

BIOTECHNOLOGY

VOL. 4, N4, 2011

BIMONTHLY

Редакційна колегія

Комісаренко С. В.
(головний редактор)
Стойка Р. С.
(заст. головного редактора)
Колибо Д. В.
(заст. головного редактора)
Виноградова О. С.
(відповідальний секретар)
Гончар М. В.
Дзядевич С. В.
Дробот Л. Б.
Карпов О. В.
Кунах В. А.
Кучук М. В.
Левицький Є. Л.
Лукаш Л. Л.
Матишевська О. П.
Мельничук М. Д.
Мінченко О. Г.
Сандомирський Б. П.
Солдаткін О. П.
Товкач Ф. І.
Філоненко В. В.

Редакційна рада

Комісаренко С. В.
(голова)
Блюм Я. Б.
Єгоров О. М. (Росія)
Єльська Г. В.
Кордюм В. А.
Кухар В. П.
Мірошников А. І. (Росія)
Пастернак Ч. (Великобританія)
Підгорський В. С.
Северин Є. С. (Росія)
Сибірний А. А.
Сидоров В. А. (США)
Скрябін К. Г. (Росія)
Созінов О. О.
Широбоков В. П.

Адреса редакції:

Редакція журналу «Біотехнологія», вул. Леонтовича, 9, 01601, Київ, Україна
Телефон: (044) 235-14-72; E-mail: biotech@biochem.kiev.ua

*Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ №10391 від 14.09.2005*

Постановою Президії ВАК України від 27.05.2009 №1-05/2 журнал внесено до Переліку наукових фахових видань для публікації матеріалів дисертаційних робіт за спеціальностями «Біохімія» та «Біотехнологія»

Науковий редактор Є. Л. Левицький
Літературний редактор Г. М. Шевченко

Комп'ютерний набір Л. П. Бабенко
Комп'ютерна верстка О. В. Мележик

Підписано до друку 23.08.2011. Формат 210×297. Папір крейд. 115 г/м².

Гарн. SchoolBookC. Друк — цифровий. Обл.-вид. арк.11,86.

Наклад 200 прим. Замовлення 4/6.

Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;
друк — ФОП Шамарін О.М.

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Науковий журнал

Виходить один раз на два місяці

БИОТЕХНОЛОГИЯ / BIOTECHNOLOGY

Том 4, №4, 2011

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

- Демченко О. П.*
Канюк М. І. Кластери з декількох атомів срібла
у флуоресцентних сенсорних технологіях 9
- Шатурський О. Я.* Закономірності утворення і функціонування
іонпровідних каналів цитолітичних протеїнів
при реконструкції у штучних ліпідних бішарах 20

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

- Туров В. В.*
Барвінченко В. М.
Крупська Т. В.
Гуцько В. М.
Чехун В. Ф. Гідратні властивості композитного матеріалу
на основі високодисперсного кремнезему та ДНК . . . 34
- Іскра Р. Я.*
Гончар М. В.
Нечай Г. І.
Максимович І. Я. Метаболічні показники крові поросят за умов
згодовування їм культуральної рідини дріжджів
Saccharomyces cerevisiae, яка містить біокомплекси
хрому 50
- Перерва Т. П.*
Мирюта Г. Ю.
Дворник А. С.
Можилевська Л. П.
Кунах В. А. Оптимізація бактеріальних живильних середовищ
екстрактом *Ungernia victoris* 59

