне. В противном случае возможны передозировки инсулина. Метод отличается высокой избирательностью (на результаты не влияют любые белки крови) и высокой точностью. В качестве лабораторного оборудования необходимы стандартный гамма-счетчик (например ГСБ-1) и коммерческий набор реагентов (в него входят меченый (по йоду) инсулин, у которого кодированы остатки тирозина и гистидина; антисыворотка к инсулину (антитела к инсулину), получаемая из крови кроликов, которым вводили инсулин).

У больного отбирается проба крови, где количество эндогенного (немеченого) инсулина неизвестно (х). Создается реакционная смесь: меченый инсулин + антисыворотка (фиксированное количество), т.е. комплекс антигена с антителом, который затем осаждается. Количество метки в осадке, определяемое радиометрическим методом, соответствует количеству меченого инсулина. Принцип анализа: если в реакционную смесь одновременно с меченым инсулином вводится проба крови с эндогенным инсулином, то количество метки в осадке будет тем меньше, чем больше ИС. В данной ситуации возникает конкуренция за антитело между меченым и немеченым инсулином. Количество немеченого инсулина не должно резко превышать количество меченого, иначе возможны погрешности в точности измерения. В соответствии с этим пробы крови принято разводить: х, х/2, х/4 и т.д. Избыток меченого инсулина помешать не может, так как метка определяется в осадке - там, где находится только связанный с антителом меченый инсулин. Расчеты проводятся по калибровочным кривым. Метод пригоден для определения числа микрограммов инсулина в 1 мл крови и не требует предварительных препаративных процедур. Один счетчик типа ГСБ-1 дает возможность анализа нескольких сотен проб в неделю. Радиоиммунный анализ

удобен для мониторинга не только инсулина, но и многих других биологически активных агентов. Не каждый их клон выживает в таких условиях. Поэтому на практике стремятся делать разбавление "маточных" клеток постепенно, вначале 1:2-1:3, а затем и более, используя специальные культиваторы.

Для выращивания гибридом в суспензионных культурах важны бессывороточные среды, поскольку это улучшает процесс культивирования в больших емкостях, снижает примерно в 500 раз белковые примеси и заметно сказывается на снижении стоимости целевого продукта. Фирма Sigma (США) выпустила в продажу такую среду (в сухом/жидком виде) под названием Huby-Max, не содержащую сыворотки и белков (SFPF-Serum Free, Protein Free). SFPF -среда включает аминокислоты, витамины, нуклеотидные предшественники, глюкозу, липиды, прогестерон, неорганические соли и микроэлементы. Подобная среда рекомендована для слияния, клонирования, выращивания гибридомных и миеломных клеток, а также для поддержания на соответствующем уровне продукции антител. Всего в среде содержится 82 ингредиента (22 аминокислоты, 12 витаминов, 27 неорганических веществ и 21 другое соединение).

Применение моноклональных антител

Практическое использование МкА Т исключительно многообразное - в медицине и ветеринарии (в целях диагностики, терапии), в биотехнологии для получения, выделения и очистки специфических продуктов, в исследованиях фундаментальных и прикладных проблем.

В последние годы отбор гибридом для клонирования проводят с использованием автоматизированного оборудования. На последующем этапе получают массовую культуру гибридомных клеток:

- 1) в культуре ткани - предпочтительный способ, так как Ig выделяют с большей чистотой;
- 2) в ферментаторах - суспензионная культура;
- 3) в организме сингенных животных (мыши, крысы). Накопленные МкАТ (10-200 мкг/мл среды) выделяют с помощью высаливания аммония сульфатом до 95% чистоты, а, при необходимости, подвергают очистке.

Очень важно использование МкА Т для прицельной доставки например цитостатиков в злокачественные клетки на предмет их деструкции и, как следствие, для лечения соответствующего больного с опухолевым процессом.

При диагностике, например СПИД, на покрытой моноклональными антителами ячейке выявляется концентрация антигенного белка р24 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) порядка 1,0-1,56 пикограмма в течение 1,5-3 часов; при цитомегаловирусной инфекции МкА Т типа Е-13 используют для выявления позднего антигена спустя 72 часа после заражения; важен вклад МкА Т в диагностику герпеса, краснухи, токсоплазмоза, различных бактериальных и грибковых инфекций, и т. д. В настоящее время около 30 компаний в мире производят МкА Т в виде диагностических наборов, а 13 компаний разработали оборудование или технологические процессы, относящиеся к МкАТ; теперь на рынке имеются такие антитела против классов и подклассов иммуноглобулинов человека, отдельных белков человека и животных, гормонов и лекарств, и многие другие. Например, в 1991 г. американская компания "Сентосог" выпустила в продажу новое моноклональное лекарство «Центоксин» для лечения сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями.

Ныне издаются книги и журналы, посвященные МкА Т, и уже это одно является веским доводом в пользу огромной роли их в фундаментальных и прикладных исследованиях самого широкого профиля.

Области применения моноклональных антител

Диагностика	Терапия	Технология	Научные исследования
1. Иммунохимические анализы биологических жидкостей, клеток организма микроорганизмов, вирусов и т.д. 2. Иммуногистохимические методы 3. Иммуноцитинграфия опухолей 4. Типирование групп крови и тканей	1. Воздействие на определенные клеточные популяции 2. Влияние на иммунные регуляторные механизмы с помощью антител к лимфокинам 3. Иммунорегуляция с помощью анти-идиотипических антител 4. Направленный транспорт лекарств с помощью моноклональных антител. 5. Элиминация токсинов, иммуноглобулинов из класса IgE	1. Идентификация молекул 2. Очистка клеток несущих специфический антиген	1. Исследование этиологии и патогенеза различных заболеваний 2. Исследование системных и межсистемных механизмов регуляции 3. Создание новых лекарственных средств биопрепаратов

Трансгенные животные

Включение чужеродных последовательностей ДНК или трансгенов в геном макроорганизма - реципиента с последующей устойчивой их наследуемостью в ряду поколений обеспечивает получение так называемых трансгенных животных. Следовательно, процесс трансгенеза по своему механизму относится к генетической инженерии и, в частности, к геной и клеточной инженерии.

Доказано, что трансгены нередко экспрессируются, вызывая те или иные структуры и функциональные изменения вплоть до изменения "программы" развития организма. Подобного рода эксперименты сулят заметный прогресс в области фундаментальных и прикладных разработок. К разряду фундаментальных относят: анализ различных отклонений в экспрессии нормальных и мутировавших генов, включая онкогены; осуществление направленного мутагенеза за счет введения

в макроорганизм экспрессирующих либо характерными особенностями, по которым можно было бы их отличить от других клеток. К тому же в костном мозге на них приходится где-то порядка 0,05% от всех клеток.

Стволовая клетка и сывороточный белок альфа-фетопротейн, открытый Г. И. Абелевым, впервые появляются в желточном мешке эмбриона. Спустя некоторое время стволовые клетки переселяются в печень эмбриона и там же интенсивно синтезируется сывороточный альфа-фетопротейн. В желточном мешке и печени протекает активное кроветворение. Позже синтез этого белка прекращается, а стволовая клетка перемещается в костный мозг, где и происходит кроветворение в течение всей последующей жизни организма.

Используя МкАТ против поверхностного CD-белка стволовых клеток, ученые из США и Германии' близко подошли к выделению таких клеток, массовое получение которых могло бы быть решающим в терапии лучевой болезни, таласемии, тяжелых осложнений при иммунодефицитах, лейкемии и других заболеваний. На способности стволовых клеток к переселению основывается способ лечения лучевой болезни внутривенным введением стерильного костного мозга.

Неоценимый вклад внесен в оценку CD-рецепторов клеток с помощью МкАТ. Это позволяет глубже понять механизмы клеточных взаимодействий в целях направленного вмешательства для их коррекции при патологических состояниях.

Непреходяще значение МкАТ в диагностике, в том числе - при использовании Иммуноферментного анализа в различных его вариантах, включая метку коллоидного золота. Например, чтобы локализовать тироксин-секретирующие клетки в образце ткани щитовидной железы, эту ткань инкубируют с мышиним моноклональным антитироксином. Затем на образец наносят конъюгат "анти-Ig-золото", специфичный к Ig-антитироксину. Фиксируя на моноклональном антителе, конъюгат становится прекрасной меткой, выявляемой в световом биологическом микроскопе по красной окраске золота.

К разряду прикладных исследований можно отнести, например, получение быстрорастущих трансгенных свиней, выведение трансгенных овец, образующих и накапливающих в молочных железах некоторые факторы свертываемости крови человека и др.

Для получения трансгенных животных, в частности - мышей, можно воспользоваться такими методами, как микроинъекции ДНК в оплодотворенное одноклеточное яйцо, заражение предим-плантированных эмбрионов рекомбинантными ретровирусами, и, наконец, применение эмбриональных стволовых ES- или ЕК-клеток.

Быстрота выполнения и надежность метода микроинъекций сделали его наиболее популярным среди специалистов-экспериментаторов. Используют различных линейных мышей, обеспеченных всем необходимым при хорошем их содержании в условиях вивария (животника). Обычно в опыт по микроинъекции берут не менее 20 гибридных самцов-производителей первого поколения (F1) в возрасте 8-12 месяцев, когда они характеризуются хорошей производительностью. При слабой или низкой активности самцов к подсаживаемым самкам их заменяют. Донорами оплодотворенных яйцеклеток выступают не менее 10 неполовозрелых (12-14 г) гибридных самок первого поколения (F1), подвергшихся суперовуляции и спариванию с гибридными самцами F1. Оплодотворенные одноклеточные яйца выделяют из операционно вскрытых яйцеводов самок-доноров спустя 12 часов после их спаривания с самцами-производителями. Выделенные яйца помещают в культуру на срок от 3 до 36 часов. От 10 самок можно получить 250 яиц, пригодных для микроинъекций.

Оплодотворенные яйцеклетки поддерживают на среде М16 в микрокапельной культуре в CO₂-инкубаторе тканей при 37⁰С и с 5% диоксида углерода. Все другие манипуляции с яйцеклетками вне инкубатора проводят в HEPES-буферной среде М2 (HEPES – это N-2-гидроксиэтилпиперазин - 2-этансульфоная кислота). Компонентный состав сред (кроме HEPES) почти тождественен. Различие касается натрия бикарбоната, фенолового красного, натрия пирувата и кальция хлорида дигидрата, доля которых в среде М 16 больше, чем в среде М2. Остальные ингредиенты представлены KCL, NaCL, KH₂PO₄, MgSO₄ · 7H₂O, натрия лактатом, глюкозой, пенициллином, стрептомицином, бычьим сывороточным альбумином (БСА), внесенными в бидистиллированную воду.

Изолированные оперативным вмешательством яйцеклетки из яйцеводов выдерживают в атмосфере 5% CO₂ при 37⁰С до микроинъекции в них клонированных ДНК любого размера в количестве 1-2 нл 0,0001-0,0005% раствора ДНК с помощью микроманипулятора.

Для трансплантации оплодотворенных яйцеклеток, в которые была инъецирована экзогенная ДНК, используют "суррогатных" матерей - псевдобеременных реципиентных самок (12 часов post coitum), вынашивающих такие яйцеклетки.

В целях получения псевдобеременных мышей половозрелые самки F-1 (19-20 г) в стадии эструса (течки, овуляции) спаривают со стерильными самцами, у которых операционно заблокированы семявыносящие протоки. Наилучшие результаты получают с самцами линии Parkes, обладающих высокой половой активностью. Обычно используют 20-30 таких самцов, которых спаривают через день с названными выше самками (получают в среднем 5 псевдобеременных самок в день). Псевдобеременные самки пригодны для пересадки донорских оплодотворенных яйцеклеток.

Отбирают яйцеклетки, переживших микроинъекцию ДНК, и вводят их в специальную микропипетку, с помощью которой привносят в яйцевод псевдобеременной мыши оплодотворенную яйцеклетку с включенной в нее клонированной ДНК. Часть пересаженных яиц погибает, а часть продолжает нормально развиваться. После этого естественным путем (или с помощью кесарева сечения) получают трансгенное потомство, идентифицируемое с помощью гибридизационного анализа высокомолекулярной геномной ДНК, изолированной из хвоста (отрезают кончик хвоста длиной примерно 1 см).

При гомологии трансгена с каким-либо участком генома мыши используют блот-гибризацию, если же гомология незначительна или она отсутствует совсем, то ограничиваются дот-блот- или слот-блот-анализом (от англ. blot - пятно, blotting - промокание, dot - точка, slot - прорез, паз). В первом случае, когда трансген идентичен эндогенному гену, он все равно окружен другими нуклеотидными последовательностями. Поэтому, используя ре-стриктазы, удается доказать локализацию трансгена в иных рестрикционных фрагментах. Во втором случае, когда трансген негомологичен геному мыши, то он огра-

ничен другими сайтами рестрикции, и здесь удобен дот-блот- или слот-блот-анализ в качестве экспресс-метода. Фрагменты анализируемой геномной ДНК нанитроцеллюлозных фильтрах выявляют при экспозиции с рентгеновской пленкой.

Трансгенные линии животных получают после скрещивания первичных трансгенных экземпляров.

Как сказано в начале раздела, другим методом получения трансгенных животных (в частности, мышей) является заражение предимплантированных эмбрионов рекомбинантными ретровирусами, которые оказались удобными объектами для этих целей. Геном ретровирусов сравнительно небольшой и с ним относительно легко манипулировать, вводя в него чужеродные гены; ретровирусы достаточно инфекционны в отношении пермиссивных клеток (почти 100% заражение их), а единственная копия ретровирусного генома ДНК прочно и строго определенным образом интегрируется с ДНК клетки-мишени и эти последние способны экспрессировать привнесенные вирусом гены. Уровень экспрессии клонированных генов заметно повышается вследствие того, что в ретро вирусах имеются весьма активные транскрипционные энхасеры, или усилители. Известные ретро вирусные векторы ведут свое происхождение от вирусов лейкоза мышей (MLV) или от вирусов птиц (ALV).

Каждая вирусная частица содержит две копии одноцепочечного РНК -генома, а после проникновения в пермиссивную клетку этот геном переводится в линейную двухнитевую ДНК под влиянием вирусного фермента - обратной транскриптазы. Чтобы интегрироваться в клеточный геном клетки-мишени, линейная днк проникает в ядро, где приобретает кольцевидную форму. Интегрированная линейная ДНК-копия ретровирусного генома (про вирус) имеет на обоих концах длинные нуклеотидныеповторы - LTR (от англ. long termine repeats). 5'LTR несет промотор, с которогоначинается транскрипция генов интегрированного провируса; 3'LTR-сайтполиаденилирования, где происходит терминация РНК-транскриптов.

Существует ряд векторов на основе ретро вирусного генома. В простейших случаях удаляют структурные гены и на их место встраивают один или больше рестрикционных сайтов в целях клонирования. Ретровирусный вектор может включить лишь около 10000 пн. Имея в руках готовый вирусный вектор, им можно инфицировать подходящие клетки-мишени, например, фибробласты, экспрессирующие соответствующие поверхностные рецепторы.

Чтобы заразить рекомбинантным ретровирусом эмбриональные клетки, в культуральную емкость с инфицированными фибробластами, продуцирующими рекомбинантный вирус, помещают восьмиклеточную морулу (группа бластомер, возникшая после равномерного дробления оплодотворенного яйца), освобожденную от яйцевой оболочки. Морула инфицируется и после достижения стадии бластоцисты ее вводят в матку псевдобеременной матери. Часть бластоцист может погибнуть, а часть нормально развивается и в соответствующие сроки трансформируется в трансгенное потомство, которое затем подвергается тщательному генетическому анализу и может использоваться для выведения трансгенных линий.

Бластоцисты стали родоначальницами плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток типов ES и Ек. Показано, что, например, ES-клетки доступны культивированию *in vitro* и после каких-либо манипуляций (например, после введения клонированных генов путем инфекции или трансфекции) можно инъецировать их в бластоцисту и вернуть в живой макроорганизм. ES-клетки колонизируют эмбрион и составляют с ним единое целое, хотя колонизация ими зародышевого пути по разным причинам удается не всегда. Последующие этапы работы с трансгенными животными во многом сходны с ранее описанными. Таким образом, все три метода получения трансгенных животных можно представить в виде следующей схемы по Д. Мерфи и Дж. Хенсону 1987 г.

С конца XIX века и до середины текущего столетия были разработаны методы пересадки эмбрионов от различных животных с последующим рождением полноценного потомства (клеточная инженерия). Следовательно, получение популяции, состоящей из генетически идентичных особей (клонирование), возможно не только с помощью рассмотренных выше трех способов (микроинъекций ДНК, вирусная инфекция и пересадка ES- и ЕК-клеток), но и с помощью пересадки эмбрионов, которая может быть

ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ

Иммуномодуляция (от лат. *immunitas* - избавление, освобождение, *modulatio* - мерность, размеренность) - термин интегративный, объединяющий представления о каком-либо целенаправленном вмешательстве в работу иммунной системы, функционирующей в условиях нормы и патологии. Составными частями иммуномодуляции являются: иммуностимуляция и иммунодепрессия (иммуносупрессия), т. е. иммунокоррекция. При иммуностимуляции происходит активизация иммунной системы, при иммунодепрессии (иммуносупрессии) - ее частичное угнетение; следовательно, иммунокоррекция сопровождается выравниванием деятельности иммунной системы. Индивидуальные вещества или средства, применяемые в качестве иммуномодуляторов, соответственно подразделяют на иммуностимуляторы и иммуносупрессоры (иммунодепрессанты).

Все иммуномодуляторы условно можно еще подразделить на специфические и неспецифические. Первые из них выступают преимущественно специфическими антигенами, индуцирующими антителообразование, вторые, влияя на иммунную систему, выражение или совсем не являются антигенноактивными. Неспецифические иммуномодуляторы бывают двух типов:

- а) действующих при нормально функционирующей иммунной системе (вакцина BCO, *Corynebacterium parvum*),
- б) максимально действующих на супрессированную иммунную систему (левamisол, препараты тимуса, интерфероны); они мало активны или совсем неактивны, когда их вводят пар:иентам с нормальной иммунной системой.

Все иммуномодуляторы используют в качестве средств лечения соответствующих заболеваний, связанных с дефектами иммунной системы, или иммунодефицитами

Иммуностимуляторы

Иммуностимуляторы повышают устойчивость организма к инфекционным заболеваниям, активизируют иммунитет у онкологических больных, получающих цитостатики, радиоактивное облучение. Их подразделяют на природные и синтетические. К природным относят иммуноглобулин- γ (Ig- γ), являющийся также средством заместительной терапии; препараты из зобной железы крупного рогатого скота (тактивин, тималин, тимопозтин и др.), интерфероны, фактор переноса, или лейкоцитарный трансфер-фактор (ЛТФ), специфические опухолевые вакцины, иммунную РНК (И-РНК), натрия нуклеинат, продигозан. Синтетическими иммуностимуляторами неспецифического действия являются батилол, изопринозин, левамизол, хлоридин и некоторые другие.

Иммунный гамма-глобулин (IgG) - продукт матричного синтеза, являющийся гликопротеином и способный проникать через плаценту. Его получают в очищенном и концентрированном виде из донорской, плацентарной и абортной крови человека в виде 10% или 16% раствора. Препарат изготавливают из смеси большого числа сывороток крови взрослых людей, ранее болевших, например гриппом, корью и другими инфекционными заболеваниями, или получавших вакцины в качестве профилактических средств. Поэтому так называемый нормальный глобулин может содержать Ig-ы против возбудителей дифтерии, кори, оспы и других заболеваний.

Основной метод выделения иммуноглобулинов является их фракционированное осаждение этанолом на холоду при строгом контроле pH и ионной силы раствора. На процесс разделения белков сыворотки крови влияют следующие основные факторы: концентрация белка, диэлектрическая постоянная раствора, концентрация этанола, изоэлектрическая точка, pH, ионная сила раствора, температура.

Необходимо иметь в виду тот факт, что в сыворотке крови содержатся различные белки. В случае сильного разбавления растворов белков увеличивается диссоциация молекул (закон действующих масс) преимущественно благодаря внутреннему электростатическому отталкиванию, и тогда белки труднее осаждаются; при высокой концентрации белков в растворе больше возможностей для пенообразования с последующей денатурацией белковых молекул. Денатурация также возрастает, если создаются реальные условия для формирования мономолекулярной белковой пленки на границе раздела фаз, например, "жидкость-воздух" (учитывать свойства ПАВ у белков).

Способность белковых растворов увеличивать или уменьшать диссоциацию находящихся в них солей, характеризуется диэлектрической постоянной таких растворов (D); чем выше полярность молекул, тем больше D; для растворов неполярных соединений величины D низкие. Существует обратная пропорциональная зависимость между D и силами электростатического притяжения и отталкивания молекул - возрастание D сопровождается стабилизацией молекул, снижение D - их притяжением и агрегацией. Напомним, что D для воды при 20°C равна - 80-82, для этанола - 24, то есть в 3,5 раза меньше, поэтому этиловый спирт используют в качестве фракционирующего агента белковых молекул. К тому же он дегидратирует эти молекулы.