<i>Коршун Л. М.</i> <i>Мойса Л. М.</i> <i>Ковтонюк Г. В.</i> <i>Ганова Л. О.</i> <i>Кисельова О. К.</i> <i>Співак М. Я.</i>	Суперсинтез розчинного протеїну — продукту експресії гена, що містить імунодомінантні ділянки глікопротеїну G вірусу герпесу 2-го типу, у бактерійній системі <i>Escherichia coli</i>64
<i>Слета І. В.</i> <i>Чиж М. О.</i> <i>Гальченко С. Є.</i> <i>Сандомирський Б. П.</i>	Моделювання некрозу міокарда за допомогою кріотехнології73
<i>Шульга С. М.</i> <i>Тігунова О. О.</i> <i>Ткаченко А. Ф.</i> <i>Бейко Н. Є.</i> <i>Хоменко А. І.</i>	Вплив ліофілізації на життєздатність дріжджів <i>Pichia anomala</i>80
<i>Сергєєва Л. Є.</i> <i>Броннікова Л. І.</i> <i>Тищенко О. М.</i>	Вміст вільного проліну як показник життєдіяльності клітинної культури <i>Nicotiana tabacum</i> L. під час стресу87
<i>Поліщук Г. Є.</i> <i>Гулак О. В.</i> <i>Згурський А. В.</i> <i>Антонюк М. М.</i>	Мікробіологічні показники рослинних екстрактів для виробництва морозива95

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

<i>Жуковський Ю. Г.</i> <i>Жуковська В. А.</i> <i>Кузнєцова Л. П.</i> <i>Нікітіна О. Р.</i> <i>Сочиліна О. О.</i>	Спосіб ідентифікації бутирилхолінестерази із сироватки крові коня101
---	--

РЕЦЕНЗІЇ

<i>Пивоваренко В. Г.</i>	Рецензія на книгу «Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology III» за редакцією О. П. Демченка (Springer Series of Fluorescence, V. 10, Springer, 2011)105
--------------------------	--

НОВИНИ107

НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН125

КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ, ВИСТАВКИ133

Доповнення до Правил для авторів147

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Демченко А. П.*
Канюк М. И. Кластеры из нескольких атомов серебра
во флуоресцентных сенсорных технологиях9
- Шатурский О. Я.* Закономерности образования и функционирования
ионпроводящих каналов цитолитических протеинов
при реконструкции в искусственных
липидных бислоях20

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Туров В. В.*
Барвинченко В. Н.
Крупская Т. В.
Гунько В. М.
Чехун В. Ф. Гидратные свойства композитного материала
на основе высокодисперсного кремнезема и ДНК ...34
- Искра Р. Я.*
Гончар М. В.
Нечай Г. И.
Максимович И. Я. Метаболические показатели крови поросят
при скормливания им культуральной жидкости
дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*,
содержащей биокомплексы хрома50
- Перерва Т. П.*
Мирюта А. Ю.
Дворник А. С.
Можилевская Л. П.
Кунах В. А. Оптимизация бактериальных питательных сред
экстрактом *Ungernia victoris*59
- Коршун Л. Н.*
Мойса Л. Н.
Ковтонюк Г. В.
Ганова Л. А.
Киселева Е. К.
Спивак Н. Я. Суперсинтез растворимого протеина — продукта
экспрессии гена, содержащего иммунодоминантные
участки гликопротеина G вируса герпеса 2-го типа,
в бактериальной системе *Escherichia coli*64
- Слета И. В.*
Чиж Н. А.
Гальченко С. Е.
Сандомирский Б. П. Моделирование некроза миокарда
с помощью криотехнологии73

Шульга С. М.
Тигунова Е. А.
Ткаченко А. Ф.
Бейко Н. Е.
Хоменко А. И.

Влияние лиофилизации на жизнеспособность
дрожжей *Pichia anomala*80

Сергеева Л. Е.
Бронникова Л. И.
Тищенко Е. Н.

Содержание свободного пролина как показатель
жизнедеятельности клеточной культуры
Nicotiana tabacum L. при стрессе87

Полищук Г. Е.
Гулак Е. В.
Згурский А. В.
Антонюк М. Н.

Микробиологические показатели
растительных экстрактов для производства
мороженого95

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Жуковский Ю. Г.
Жуковская В. А.
Кузнецова Л. П.
Никитина Е. Р.
Сочилина Е. Е.

Способ идентификации бутирилхолинэстеразы
из сыворотки крови лошади101

РЕЦЕНЗИИ

Пивоваренко В. Г.