В изоэлектрической точке (Pi) при данном pH, когда число положительных зарядов белковых молекул равно общему числу их отрицательных зарядов, белок становится наименее растворимым, и он легче выпадает в осадок.

Температура - важный фактор для сохранения белков в нативном состоянии. При их фракционировании стремятся поддерживать температуру ниже ООС, при которой снижаются растворимость белковых молекул и рост случайно попавших в раствор микробов-контаминантов:

Известны два способа производства IgG - камерный и внекамерный (последний применяют при крупносерийном производстве препарата; он предложен Г. Я. Розенбергом в 1959 г.).

Фракционирование, например, донорской крови включает сепарирование форменных элементов, отделение фибрина; полученную сыворотку очищают от остатков фибриногена, балластных белков, а затем ее передают на последующие ступени выделения IgG. Полученный иммуноглобулин растворяют и подвергают стерилизующей фильтрации.

В целях улучшения качества продукта указанный выше метод неоднократно модифицировали.

К иммуноглобулинам, получаемым из крови человека, относятся иммуноглобулины: антирабический, нормальный, противогриппозный, противостафилококковый, противостолбнячный, противоязвенный (титрованный на антитела к вирусу клещевого энцефалита), из крови животных получают Ig-ы, или сыворотки, содержащие Ig-ы: антирабический, противоботулиновые, противогангренозные, противодифтерийный, противолептоспирозный, против клещевого энцефалита, противосибиреязвенный, против столбняка.

Антитоксины - обычно это препараты лечебно-профилактического действия, изготавливаемые из сывороток крови лошадей, иммунизированных соответствующими анатоксинами. Обезвреживание токсина возможно с помощью других детоксикаторов (протеазы или окислители и пр.).

В некоторых случаях отделение форменных элементов крови осуществляют одноактно с дефибринированием крови. При этом фибриновый сгусток включает в себя эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Однако при работе с большими объемами крови названный одноактный процесс сопровождается частичным гемолизом эритроцитов, что осложняет последующую очистку антитоксина.

На практике получают гипериммунизированных соответствующими анатоксинами лошадей лечебные или лечебно-профилактические антитоксические сыворотки: противоботулиновые типов А и В (в жидком виде), концентрированные жидкие противогангренозные очищенные (моно- и поливалентные), противодифтерийную и противостолбнячную.

Очищенный сорбированный на алюминия гидроксиде столбнячный анатоксин применяют для ревакцинации людей, являющихся затем донорами специфического Ig. Выпускают противостолбнячный Ig в жидком виде в ампулах.

Кроме Ig-ов другие белковые фракции сыворотки крови обладают важными биологическими функциями и поэтому

могут быть выделены в очищенном виде для последующего использования в практическом здравоохранении и медицине в целом.

Препараты тимуса. К ним относят тактивин, тималин, тимопоэтин и некоторые другие, получаемые методами экстракции и последующей очистки из зобной железы (Glandlls thymlls) крупного рогатого скота, поступающего на мясокомбинаты для уоя и последующей комплексной переработки. Зобную железу относят к центральным органам иммунной системы. В ней проходят специальную обработку будущие тимоциты, при обретающие соответствующие функции (Т-хелперы, Т-супрессоры, Т-киллеры). В этой железе содержатся гормоноподобные субстанции, которые и составляют основу иммуностимулирующих веществ.

Фактор переноса, или лейкоцитарный трансфер-фактор (ЛТФ) - это составная часть диализата экстракта лейкоцитов, ответственная за пассивный перенос реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) от сенсибилизированных доноров к несенсибилизированным реципиентам. Впервые открыт К. Ланд-штейнером и М. Чейзом в 1942 Г. в лейкоцитах морской свинки. ЛТФ является медиатором клеточного компонента иммунной системы и его можно причислить к лимфокинам; вырабатывается нормальными лимфоидными клетками. Кроме индукции кожных реакций (ГЗТ) он тормозит миграцию клеток и вызывает трансформацию лимфоцитов. ЛТФ не является антителом, не обладает иммуногенностью и не проявляет свойств трансплантационного антигена. Он устойчив к ДНК-азе, РНК-азе и трипсину, но термолабилен (инактивируется при 560С в течение 30 мин.). В составе ЛТФ обнаружены полипептиды и олигонуклеотиды, ММ менее 10 кДа, хорошо растворим в воде.

Выделение иммуностимулирующих средств ("суммарный препарат") из ткани зобной железы крупного рогатого скота (ФСБ - фосфатно-солевой буфер)

Под влиянием ЛТФ отрицательная ГЗТ переходит в положительную. Такой эффект одной дозы фактора переноса продолжается до 6 месяцев. В настоящее время за одну дозу ЛТФ принято его количество, получаемое из 108,9 лимфоцитов. ЛТФ можно применять в больших дозах в течение нескольких месяцев при иммунодефицитах.

Схема получения фактора переноса заключается в следующем. От здоровых доноров с выраженной реакцией ГЗТ на соответствующий антиген отбирают кровь в асептических условиях. Кровь собирают в стерильные емкости, куда добавляют антикоагулянт гепарин и 6% раствор декстрана 250 в 0,15 М натрия хлорида (из расчета 500 МЕ гепарина и 10 мл декстрана на каждые 100 мл крови). Емкость закрывают, несколько раз встряхивают и термостатируют при 370С. Осаждение эритроцитов по времени не должно продолжаться более часа. Надосадочную жидкость центрифугируют в асептических условиях (1500 g 10 минут), плазму осторожно сливают (декантируют). Остающийся осадок включает эритроциты, на поверхности которых располагается слой лейкоцитов (1 мл осевших лейкоцитов соответствует примерно 10^9 клеток, что достаточно для получения 1-10 доз ЛТФ). Из числа белых клеток этого слоя 70% приходится на лимфоциты. На осадок осторожно наслаивают 0,15 М стерильный раствор натрия хлорида, приготовленный на апиригенной воде (0,5 мл на 100 мл крови), и осторожно отсасывают лейкоциты в виде суспензии в изотоническом растворе NaCl. Полученную суспензию замораживают смесью сухого льда с этанолом и размораживают при 370С десятикратно (до полного разрушения лейкоцитов). В полученный вязкий раствор добавляют ДНК-азу и катионы магния для гидролиза ДНК при 370С (эта процедура возможна в процессе замораживания и оттаивания, поскольку ДНК-аза стабильна в таких условиях). Демполимеризованный экстракт лейкоцитов диализуют против дистиллированной воды (на 1 л экстракта берут 50 мл дистиллированной воды) в течение суток при +40С, после чего его подвергают фильтрующей стерилизации через мембранный фильтр и лиофильно высушивают.

Полученный диализат экстракта лейкоцитов растворяют в стерильном фосфатно-солевом буфере с pH 7,4 (0,01 М фосфатный буфер +8,5 г/л NaCl) в соотношении 1:20 и асептично подают на хроматографическую колонку, заполненную сефадексом G-25, ранее законсервированную 0,2% натрия азидом и промытую тем же ФСБ, разведенным в 20 раз.

Хроматографию про водят в указанном выше стерильном буфере со скоростью до 90 мл/час. Собирают активные фракции (восстановление способности лимфоцитов к розеткообразованию трипсинизированных эритроцитов барана в присутствии фактора переноса) - это и есть ЛТФ. ЛТФ не рекомендуют применять при кандидозах кожи и слизистых оболочек, кокцидиоидозе, лепре, туберкулезе и остеогенной саркоме. Специфические опухолевые вакцины, а также иммунная РНК еще не вышли за пределы лабораторий, поэтому их крупномасштабное производство пока не освоено.

Иммунодепрессоры (иммуносупрессоры)

Среди иммунодепрессоров известны синтетические вещества (азатиоприн, меркаптопурин, преднизон, циклофосфамид и пр.), отдельные антибиотики (блеомицин, циклоспорин А, а также зообиотехнологические продукты - антилимфоцитарный иммуноглобулин, лимфоцитарные кейлоны. Антилимфоцитарный Ig получают из сыворотки крови животных по схеме, близкой к описанной выше для выделения IgG. при этом иммунизирующим агентом (антигеном), являются человеческие лейкоциты.

При выделении суммарных иммуноглобулинов можно использовать два подхода. Один из них базируется на высадке Ig-ОВ насыщенным раствором аммония сульфата (3,9 М при ООС или 4,06 М при 200С) с последующей хроматографией растворенного осадка антилимфоцитарного Ig в подходящем буфере (например, фосфатном - 0,01 М с pH 6,5). Хроматографию проводят на ионообмен-никах - ДЭАЭ-сефадексе или ДЭАЭ-целлюлозе.

Поскольку антилимфоцитарный Ig содержит разные Ig-ы со сходными характеристиками, то их можно разделить, изменяя ионную силу элюента. В производственных условиях получают в среднем 5,5-6,0 г IgG из 1 л иммунной сыворотки в.пересчете на сухое вещество. Более высокого выхода Ig удается достигнуть согласно другому методу - с помощью 2-этоксиди-6,9-диаминаоакридинлактата, или риванола. Выход IgG при этом составляет в среднем 60-65%.

Реакция взаимодействия риванола (катион) с белками протекает при незначительном сдвиге pH от изоэлектрической точки, то есть при малом отрицательном заряде белковой молекулы, а образующийся риванольно-белковый комплекс слабо растворим в воде - он растворим при pH 5,0.

В слабо щелочной среде риванол не образует комплексов с IgG, на чем и основана очистка IgG: IgG можно выделять прямо из иммунной сыворотки, добавляя к ней 0.75% раствор риванола в соотношении примерно 1:2.

Все препараты Ig-оВ контролируют на стерильность, безвредность, апиrogenность, содержание в них 19G должно быть не менее 90% общего белка.

ТЕМА 9 ПРЕПАРАТЫ НОРМОФЛОРЫ

Характеристика нормофлоры человека. Микрофлора человека составляет основу его микрoэкологии, организм человека населяют примерно 500 видов бактерий, не считая вирусов, простейших, а также грибов. Нормальную флору принято рассматривать как совокупность микробиоценозов различных частей тела, контактирующих с внешней средой. Совокупность микробиоценозов обозначается как нормобиоценоз или эубиоз. для здорового человека характерно состояние равновесия микрoэкологии организма. В организме человека проживает 10^{14} - 10^{16} бактерий, т.е. бактериальных клеток значительно больше, чем клеток самого организма. Они составляют своеобразный «экстракорпоральный» (хорошо организованный) орган. Этот «орган», как и любой орган человека, имеет свои функции, критерии, показатели функционального состояния, т.е. нормы и отклонения от нее.

Велика защитная роль нормофлоры в обеспечении здоровья, поэтому нарушение равновесия между отдельными видами микроорганизмов местах их постоянного обитания за счет более интенсивного размножения или гибели какого-либо вида может повлечь нарушение гомеостаза с соответствующими последствиями патологического характера. Дисбиотические состояния приводят к изменениям количественного и качественного состава нормофлоры человека.

Микроорганизмы индигенные (постоянные) и транзиторные (случайные), с которыми человек встречается в течение жизни можно условно разделить на 4 группы:

- 1) микроорганизмы, не способные к длительному пребыванию в организме человека, нахождение которых в нем носит случайный характер;
- 2) постоянные представители микрофлоры, приносящие несомненную пользу (бифидо-, лакто- и колибактерии);
- 3) условно-патогенные представители нормофлоры, которые при определенных условиях могут стать патогенными (стафилококки);
- 4) микроорганизмы - возбудители инфекционных заболеваний.

Нормальная микрофлора кишечника в процессе эволюции приобрела исключительно важную роль в формировании колонизационной резистентности организма: Одним из главных механизмов защиты от колонизации условно-патогенными и патогенными бактериями является присутствие в организме достаточного количества собственной полезной микрофлоры, к которой, в первую очередь, относятся лакто- и бифидобактерии. Молочнокислые бактерии (*Lactobacteriidae*) относятся к грампозитивным истинным бактериям, имеющим округлую форму (*Streptococcus*, *Diplococcus*) или палочковидную (*Lactobacterium*) форму. Молочнокислые кокки и многие бактерии располагаются в виде коротких или длинных цепочек. Те и другие не образуют спор, неподвижны, анаэробны.

Молочнокислые бактерии в кишечнике человека занимают одно из ведущих мест по своей численности среди других представителей бактериальной флоры. Бесспорно, что эти микроорганизмы играют первостепенную роль в симбиотических взаимоотношениях нормальной микрофлоры кишечника с макроорганизмом.

В процессе сбраживания сахара одни молочнокислые бактерии образуют в качестве главного продукта молочную кислоту. Поэтому их называют гомоферментными (одноферментными), другие - гетероферментными, продуцирующими в качестве основных продуктов молочную и уксусную кислоты, этанол, двуокись углерода и некоторые летучие вещества, типа эфиров. Гомоферментативные бактерии включают *S. lactis*, *S. cremoris*, *Lactobacterium casei*, *L. lactis* и др. К гетероферментным относят ароматообразующие бактерии (*S. citrovorus*, *S. acetonicus*), а также представителей бактерий из групп *Betabacterium*, *Coli-aerogenes* и некоторые другие (*S. faecalis*, *S. bovis* и др.).

Имеются молочнокислые бактерии, развивающиеся при оптимальной температуре 25-35°C (мезофилы), *S. lactis*, *S. foveis*, *L. Casei*, ароматообразующие бактерии; при 40-45°C (термофилы) - *L. lactis*, *L. helveticum*.

Нормальная микрофлора кишечника выполняет и регулирует многие функции организма, которые можно уподобить работе лаборатории, осуществляющей многие сотни биохимических процессов. Биомасса микробов, заселяющих кишечник взрослого человека, составляет 2,5-3 кг. В процессе их жизнедеятельности образуются органические кислоты, снижающие pH среды толстой кишки до 5,3-5,8, лизоцим и другие антибиотикоподобные вещества, обуславливающие антагонистическую активность этих бактерий по отношению к патогенной, гнилостной и газообразующей микрофлоре. В результате значительно снижается хроническое отравление организма продуктами гнилостного распада в кишечнике (индол, фенол, скатол). Представители нормофлоры в кишечнике конкурируют с патогенной флорой за аргинин, аспарагиновую кислоту, серин, за область обитания - экологические ниши. Таким образом, бифидо- и лактобактерии регулируют количественный и качественный состав нормальной микрофлоры кишечника, сдерживая рост и размножение в нем патогенных и условно-патогенных микробов.

Важна ферментопродуцирующая роль микрофлоры кишечника, имеющая большое значение в процессах пищева-

рения и метаболизма. Бактериальные протеазы гидролизуют белки и пептиды, последние под действием бактериоидов гидролизуются до аминокислот и пептидных остатков. Одним из свойств нормофлоры является метаболизм азот- и углеродсодержащих соединений за счет микробных ферментов. Метаболизм мочевины в кишечнике происходит за счет микробных уреаз. Микрофлора кишечника участвует в деградации липидов и в их синтезе. Нормальная микрофлора принимает участие в рециркуляции желчных кислот. И активно влияет на холестеринный и билирубиновый метаболизм. Бифидо- и лактобактерии, бактериоиды, эубактерии способствуют всасыванию кальция, витамина Д, железа.

Эшерихии, бифидо-, лакто- и эубактерии выполняют витаминообразующую функцию (участвуют в синтезе и всасывании витаминов К, группы В, тиамин, биотин, цианкобаламин, фолиевой и никотиновой кислот). Кроме того, они способствуют синтезу незаменимых аминокислот, лучшему усвоению солей кальция, витамина Д. Метаболиты бифидо- и лактобактерий препятствуют микробному декарбоксилированию пищевого гистидина и повышению количества гистамина, т.е. обладают антианемическим, антирахитическим, антиаллергическим действием. Лактобактерии образуют молочную кислоту, продуцируют лизоцим, лизин, ацидофилин и др. Кишечная палочка способствует синтезу иммуноглобулинов, что препятствует развитию инфекции, вырабатывает канцеролитические вещества.

Большое значение имеет продуцирование анаэробами биологически-активных соединений - летучих жирных кислот, принимающих участие в рециркуляции и абсорбции ионов натрия, калия, кальция, магния, цинка, хлора, воды. Кишечная нормофлора способна разлагать белки до конечных продуктов распада (индол, фенол, скатол), утилизировать неперева- ренные пищевые субстраты, образуя органические кислоты, аминокислоты и другие соединения, которые нормализуют обмен веществ в организме. Микрофлора кишечника, в конечном счете, поддерживает водный, электролитный и кислотно-щелочной балансы организма.

Нормальная микрофлора кишечника играет важную роль в формировании и функционировании иммунной системы. В экспериментах на животных установлено, что пероральное введение бифидо- и лактобактерий повышает устойчивость к различным инфекциям, что дает возможность говорить об иммунопотенцирующей способности эубиотиков. Иммуностимулирующий эффект под воздействием нормофлоры проявляется усилением фагоцитарной активности макрофагов, моноцитов, синтезом цитокинов; стимуляцией клеточных иммунных механизмов защиты.

Нормальная микрофлора способствует пролиферации плазматических клеток. Бифидобактерии стимулируют синтез антител, лактобактерии повышают активность фагоцитов и лимфоцитов. Бактериальные модулины бифидо- и лактобактерий стимулируют лимфоидный аппарат, синтез иммуноглобулинов, интерферона, увеличивают уровень пропердина и комплемента, повышают активность лизоцима, способствуют уменьшению проницаемости сосудисто-тканевых барьеров для токсичных продуктов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, препятствуют транслокации бактерий во внутренние органы и кровь, уменьшают воспалительные процессы слизистой кишечника.

Анаэробные бактерии вырабатывают БАВ, β-аланин, 5-аминовалериановая и γ-аминомасляная кислоты, а также медиаторы, влияющие на функцию ЖКТ, печени, сердечно-сосудистой системы, кроветворение и обменные процессы. Продукты жизнедеятельности нормальной микрофлоры кишечника (в том числе пропеоновые бактерии) оказывают регулирующее действие на вегетативную нервную систему. Как «естественный биосорбент» нормальная микрофлора способна аккумулировать значительное количество различных токсических продуктов, включая металлы, фенолы, яды растительного и микробного происхождения, другие ксенобиотики. Деятельность нормальной микрофлоры кишечника делает организм менее зависимым от окружающей среды.

Положительными функциями нормальной микрофлоры кишечника являются:

1. Колонизационная резистентность;
2. Синтетическая функция - способность бактерий продуцировать витамины, гормоны, антибиотики; .
3. Поддержание высокого уровня содержания лизоцима, секреторных иммуномодуляторов, интерферона, важных для иммунологической резистентности;
4. Детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов;
5. Обменная функция - участие бактерий в метаболизме белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот, солей, желчных кислот и других жизненно важных веществ;
6. Пищеварительная - морфокинетическое влияние на слизистые оболочки, абсорбцию абиотических компонентов, транзит нутриентов, газовый состав, мышечный тонус кишечника, перистальтику кишечника, эвакуацию кишечного содержимого. Защитные и физиологические функции нормальной микрофлоры кишечника в условиях нормобиоценоза указаны в табл. При определенных условиях микрофлора человека может оказать неблагоприятное влияние на жизнедеятельность и состояние организма человека. Возможно возникновение гнойно-воспалительных реакций, сенсibilизации организма со многими клиническими проявлениями аллергического порядка, формирование в организме банка плазмид и генов с проявлениями мутагенной и антимутагенной активности.

Таблица

Функции нормальной микрофлоры (нормобиоценоза)

Функция	Механизм реализации
Колонизационная резистентность	Межмикробный антагонизм, активация иммунной системы
Детоксикационная	Гидролиз продуктов метаболизма белков, липидов, углеводов и т.д.
Синтетическая	Синтез витаминов, гормонов, антибиотических и других веществ
Пищеварительная	Усиление физиологической активности ЖКТ

Факторы, ведущие к нарушениям в состоянии нормофлоры, весьма многочисленны. Возможно, в связи с этим почти 90% населения нашей страны, в той или иной мере, страдает дисбактериозами, т.е. микробиологическими нарушениями. Наиболее распространен дисбактериоз кишечника, причинами которого могут быть тяжелые болезни, интоксикации, нерациональное питание, нарушения в иммунной системе и, особенно часто, бесконтрольное и необоснованное применение антибиотиков и других антимикробных препаратов. Дисбактериоз может служить причиной возникновения колитов, холециститов, диатеза, нейродермита, анемии, псориаза, грибковых поражений слизистых, аллергии.

Тактика лечения зависит от степени выраженности дисбактериоза и предполагает, комплексный подход, включающий:

- устранение избыточного бактериального обсеменения тонкой кишки, восстановление нормальной микробной флоры;
- улучшение кишечного пищеварения и всасывания;
- восстановление нормальной моторики кишечника;
- стимуляция реактивности организма:

В профилактике и лечении дисбактериозов показано применение биопрепаратов нормальной микрофлоры кишечника, т.е. эубиотиков (пробиотиков) - препаратов нормальной микрофлоры человека. Термин «пробиотик» впервые ввели в научную литературу в 1965 г. Lilley и Stillwell для обозначения соединений микробного происхождения, которые, в отличие от антибиотиков, не убивали, а стимулировали рост микроорганизмов. Пробиотики (эубиотики) имеют в своем составе живые клетки специально подобранных штаммов микроорганизмов растительного или животного происхождения; они выживают в условиях кишечного окружения, непатогенны, нетоксичны, стабильны в течение длительного срока хранения.