Рецензия на книгу «Advanced Fluorescence
Reporters in Chemistry and Biology III»
под редакцией А. П. Демченко (Springer Series
of Fluorescence, V. 10, Springer, 2011)105

НОВОСТИ107

**НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ
И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ**125

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ, СИМПОЗИУМЫ, ВЫСТАВКИ133

Дополнения к Правилам для авторов 147

CONTENTS

REVIEWS

- Demchenko O. P.*
Kanyuk M. I. Clusters from a few silver atoms in fluorescent sensory technologies9
- Shatursky O. Ya.* The channel formation and functioning regularities for cytotoxic pore-forming proteins at the reconstruction into artificial lipid bilayers20

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Turov V. V.*
Barvinchenko V. M.
Krupska T. V.
Gun'ko V. M.
Chekhun V. F. Hydrated properties of composite material based on nanosilica and DNA34
- Iskra R. Ya.*
Gonchar M. V.
Nechay H. I.
Maksymovych I. Ya. Metabolic indices of pigs blood at feeding of cultural liquid of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* containing chromium biocomplexes50
- Pererva T. P.*
Miryuta A. Yu.
Dvornik A. S.
Mozhylevskaya L. P.
Kunakh V. A. Optimization of bacterial nutrient media by *Ungernia victoris* extract59
- Korshun L. M.*
Moysa L. M.
Kovtonjuk G. V.
Ganova L. O.
Kiselyova O. K.
Spivak M. J. Supersyntes of product gene expression soluble protein, which includes immunodominant regions of glycoprotein G herpes simplex virus type 2 in the bacterial *Escherichia coli* system64
- Sleta I. V.*
Chizh N. A.
Galchenko S. Ye.
Sandomirsky B. P. Myocardium necrosis modeling by criotechnology using73

<i>Shulga S. M.</i> <i>Tigunova O. O.</i> <i>Tkachenko A. F.</i> <i>Beyko N. E.</i> <i>Khomenko A. I.</i>	Lyophilization effect to <i>Pichia anomala</i> yeasts viability	80
<i>Sergeeva L. E.</i> <i>Bronnikova L. I.</i> <i>Tishchenko E. N.</i>	The free proline content as the viability index of <i>Nicotiana tabacum</i> L. cell culture under stress conditions	87
<i>Polischuk G. E.</i> <i>Gulak O. V.</i> <i>Zgurskiy A. V.</i> <i>Antonyuk M. M.</i>	Microbiological characteristics of plant extracts for ice cream production	95
SHORT MESSAGE		
<i>Zhukovskii Yu. G.</i> <i>Zhukovskaya V. A.</i> <i>Kuznetsova L. P.</i> <i>Nikitina O. R.</i> <i>Sochilina O. O.</i>	The method for identification of horse serum butyrylcholinesterase	101
REVIEWS		
<i>Pivovarenko V. G.</i>	Review on the book «Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology III» Volume Editor A. P. Demchenko (Springer Series of Fluorescence, V. 10, Springer, 2011)	105
NEWS		107
NEW PUBLICATIONS ON BIOTECHNOLOGY AND ADJOINING BRANCHES OF SCIENCE		
		125
CONFERENCES, CONGRESSES, SYMPOSIA, EXHIBITIONS		
		133
<i>Amendments to Author rules</i>		
		147

УДК 577 (087.1 + 112.4)

КЛАСТЕРИ З ДЕКІЛЬКОХ АТОМІВ СРІБЛА У ФЛУОРЕСЦЕНТНИХ СЕНСОРНИХ ТЕХНОЛОГІЯХ

О. П. ДЕМЧЕНКО, М. І. КАНЮК

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: alexdem@ukr.net; kanyukni@ukr.net

Кластери з декількох атомів срібла мають унікальні оптичні властивості, що дозволяє розглядати їх як ефективну заміну органічним барвникам у різних флуоресцентних сенсорних технологіях. Описано їхні властивості і приклади застосування, техніку створення і стабілізації за допомогою різних високомолекулярних та низькомолекулярних матриць. Зокрема, дуже простими є методи одержання кластерів із використанням хімічних відновників, а також відновлення під дією світла.

Продемонстровано застосування кластерів срібла для мічення ДНК та створення ДНК-сенсорів на основі їх гібридизації з наступним детектуванням флуоресценції кластерів. Надзвичайно швидко розвиваються інші перспективні напрями, зокрема детектування іонів та мічення живих клітин, як у плані фундаментальних досліджень, так і з огляду на широкі можливості практичного застосування.