Механизм положительного влияния пробиотиков включает:

- подавление микробных патогенов за счет продукции антибактериальных веществ, конкуренции за лимитируемые питательные вещества и сайты адгезии на кишечной стенке;
- влияние на ферментативную активность кишечных микроорганизмов;
- стимуляцию иммунной системы макроорганизма.

Препаратами этой группы являются бифидумбактерин, бификол, бифиформ, лактобактерин, бактисубтил, линекс, энтерол и др. Весьма перспективно создание с помощью генной инженерии рекомбинантных пробиотиков, характеризующихся одновременно антибактериальными и противовирусными свойствами.

Пребиотиками принято считать пищевые добавки, селективно-стимулирующие рост и размножение так называемых дружественных человеку бактерий. Это низкомолекулярные углеводы (фруктозо-олигосахариды, инулин, лактулоза и др.), которые не должны подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами.

Симбиотики - комплексные препараты, содержащие пробиотик и пребиотик. Возможен еще один способ устранения дисбактериоза - воздействие на патогенную микробную флору продуктами метаболизма нормальных микроорганизмов. К таким препаратам относится хилак форте, представляющий собой стерильный концентрат продуктов обмена веществ нормальной микрофлоры кишечника: молочной кислоты, лактозы, аминокислот и жирных кислот. Эти вещества способствуют восстановлению в кишечнике биологической среды, необходимой для существования нормальной микрофлоры, и подавляют рост патогенных бактерий.

Возможно, продукты метаболизма улучшают трофику и функцию эпителиоцитов и колоноцитов.

Производство препаратов нормофлоры

Необходимым условием массового производства препаратов эубиотиков является сохранение их стабильности в течение длительного времени. Бактерийные препараты, содержащие живые микроорганизмы, относятся к наименее стойким, их активность снижается за счет гибели клеток. Микроорганизмы, имея низкий уровень биологической организации, сохраняют жизнеспособность практически при полной потере воды, при этом в них обратимо замедляются или прекращаются обменные процессы. Для увеличения сроков жизнеспособности бактерий показана сублимационная сушка, проходящая в условиях низкой температуры и глубокого вакуума (незначительной концентрации кислорода).

По причине гигроскопичности укупорку сухих биопрепаратов проводят под вакуумом или в токе инертного газа. К факторам, оказывающим влияние на выживаемость микроорганизмов в препаратах сухих эубиотиков при хранении, следует отнести:

- регламентированное содержание остаточной влаги;
- наличие защитных сред;
- хранение сухих препаратов в атмосфере, не содержащей кислород.

В целях защиты эубиотиков от кислой среды желудка на таблетированные и капсулированные формы наносят ацидорезистентные покрытия или проводят иммобилизацию бактерий на сорбенте. Производство должно быть организовано в соответствии с ГОСТ р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств («GMP»).

Общая схема технологического процесса производства пробиотиков:

1. Подготовка производственных помещений, оборудования, посуды, персонала, вентиляционной системы - проводят в соответствии с требованиями инструкций, регламентирующих условия работы со стерильными лекарственными средствами.
2. Подготовка и стерилизация сред (концентрированной, производственной и защитной среды высушивания). Предварительные работы включают:

- качественный подбор необходимых для данной культуры веществ;
- оценку влияния отдельных компонентов на выход целевого продукта;
- нахождение оптимального соотношения составляющих и удешевление сред.

3. Выращивание маточных (до 6 пассажей) и производственных культур. Вначале выращивают маточную культуру из специального штамма при температуре 370°С, используя различные питательные среды. Производственную культуру выращивают методом глубинного культивирования в реакторах, установленных в боксах. Реакторы оснащены магнитной мешалкой и паровой рубашкой.

4. Розлив жидкого полуфабриката во флаконы. Розлив микробной суспензии в ампулы и флаконы проводят на аппаратах розлива и запайки ампул. Заполненные ампулы и флаконы поступают на сублимацию.

5. Сублимационная сушка. Ампулы помещают в морозильные камеры под углом 7500. Содержимое ампул замораживают при температуре -400°С, выдерживают при этой температуре 18-24 ч, подвергая сублимации.

6. Укупорка. Ампулы с сухой микробной массой запаивают (флаконы укупоривают) с газовой защитой.

7. Маркировка, упаковка. Ампулы маркируют и упаковывают в пачки по 10 штук.

8. Контроль качества готовой лекарственной формы.

Частная технология препаратов нормофлоры

Лактобактерин. Для производства лактобактерина применяют штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum*, который относится к роду *Lactobacillo*soccus. Лактобактерии представляют собой грамположительные палочки длиной 0,7-3,0 мкм. Растут в атмосфере CO₂, N₂, O₂.

Лактобактерин сухой (*Lactobacterium siccum*) получают по общей схеме для бактериальных препаратов.

1. Приготовление и стерилизация питательных сред:

1.1. Приготовление гидролизованного молока (к прокипяченному обезжиренному молоку с рН 7,7±0,1 добавляют панкреатин и хлороформ, выдерживают при 40±2°С 72 ч; затем фильтруют, разводят вдвое водой для инъекций, разливают в бутылки и стерилизуют).

1.2. Приготовление дрожжевого аутолизата (хлебопекарные дрожжи разводят в бутылках водой для инъекций и стерилизуют).

1.3. Приготовление среды МРС (к гидролизованному молоку добавляют дрожжевой аутолизат и навески следующих веществ: марганца и магния сернокислого, аммония лимоннокислого, глюкозы и др.).

1.4. Приготовление гидролизата казеина (в реакторе готовят раствор казеина, устанавливают необходимое значение рН, добавляют хлороформ, выдерживают пять суток при 45 °С, затем фильтруют в бутылки и стерилизуют).

1.5. Приготовление казеиново-дрожжевой среды.

1.6. Приготовление защитных сред высушивания (желатин, сахароза, молоко, натрий лимоннокислый и вода).

2. Получение маточной культуры

(6 пассажей в пробирках, чашках Петри, флаконах и бутылках - в течение 9 суток).

3. Выращивание производственной культуры

(в реакторах с жидкой питательной средой в течение 8-12 ч при 370 °С; в 1 мл микробной суспензии производственного штамма должно быть не менее 6 млрд. живых микробных клеток; к полученной микробной суспензии добавляют защитные среды высушивания – сахарозно-желатозную или обрат молока).

4. Розлив лактобактерина в ампулы (доза зависит от концентрации живых микробных клеток).

5. Лиофильная (сублимационная) сушка:

5.1. Замораживание ампул с лактобактерином, расположенных наклонно под углом 75°, в течение 18-24 ч в холодильной камере до минус 40 °С;

5.2. Лиофилизация (сублимирование) - сушка в условиях глубокого вакуума, длительность сублимации 68-70 ч.

6. Запайка ампул (в режиме газовой защиты - в атмосфере азота).

7. Контроль качества:

7.1. Описание: кристалльная или пористая масса желтовато-белого цвета, кисломолочного запаха и вкуса. Определяют органолептически.

7.2. Подлинность определяется наличием характерных морфологических, культуральных и биохимических свойств в производственных штаммах лактобацилл.

7.3. Показатель рН растворенного препарата должен составлять 5,5:f:0,5.

7.4. Остаточная влажность лактобактерина в ампулах или флаконах не должна превышать 3,5%, в таблетках 5%.

7.5. Растворимость. Сухой препарат должен растворяться в воде, очищенной и добавленной из расчета 1 мл на 1 дозу, в течение 5 мин. образовывать гомогенную взвесь, желтовато-бежевого цвета. Определяют визуально.

7.6 Бактериальная контаминация проверяется бактериоскопически и бактериологически.

Бактериоскопически - путем просмотра мазков, приготовленных из взвеси растворенного препарата и окрашенных по Граму. В мазках должны быть клетки, характерные для лактобацилл (грамположительные).

Бактериологически - путем посева на питательные среды и инкубации в течение 2-х суток не должно содержаться колоний. Если обнаружили рост хотя бы в одной пробирке или чашке, производят повторный посев удвоенного количества образцов.

В случаях повторного роста -серию препарата бракуют. Препарат сухой не должен быть; контаминирован пост-

ронней микрофлорой. Препарат в таблетках не должен содержать патогенных и условно-патогенных микроорганизмов; допускается наличие микробов сапрофитов в количестве не более 300 на 1 таблетку.

7.7. Специфическая безвредность. Препарат должен быть безвредным для белых мышей при введении его внутрь в количестве одной дозы. Наблюдение за мышами осуществляется в течение 5 суток. В случае гибели за этот срок хотя бы одной мыши контроль повторяют на удвоенном количестве животных. Если мыши не погибнут, препарат считают выдержавшим испытание; в противном случае данную серию препарата бракуют.

7.8. Специфическая активность. По количеству жизнеспособных клеток лактобацилл в 1 дозе препарата и активностью кислотообразования.

7.8.1. Определение количества живых лактобацилл в 1 дозе. для определения количества живых лактобацилл в одной дозе препарата от каждой серии испытывают не менее 3-х образцов. Содержимое флакона после разведений высевают по 0,1 мл микробной суспензии на 4 чашки Петри. После 44 ч инкубации при $t = 37^{\circ}\text{C}$ производят подсчет выросших колоний и вычисляют содержание живых бактерий в 1 дозе препарата.

7.8.2. Определение активности кислотообразования проводят титриметрическим методом при выращивании бифидобактерий в модифицированной печеночной среде. Каждую пробу титруют раствором натрия гидроксида 0,1 моль/л в присутствии индикатора фенолфталеина до появления слабо-розового окрашивания. В одной дозе препарата (1 таблетка) при выпуске должно содержаться не менее 2×10^9 живых лактобацилл. Показатель активности кислотообразования лактобактерина, выраженный в градусах Тернера (ТО), должен быть не менее 200..

7.9. Определение компонентов стабилизирующей среды высушивания и других веществ, входящих в состав препарата.

8. Маркировка и упаковка

При производстве таблеток лактобактерина микробную суспензию сушат в кассетах. Сухую микробную массу (СММ) протирают через металлическое сито в бутылки азотом. Таблеточную массу готовят в шаровой мельнице с добавлением к СММ вспомогательных веществ (лактозы, аэросцла, кальция стеарата). В таблеточной массе определяют количество живых лактобактерий и рассчитывают массу таблетки. Таблетирование ведут методом прямого прессования в асептических условиях при строгом соблюдении влажности воздуха (не более 50% при 18°C). Таблетки передают на фасовку во флаконы. Препарат должен находиться в вакууме, атмосфере азота или стерильного воздуха. С целью защиты бактериальных препаратов от агрессивной кислой среды желудка создаются таблетки с ацидорезистентным покрытием, капсулированные формы, иммобилизованные на сорбенте бактерии. Предприняты попытки создания микрокапсулированных форм пробиотиков.

Продолжительность процесса производства лактобактерина в ампулах и таблетках составляет соответственно 42 и 66 суток. Хранят препарат в сухом, темном месте при $T = 5 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Срок годности 12 и 6 -месяцев. Срок годности равен 12 месяцам, если в одной дозе при выпуске содержится 4 млрд. и более живых лактобацилл; 6 – при содержании от 2 до 3,9 млрд. К концу срока годности должно содержаться 1 млрд. живых лактобацилл.

Номенклатура препаратов нормофлоры

Последние годы характеризуются бурным увеличением количества пробиотиков за счет как модернизации и улучшения свойств старых препаратов, так и появления новых, в том числе поликомпонентных, содержащих новые штаммы микроорганизмов, а также различные биологически активные вещества. Это позволило классифицировать группу пробиотиков на несколько составляющих ее подгрупп:

1. Монокомпонентные. Бифидосодержащие (бифидумбактерин, состоящий из штаммов вида *B.breve*, бифидин, содержащий штаммы вида *B.adolescentis*). Лактосодержащие (биобактон, состоящий из ацидофильных лактобактерий). Препараты из апатогенных представителей рода *bacillus* (споробактерин).
2. Поликомпонентные. Бифилонг, ацилак, аципол, биоспорин, линекс (3-компонентный препарат из ацидофильных лактобактерий, бифидобактерий инфантис и фекального стрептококка). Бифилак, бификол, бифиформ, бифилонг, ацепол, ацелак.
3. Комбинированные. Бифидумбактерин форте, кипацид - лактобактерии и комплексный иммуноглобулин, препарат с лизоцимом - бифилиз, биофлор жидкий с экстрактом сои, овощей и прополиса.
4. Иммобилизованные на сорбенте бактерии - бифидумбактерин форте.
5. Бифидо- и лактосодержащие пищевые продукты - бифилакт, бифидок и др.

Бактисубтил - препарат на основе устойчивых к действию желудочного сока спор бактерий, прорастание которых происходит в кишечнике. Вегетативные формы бактерий высвобождают энзимы, расщепляющие углеводы, жиры, белки; в результате образуется кислая среда, угнетающая процессы гниения. Препарат препятствует нарушению синтеза в кишечнике витаминов группы В и Р. Форма выпуска - капсулы.

Бифидумбактерин в порошке представляет собой лиофилизированную микробную массу живых антагонистически активных штаммов *Bifidumbacterium bifidum*. Обладает антибактериальной активностью в отношении широкого спектра патогенных и условно-патогенных бактерий, восстанавливает микрофлору кишечника, нормализует деятельность ЖКТ, обладает иммунорегулирующими свойствами. Назначают при дисбактериозе у детей и взрослых. Выпускается в виде таблеток, во флаконах, пакетах и ампулах.

Бификол сухой представляет собой микробную массу живых антагонистически активных штаммов *Bifidumbacterium bifidum* и *E. Coli*. Применяется для лечения больных хроническими колитами разной этиологии на фоне дисбактериоза у детей и взрослых. Форма выпуска - флаконы и таблетки.

Бифилиз в 1 мл содержит 5 млн. живых бифидобактерий, органические кислоты, легкоусвояемый белок, лизоцим. Показан при острых кишечных заболеваниях вирусно-бактериальной природы.

Бифилонг сухой представляет собой микробную массу живых антагонистически активных двух штаммов *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium longum*. В виде лиофилизата выпускается в ампулах и флаконах. Применяется для лечения острых и хронических заболеваний кишечника, профилактики и лечения дисбактериоза у детей и взрослых.

Биовестин - экологически чистая эмульсия живых бифидумбактерий (активнее сухого бифидумбактерина). Назначают при диспепсиях иммунодефицитах с первых дней жизни.

Лактобактерин в порошке - сухая микробная масса живых антагонистически активных двух штаммов *Lactobacterium acidophilus*. Форма выпуска - ампулы.

Аципол сухой содержит штаммы *Lactobacterium acidophilus* и полисахарида кефирных грибков. Рекомендован детям с первых дней жизни взрослым для коррекции дисбиотических изменений в кишечнике.

Линекс содержит *Lactobacterium acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *E. faecalis*. Поддерживает физиологическое равновесие кишечной микрофлоры.

Колибактерин сухой - лиофилизированная микробная масса живых бактерий *E. Coli*. Применяется для лечения детей и взрослых, страдающих хроническим колитом. Форма выпуска - флаконы, ампулы и таблетки.

Споробактерин сухой - микробная масса живых бактерий *Bacillus subtilis*. Применяется для лечения хирургических инфекций мягких тканей, остеомиелита, дисбактериозов. Выпускается в виде лиофилизированной массы в ампулах.

Энтерол 250 применяется в качестве активного компонента, содержит лиофилизированные дрожжи *Saccharomyces boulardii*, механизм действия которых принципиально отличается от механизма действия других бактериальных препаратов. *Saccharomyces boulardii*, обладают генетически обусловленной устойчивостью к антибиотикам и поэтому при проведении антибактериальной терапии сохраняют свою активность. Они не колонизируют пищеварительный тракт, клетки дрожжей элиминируются с калом в течение нескольких дней после завершения курса терапии. Таким образом, *Saccharomyces boulardii* действуют как «временная» кишечная микрофлора, способная сохранять или восстанавливать равновесие экосистемы кишечника.

Концентрат «Наринэ» - лиофилизированная в среде культивирования микробная масса живого штамма *Lactobacillus acidophilus* новорожденных детей Армении с добавлением защитной среды сахаро-желатино-молочной. Препарат выпускается в виде порошка кремового цвета, кисломолочного вкуса, во флаконах и пакетах.

Пребиотики.

Лактулоза - синтетический дисахарид. Под влиянием препарата увеличивается количество лактобактерий, что приводит к повышению кислотности в просвете толстого кишечника; наряду проявляется слабительный эффект без влияния на слизистую оболочку и гладкую мускулатуру кишечника. Лактулоза уменьшает образование и всасывание азотсодержащих токсичных веществ в проксимальном отделе толстого кишечника, не уменьшает абсорбцию витаминов, не вызывает привыкания. Форма выпуска - сироп, состоящий из лактулозы, галактозы, лактозы.

Пантотенат кальция. Утилизируется бифидобактериями и способствует увеличению их массы.

Памба (парааминобензойная кислота). Способствует росту бифидо- и лактобактерий, кишечных палочек.

Хилак-форте - концентрат метаболизма бактерий. Способствует восстановлению нормофлоры.

Нормазе (лактүлоза) - синтетический дисахарид. Понижает pH в толстом кишечнике, снижает концентрацию гнилостных бактерий, стимулирует перистальтику и рост бифидобактерий.

Лизоцим - мукополисахаридаза, фермент белковой природы. Препарат оказывает бактериолитическое действие, разрушает полисахариды микробной клетки, подавляет рост грамположительных бактерий, стимулирует неспецифическую реактивность организма, оказывает противовоспалительное и муколитическое действие.

ТЕМА 10 ПРАВИЛА GMP, GLP, GCP

Современная биотехнология далеко ушла от той науки о живой материи, которая зародилась в середине прошлого века. Успехи молекулярной биологии, генетики, цитологии, а также химии, биохимии, биофизики, электроники позволили получить новые сведения о процессах жизнедеятельности микроорганизмов. Быстрый рост численности населения нашей планеты, увеличение потребления природных ресурсов при постоянном уменьшении площадей агросферы привели к образованию диспропорций в окружающей среде, к деформации установившихся равновесий экосистем, к ухудшению экологической ситуации во всех сферах деятельности человека.

Биотехнология призвана сыграть значительную роль при создании безотходных технологий и, конечно, при разработке различных схем очистки производственных стоков и твердых отходов.

Однако нельзя забывать, что биотехнологические производства сами по себе могут быть опасными как для обслуживающего персонала, так и для потребителей продукции. Таких примеров можно привести много.

Например, серьезная экологическая ситуация складывается и на биохимических заводах, производящих кормовые дрожжи на основе парафинов нефти. Здоровью человека угрожают не только стоки, но и атмосферный воздух, в котором увеличено содержание дрожжей из рода *Candida*. Деятельность таких заводов сейчас в основном, приостановлена.

Поэтому, с целью обеспечения защиты жизни и здоровья граждан, животных, растений, а также охраны окружающей среды и обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия созданы и утверждены документы (стандарты GLP,

GCP, GMP и GPP и пр.), регламентирующие деятельность предприятий фармацевтического профиля, в т.ч. микробиологических и биотехнологических, по проведению исследований, производству, хранению, перевозке, использованию, утилизации и уничтожении их продукции.

Правила GLP

Правила надлежащей лабораторной практики (GLP) формально определяются как система качества проведения неклинических исследований. Они распространяются на работу фармакологических, токсикологических и других лабораторий биологического профиля и направлены на обеспечение приемлемости результатов научных исследований на этапе экспериментального изучения новых лекарственных препаратов. Под приемлемостью в данном случае понимается как доказательность и надежность данных, так и соблюдение принципов гуманного обращения с лабораторными животными. В странах с развитой контрольно-разрешительной системой результаты исследований, выполненных без соблюдения указанных правил, не принимаются к рассмотрению при подаче заявок на регистрацию новых лекарств.

Вместе с GMP и GCP, эти правила образуют комплекс базовых стандартов или кодексов профессиональной практики, регулирующих изучение, оценку и производство лекарственных препаратов. Все три стандарта одновременно преследуют две цели: защиту интересов потребителей медикаментов и содействие международной торговле ими за счет признания другими странами результатов работ, проведенных в одной стране.

Впервые "Правила GLP" были сформулированы в США в 1976 г. и вступили в силу с 1979 г. Наиболее широкое международное признание получили правила GLP Организации экономического сотрудничества и развития, выпущенные в 1981 г. и пересмотренные в 1997г. Формированию и распространению принципов GLP содействовал успех Правил GMP, получивших во второй половине 1970 гг. мировое признание.

При разработке Правил GLP были использованы принципы обеспечения качества, ранее воплощенные в требованиях GMP. Наряду с этим, в них было включено положение о необходимости гуманного обращения с лабораторными животными.

В СССР в 1991 г. коллективом сотрудников ВНЦ БАВ были разработаны отечественные правила GLP (РД 64-126-91). При их составлении использовался американский стандарт и некоторые национальные документы. Кроме того, в текст Правил были включены требования в отношении объема доклинических испытаний, безопасности химических веществ и конкретные методические указания по изучению различных видов токсичности. По ряду причин работа над этим документом была приостановлена.

В настоящее время в России доклинические исследования лекарственного средства (ЛС) проводятся разработчиком в соответствии с требованиями международных правил лабораторной практики (GLP).

В 2000 году группой авторов были предложены "Правила доклинических исследований безопасности и эффективности фармакологических веществ" (ПДИ). Эти Правила не утверждены каким-либо органом власти или общественной организацией и имеют характер научных рекомендаций.

На систему GLP опираются в случаях испытания веществ: на микробную обсемененность, на пирогенность, токсичность, канцерогенность, мутагенность, тератогенность и т.д. Соблюдение правил GLP должно подкрепляться совершенством организации всех вспомогательных служб и достаточным материальным обеспечением.

Можно выделить несколько главных требований, содержащихся в правилах GLP:

- заблаговременная разработка стандартной методики проведения испытаний, или стандартной операционной процедуры (СОП) для всех этапов;
- назначение руководителя и ответственных за каждый вид испытаний;
- результаты выполнения всех операций должны быть заprotoколированы, датированы и подписаны;
- в случае выполнения сложных операций, во избежание ошибок, рекомендуется прибегать к двойной проверке;
- фактические данные, записи и препараты (вещества) должны храниться в полном порядке таким образом, чтобы всегда можно было отыскать требуемое (необходимое);
- должна быть создана и функционировать независимая Служба обеспечения качества, подотчетная непосредственно руководству исследовательской организации, в обязанности которой входит проведение внутренних проверок (аудитов) и выдача рекомендаций, направленных на совершенствование процессов проведения испытаний.

Надлежащая клиническая практика (GCP)

Одобренный по результатам биотестирования препарат допускается к клиническим исследованиям на людях, в ходе которых подтверждается высокая лечебная эффективность и выясняется наличие или отсутствие неблагоприятных побочных эффектов при лечении больных. На данном этапе руководствуются правилами GCP.

Под правилами "Надлежащей (или качественной) клинической практики" (GCP) понимается стандарт проведения клинического испытания, разработанный для того, чтобы предотвратить ошибки и подлог в процессе испытания лекарственного препарата и защитить права субъекта испытания. Принципы GCP охватывают планирование, организацию, мониторинг, аудит, анализы, отчетность и документацию клинического испытания, а также гарантируют, что это исследование научно и этически обосновано.

Правила GCP являются логическим продолжением GLP в области клинических исследований. Главная их цель – стандартизировать подготовку исследования, сбор данных, их проверку и анализ, ведение документации. Они определяют обязанности фармацевтической промышленности (спонсоров исследований), клинических исследователей и тех, кто контролирует ход исследований. В них также включены указания о порядке получения согласия пациентов или здоровых лиц на участие в испытаниях и сборе данных о побочных действиях препаратов.

Внедрение правил GCP позволяет:

- улучшить методологию клинических испытаний и получить более надежные результаты исследований относительно эффективности и безопасности;
- гарантировать защиту интересов участников испытаний;
- ускорить разработку новых препаратов и, следовательно, доступ пациентов к новым лекарствам;
- ускорить спонсорам (разработчикам/производителям) выход к новым рынкам;
- участвовать клиническим учреждениям в многоцентровых международных клинических испытаниях.

Правила GMP

Если препарат проходит все необходимые доклинические испытания по системе GLP и клиническую проверку, то он разрешается к промышленному выпуску. На стадии производства действуют правила GMP (Good manufacturing practice).

Первые стандарты GMP были утверждены в 1968 году Всемирной Организацией Здравоохранения, для обеспечения высокого качества фармацевтической продукции, в 1971 г. они были изданы в виде приложения ко второму изданию Международной фармакопеи.

В настоящее время GMP Европейского Союза и США являются основными “законодателями” в производственной практике, с их помощью ведется активная подготовительная работа по сближению этих основополагающих документов, чтобы, в конечном счете, был создан единый регламентирующий документ для всех. Для контроля над исполнением стандартов GMP существует Конвенция по фармацевтической инспекции (Pharmaceutical Inspection Convention – PIC). Под Конвенцией подписалось 22 европейские страны, представители которых получили право инспектировать предприятия фармацевтической промышленности любой страны – участника PIC.

В России требования GMP утверждены в 1991 году применительно к контролю и производству лекарственных средств, эти правила соответствуют международной системе GMP. С 1 января 2005 года в РФ действует ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства лекарственных средств».

GMP – это свод основных требований и методов, которые подлежат соблюдению при производстве и контроле качества лекарственных средств согласно современным достижениям науки и практики.

Основной концепцией GMP является понимание того, что все производственные стадии и операции, включая ручные манипуляции, должны быть, регламентированы, протоколно зафиксированы и подлежать проверке. Даже перемещение неэтикетированных материалов и продуктов, упаковочного материала должны быть организованы таким образом, чтобы исключить риск перемешивания и ошибок.

Исходя из особенностей лекарственных препаратов, контроль готового продукта не является гарантией качества. Качество обеспечивается технологией и организацией производства, что и является целью Правил GMP.

Содержание GMP:

- подчинение всего гарантии качества;
- требования к персоналу, обучение персонала;
- сплошное документирование;
- валидация процессов и оборудования;
- требования к помещениям и оборудованию;
- требования к производству;
- самоконтроль;
- измерение и регистрация всех критических параметров.

Применительно к производству лекарственных средств указано, что оно должно опираться на принцип четкого соблюдения методов ведения технологического процесса согласно нормативно-технической документации с целью получения продукта требуемого качества и в соответствии с разрешением на его изготовление и продажу.

По возможности следует избегать любых отклонений от методик или инструкций. При наличии отклонений необходимо согласование, разрешение, утверждение и подпись назначенного ответственного лица, а при необходимости – привлечение службы контроля качества.

Операции с продуктами не должны выполняться одновременно или последовательно в одном и том же помещении пока не устранен риск перемешивания или перекрестного загрязнения.

Перекрестное загрязнение может быть предотвращено изготовлением каждого целевого продукта в отдельных зонах (пенициллины, живые вакцины и другие БАВ) или, по крайней мере, разделением изготовления их по времени; обеспечением соответствующих воздушных шлюзов; ношением защитной технологической одежды; использованием средств эффективной деонтификации оборудования, стен и пр.; использованием «закрытых систем производства».

Контроль качества продукции касается процесса забора проб, проведения исследований, документации и пр. Все исследования должны проводиться согласно утвержденным инструкциям для каждого материала или продукта. Забор проб осуществляют таким образом, чтобы не загрязнить или не подвергнуть нежелательному воздействию, сказывающемуся на качестве продукта или, напротив, чтобы отбираемый материал не был токсичным (вредным) для здоровья оператора.

Приложения к требованиям GMP включают разделы о стерильных фармацевтических продуктах и практике качественного производства основной массы лекарственных субстанций.

Отражая различные аспекты единой концепции обеспечения качества, эффективности и безопасности лекарств, правила GMP, GCP и GLP тесно связаны между собой внутренней логикой и подходами. Эти правила основаны на комплексном учете всех факторов, могущих отрицательно повлиять на качество результатов труда. Они предусматривают наличие соот-

ветствующих предприятий и учреждений, необходимых для выполнения запланированных работ, кадров, помещений, оборудования и материалов. В каждом из них большое значение уделяется документации - наличию инструкций по выполнению всех операций, протоколированию, выполненным работ и архивированию составленных документов.

Общим является требование наличия у каждого предприятия и учреждения внутренней, независимой службы качества, а также положения о внешнем, чаще всего государственном, контроле. На основании каждого кодекса заключены международные соглашения о проверке. Проверки осуществляются в форме инспектирования зарубежных предприятий или учреждений, либо путем взаимного признания результатов проверок силами национальных контрольных органов.

Кодексы взаимосвязаны в сфере применения. Ведущие руководства по GMP требуют, чтобы передаваемые в серийное производство новые препараты были разработаны и испытаны в соответствии с правилами GLP и GCP. Биохимические и другие лаборатории, участвующие в клинических испытаниях препаратов, должны отвечать требованиям GLP.

Правила оптовой торговли GDP и Правила надлежащей аптечной практики GPP

Существуют ещё два стандарта, регулирующие деятельность по оптовой и розничной торговле лекарственными средствами – Правила оптовой торговли GDP и Правила надлежащей аптечной практики GPP.

Аналог GDP - ОСТ 915000.05.00055-2002 "Правила оптовой торговли лекарственными средствами. Основные положения" был утвержден Приказом Минздрава РФ от 15 марта 2002 г. № 80. Текст ОСТа представляет собой компиляцию главы VII Федерального закона "О лекарственных средствах", устаревших руководящих материалов в отношении аптечных складов и некоторых положений Руководства Евросоюза по GDP.

На заключительном этапе доведения лекарственного средства (ЛС) до непосредственных потребителей находятся специализированные организации – аптеки. Основная задача аптеки – обеспечение населения ЛС. Именно от деятельности аптеки в большой степени зависит качество лекарственной помощи.

Международная практика в области регулирования аптечной деятельности заключается во внедрении правил Надлежащей аптечной практики – Good Pharmacy Practice (GPP), направленных на обеспечение качества лекарственной помощи на этапе непосредственного поступления ЛС к пациентам. Правила GPP базируются на концепции оказания лекарственной помощи, предоставляемой фармацевтическими работниками.

Большая роль в правилах GPP отводится необходимости надлежащего информационного обеспечения фармацевтических работников аптек. Фармацевтические работники должны иметь объективную, полную и современную информацию по применению ЛС. Правилами GPP предусматривается постоянное повышение уровня профессиональных знаний фармацевтических работников аптек путем освоения специальных образовательных программ, адекватно отражающих происходящие изменения.

В соответствии с идеологией GPP должны быть разработаны национальные стандарты в системе лекарственного обеспечения (по процедуре отпуска ЛС по рецептам, оценке назначения ЛС, ведению документации, относящейся к профессиональной деятельности, и пр.). Так, стандарты в отношении отпуска ЛС по рецептам устанавливают, требования к помещениям, непосредственно к процедуре отпуска ЛС, квалификации персонала. Стандарты по оценке фармацевтическими работниками назначения ЛС предусматривают соблюдение фармацевтических, фармакологических, социальных, правовых и экономических требований, а также соответствие назначения индивидуальным особенностям конкретного пациента. Правилами GPP регламентируются условия хранения ЛС, включая требования к помещениям, организации рабочих мест, используемому оборудованию, а также процедура уничтожения ЛС с истекшим сроком годности. Особое внимание уделяется обеспечению качества ЛС, индивидуально изготавливаемых в условиях аптек.

Следует отметить, что Минздравом России в 2003 г. был принят отраслевой стандарт 91500.05.0007-2003 "Правила отпуска (реализации) лекарственных средств в аптечных организациях. Основные положения". Принятие данного ОСТа является в определенной степени позитивным моментом в упорядочении деятельности аптечной службы.

Требования Правильной Практики Производства (Good Manufacturing Practice – GMP), Правильной Лабораторной Практики (Good Clinical Practice – GCP) регламентируют весь "жизненный цикл" лекарственного средства: изготовление, изучение и контроль качества, лечебное применение. Все три этапа правильной практики необходимо рассматривать, как единый механизм достижения эффективности системы качества, функционирующей в международном масштабе, в рамках одного государства или в пределах конкретного предприятия.

Биотехнологическое ОП как специфический источник экологической опасности. Контроль и обеспечение безопасных условий эксплуатации

Источники опасности на биотехнологических производствах. Общие требования к биобезопасности

Микробиологические и биотехнологические производства и их продукция могут оказывать на человека, животных и растительный мир следующие виды повреждающего действия:

- развитие инфекционных, паразитарных и других заболеваний;
- токсическое действие;
- аллергенное действие;
- общее и местное неспецифическое (раздражающее) действие;
- действие на генетический аппарат клеток;
- воздействие на экологическую обстановку.

Источниками биологической опасности могут быть патогенные и генно-модифицированные микроорганизмы, используемые в производстве, продукты их метаболизма, токсины, различные химические вещества, содержащиеся в отходах

производства, вызывающие заболевания человека, животных, растений, разрушение материалов, резкое ухудшение качества окружающей среды.

Можно выделить следующие общие требования к биобезопасности микробиологических и биотехнологических производств и их продукции:

1) Безопасность означает отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия микроорганизмов, их модифицированных вариантов, генно-инженерных материалов, оборудования и лабораторных животных, используемых в производстве и контроле препаратов, на здоровье человека и животных, а также на окружающую среду.

2) необходимо иметь полную информацию об используемых в производстве микроорганизмах, их генно-инженерных вариантах, материалах, оборудовании и животных;

3) для определения безопасности микробиологической и биотехнологической продукции необходимо использовать информативные лабораторные методы, позволяющие получить данные, предположительно коррелирующие с ее безопасностью для людей и животных. Заключение о безопасности микробиологической и биотехнологической продукции должно базироваться на комплексной оценке повреждающего действия продукции на организм человека и животных, а также на окружающую среду при кратковременном и длительном воздействии;

4) производственный процесс должен быть организован таким образом, чтобы обеспечить его безопасность внутри и вне производственных помещений и предусматривать превентивные действия для недопущения выпуска в окружающую среду потенциально опасных микроорганизмов (токсигенов), их генно-инженерных вариантов, а также материалов и веществ, используемых в производстве;

5) каждый производитель должен обеспечивать безопасность микробиологической и биотехнологической продукции и гарантировать ее соответствие назначению и требованиям нормативной документации и обязан обеспечивать мониторинг безопасности продукции после размещения ее на рынке. Аналогичные обязанности возлагаются на уполномоченные органы исполнительной власти в области здравоохранения.

6) для контроля над соблюдением на производстве режима безопасности и анализа чрезвычайных случаев нарушения безопасности должен быть создан постоянно действующий орган (комиссия) по режиму безопасности. На каждом производственном участке должен быть сотрудник, ответственный за соблюдение безопасности.

За микробиологическими и биотехнологическими производствами и их продукцией должен осуществляться санитарно-эпидемиологический надзор органами и учреждениями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, а также Государственный контроль (надзор) за соблюдением требований технического регламента и нормативной документации по безопасности микробиологических и биотехнологических производств и их продукции.

Контроль и обеспечение безопасных

условий эксплуатации биотехнологического производства

Специфика производства микробиологической и биотехнологической продукции требует строгого соблюдения нормативно-правовых актов, устанавливающих санитарно-эпидемиологические требования, в том числе критерии безопасности, на всех этапах технологического процесса, включая контроль продукции.

Все производственные процессы должны быть регламентированы и документированы и должны обеспечить неизменность производства продукции, отвечающей требованиям безопасности и другим параметрам качества.

Безопасность производственных помещений должна определяться специальными требованиями к проектированию, строительству и эксплуатации зданий, строений, сооружений. Территория, на которой располагаются производственные помещения, должна быть отделена санитарно-защитной зоной от жилой застройки или от объектов промышленной застройки.

Для безопасного производства микробиологической и биотехнологической продукции должно быть предусмотрено изолированное размещение технологических помещений: отдельные здания или размещение на отдельных этажах одного здания с отдельным входом. Особое внимание должно быть уделено вопросам создания герметизации помещений для того, чтобы избежать перекрестной контаминации и возможных выбросов инфекционных и биологических агентов или химических реагентов, применяемых в технологии производства, в окружающую среду.

Необходимо проектировать помещения таким образом, чтобы избежать пересечения потоков движения стерильной продукции, стерильной лабораторной посуды и реактивов, расходных материалов, необходимых для производства, с потоками движения отработанных реагентов, грязной посуды, мусора и т.д.

Производственные помещения должны иметь разделение на «заразную» зону, где осуществляется работа с микроорганизмами I - IV групп патогенности и их хранение, и на «чистую» зону, где проводятся работы с продукцией после прохождения процедуры инактивации и контроля на специфическую безопасность. Помещения «заразной» и «чистой» зон должны быть разделены специальным помещением – санпропускником.

В производственных помещениях трубы отопления, водопровода, провода электроснабжения, радио- и телефонной связи должны быть убраны в потолочные и настенные покрытия. Настенные или потолочные светильники, лампы ультрафиолетового облучения должны быть закрытыми и доступными для очистки. Все стыки между стенами, стенами и потолком, стенами и полом должны иметь закругленную форму, удобную для уборки и дезинфекции.

Оборудование должно быть сконструировано, смонтировано и размещено таким образом, чтобы:

- обеспечивать непрерывность процесса производства;
- оптимизировать потоки исходного сырья, материалов и свести к минимуму перемещение персонала;
- гарантировать условия асептичности или стерильности в процессе эксплуатации;

- создавать удобства для выполнения производственных операций и уменьшать риск ошибок;
- допускать эффективную уборку.

Помещения блока для работы с инфицированными животными, боксированные помещения и помещения для микробиологических исследований должны быть оборудованы автономными системами приточно-вытяжной вентиляции с механическим побуждением. Указанные системы должны быть оснащены фильтрами тонкой очистки на выходе, проверенными на защитную эффективность. Рециркуляция воздуха не допускается.

Особое внимание уделяется в Правилах безопасности работе с экспериментальными животными. Необходимо обеспечить максимальную изоляцию всех помещений клиники (вивария) от остальных подразделений учреждения, а также помещений для изоляторов и карантина от остальных помещений клиники (вивария).

При проектировании помещений для лабораторных животных следует предусмотреть степень опасности используемых микроорганизмов и виды животных, на которых проводятся исследования. При этом необходимо иметь в виду, что отдельные возбудители могут передаваться от животных к человеку и наоборот (вирусы бешенства, шигеллы, сальмонеллы, микобактерии туберкулеза). Помещение должно быть спроектировано, а оборудование размещено таким образом, чтобы исключить заражение инфекционными агентами или получения персоналом физических травм.

Помещения, предназначенные для зараженных животных, и помещения, где содержатся чистые животные, должны быть отделены от вспомогательных помещений исследовательских лабораторий. Эти помещения должны иметь специальную маркировку, доступ в них должен быть разрешен только определенному кругу лиц.

Для работ с инфекционным материалом, зараженными животными, трупами клиники (виварий) должна быть обеспечена боксовыми помещениями, а материалы, представляющие угрозу для персонала и окружающей среды, должны оставаться внутри боксовых помещений.

С целью предупреждения случайных выбросов опасных материалов за пределы клиники (вивария) и воздействия на окружающую среду необходимо наличие «вторичных барьеров» (шлюзов, воздушных фильтров и т.д.) с их периодическим контролем.

Роль биологических техногенных факторов в обеспечении безопасности опытного производства

Общие требования к обезвреживанию отходов биотехнологических производств

Биотехнологические отходы относятся, как правило, к типу разлагающихся в природных условиях под действием различных факторов (биологических — минерализация с участием микроорганизмов, химических — окисление, физико-химических благодаря комплексному воздействию, например, лучистой энергии и химических веществ). Однако они могут содержать патогенные микроорганизмы, остатки куриных эмбрионов при культивировании, например, вируса гриппа, некоторые тканевые культуры млекопитающих и т.д., а также органические и неорганические вещества, используемые в биотехнологическом процессе, которые при попадании в окружающую среду могут послужить причиной экологической катастрофы.

Поэтому на предприятии должны быть созданы условия для предотвращения хищений подлежащих уничтожению вспомогательных материалов, исходного сырья, отходов и забракованной продукции, с целью исключить попадание используемых микроорганизмов и отходов в окружающую среду.

Качество отходов диктует выбор метода их обезвреживания. Так, патогенные микробы – продуценты сильных ядов (токсина) должны быть обезврежены полностью, и наиболее эффективный способ для этого – сжигание. Нетоксичные отходы по возможности отправляют на утилизацию, например биомасса клеток стрептомицетов после термической обработки может быть направлена на корм скоту.

Общие требования к сбору, обеззараживанию и хранению отходов должны включать следующие положения:

- Инфицированные отходы производства должны помещаться в специальные промаркированные контейнеры, конструкция которых должна быть герметичной, влагонепроницаемой, препятствующей контакту посторонних лиц, животных и членистоногих.
- Все материалы и жидкие отходы, контаминированные микроорганизмами I-IV групп патогенности, должны быть обезврежены термическим или химическим способом перед их спуском в канализацию независимо от наличия стерилизующих установок в канализационной системе. Жидкие отходы не должны храниться в производственных зданиях.
- Для обезвреживания сточных вод из подразделений, работающих с возбудителями I-II групп патогенности и спорообразующими бактериями III группы патогенности, должны быть смонтированы специальные обезвреживающие установки (монжусы с паровым обогревом или стерилизаторы непрерывного действия), позволяющие проводить термическую обработку сточных вод по специально установленным режимам, обеспечивающим полное обеззараживание. Канализационные трубопроводы от приемников отходов до стерилизующих установок должны быть выполнены из нержавеющей стали на сварных соединениях и снабжены приспособлениями для пропаривания.
- Инфицированные твердые отходы и биологические отходы вивария должны уничтожаться сжиганием в специальных установках для термического обезвреживания. Запрещается сжигание зараженных отходов и трупов животных в топках котельных и мусоросжигательных печах общего назначения.
- При обезвреживании плотных отходов в микробиологических производствах лишь убиванием необходимо иметь в виду антигенные особенности такой микробной биомассы, — в любом случае необходимо исключить сенсibiliзирующее действие ее на макроорганизмы во избежание возникновения аллергических заболеваний.
- В аэротенках очистных сооружений, где происходит обезвреживание жидких отходов, лимитирующими факторами выступают главным образом качество и площадь биологической пленки, состоящей из микро- и макрофлоры, микро- и

макрофауны. В этой связи необходимо быть убежденным, что привносимые плотные отходы, богатые органическими веществами, не приведут к ухудшению работы аэротенков.

- Если по технологической схеме плотные и жидкие отходы подаются в воду в виде смешанного стока, то вначале осуществляют грубое разделение первых от вторых, затем производят отжим влаги с последующей передачей уплотненной биомассы клеток на обезвреживание вышеуказанными путями. Аналогичным образом подходят к плотным отходам растительного или животного происхождения — токсичные из них сжигают, не токсичные, по возможности, отправляют на утилизацию.

Экологически безопасная технологическая схема опытного производства

Экологические проблемы промышленной биотехнологии определяются тем, что эта область производства связана с использованием огромных масс технологической воды и воздуха, т.е. является источником большого количества воздушных и водных выбросов. Экологическая опасность этих выбросов определяется, в первую очередь, присутствием живых или убитых клеток микроорганизмов. Попадание их в окружающую среду может вызвать в ней нежелательные и неконтролируемые изменения.

Следствием выброса живых клеток продуцентов из аппаратов, где протекает микробиологический синтез или идет переработка его продуктов, может быть изменение структуры экологических ниш в окружающей среде: в почве, воде и как результат — нарушение состава сообществ микроорганизмов, взаимодействующих в этих нишах, а значит, и их роли в круговороте веществ в природе.

Известны случаи, когда необработанные стоки от промышленных предприятий поступают непосредственно в водоемы или в почву. В таких ситуациях нормальные обитатели водоема или почвенного слоя погибают либо из-за популяционного давления одних видов над другими («цветение воды»), либо вследствие невыносимости экстремальных условий жизни, поскольку в природном водоеме нарушается биологическое равновесие за счет изменения степени аэрации воды, возрастания уровня содержания органических (фенольные соединения, ПАВ) и неорганических веществ (фосфор, сера, тяжелые металлы), изменения pH, температуры.

Другим нежелательным последствием, связанным с выбросом клеток или продуктов их распада, может быть прямое или косвенное воздействие на человеческий организм, т.е. влияние на здоровье обслуживающего персонала и населения. Здесь речь идет не столько о заражении, сколько о повышенной индивидуальной чувствительности в форме аллергии или сенсибилизации к другим неблагоприятным факторам внешней среды.

При рассмотрении связанных с биотехнологией экологических проблем необходимо учитывать, что важной составной частью современной биотехнологии является очистка воды от загрязнений.

Жидкие отходы в биотехнологических производствах достаточно разнообразны по своему составу. Например, в производстве антибиотиков, в состав жидких отходов могут входить углеводы и углеводистые продукты, масла, соевая мука, кукурузный экстракт, нитраты, соли аммония, серо- и фосфорсодержащие соединения, возможные предшественники антибиотиков (например, амид фенилуксусной кислоты в качестве предшественника пенициллина; n-пропанол в качестве предшественника эритромицина и т. д.), неорганические кислоты и щелочи, органические экстрагенты и пр.

Схема очистки сточных вод

В зависимости от качества сточных вод возможна также их очистка до целесообразного уровня (например, получение оборотной воды, реализуемой повторно в том же биотехнологическом производстве). На рисунке 1 приведена схема очистки сточных вод.

Методы очистки воды основаны на использовании специфических биологических сообществ, носящих общее название активного ила, для глубокой утилизации как органических, так и неорганических загрязнений, оставшихся в воде после осуществления всех других возможных вариантов ее очистки. Содержащиеся в технологической воде клетки продуцентов и продукты метаболизма легко утилизируются активным илом. Существует много видов одноклеточных микроорганизмов, перерабатывающих подобные отходы.

Растворенные органические вещества можно удалять с помощью активного ила в аэротенках или при аэробной обработке, на биологических капельных фильтрах. Нитраты обезвреживают с помощью микробов-денитрификаторов (*Pseudomonas* spp., *Vac. lichemformis*, *Paracoccusdenitrifians*, *Thiobacillusdenitrifians*), соли фосфорной кислоты коагулируют и осаждают. Вновь образующиеся твердые (плотные) осадки концентрируют, обезвоживают (фильтрованием, центрифугированием, отстоем на песчаном слое), а затем сжигают либо используют в качестве удобрения.

При очистке сточных вод до уровня чистой воды можно выделить следующие фазы: отделение крупных, легко осаждающихся частиц и масляных пленок (грубая очистка), отделение суспендированных частиц и растворенных органических веществ (умеренно тонкая очистка), и, наконец, отделение всех других примесей (тонкая очистка). При грубой очистке воды отделяются частицы размером 100 мкм и более, при умеренно тонкой — от 1 мкм до 100 мкм, при тонкой — от 0,1 мкм до 1 мкм.

Тонкой очистки сточных вод последовательно достигают с помощью фильтрации через песчаные слои, хлорирования, фильтрации через активированный уголь, упаривания (жидкостной экстракции, вымораживания, обратного осмоса), ионного обмена. Если в этой фазе образуются осадки (плотные вещества), то их присоединяют к другим осадкам и обрабатывают, как сказано выше.

Перед промышленной биотехнологией стоит задача активного использования симбиоза и кометаболизма и создание метаболически замкнутых циклов. Действительно, остаточная культуральная жидкость сама по себе или после определенного

регулирования ее состава может стать питательной средой для роста соответствующего нового продуцента. Ее можно применять до тех пор, пока на очередной стадии она станет вновь подходящей или даже лучшей (за счет стимуляторов) питательной средой для проведения исходного основного процесса. В таком метаболическом цикле на каждом этапе будут получаться полезные продукты и уже нельзя будет выделить основную и вспомогательные стадии.

Однако полностью безотходным процесс может стать только при рациональном решении проблемы воздушных выбросов.

Газообразным отходом биотехнологических производств является «отработанный воздух», представляющий высокодисперсный аэрозоль, в котором дисперсной фазой оказываются капли жидкости и микроорганизмы. Поэтому отработанный воздух не должен поступать в атмосферу без очистки и обезвреживания. Высокодисперсные аэрозоли легко переносятся воздушными потоками на большое расстояние, поэтому не исключено неблагоприятное их воздействие на людей и животных. Воздух, содержащий микроорганизмы, должен быть термически обработан.

Отработанный воздух со стадии ферментации в простейшем случае очищается водой в трубе Вентури, обеспечивающей хорошее смешение потоков за счет разрежения в сопле, создаваемого потоком очищающей воды. Выбросы из сушилок очищаются от пылевидного продукта в последовательно установленных циклонах, что позволяет одновременно увеличить выход продукта.

В последнее время требования к очистке отработанных газов биотехнологических производств значительно возросли. Это связано с общим стремлением к повышению чистоты воздушного бассейна и полностью отвечает решениям директивных органов по оздоровлению экологической обстановки. Поэтому на всех основных заводах воздушные потоки из сушилок направляются на стадию сжигания в печах.

Экологическая биотехнология бурно развивается, появляются системы для утилизации органических и неорганических веществ, загрязняющих среду и попадающих в нее с жидкими и газовыми выбросами. В аэробных и анаэробных условиях обычно с помощью иммобилизованных культур микроорганизмов в жидких стоках разрушают большое количество органических соединений. Примером может быть окисление сульфидов до сульфатов в жидких стоках аутоотрофными бактериями *Thiobacillus denitrificans*, иммобилизованными в геле альгината.

Учёными-биотехнологами разработана также биотехнологическая система для окисления металлов в грязеобразной среде с содержанием сухого вещества 10—30 %. Так, бактерии рода *Leptospirillum* окисляют ртуть, серебро, молибден, селен и др. (Е. А. Griffin et. al., 1989). Достаточно широко практикуют денитрификацию стоков, биологическую утилизацию фосфора и удаление из стоков углеводов нефти.

Таким образом, создание метаболически замкнутых биотехнологических процессов в сочетании с полной очисткой газовых выбросов от биологического материала позволяет создавать безотходные технологические процессы.

Деятельность любого биотехнологического производства может привести к возникновению экологических проблем общего и частного характера:

- 1) истощению и гибели естественных экосистем вокруг биотехнологических предприятий или неадекватному популяционному давлению одних видов живых существ на другие (например, разрастание цианобактерий в водохранилищах);
- 2) возрастанию стрессовых нагрузок на людей, проживающих вблизи крупных биотехнологических предприятий (выхлопные газы, шум, испарения, корпускулярные аллергены в атмосфере и пр.);
- 3) загрязнению воздуха, природных водоемов почв биологическими и химическими агентами, используемых в технологическом процессе и содержащихся в отходах производства.

Поэтому, экологически безопасная схема биотехнологического производства обязательно должна включать стадии изоляции и обеззараживания твердых, жидких и газообразных технологических отходов.

Выбор системы обеззараживания и очистки — дело инженерного расчета с учетом экономической оценки вариантов. Но главным критерием всегда должно быть отсутствие рисков для человека и окружающей среды.

И в данном случае, государство должно не только обеспечить контроль над соблюдением нормативов по безопасности биотехнологических производств, но и централизованно покрыть часть расходов на установление таких систем. Такого подхода требуют интересы современного общества и будущих поколений.

ТЕМА 11 ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Центральная проблема биотехнологии – интенсификация биопроцессов как за счет повышения потенциала биологических агентов и их систем, так и за счет усовершенствования оборудования, применения биокатализаторов (иммобилизованных ферментов и клеток) в промышленности, аналитической химии, медицине.

В основе промышленного использования достижений биологии лежит техника создания рекомбинантных молекул ДНК. Конструирование нужных генов позволяет управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов и создавать организмы с новыми свойствами. В частности, возможно управление процессом фиксации атмосферного азота и перенос соответствующих генов из клеток микроорганизмов в геном растительной клетки.

В качестве источников сырья для биотехнологии все большее значение будут приобретать воспроизводимые ресурсы не пищевых растительных материалов, отходов сельского хозяйства, которые служат дополнительным источником как кормовых веществ, так и вторичного топлива (биогаза), органических удобрений.

Одной из бурно развивающихся отраслей биотехнологии считается технология микробного синтеза ценных для человека веществ. По прогнозам, дальнейшее развитие этой отрасли повлечет за собой перераспределение ролей растениеводства и животноводства с одной стороны, и микробного синтеза - с другой, в формировании продовольственной базы человечества.

Не менее важным аспектом современной микробиологической технологии является изучения участия микроорганизмов в биосферных процессах и направленная регуляция их жизнедеятельности с целью решения проблемы охраны окружающей среды от техногенных, сельскохозяйственных и бытовых загрязнений.

С этой проблемой тесно связаны исследования по выявлению роли микроорганизмов в плодородии почв (гумусообразовании и пополнении запасов биологического азота), борьбе с вредителями и болезнями сельскохозяйственных культур, утилизации пестицидов и др. химических соединений в почве. Имеющиеся в этой области знания свидетельствуют о том, что изменение стратегии хозяйственной деятельности человека от химизации к биологизации земледелия оправдывается как с экономической, так и с экологической точек зрения. В данном направлении перед биотехнологией может быть поставлена цель регенерации ландшафтов.

Ведутся работы по созданию биополимеров, которые будут способны заменить современные пластмассы. Эти биополимеры имеют существенное преимущество перед традиционными материалами, так как нетоксичны и подвержены биодеградации, то есть легко разлагаются после их использования, не загрязняя окружающую среду.

Биотехнологии, основанные на достижениях микробиологии, наиболее экономически эффективны при комплексном их применении и создании безотходных производств, не нарушающих экологического равновесия. Их развитие позволит заменить многие огромные заводы химической промышленности экологически чистыми компактными производствами.

Важным и перспективным направлением биотехнологии является разработка способов получения экологически чистой энергии. Получение биогаза и этанола были рассмотрены выше, но есть и принципиально новые экспериментальные подходы в этом направлении. Одним из них является получение фотоводорода. Если из хлоропластов выделить мембраны, содержащие фотосистему 2, то на свету происходит фотолиз воды - разложение на кислород и водород. Моделирование процессов фотосинтеза, происходящих в хлоропластах, позволило бы запастись энергией Солнца в ценном топливе - водороде. Преимущества такого способа получения энергии очевидны:

- наличие избытка субстрата, воды;
- нелимитируемый источник энергии - Солнце;
- продукт (водород) можно хранить, не загрязняя атмосферу;
- водород имеет высокую теплотворную способность (29 ккал/г) по сравнению с углеводородами (3.5 ккал/г);
- процесс идет при нормальной температуре без образования токсических промежуточных продуктов;
- процесс циклический, так как при потреблении водорода регенерируется субстрат - вода.

Другой механизм превращения энергии у галофитных бактерий *Halobacterium halobium*, которые используют энергию солнца, поглощаемую пурпурным пигментом бактериородопсином, находящимся в мембране клетки. Поглощение света вызывает химические и физические изменения в мембране, приводящие к направленному транспорту протонов водорода с одной стороны мембраны на другую и созданию электрохимического градиента. Следствием этого является синтез аденозинтрифосфорной кислоты. *H. halobium* можно культивировать в мелких водоемах с высоким содержанием NaCl и других минеральных солей. Из 10 литров бактериальной культуры можно получить 0,5 грамма мембран, содержащих до 100000 молекул пигмента. Пигмент можно фиксировать на подложках, обладающих физическими и химическими свойствами для транспорта протонов.

В Комплексной программе научно-технического прогресса стран — членов СЭВ в качестве первоочередных задач биотехнологии определены создание и широкое народнохозяйственное освоение:

— новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормонов роста человека, моноклональных антител и т.д.), позволяющих осуществить в здравоохранении раннюю диагностику и лечение тяжелых заболеваний — сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных;

— микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей, бактериальных удобрений и регуляторов роста растений; новых высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии;

— ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.) для повышения продуктивности животноводства; новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных;

— новых технологий получения хозяйственно ценных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности;

— технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов, использования сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений.

По оценкам специалистов, мировой рынок биотехнологической продукции уже к середине 90-х годов достигнет уровня 130—150 млрд. руб. (Ю. А. Овчинников, 1985).

На пути решения поставленных задач биотехнологию подстерегают немалые трудности, связанные с исключительной сложностью организации живого. Любой биообъект — это целостная система, в которой нельзя изменить ни один из элементов, не меняя остальных, нельзя произвольно перекомбинировать их, придавая организму то или иное желаемое

свойство, например бактерии — способность к сверхсинтезу требуемой аминокислоты, сельскохозяйственному растению — устойчивость к фитопатогенным грибкам. Любое воздействие на объект вызывает не только желаемые, но и побочные эффекты; перестройка генома сказывается сразу на многих признаках организма. У человека существуют гены, отвечающие за злокачественное перерождение клеток. Высказывалось немало идей о необходимости превентивных генетических операций, пока не было установлено, что эти гены необходимы и для нормального роста. Помимо этого, экосистема также представляет собой целостную систему и изменения каждого из ее компонентов сказываются на остальных компонентах. Не исключено, что плазида, с помощью которой трансплантирован желаемый ген культурному растению, будет далее передаваться сорнякам. Не будет ли в результате генных манипуляций превращаться в сорняк само культурное растение?

Успехи, достигнутые в области генетической и клеточной инженерии на простейших биологических системах, прокариотных организмах, вселяют уверенность в преодолимость рассмотренных трудностей. Что касается более сложных систем, а именно эукариотных организмов, то здесь делаются лишь первые шаги, идет накопление фундаментальных знаний.

Биотехнологические разработки могут внести немаловажный вклад в решение комплексных проблем народного хозяйства, здравоохранения и науки.

Для удовлетворения пищевых потребностей необходимо увеличить эффективность растениеводства и животноводства. Именно на это, в первую очередь, нацелены усилия биотехнологов. Кроме того, биотехнология предлагает как источник кормового (возможно, и пищевого) белка клеточную массу бактерий, грибов и водорослей.

Во-вторых, повышение цен на традиционные источники энергии (нефть, природный газ, уголь) и угроза исчерпания их запасов побудили человечество обратиться к альтернативным путям получения энергии. Биотехнология может дать ценные возобновляемые энергетические источники: спирты, биогенные углеводороды, водород. Эти экологически чистые виды топлива можно получать путем биоконверсии отходов промышленного и сельскохозяйственного производства.

В-третьих, уже в наши дни биотехнология оказывает реальную помощь здравоохранению. Нет сомнений в терапевтической ценности инсулина, гормона роста, интерферонов, факторов свертывания крови и иммунной системы, тромболитических ферментов, изготовленных биотехнологическим путем. Помимо получения лечебных средств, биотехнология позволяет проводить раннюю диагностику инфекционных заболеваний и злокачественных новообразований на основе применения препаратов антигенов, моноклональных антител, ДНК/РНК-проб. С помощью новых вакцинных препаратов возможно предупреждение инфекционных болезней.

В-четвертых, биотехнология может резко ограничить масштабы загрязнения нашей планеты промышленными, сельскохозяйственными и бытовыми отходами, токсичными компонентами автомобильных выхлопов и т. д. Современные разработки нацелены

на создание безотходных технологий, на получение легко разрушаемых полимеров (в частности, биогенного происхождения: поли-*b*-оксибутирата, полиамилозы) и поиск новых активных микроорганизмов-разрушителей полимеров (полиэтилена, полипропилена, полихлорвинила). Усилия биотехнологов направлены также на борьбу с пестицидными загрязнениями — следствием неумеренного и нерационального применения ядохимикатов.

Биотехнологические разработки играют важную роль в добыче и переработке полезных ископаемых, получении различных препаратов и создании новой аппаратуры для аналитических целей.

1. Биотехнология и сельское хозяйство

Биотехнология и растениеводство

Культурные растения страдают от сорняков, грызунов, насекомых-вредителей, нематод, фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, неблагоприятных погодных и климатических условий. Перечисленные факторы наряду с почвенной эрозией и градом значительно снижают урожайность сельскохозяйственных растений. Известно, какие разрушительные последствия в картофелеводстве вызывает колорадский жук, а также гриб *Phytophthora* — возбудитель ранней гнили (фитофтороза) картофеля. Кукуруза подвержена опустошительным «набегам» южной листовой гнили, ущерб от которой в США в 1970 г. был оценен в 1 млрд. долларов.

В последние годы большое внимание уделяют вирусным заболеваниям растений. Наряду с болезнями, оставляющими видимые следы на культурных растениях (мозаичная болезнь табака и хлопчатника, зимняя болезнь томатов), вирусы вызывают скрытые инфекционные процессы, значительно снижающие урожайность сельскохозяйственных культур и ведущие к их вырождению.

Биотехнологические пути защиты растений от рассмотренных вредоносных агентов включают: 1) выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; 2) химические средства борьбы (пестициды) с сорняками (гербициды), грызунами (ратициды), насекомыми (инсектициды), нематодами (нематоциды), фитопатогенными грибами (фунгициды), бактериями, вирусами; 3) биологические средства борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами.

Наряду с защитой растений ставится задача повышения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой (кормовой) ценности, задача создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах. Разработки нацелены на повышение энергетической эффективности различных процессов в растительных тканях, начиная от поглощения кванта света и кончая ассимиляцией CO_2 и водно-солевым обменом.

Выведение новых сортов растений. Традиционные подходы к выведению новых сортов растений — это селекция на основе гибридизации, спонтанных и индуцированных мутаций. Методы селекции не столь отдаленного будущего включают генетическую и клеточную инженерию.

Генетическую инженерию предлагают использовать для выведения азотфиксирующих растений. В природных условиях азотфиксирующие клубеньковые бактерии, представители рода *Rhizobium*, вступают в симбиоз с бобовыми. Комплекс генов азотфиксации (*nif*) из этих или иных бактерий предлагают включить в геном злаковых культур. Трудности связаны с поиском подходящего вектора, поскольку широко используемые для подобных целей *Agrobacterium* плазмидами Ti и Ri не заселяют злаки. Планируют модификацию генома *Agrobacterium*, чтобы бактерия могла вступать в симбиоз со злаками и передавать им генетическую информацию. Другим решением проблемы могла бы быть трансформация растительных протопластов посредством ДНК. К компетенции клеточной инженерии относят создание новых азотфиксирующих симбиотических ассоциаций «растение — микроорганизм».

В настоящее время выделены и клонированы гены *sym*, отвечающие за установление симбиотических отношений между клубеньковыми азотфиксаторами и растением-хозяином. Путем переноса этих генов в свободноживущие азотфиксирующие бактерии (*Klebsiella*, *Azotobacter*) представляется возможным заставить их вступить в симбиоз с ценными сельскохозяйственными культурами. Методами генетической инженерии предполагают также повысить уровень обогащения почвы азотом, амплифицируя гены азотфиксации у *Klebsiella* и *Azotobacter*.

Разрабатываются подходы к межвидовому переносу генов *asm*, обуславливающих устойчивость растений к нехватке влаги, жаре, холоду, засоленности почвы. Перспективы повышения эффективности биоконверсии энергии света связаны с модификацией генов, отвечающих за световые и темновые стадии этого процесса, в первую очередь генов *cfx*, регулирующих фиксацию CO₂ растением. В этой связи представляют большой интерес

разработки по межвидовому переносу генов, кодирующих хлорофилл *a/b*-связывающий белок и малую субъединицу рибулозо-бис-фосфаткарбоксилазы — ключевого фермента в фотосинтетической фиксации CO₂.

Гены устойчивости к некоторым гербицидам, выделенные из бактерий и дрожжей, были успешно перенесены в растения табака. Разведение устойчивых к гербицидам растений открывает возможность их применения для уничтожения сорняков непосредственно на угодьях, занятых сельскохозяйственными культурами. Проблема состоит, однако, в том, что массивные дозы гербицидов могут оказаться вредными для природных экосистем.

Некоторые культурные растения сильно страдают от нематод. Обсуждается проект введения в растения новых генов, обуславливающих биосинтез и выделение нематоцидов корневыми клетками. Важно, чтобы эти нематоциды не проявляли токсичности по отношению к полезной прикорневой микрофлоре. Возможно также создание почвенных ассоциаций «растение — бактерия» или «растение — гриб (микориза)» так, чтобы бактериальный (грибной) компонент ассоциации отвечал за выделение нематоцидов.

Важное место в выведении новых сортов растений занимает метод культивирования растительных клеток *in vitro*. Регенерируемая из таких клеток «молодая поросль» состоит из идентичных по генофонду экземпляров, сохраняющих ценные качества избранного клеточного клона. В Австралии из культивируемых *in vitro* клеточных клонов выращивают красные камедные деревья (австралийские эвкалипты), отличающиеся способностью расти на засоленных почвах. Предполагается, что корни этих растений будут выкачивать воду из таких почв и тем самым понижать уровень грунтовых вод. Это приведет к снижению засоленности поверхностных слоев почвы в результате переноса минеральных солей в более глубокие слои с потоками дождевой воды. В Малайзии из клеточного клона получена масличная пальма с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и увеличенной способностью к образованию масла (прирост на 20—30%). Клонирование клеток с последующим их скринингом и регенерацией растений из отобранных клонов рассматривают как важный метод сохранения и улучшения древесных пород умеренных широт, в частности хвойных деревьев. Растения-регенеранты, выращенные из клеток или тканей меристемы, используют ныне для разведения спаржи, земляники, брюссельской и цветной капусты, гвоздик, папоротников, персиков, ананасов, бананов.

С клонированием клеток связывают надежды на устранение вирусных заболеваний растений. Разработаны методы, позволяющие получать регенеранты из тканей верхушечных почек растений. В дальнейшем среди регенерированных растений проводят отбор особей, выращенных из незараженных клеток, и выбраковку больных растений. Раннее выявление вирусного заболевания, необходимое для подобной выбраковки, может быть осуществлено методами иммунодиагностики, с использованием моноклональных антител или методом ДНК/РНК-проб. Предпосылкой для этого является получение очищенных препаратов соответствующих вирусов или их структурных компонентов.

Клонирование клеток — перспективный метод получения не только новых сортов, но и промышленно важных продуктов. При правильном подборе условий культивирования, в частности при оптимальном соотношении фитогормонов, изолированные клетки более продуктивны, чем целые растения. Имобилизация растительных клеток или протопластов нередко ведет к повышению их синтетической активности. Табл. 6 включает биотехнологические процессы с использованием культур растительных клеток, наиболее перспективные для промышленного внедрения.

Коммерческое значение в основном имеет промышленное производство шиконина. Применение растительных клеток, которые являются высокоэффективными продуцентами алкалоидов, терпенов, различных пигментов и масел, пищевых ароматических добавок (земляничной, виноградной, ванильной, томатной, сельдерейной, спаржевой) наталкивается на определенные трудности, связанные с дороговизной используемых технологий, низким выходом целевых продуктов, длительностью производственного процесса.

Таким образом, биотехнология открывает широкие перспективы в области выведения новых сортов растений, устойчивых к неблагоприятным внешним воздействиям, вредителям, патогенам, не требующих азотных удобрений, отличающихся высокой продуктивностью.

Биодеградация пестицидов. Пестициды обладают мощным, но недостаточно избирательным действием. Так, герби-

циды, смываясь дождевыми потоками или почвенными водами на посевные площади, наносят ущерб сельскохозяйственным культурам. Помимо этого, некоторые пестициды длительно сохраняются в почве, что тоже приводит к потерям урожая. Возможны разные подходы к решению проблемы: 1) усовершенствование технологии применения пестицидов, что не входит в компетенцию биотехнологии; 2) выведение растений, устойчивых к пестицидам; биodeградация пестицидов в почве.

К разрушению многих пестицидов способна микрофлора почвы. Методами генетической инженерии сконструированы штаммы микроорганизмов с повышенной эффективностью биodeградации ядохимикатов, в частности штамм *Pseudomonas ceraria*, разрушающий 2, 4, 5-трихлорфеноксиацетат. Устойчивость того или иного пестицида в почве меняется при добавлении его в сочетании с другим пестицидом. Так, устойчивость гербицида хлорпро-фама увеличивается при его внесении совместно с инсектицидами из группы метилкарбаматов. Оказалось, что метилкарбаматы ингибируют микробные ферменты, катализирующие гидролиз хлорпрофама.

Микробная трансформация пестицидов имеет и обратную сторону. Во-первых, быстрая деградация пестицидов сводит на нет их полезный эффект. Во-вторых, в результате микробного превращения могут образоваться продукты, сильно ядовитые для растений. При использовании гербицида тиобенкарба в Японии наблюдали подавление роста и развития риса. Установлено, что подавляет не сам гербицид, а его дехлорированное производное S-бензил-N,N-диэтилтиокарбамат. Чтобы предотвратить образование такого производного, тиобенкарб применяют в комбинации с метоксифеном, ингибитором дехлорирующего фермента микроорганизмов.

Биологическая защита растений от вредителей и патогенов. Из широкого спектра биологических средств защиты растений ограничимся рассмотрением средств борьбы с насекомыми-вредителями и патогенными микроорганизмами. Именно в этих областях имеются наибольшие перспективы.

К традиционным биологическим средствам, направленным против насекомых, принадлежат хищные насекомые. В последние годы арсенал «оружия» инсектицидного действия пополнен грибами, бактериями, вирусами, патогенными для насекомых (энтомо-патогенными). Многие виды насекомых-вредителей (тля, колорадский жук, яблоневая плодожорка, озимая совка и др.) восприимчивы к заболеванию, вызываемому грибом *Beauveria bassiana*. Препарат боверин из лиофильно высушенных конидий гриба сохраняет энтомопатогенность в течение года после обработки почвы или растений. Препарат пецилолин из гриба *Poecilomyces fumoso-roseus* применяют для борьбы с вредителями кустарников, например смородины.

Важным источником бактериальных энтомопатогенных препаратов служит *Bacillus thuringiensis*. Эти препараты обладают высокой устойчивостью и патогенны для нескольких сотен видов насекомых-вредителей, в том числе для листогрызущих насекомых — вредителей яблонь, винограда, капусты, лесных деревьев. Гены, отвечающие за синтез одного из токсинов *B. thuringiensis*, были изолированы и перенесены в растения *табака*. Необходимо, чтобы такие «энтомопатогенные» растения не содержали веществ, токсичных для человека и животных.

Вирусные препараты отличаются высокой специфичностью действия, длительным (до 10—15 лет) сохранением активности, устойчивостью к колебаниям температуры и влажности. Из многих сотен известных энтомопатогенных вирусов наибольшее применение находят вирусы ядерного полиэдрома, обладающие высокой эффективностью действия на насекомых-вредителей. Насекомых выращивают в искусственных условиях, заражают вирусом, из гомогенатов погибших насекомых готовят препараты. Применяют отечественные препараты вирин-ЭКС (против капустной совки), вирин-ЭНШ (против непарного шелкопряда). В последние годы для культивирования вирусов широко применяют культуры клеток насекомых.

Комбинация из нескольких биологических средств нередко действует на вредителей более эффективно, чем каждый в от дельности. Смертность соснового шелкопряда резко возрастает, если вирус цитоплазматического полиэдрома применяют в сочетании с препаратами из *Bac. thuringiensis*. Эффективна комбинация биологических и химических средств защиты растений от насекомых.

Среди новых средств защиты растений — вещества биогенного происхождения, ингибирующие откладку яиц насекомыми или стимулирующие активность естественных врагов насекомых-вредителей: хищников, паразитов.

Разнообразны средства защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов.

1. Антибиотики. Примерами могут служить триходермин и трихотецин, продуцируемые грибами *Trichoderma sp.* и *Trichotecium roseum*. Эти антибиотики используются для борьбы с корневыми гнилями овощных, зерновых и технических культур.

2. Фитоалексины, естественные растительные агенты, инактивирующие микробных возбудителей заболеваний. Эти соединения, синтезируемые в тканях растений в ответ на внедрение фитопатогенов, могут служить высокоспецифичными заместителями пестицидов.

Фитоалексин перца успешно применяли при фитофторозе. Могут быть использованы также вещества, стимулирующие синтез фитоалексинов в растительных тканях.

3. Использование микробов-антагонистов, вытесняющих патогенный вид и подавляющих его развитие.

4. Иммунизация и вакцинация растений. Вакцинные препараты стремятся вводить непосредственно в прорастающие семена.

5. Введение в ткани растений специфичного агента (d-фактора), снижающего жизнеспособность возбудителя.

Биологические средства — важная составная часть комплексной программы защиты растений. Эта программа предусматривает проведение защитных мероприятий агротехнического, биологического и химического плана наряду с использованием устойчивых сортов растений. Задачей комплексной программы является поддержание численности вредителей растений на экологически сбалансированном уровне, не наносящем ощутимого вреда культурным растениям.

Биологические удобрения. Биологические (бактериальные) удобрения применяют для обогащения почвы связанным азотом. Большое распространение получили препараты нитрагин и азотобактерин — клетки клубеньковых бактерий и азотобактера, к которым добавляют стабилизаторы (мелассу, тиомочевину) и наполнитель (бентонит, почву). Азотобактерин обогащает почву не только азотом, но и витаминами и фитогормонами, гиббереллинами и гетероауксинами. Препарат фосфо-бактерин из *Bacillus megaterium* превращает сложные органические соединения фосфора в простые, легко усвояемые растениями. Фосфобактерин также обогащает почву витаминами и улучшает азотное питание растений.

Растения синтезируют ряд соединений, регулирующих их рост и развитие (фитогормоны, биорегуляторы). К их числу принадлежат ауксины, гиббереллины, цитокинины. Созревание плодов стимулирует этилен. Эти биорегуляторы находят применение в сельском хозяйстве. К числу новых, обнаруженных в последние годы биорегуляторов относят пептиды, имеют перспективу их применения в сельском хозяйстве.

Биотехнология и животноводство.

Большое значение в связи с интенсификацией животноводства отводится профилактике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных с применением рекомбинантных живых вакцин и генноинженерных вакцин-антигенов, ранней диагностике этих заболеваний с помощью моноклональных антител и ДНК/РНК-проб.

Для повышения продуктивности животных нужен полноценный корм. Микробиологическая промышленность выпускает кормовой белок на базе различных микроорганизмов — бактерий,

грибов, дрожжей, водорослей. Богатая белками биомасса одноклеточных организмов с высокой эффективностью усваивается сельскохозяйственными животными. Так, 1 т кормовых дрожжей позволяет получить 0,4–0,6 т свинины, до 1,5 т мяса птиц, 25–30 тыс. яиц и сэкономить 5–7 т зерна (Р. С. Рычков, 1982). Это имеет большое народнохозяйственное значение, поскольку 80% площадей сельскохозяйственных угодий в мире отводятся для производства корма скоту и птице.

Одноклеточные организмы характеризуются высоким содержанием белка — от 40 до 80% и более. Белок одноклеточных богат лизином, незаменимой аминокислотой, определяющей его кормовую ценность. Добавка биомассы одноклеточных к недостаточным по лизину растительным кормам позволяет приблизить их аминокислотный состав к оптимальному. Недостатком биомассы одноклеточных является нехватка серусодержащих аминокислот, в первую очередь метионина. У одноклеточных его приблизительно вдвое меньше, чем в рыбной муке. Этот недостаток присущ и таким традиционным белковым кормам, как соевая мука. Питательная ценность биомассы одноклеточных может быть значительно повышена добавкой синтетического метионина.

Производство кормового белка на основе одноклеточных — процесс, не требующий посевных площадей, не зависящий от климатических и погодных условий. Он может быть осуществлен в непрерывном и автоматизированном режиме.

В нашей стране производится биомасса одноклеточных, в особенности на базе углеводородного сырья. Достигнутые успехи не должны заслонять проблемы, возникающей при использовании углеводородов как субстратов для крупномасштабного производства белка, — ограниченность их ресурсов. Важнейшими альтернативными субстратами служат метанол, этанол, углеводы растительного происхождения, в перспективе водород.

Очищенный этанол на мировом рынке стоит почти вдвое дороже метанола, но этанол отличается очень высокой эффективностью биоконверсии. Из 1 кг этанола можно получить до 880 г дрожжевой массы, а из 1 кг метанола — до 440 г. Биомасса из этанола особенно богата лизином — до 7%.

Большое значение для животноводства имеет обогащение растительных кормов микробным белком. Для этого широко применяют твердофазные процессы.

Перспективными источниками белка представляются фото-трофные микроорганизмы, в особенности цианобактерии рода *Spirulina* зеленые одноклеточные водоросли из родов *Chlorella* *Scenedesmus*. Наряду с обычными аппаратами для их выращивания используют искусственные водоёмы. Добавление к растительным кормам биомассы *Scenedesmus* позволяет резко повысить эффективность усвоения белков животными.

Таким образом, существуют разнообразные источники сырья для получения биомассы одноклеточных. Некоторые субстраты (этанол) дают столь высококачественный белок, что он может быть рекомендован в пищу. Цианобактерии рода *Spirulina* издавна используют в пищу ацтеки в Центральной Америке и племена, обитающие на озере Чад в Африке.

2. Технологическая биоэнергетика

Технологическая биоэнергетика — одно из направлений биотехнологии, связанное с эффективным использованием энергии, запасаемой при фотосинтезе. Это может быть достигнуто путем: 1) превращения биомассы, накопленной в результате фотосинтеза в дешевое и высококалорийное топливо — метан и другие углеводороды, этанол и т. д.; 2) модификации самого процесса фотосинтеза, в результате которой энергия света с максимальной эффективностью используется на образование водорода или другого топлива, минуя стадию фотоассимиляции CO_2 и синтеза компонентов клетки. На уровне теоретических разработок находится идея непосредственного преобразования энергии Солнца в электрическую (биофотоэлектрические преобразователи энергии).

Рассмотрим вначале путь, пролегающий через использование биомассы, в первую очередь, растительной, ресурсы которой в мире огромны и оцениваются в 100 млрд. т по сухому веществу в год. Лишь незначительная часть ее расходуется человечеством, но и эта часть дает до 14% потребляемой в мире энергии. Биомасса — не только возобновляемый и почти даровый источник энергии, но и альтернатива тающим запасам полезных ископаемых.

Получение этанола как топлива.

Этанол — экологически чистое топливо, дающее при сгорании CO_2 и H_2O . Он используется в двигателях внутреннего сгорания в чистом виде или как 10–20%-ная добавка к бензину (газохол). В Бразилии уже к 1983 г. 75% автомобилей

работали на 95%-ном этаноле, а остальные — на газохоле. В США предполагают заменить на этанол 10% потребляемого бензина. Широкое внедрение этанола планируется в странах Западной Европы.

На значительных посевных площадях намечают выращивать сельскохозяйственные культуры, предназначенные для биотехнологической переработки в этанол. В условиях дефицита посевных площадей возникает проблема, которая уже в наши дни актуальна для Бразилии и выражается дилеммой: продовольствие или энергия. Производство этанола из растительного сырья не является безотходным: на каждый литр спирта приходится 12—14 л сточных вод с высокой концентрацией отходов, опасных для природных экосистем. Проблема рациональной переработки этих отходов не решена.

Классическим биообъектом, используемым при получении спирта, являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи имеют ряд недостатков.

1. Конкуренция брожения и дыхания. Субстрат (например, глюкоза) лишь частично сбраживается до этанола. Оставшаяся часть безвозвратно теряется, превращаясь в результате дыхания в CO_2 и H_2O . Процесс необходимо вести в анаэробных условиях или применять мутанты дрожжей, утратившие митохондрии и не способные к дыханию.

2. Чувствительность к этанолу, которая снижает выход целевого продукта на единицу объема биореактора. Получены устойчивые к этанолу мутанты, характеризующиеся измененным строением клеточных мембран.

3. Отсутствие ферментов, катализирующих расщепление крахмала, целлюлозы, ксилана. Необходим предварительный гидролиз субстрата или засев биореактора смешанной культурой, содержащей, помимо *S. cerevisiae*, микроорганизмы с соответствующей гидролитической активностью.

Бактерия *Zyomonasmolilis*, применявшаяся центральноамериканскими индейцами для сбраживания сока агавы, более эффективно сбраживает сахара и более устойчива к этанолу. Дальнейшее повышение устойчивости *Z. mobilis* к этанолу достигается добавлением в среду инкубации Mg^{2+} и ряда нуклео-тидных компонентов.

Термофильные бактерии, продуценты этанола характеризуются высокой скоростью роста и метаболизма, чрезвычайно стабильными ферментами, необычной для остальных бактерий устойчивостью к этанолу (до 15% и более). Термофилы способны к биоконверсии полисахаридных субстратов в этанол. Так, *Thermoanaerobium brockii* сбраживает крахмал, *Clostridium thermocellum* — целлюлозу, *Cl. thermohydrosulfuricum* утилизирует продукты деградации целлюлозы с очень высоким выходом спирта. Перспективно применение экстремально термофильного продуцента спирта *Thermoanaerobacterethanolicus*. Планируют использование также ацидофильных (оптимум pH 1,5) и галофильных продуцентов спирта.

Повышение выхода спирта и стабилизация активности его продуцентов могут быть достигнуты путем иммобилизации клеток. Так, эффективный синтез этанола осуществлен с применением клеток *Z. mobilis*, иммобилизованных на хлопчатобумажных волокнах (S. Prentis, 1984).

Получение метана и других углеводородов.

Получение метана — важный путь утилизации сельскохозяйственных отходов. Он получается в виде биогаза — смеси метана и CO_2 . Присутствие CO_2 ограничивает теплотворную способность биогаза как топлива, которая в зависимости от соотношения CH_4/CO_2 составляет 20,9—33,4 кДж/м³. Содержание метана в биогазе варьирует от 50 до 85%.

Непосредственно к образованию метана способна небольшая группа микроорганизмов, относящихся к архебактериям. Жизнедеятельность метанобразующих архебактерий протекает в строго анаэробных условиях. Субстратами для образования метана могут служить муравьиная и уксусная кислоты, метанол, газовые смеси ($\text{H}_2 + \text{CO}$, $\text{H}_2 + \text{CO}_2$). Поскольку биогаз практически получают из сложных органических веществ (целлюлозы, крахмала, белков, липидов, нуклеиновых кислот), то для метан-образования применяют многокомпонентные микробные ассоциации.

Наряду с метанобразующими бактериями в состав таких ассоциаций входят микроорганизмы, переводящие органические субстраты в метанол, муравьиную и уксусную кислоты, H_2 , CO и т. д. Примером может служить метаногенная ассоциация «*Methanobacillus Kuzneceovii*», образующая метан при разложении биомассы водорослей (Чан Динь Тоай, 1984).

Процесс метанобразования отличается высокой эффективностью: до 90—95% используемого углерода переходит в метан. Поэтому метаногенные ассоциации с успехом используют для очистки сточных вод от органических загрязнений с одновременным получением высококалорийного топлива. До 5—10% потребленного углерода превращается в биомассу, которая также находит применение. Используют как жидко-, так и твердофазные процессы получения биогаза (биогазификации).

Наряду с биогазом метаногенные ассоциации образуют другие ценные продукты, например витамин B_{12} . После переработки органического субстрата в биогаз остается материал, представляющий собой ценное минеральное (азотное и фосфорное) удобрение.

Получение биогаза — процесс, отличающийся простотой оборудования и доступностью сырья, требует небольших капиталовложений. В Китае, Индии, ряде других стран эксплуатируются небольшие установки, в которые вносят подручный материал (солому, навоз и др.), что исключает затраты на доставку сырья. В Китае действует свыше 7 млн. малых установок вместимостью 10—15 л, достаточных для удовлетворения энергетических потребностей семьи из пяти человек.

Кроме метаногенных анаэробов существует другая группа организмов — продуцентов углеводородов как заменителей топлива. Это микроводоросли — *Botryacoccus*, *Isochrysis*, *Nanochloropsis* и др. Углеводороды накапливаются в значительных количествах — до 80% сухой массы клеток. В США действует ферма для выращивания водорослей с суммарной площадью водоемов 52 тыс. гектаров, дающая около 4800 м³ жидких углеводородов в сутки. Для улучшения топливных характеристик полученные из водорослей углеводороды подвергают гидрированию (Г. Н. Чернов, 1982).

Получение водорода как топлива будущего.

Получение водорода как топлива пока остается на уровне поисковых разработок. Это абсолютно чистое топливо, дающее при сгорании лишь H_2O , отличается исключительно высокой теплотворной способностью — 143 кДж/г. Химический и электрохимический способы получения H_2 неэкономичны, поэтому заманчиво использование микроорганизмов, способных выделять водород. Такой способностью обладают аэробные и анаэробные хемотрофные бактерии, пурпурные и зеленые фототрофные бактерии, цианобактерии, различные водоросли и некоторые простейшие (Е. Н. Кондратьева, И. Н. Го-готов, 1981). Процесс протекает с участием гидрогеназы или нитрогеназы.

Гидрогеназа — фермент, содержащий FeS-центры. Она катализирует реакцию $2H^+ + 2e^- = H_2$

Одна из технологических возможностей основана на включении изолированной гидрогеназы в состав искусственных H_2 -генерирующих систем. Сложной проблемой является нестабильность изолированного фермента и быстрое ингибирование его активности водородом (продуктом реакции) и кислородом. Повышение стабильности гидрогеназы может быть достигнуто ее иммобилизацией (Чан Динь Тоай, 1984; Y. Nosaka et al., 1986). Иммобилизация предотвращает ингибирование гидрогеназы кислородом.

Предложено много вариантов модельных систем, катализирующих образование водорода из воды за счет энергии света. Эти системы различаются механизмом улавливания энергии света и содержат хлоропласты или изолированный из них хлорофилл, а также восстановленные никотинамидные нуклеотиды. Некоторые системы наряду с водородом образуют кислород: в этом случае речь идет о биофотоллизе воды.

Примером может служить система хлоропласт — ферредоксин — гидрогеназа. Ферредоксин служит промежуточным переносчиком электронов от фотосинтетической цепи хлоропластов к добавленной гидрогеназе. Серьезной проблемой является поддержание низкого парциального давления этих газов, с тем чтобы не наступило ингибирование гидрогеназы. При замене ферредоксина на флавопротеид или метилвиологен система образует только H_2 . Флавопротеид и, по некоторым данным, метилвиологен защищают гидрогеназу от ингибирования кислородом. Разрабатываются системы с изолированным хлорофиллом, встроенным в детергентные мицеллы или липосомы вместе с гидрогеназой. Предложена также система с гидрогеназой, иммобилизованной в агарозном геле, с которым прочно связан полимерный виологен и металлопорфирин, аналог хлорофилла.

Водород получают также с применением целых клеток микроорганизмов, стабильность которых возрастает при их иммобилизации. Высокоэффективными продуцентами H_2 являются пурпурные фототрофные бактерии, например *Rhodospseudomonas* sp., которые при иммобилизации в агарозном геле дают до 180 мкмоль H_2 за 1 ч в пересчете на 1 мг бактериохлорофилла (M. Tadashi, A. Akiga, 1983). Важное направление работ — поиск продуцентов H_2 с устойчивой к O_2 гидрогеназой.

Другим ферментом, катализирующим выделение водорода, является нитрогеназа. У всех микроорганизмов нитрогеназа состоит из двух, компонентов, а именно из MoFeS-протеида (молибдоферредоксина) и FeS-протеида (азоферредоксина). Основной функцией нитрогеназы является восстановление молекулярного азота:



В отсутствие основного субстрата (N_2) нитрогеназа катализирует энергозависимое

восстановление H^+ с образованием H_2 . Переключение фермента с одного режима работы на другой является технологической проблемой. Один из путей решения — получение штаммов микроорганизмов с нитрогеназой, не утилизирующей азот.

В Японии получен штамм *Anabaena* sp., который осуществляет биофотолиз воды в режиме, не чувствительном к H_2 , O_2 и N_2 . Повышению эффективности биофотолиза воды способствует чередование периодов функционирования биообъекта как продуцента H_2 и O_2 с периодами «отдыха», когда клетки фотоассимилируют CO_2 (вводимый в этот период в среду культивирования). Возможно комбинирование процессов получения H_2 и других ценных продуктов. В частности, представители рода *Clostridium* дают органические растворители и в то же время обладают активной гидрогеназой. Если в реакторе с культурой *Cl. saccharo-perbutylacetoniocum*не создавать оттока для выделяющегося H_2 , то наблюдается ингибирование образования H_2 и эффективный синтез бутанола, ацетона и этанола. Если водороду обеспечивают свободный отток, то наряду с довольно активным образованием H_2 культура синтезирует лишь этанол. Этот пример иллюстрирует возможность управления ходом биотехнологического процесса условиями культивирования биообъекта.

Таким образом, предложены разнообразные проекты систем для получения водорода с использованием биообъектов. Речь идет о вмешательстве человека в процесс биоконверсии энергии с целью добиться ее возможно более полного превращения в энергию химической связи в молекуле H_2 .

Пути повышения эффективности фотосинтетических систем.

Рассчитанная теоретически эффективность фотосинтеза, т. е. коэффициент превращения световой энергии в химическую энергию органических веществ, близка к 15%. Фактически, однако, наиболее продуктивные культурные растения запасают не более 1,5—2% энергии падающего света. Актуальная проблема технологической биоэнергетики — повышение эффективности фотосинтеза у культурных растений.

Разрабатывают следующие основные подходы к решению этой проблемы: 1) повышение коэффициента превращения солнечной энергии до 4—5% за счет увеличения площади листьев и их раннего формирования; 2) вмешательство в системы регуляции фотосинтеза — сбалансированное использование фитогормонов, трансплантация регуляторных генов; 3) увеличение скорости роста растений за счет оптимизации водного и минерального питания, что приведет к повышению их фотосинтетической активности; 4) увеличение числа хлоропластов в клетке на единицу площади листа; 5) установление оптимального соотношения между функционирующими реакционными центрами хлорофилла и промежуточными перенос-

чиками электронов, например, цитохромами; б) увеличение скорости переноса электронов между фотосистемами I и II и эффективности сопряжения между транспортом электронов и синтезом АТФ.

Радикальным способом максимизации эффективности фотосинтеза было бы создание искусственных фотосистем, имитирующих основные блоки фотосинтетического аппарата живых организмов, но внедрение подобных преобразователей энергии, по-видимому, отделено от нас несколькими десятилетиями.

Биотопливные элементы.

На уровне поисковых разработок находятся биотопливные элементы, превращающие химическую энергию субстрата в электрическую. Примерами могут служить топливные элементы на основе окисления метанола в муравьиную кислоту с участием алкогольдегидрогеназы, муравьиной кислоты в CO_2 с участием формиатдегидрогеназы, глюкозы в глюконовую кислоту с участием глюкозооксидазы. Используют также каталитическую активность целых клеток, например *E. coli*, *Bac. subtilis*, *Ps. aeruginosa*, в реакции окисления глюкозы.

Окисление субстрата происходит на электроде (аноде). Посредником между субстратом и анодом является биокатализатор. Существуют два пути дальнейшей передачи электронов на

электрод: 1) с участием медиатора и 2) непосредственный транспорт электронов на электрод (А. И. Ярополов, И. В. Березин, 1985). Конструкция биотопливного элемента позволяет генерировать не только электрический ток, но и осуществлять важные химические превращения. Например, топливный элемент с глюкозооксидазой и р-D-фруктофуранидазой преводит сахарозу в смесь фруктозы и глюконовой кислоты.

Ферментные электроды применяются не только в топливных элементах. Они представляют собой основной компонент биологических датчиков — биосенсоров, широко применяемых в химиче-

ской промышленности, медицине, при контроле за биотехнологическими процессами, в аналитических целях и т. д. Обычно используют системы с биокатализатором, иммобилизованным на поверхности мембранного электрода. Например, иммобилизацией пенициллиназы на обычном рН-электроде получают чувствительный биосенсор, регистрирующий концентрацию пенициллина. Иммобилизация клеток *E. coli* на кислородном электроде дает биосенсор для измерения концентрации глутаминовой кислоты, а иммобилизация клеток *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* на том же электроде — биосенсор на NH_4^+ . На биосенсоре протекают следующие превращения: $\text{NH}_4^+ \xrightarrow{\text{Nitrosomonas}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{Nitrobacter}} \text{NO}_3^-$ Разработаны биосенсоры для быстрой регистрации концентрации глюкозы в крови больного, что особенно важно при диагностике диабета.

3. Биотехнология и медицина

Нет такого экспериментального подхода или исследовательского направления в биотехнологии, которые бы не получили применения в медицине. Вот почему столь многообразны связи между биотехнологией и самой гуманной из всех наук. Здесь мы остановимся лишь на основных моментах.

Антибиотики.

Антибиотики — это специфические продукты жизнедеятельности, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов и к злокачественным опухолям, избирательно задерживающих их рост или полностью подавляющих развитие (Н. С. Егоров, 1979). Далеко не все из этих соединений, число которых приближается к 5000, допущены для применения в медицине. К важнейшим антибиотикам терапевтического назначения принадлежат следующие их классы (табл. 2).

Приведенные классы антибиотиков не исчерпывают их многообразия, список их пополняется с каждым годом. Причины неослабевающего внимания к поиску новых антибиотиков, как видно из табл. 10, связаны с токсичностью существующих антибиотиков, аллергическими реакциями, вызываемыми ими, нарастанием устойчивости патогенных микроорганизмов к применяемым препаратам и, помимо этого, с необходимостью изыскания средств борьбы с возбудителями, против которых недостаточно эффективны известные ныне антибиотики. Основные пути поиска включают:

1. Испытание новых продуцентов. Так, с начала 80-х годов исследуют миксобактерии, продуцирующие большое количество антимикробных агентов (Н. Thierbach, N. Reichenbach, 1981).

2. Химическая модификация антибиотиков. Противомикробные макролиды токсичны для человека. Например, гептаен амфо-терицин В, используемый по жизненным показаниям при тяжелых микозах, вызывает необратимые поражения почек. Получены метиловые эфиры амфотерицина, менее токсичные и сохраняющие противогрибковую активность. При модификации пенициллинов и цефалоспоринов используют иммобилизованные ферменты.

3. Мутасинтез. Применяют мутантные штаммы, у которых блокирован синтез отдельных фрагментов молекулы антибиотика. В среду культивирования вносят аналоги этих фрагментов. Микроорганизм использует эти аналоги для биосинтеза, в результате чего получают модифицированный антибиотик.

4. Клеточная инженерия. Получают гибридные антибиотики, например, с новыми комбинациями агликона и Сахаров.

5. Генетическая инженерия — введение в геном микроорганизма информации о ферменте, необходимом для модификации продуцируемого антибиотика, например его метилирования при помощи метилаз.

Важной задачей является повышение эффективности биосинтеза известных антибиотиков. Значительных результатов удалось добиться за десятилетия селекции штаммов-продуцентов с применением индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора. Например, продуктивность штаммов *Penicillium* по синтезу пенициллина увеличена в 300—350 раз. Определенные перспективы открываются в связи с возможностью клонирования генов «узких мест» биосинтеза антибиотика или в случае, если все биосинтетические ферменты кодируются единым опероном.

Многообещающим подходом служит инкапсулирование антибиотиков, в частности их включение в лигусомы, что

позволяет прицельно доставлять препарат только к определенным органам и тканям, повышает его эффективность и снижает побочное действие. Этот подход применим и для других лекарственных препаратов. Например, кала-азар, болезнь, вызываемая лейшманией, поддается лечению препаратами сурьмы. Однако лечебная доза этих препаратов токсична для человека. В составе липосом препараты сурьмы избирательно доставляются к органам, пораженным лейшманией, — селезенке и печени.

Вместо антибиотика в организм человека может вводиться его продуцент, антагонист возбудителя заболевания. Этот подход берет начало с работ И. И. Мечникова о подавлении гнилостной микрофлоры в толстом кишечнике человека посредством молочнокислых бактерий. Важную роль в возникновении кариеса зубов, по-видимому, играет обитающая во рту бактерия *Streptococcus mutans*, которая выделяет кислоты, разрушающие зубную эмаль и дентин. Получен мутант *Strept. mutans*, который при введении в ротовую полость почти не образует коррозионных кислот, вытесняет дикий патогенный штамм и выделяет летальный для него белковый продукт.

Гормоны.

Биотехнология предоставляет медицине новые пути получения ценных гормональных препаратов. Особенно большие сдвиги произошли в последние годы в направлении синтеза пептидных гормонов.

Раньше гормоны получали из органов и тканей животных и человека (крови доноров, удаленных при операциях органов, трупного материала). Требовалось много материала для получения небольшого количества продукта. Так, человеческий гормон роста (соматотропин) получали из гипофиза человека, каждый гипофиз содержит его не более 4 мг. В то же время для лечения одного ребенка, страдающего карликовостью, требуется около 7 мг соматотропина в неделю; курс лечения должен продолжаться несколько лет. С применением генноинженерного штамма *E. coli* настоящее время получают до 100 мг гормона роста на 1 л среды культивирования. Открываются перспективы борьбы не только с карликовостью, но и с низкорослостью — более слабой степенью дефицита соматотропина. Соматотропин способствует заживлению ран и ожогов, наряду с кальцитонином (гормоном щитовидной железы) регулирует обмен Ca^{2+} в костной ткани.

Инсулин, пептидный гормон островков Лангерганса поджелудочной железы, представляет основное средство лечения при сахарном диабете. Эта болезнь вызвана дефицитом инсулина и проявляется повышением уровня глюкозы в крови. До недавнего времени инсулин получали из поджелудочной железы быка и свиньи. Препарат отличался от человеческого инсулина 1—3 аминокислотными заменами, так что возникала угроза аллергических реакций, особенно у детей. Широкомасштабное терапевтическое применение инсулина сдерживалось его высокой стоимостью и ограниченностью ресурсов. Путем химической модификации инсулин из животных удалось сделать неотличимым от человеческого, но это означало дополнительное удорожание продукта.

Компания Eli Lilly с 1982 г. производит генноинженерный инсулин на основе раздельного синтеза *E. coli* А- и В-цепей. Стоимость продукта значительно снизилась, получаемый инсулин идентичен человеческому. С 1980 г. в печати имеются сообщения о клонировании у *E. coli* гена проинсулина — предшественника гормона, переходящего в зрелую форму при ограниченном протеолизе.

К лечению диабета приложена также технология инкапсулирования: клетки поджелудочной железы в капсуле, введенные однократно в организм больного, продуцируют инсулин в течение года.

Компания Integrated Genetics приступила к выпуску фолликуло-стимулирующего и лютеинизирующего гормонов. Эти пептиды составлены из двух субъединиц. На повестке дня вопрос о промышленном синтезе олигопептидных гормонов нервной системы — энкефалинов, построенных из 5 аминокислотных остатков, и эндорфинов, аналогов морфина. При рациональном применении эти пептиды снимают болевые ощущения, создают хорошее

настроение, повышают работоспособность, концентрируют внимание, улучшают память, приводят в порядок режим сна и бодрствования. Примером успешного применения методов генетической инженерии может служить синтез р-эндорфина по технологии гибридных белков, описанной выше для другого пептидного гормона, соматостатина.

Значителен вклад биотехнологии и в промышленное производство непептидных гормонов, в первую очередь стероидов. Методы микробиологической трансформации позволили резко сократить число этапов химического синтеза кортизона, гормона надпочечников, применяемого для лечения ревматоидного артрита. При производстве стероидных гормонов широко используют иммобилизованные микробные клетки, например *Arthrobacter globiformis*, для синтеза преднизолона из гидрокортизона. Имеются разработки по получению гормона щитовидной железы тироксина из микроводорослей.

Интерфероны, интерлейкины, факторы крови.

Интерфероны выделяются клетками человека и животных в ответ на инфицирование вирусами. Они обладают антивирусной активностью. Механизм действия интерферонов до конца не выяснен. Предполагается, в частности, что Интерфероны препятствуют проникновению вирусных частиц в клетку. Интерфероны стимулируют деятельность иммунной системы и препятствуют размножению клеток раковых опухолей. Все аспекты действия интерферонов важны с точки зрения их терапевтического применения.

Различают *a*-, *b*-, *g*- и *e*-интерфероны, образуемые соответственно лейкоцитами, фибробластами соединительной ткани, Т-лимфоцитами и эпителиальными клетками. Наибольшее значение имеют первые три группы. Интерфероны состоят из 146—166 аминокислотных остатков, *b*- и *g*-интерфероны связаны с остатками Сахаров (гликозилированы). До введения методов генетической инженерии интерфероны получали из донорской крови — до 1 мкг неочищенного интерферона из 1 л крови, т. е. примерно одну дозу для инъекции.

В настоящее время *a*-, *b*- и *g*-интерфероны успешно получают с применением генноинженерных штаммов *E. coli*, дрожжей, культивируемых клеток насекомых (*Drosophila*) и млекопитающих. Генно-инженерные интерфероны могут быть

очищены с использованием моноклональных антител. В случае γ - и ρ -интерферонов предпочтительно применение эукариотических продуцентов, так как прокариоты не гликозилируют белки. Некоторые фирмы, например *Bioferon* (ФРГ), используют не генноинженерные мутанты, а культивируемые *invitro* фибропласты человека.

Интерфероны используются для лечения болезней, вызываемых вирусами герпеса, бешенства, гепатитов, цитомегаловирусом, вирусом, вызывающим опасное поражение сердца, а также для профилактики вирусных инфекций. Вдыхание аэрозоля интерферонов позволяет предупредить развитие острых респираторных заболеваний. Нескольким курьезной проблемой является то, что интерфероны, в частности α -интерфероны, сами могут вызывать у пациентов простудные симптомы (насморк, повышение температуры и т.д.). Проблема побочного действия стоит особенно остро при длительном терапевтическом применении интерферонов, необходимом для лечения злокачественных опухолей.

Интерфероны оказывают лечебное воздействие на организм больных раком груди, кожи, гортани, легких, мозга, рассеянной миеломе и саркоме Капоци — два последних заболевания характерны для лиц, страдающих приобретенными иммунодефицитами (см. ниже). Интерфероны полезны также при лечении рассеянного склероза.

Методы генетической инженерии позволяют получать модифицированные Интерфероны. Антивирусная активность интерферонов варьирует при аминокислотных заменах (J. Wergenne, 1983). Американская компания Cetus Corporation производит β -интерферон, в аминокислотной последовательности которого цистеин в положении 17 замещен на серин. Это приводит к повышению терапевтической активности препарата, так как предотвращает наблюдаемое *invitro* формирование неактивного димера β -интерферона за счет дисульфидных связей между остатками цистеина в положении 17. Определенные надежды возлагают на модификацию интерферонов путем получения гибридных молекул (Е. Д. Свердлов, 1984).

Интерлейкины — сравнительно короткие (около 150 аминокислотных остатков) полипептиды, участвующие в организации иммунного ответа. Интерлейкин-1, образующийся определенной группой лейкоцитов крови — макрофагами, в ответ на введение антигена стимулирует размножение (пролиферацию) Т-хелперов (субпопуляции Т-лимфоцитов), продуцирующих, в свою очередь, интерлейкин-2. Последний вызывает пролиферацию различных субпопуляций Т-лимфоцитов — Т-киллеров, Т-хелперов, Т-супрессоров, а также В-лимфоцитов, продуцентов антител. Под влиянием интерлейкина-2 из Т-лимфоцитов высвобождаются регуляторные белки — лимфокины, активирующие звенья иммунной системы; синтезируются также Интерфероны.

Интерлейкины, основные лечебные средства при иммунных расстройствах, получают путем клонирования соответствующих генов в *E. coli* или культивирования лимфоцитов *invitro*. Английская компания Celltech Ltd и японская Sakyocompany предлагают синтезированный генноинженерными бактериями интерлейкин-1 наряду с другим тьюлипептидным агентом — фактором некроза опухолей — для лечения ряда опухолевых заболеваний (B. Sikyaelal., 1986).

Получаемые биотехнологическим путем факторы свертывания крови, особенно фактор VIII (с помощью культивируемых клеток млекопитающих) и фактор IX (с помощью генноинженерного штамма *E. coli*), необходимы для терапии форм гемофилии наследственной болезни, при которой кровь теряет способность свертываться. К числу ценных с клинической точки зрения факторов, полученных в биореакторах с культурами животных клеток, следует отнести фактор роста В-лимфоцитов, фактор активации макрофагов, Т-заместительный фактор, активатор тканевого плазминогена.

Моноклональные антитела и ДНК-или РНК-пробы.

Моноклональные антитела — продукты В-гибридомных клеток — используют для диагностики различных заболеваний. Обладая высокой специфичностью действия, они обеспечивают идентификацию не только вида возбудителя, но и его серотипа. С помощью моноклональных антител можно тестировать различные гормоны, метаболиты, белковые факторы. Наиболее быстрый метод индикации основан на применении антител, иммобилизованных на мембранных электродах — аналогах ферментных биосенсоров. Они позволяют диагностировать беременность, выявлять предрасположенность к диабету, ревматоидному артриту (J. Col-linsetal., 1986), идентифицировать наследственные заболевания, сопровождающиеся утратой тех или иных ферментов и других белковых компонентов. Моноклональные антитела широко используют для диагностики рака и определения его форм.

Трудности связаны с тем, что специфических «раковых» антигенов, по-видимому, не бывает, и характерные для злокачественно переродившейся клетки детерминанты могут быть с некоторой, пусть небольшой, вероятностью обнаружены и в здоровых клетках. Перспективна диагностика рака при помощи моноклональных антител к вырабатываемым злокачественной опухолью особым гормонам, аутокринам, ведущим к самостимуляции роста раковых клеток.

Моноклональные антитела имеют не только диагностическое, но и лечебное значение. При аутоиммунных заболеваниях, когда иммунные клетки «оползают» против собственных органов и тканей, моноклональные антитела соответствующей специфичности могут связывать антитела, наносящие вред организму больного. Для лечения рака предлагают использовать моноклональные антитела, конъюгированные с токсичными для раковых клеток соединениями. Моноклональные антитела доставляют яд точно по адресу, избегая поражения здоровых клеток. Поэтому к моноклональным антителам можно присоединять очень сильные токсины, например ризин — яд из клещевины, одной молекулы которого достаточно для поражения одной клетки. В современной фармацевтической промышленности моноклональные антитела используют для очистки лекарственных препаратов.

Диагностическое значение имеют короткие фрагменты ДНК и РНК, несущие радиоактивную или иную метку, так называемые ДНК/РНК-пробы. С их помощью можно установить наличие в организме определенных типов нуклеиновых кислот, соответствующих болезнетворным агентам, злокачественным опухолям, а также проверить геном пациента на наличие у него тех или иных генетических аномалий. Метод основан на комплементарном взаимодействии проб с участками ДНК или РНК, выделенными из исследуемых клеток и фиксированными на носителе. Взаимодействия нуклеотидных

цепочек пробы с ДНК (РНК) из образца регистрируют по радиоактивной метке или иным способом.

Моноклональные антитела и ДНК/РНК-пробы используют для диагностики болезней животных и растений. В частности, с помощью этих проб проводят индикацию зараженности картофеля вирусом. Диагностические средства из арсенала биотехнологов предлагают применять для быстрого определения пола у цыплят.

Рекомбинантные вакцины и вакцины-антигены.

Вакцинация — один из основных способов борьбы с инфекционными заболеваниями. Путем поголовной вакцинации ликвидирована натуральная оспа, резко ограничено распространение бешенства, полиомиелита, желтой лихорадки. На повестке дня — изготовление вакцин против гриппа, гепатитов, герпесов, свинки, кори, острых респираторных заболеваний. Большое экономическое значение имеет разработка вакцин против болезней сельскохозяйственных животных — ящура, африканской болезни лошадей, овечьей бо-

лезни «синего языка», трипаносомозов и др. Традиционные вакцинные препараты изготавливают на основе ослабленных, инактивиро-ванных или дезинтегрированных возбудителей болезней.

Современные биотехнологические разработки предусматривают создание рекомбинантных вакцин и вакцин-антигенов. Вакцины обоих типов основаны на генноинженерном подходе.

Для получения *рекомбинантных вакцин* обычно используют хорошо известный вирус коровьей оспы (осповакцины). В его ДНК встраивают чужеродные гены, кодирующие иммуногенные белки различных возбудителей (гемагглютинин вируса гриппа, гликопротеин D вируса герпеса, поверхностный антиген вируса гепатита В, антиген малярийного плазмодия). Получаются вакцины против соответствующих инфекций, хорошо зарекомендовавшие себя в опытах на животных. К их достоинствам относится возможность создания поливалентных вакцинных препаратов на основе объединения участков ДНК различных патогенов «под эгидой» ДНК вируса осповакцины. Открывается возможность одномоментной комплексной иммунизации, скажем, крупного рогатого скота против всех опасных инфекций данной местности.

Вакцины-антигены получают, клонируя гены возбудителя болезни в *E. coli*, дрожжах, клетках насекомых и млекопитающих. Клонирован ген поверхностного антигена НВS-вируса гепатита В (сывороточного гепатита), ген белка оболочки УРВируса ящура. Вирус ящура существует в виде многих серотипов, методом белковой инженерии удалось скомбинировать иммуногенные компоненты различных серотипов в рамках одной вакцины-антигена.

Вакцины-антигены высокостабильны при хранении и перевозке, сравнительно просты в изготовлении (в том числе и при крупномасштабном производстве), содержат минимальное количество белка и поэтому малоопасны как аллергены. Они гарантированы от остаточной инфекционности — способности вызывать инфекционную болезнь вместо того, чтобы предохранять от нее. Проблемой является низкая иммуногенность вакцин-антигенов. Одной из причин может быть то, что вакцина не включает всех компонентов возбудителя, необходимых для создания иммунитета к нему. Так, вирус, покидая клетку, часто «одевается» ее мембраной. Компоненты этой мембраны, отсутствующие в генноинженерном белке, могут обладать иммуноген-ными свойствами. К повышению иммуногенности вакцин-антигенов ведет добавление адьювантов, иммобилизация вакцин на носителях или их включение в липосомы.

Ферменты медицинского назначения.

Многообразно применение ферментных препаратов в медицине. Их используют для растворения тромбов, лечения наследственных заболеваний (вместо отсутствующих эндогенных ферментов), удаления нежизнеспособных, денатурированных структур, клеточных и тканевых фрагментов, освобождения организма от токсических веществ (Н.Ф. Казанская и др., 1984). Яркий пример-спасение жизни больных с тромбозом конечностей, легких, коронарных сосудов сердца при помощи тромболитических ферментов (стрептокиназы, урокиназы). В СССР такие препараты созданы в иммобилизованной форме под руководством Е.И. Чазова и И.В. Березина. Ген урокиназы клонирован в бактериях (S. Prentis, 1984). В современной медицине протеазы применяются для очистки очагов гнойно-некротических процессов от патологических продуктов, а также для лечения ожогов. Лечение рака связано с использованием L-аспарагиназы, которая лишает раковые клетки ресурсов необходимого для их развития аспарагина, поступающего с током крови. Здоровые клетки в отличие от раковых (некоторых типов) способны к самостоятельному синтезу аспарагина.

Известно около 200 наследственных заболеваний, обусловленных дефицитом какого-либо фермента или иного белкового фактора. В настоящее время делают попытки лечения этих заболеваний с применением ферментов. Так, пытаются лечить болезнь Готе, при которой организм не способен расщеплять, глюкоцереброзиды (S. Prentis, 1984).

В последние годы все больше внимания уделяют ингибиторам ферментов. Ингибиторы протеаз, получаемые из актиномицетов (лейпептин, антипаин, химостатин и др.) и генно-инженерных штаммов *E. coli* (эглин) и дрожжей (a-1 антитрипсин) оказываются полезными при септических процессах, инфаркте миокарда, эмфиземе легких, панкреатите. Уменьшение концентрации глюкозы в крови больных диабетом может быть достигнуто при использовании ингибиторов кишечных инвертаз и амилаз, отвечающих за превращение крахмала и сахарозы в глюкозу. Особой задачей является поиск ингибиторов ферментов, с помощью которых патогенные микроорганизмы разрушают антибиотики, вводимые в организм больного.

Таковы основные направления биотехнологических разработок в области медицины. Без преувеличения можно сказать что центральное приложение новейших биотехнологических подходов — медицина. Одной из проблем, связанных с белками медицинского назначения, является наличие у них побочных эффектов. Например, аллергические реакции возникают как против генноинженерных белков, так и против моноклональных антител, даже если их получают на основе человеческого гибридом. Эта проблема не нова для медицины и не является непреодолимой.

4. Биотехнология и пищевая промышленность

Микроорганизмы, культуры растительных клеток могут дать пищевые добавки, выгодно отличающиеся своей «натуральностью» от синтетических продуктов, преобладающих в настоящее время. В будущем кулинар сможет добавить в изделие аромат земляники или винограда, масла чеснока или мяты — продукты, образуемые в биореакторах с растительными клетками.

Все большее значение приобретают низкокалорийные, не опасные для больных диабетом заменители сахарозы, в первую очередь фруктоза — продукт превращения глюкозы при участии иммобилизованной глюкоизомеразы. В некоторых продуктах применяют глицин, дающий в комбинации с аспарагиновой кислотой различные оттенки сладкого и кислого. Планируют пищевое применение очень сладкого дипептида аспартама и особенно 100—200-звенных пептидов тауматина и монеллина, которые слаще сахарозы в 10 тыс. раз. В виде мультимера аспартам получен с помощью генноинженерных мутантов *E. coli*, недавно клонирован также ген тауматина.

Немаловажную роль играют ныне в пищевой промышленности ферменты. С их помощью осветляют! фруктовые соки, производят безлактозное (диетическое) молоко, размягчают мясо. Большие возможности в плане повышения питательной ценности представляет добавление в продукты питания витаминов и аминокислот. Ряд аминокислот производят с применением микробов-сверхпродуцентов, полученных с применением методов генетической инженерии. Так, генноинженерный штамм *E. coli* синтезирует до 30 г/л L-треонина за 40 ч культивирования. Важный аспект биотехнологии — улучшение штаммов промышленных микроорганизмов.

Биомасса одноклеточных в перспективе может употребляться как пищевая добавка. Основные принципы получения белка в пищу те же, что и для производства кормового белка, однако круг допустимых субстратов более ограничен, в требованиях к компонентному составу биомассы более жесткие. В пищевой биомассе должно содержаться не менее 80% белка сбалансированного аминокислотного состава, не более 2% нуклеиновых кислот и 1% липидов (М. Г. Безруков, 1985). Необходимы детальные токсикологические и медико-биологические исследования с последующим клиническим испытанием пищевых препаратов биомассы (В. Г. Высоцкий, 1985)

Психологический барьер, на который наталкивается производством «микробной пищи» в странах Европы и Японии, связан не только с прямым риском подвергнуться интоксикации, но и с сомнительными вкусовыми достоинствами этой «пищи будущего». Эксперт по проблемам питания, попробовав образец бактериальной биомассы, заметил: «Она имеет все те свойства, которыми должна обладать новая человеческая пища: не имеет ни запаха, ни цвета, ни структуры, ни вкуса».

Остается выразить надежду на то, что в эпоху, когда белок одноклеточных войдет в употребление, биотехнология сможет в полной мере использовать созданный ею же потенциал растительных и микробных клеток как продуцентов вкусовых, ароматизирующих и структурирующих пищу добавок. Перспективным представляется культивирование грибов (*Fusarium*), цианобактерий (*Spirulina*), зеленых водорослей (*Chlorella*, *Scenedesmus*), имеющих консистенцию и другие органолептические свойства, более привычные для человека. Волокнистую массу *Fusarium* на базе картофельного или пшеничного крахмала как источник пищи для человека производит ныне компания RankHovisMe. Dougall.

5. Биогеотехнология

Приложения биотехнологии к добыче, обогащению и переработке руд, отделению и концентрированию металлов из сточных вод как вторичного сырья, экстракции остаточных порций нефти из иссякающих месторождений относятся к области *биогео-технологии*. Большую роль в этих процессах играют микроорганизмы, способные жить в недрах Земли и осуществлять там химические превращения.

Способностью переводить металлы в растворимые соединения (выщелачивание металлов из руд) обладают различные бактерии. Например, *Thiobacillus ferrooxidans* выщелачивает железо, медь, цинк, уран и другие металлы, окисляя их серной кислотой, которая образуется этой бактерией из сульфида (Г. И. Каравайко, 1984). *Chromobacterium violaceum* растворяет золото по схеме $\text{Au-vAu}(\text{CN})_2$ (А. D. Smith, R. J. Hunt, 1985). Технологии подобных процессов подкупают своей простотой: для извлечения остатков меди, урана, никеля из «пустых пород» горнорудного производства их обливают водой и собирают вытекающие продукты жизнедеятельности микроорганизмов — растворимые соединения (CuSO_4 , UO_2^{+} и т. д.). Метод бактериального выщелачивания позволяет рассматривать разработку бедных месторождений как экономически выгодное предприятие. В США бедные никелевые руды, содержащие всего около 1 кг Ni на 1 т породы, предполагают «выдать на гора» с применением бактериального выщелачивания.

Если речь идет об извлечении металлов из сточных вод, то большое значение придается таким микроорганизмам, как *Citrobacter* sp. (L. E. Macaskie, A. C. R. Dean, 1985), *Zoogloea ramigera*, клетки и внеклеточные полисахариды которой извлекают U, Си, Cd (Г. И. Каравайко, 1984). Велика хелирующая способность грибной биомассы, что, учитывая сравнительно дешевизну ее наработки в больших количествах, открывает

перспективы не только для концентрирования металлов (Pb, Hg, Zn, Cu, Ni, Co, Mn, Cr, Ag, Au, Pt, Pd) из растворов, где они присутствуют в следовых количествах (Г. И. Каравайко, 1984), но и для освобождения растворов от радиоактивных примесей (дезактивации).

Ксантан, внеклеточный полисахарид бактерии *Xanthomonas campestris*, может применяться для извлечения нефти из иссякающих месторождений. Остаточные порции нефти обычно адсорбируются на различных породах, содержащихся в нефтеносных пластах, и не вымываются из них водой. Раствор ксантана в воде обладает, однако, высокой вязкостью и при закачке в пласты под повышенным давлением высвобождает капли нефти из всех трещин и углублений нефтеносных пород (S. Prentis,

1984). Бактерии-деэмульгаторы, например *Nocardia* sp., *Rhodococcus rhodochrous*, разделяют водную и нефтяную фазы, что может быть использовано как для концентрирования нефти, так и для очистки сточных вод от нефтяных примесей,

создающих угрозу для окружающей среды.

Пересечение различных сфер приложения биотехнологии (в нашем примере — биогеотехнологической и природоохранной) составляет характерную особенность ее современного этапа развития. Генноинженерные штаммы псевдомонад, утилизирующие сырую нефть, допускают, по меньшей мере, две сферы применения: получение биомассы на базе необработанной нефти и предотвращение нефтяного загрязнения окружающей среды, в частности устранения нефтяных пленок на поверхности вод морей и океанов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нет сомнения, потенциал биотехнологии в наши дни велик. Ей дано — пусть в определенных границах — переживать поновому «нить жизни» — ДНК — методами генетической и клеточной инженерии, создавать биообъекты по заранее заданным параметрам и, как обычно добавляют, на благо человечества.

Всегда ли на благо? Думается, что уже из основного текста ясно: что накопленный разносторонний потенциал современной биотехнологии — это обоюдоострый меч, который, подобно другим новым отраслям научно-технического прогресса, сформировавшимся в XX в. (ядерная энергетика, компьютерная электроника, космонавтика), может принести не только пользу, но и вред при неконтрольном, неосторожном и тем более злонамеренном применении. Так, в распространении методов генетической инженерии видели угрозу заражения людей невиданными болезнетворными «генетическими монстрами», создания новых разновидностей злостных сорняков и даже выведения «стандартных людей» по заранее заданным программам. Потенциальную угрозу, заключающуюся в развитии биотехнологии, нельзя ни преувеличивать, ни преуменьшать, она в значительной мере определяется не чисто научно-техническими, а этическими и социально-политическими факторами. Как отмечено в материалах XXVII съезда КПСС, в разных общественно-политических системах научно-техническая революция оборачивается разными ее гранями и последствиями.

Биотехнология представляется «страной контрастов», сочетания самых передовых достижений научно-технического прогресса с определенным возвратом к прошлому, выражающимся в использовании живой природы как источника полезных для человека продуктов вместо химической индустрии.

Значительные контрасты характерны для биотехнологии и в отношении необходимых для ее развития финансовых средств, сырьевых материалов и кадров. Есть биотехнологические разработки, требующие весьма внушительных капиталовложений, концентрации усилий крупных коллективов научных работников, инженерно-технических и управленческих кадров, дорогостоящего сырья и оборудования (многие генноинженерные разработки, биотехнологические процессы с применением автоматизированных систем управления). Это так называемая «большая

биотехнология». Ей противостоит «малая биотехнология» (получение биогаза, выращивание микроводорослей в прудах), обходящаяся во многом даровыми источниками энергии и сырья, низкими капиталовложениями, небольшими затратами труда.

Все направления современной биотехнологии должны служить всему человечеству, а не только тем, кто способен финансировать развитие той или иной отрасли. В частности, развивающиеся страны должны получить доступ к «большой биотехнологии», которая им пока во многом «не по карману». Генно-инженерная вакцина против малярии необходима для стран Африки, где от малярии погибает более миллиона детей в год. Но могут ли развивающиеся страны Африки финансировать массовое производство генно-инженерных вакцин? Настоятельной необходимостью является международная координация усилий биотехнологов, всех заинтересованных стран. В рамках государств — участников СЭВ такая координация предусмотрена в Комплексной программе научно-технического прогресса, рассчитанной на период до 2000 г.

Биотехнология — междисциплинарная область научно-технического прогресса. Она весьма гетерогенна по своему теоретическому базису, потому что призвана исследовать не какой-либо класс объектов, а решать определенный круг комплексных проблем. Одной из них является, например, поиск дешевого заменителя тростникового (свекловичного) сахара, и армия биотехнологов берется за дело, сочетая в своей деятельности элементы различных наук: методы микробиологии, необходимые для выращивания микроорганизма, биохимии — для выделения глюкоизомеразы (дающей глюкозо-фруктозный сироп при использовании глюкозы как субстрата), органического синтеза — для получения полимерного носителя, а при регулировке параметров системы с иммобилизованным ферментом необходимы физико-химические расчеты. Можно добавить еще, что для повышения эффективности биосинтеза глюкоизомеразы могут быть использованы методы генетической и клеточной инженерии.

Круг вопросов, к решению которых привлекают биотехнологические разработки, весьма широк. Однако большинство из них прямо или косвенно связано с глобальными проблемами, стоящими перед современной цивилизацией: загрязнение окружающей среды, угроза экологического кризиса; истощение запасов полезных ископаемых, в первую очередь источников энергии, угроза мирового энергетического кризиса; нехватка продовольствия, особенно осязаемая в развивающихся странах.

Слова «биология» и «биотехнология» различаются лишь тем, что в слове «биотехнология» есть вставка «техно». И биология, и биотехнология имеют дело с живыми объектами, но как различны их подходы к живому! Биотехнолог изучает живое не из чисто познавательного интереса, он пытается «заставить» работать живые объекты, производить нужные человеку продукты. «Зачем брать на себя труд изготовления химических соединений, если микроб может сделать это за нас?», — говорил Дж. Б. С. Холдейн еще в 1929 г., предвосхищая грядущий расцвет биотехнологии. В современной биотехнологии живое рассматривается как средство производства в ряду всех прочих средств; например, при биологической трансформации органических соединений микроорганизмам отводят роль химических реагентов. Не случайна и стандартная для инженерной энзимологии метафора, уподобляющая иммобилизованные биообъекты «закованным в цепи рабам». Биообъ-

ект, таким образом, понижают в ранге, переводя из категории самостоятельной целостной живой системы в категорию реагентов, датчиков, реле, компьютерных деталей, прочих орудий модернизированного производства.

Эта тенденция современной биотехнологии имеет не только философское, но и практическое значение. Она порождает чересчур грубый, примитивный, чисто эмпирический подход к такому сложному объекту, как живое, что ведет к его низкоэффективному функционированию в условиях биотехнологического процесса. Не оправдал себя, в частности, лобовой метод оптимизации подобного процесса, оптимизация «грубой силой», проводимый без детальных знаний физиологии используемого организма. Недостаточно надежен в биотехнологии и метод кибернетического моделирования, упрощающий биологический объект до «черного ящика».

Существует и другая тенденция в биотехнологии. Ее приверженцы относятся с «пониманием» к тонкости и слаженности систем регуляции процессов жизнедеятельности в клетке биообъекта. В полушутливой форме эти мысли выражены журналистом и популяризатором биотехнологии Фишлоком в предисловии к книге «Биотехнологический бизнес» (1982): «Микробы намного умнее и способнее микробиологов, генетиков и инженеров». Речь нередко идет о повышении ранга биообъекта в биотехнологии.

Описанные особенности подхода биотехнологии к объекту выделяют ее среди традиционных естественно-научных дисциплин.

Биотехнология — типичное порождение нашего бурного, динамичного XXI в. Она открывает новые горизонты перед человеческим разумом. Проблемы биотехнологии чрезвычайно многообразны, начиная от чисто технических (например, снижение каталитической активности ферментов при их иммобилизации) и кончая тонкими интеллектуальными проблемами, связанными с обеднением фундаментальной науки в связи с доминированием чисто проблемно-прикладных разработок.

В условиях социализма открываются широкие перспективы и возможности для использования новых научных исследований и разработок на благо человека и общества.