Ключові слова: флуоресценція, кластери атомів срібла, сенсорні технології.

У біосенсорних та сенсорних технологіях триває пошук методів з якомога ширшим колом застосування і з найвищою абсолютною чутливістю. Йде невпинне вдосконалення методу, який найбільшою мірою відповідає цим вимогам, — методу флуоресценції. В минулі часи його розвиток та впровадження були пов'язані з органічними барвниками. Чималий набір цих барвників з різними спектроскопічними параметрами і практично невичерпними можливостями ковалентної модифікації та функціоналізації в біологічних системах забезпечили широке застосування їх у молекулярних та клінічних дослідженнях. Проте виявились і їхні суттєві недоліки, передусім низька фотохімічна стійкість, тобто здатність до вицвітання (фотодеградації). Існують принципові обмеження й щодо їхньої яскравості, часу випромінювання тощо.

В останній час дослідники звернули увагу на унікальні спектроскопічні властивості кластерів срібла, що складаються з декількох атомів — Ag_n , де $n = 2 - 8$ [1, 2]. Маючи оптичні характеристики, подібні до органічних барвників, вони перевершують їх за величиною молярного поглинання та флоростабільністю [3]. Водночас кластери значно менші за розміром порівняно з напівпровід-

никовими наноматеріалами (квантовими точками), які токсичні на рівні клітини та організму. Відсутність цих недоліків у поєднанні зі значними перевагами в оптичних властивостях (таблиця) робить кластери срібла гідними уваги в різноманітних сферах застосування. Цікаві та обнадійливі результати одержано на рівні одиничних молекул для розвитку молекулярно-оптичних і електронних пристроїв майбутнього [4]. Багатообіцяльним є їх використання в молекулярних сенсорах та біосенсорах [5–7], а також у біології клітини [8, 9]. Обговоренню цих питань присвячено цей огляд.

Властивості кластерів срібла

Кластери з кількох (2–8) атомів срібла мають унікальні властивості. Це структури розміром менше 0,5 нм. Їхні властивості принципово відрізняються від добре вивчених більших за розміром наночастинок срібла. Для останніх є характерним плазмонне поглинання та розсіювання [10]. Локалізовані плаزمони — це одночасні коливання електронів, що виникають унаслідок просторового обмеження їх руху в наночастинках (деяких) металів. Оскільки їхній розмір значно менший, ніж довжина хвилі

Порівняльні властивості кластерів срібла, органічних барвників та квантових точок

Властивості	Кластери срібла	Органічні барвники	Квантові точки
Розмір (нм)	~0,5	0,5–2	10–20
Молярна екстинкція ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	~ 10^5	10^3 – 10^5	~ 10^7
Час життя флуоресценції (нс)	0,5–5	3–5	10–20
Стоксів зсув (нм)	До 100	10–60	~15
Чутливість спектрів до оточення	Помірна	Різна, часом значна	Відсутня
Фотостабільність	Стабільні	Вицвітають	Стабільні
Токсичність	Відсутня	Різна	Потенційно значна

світла, то виникають коливання густини електронів з частотою світла. Спектри екстинкції містять значну компоненту розсіювання, а також пік плазмонного резонансного поглинання при 380–410 нм. Такі частинки практично не випромінюють світла. Їхні властивості зазнають істотних змін зі зменшенням розміру до кількох атомів (рис. 1).

Змінюються спектральні характеристики кластерів, передусім зникає їх плазмонне поглинання, оскільки колективних коливань електронів уже не існує. Водночас виникають нові смуги поглинання у видимій та ближній ультрафіолетовій (УФ) області завдяки збільшенню відстані між енергетичними рівнями. Кластери срібла стають потужними випромінювачами флуоресценції, і це випромінювання нагадує флуоресценцію органічних молекул. Такі зміни відбуваються тому, що в кластерах атомів металу електрони вже не делокалізовані

й для них характерні дискретні електронні стани і електронні переходи між цими станами. Ці електронні переходи відповідають енергії поглинання та випромінювання світла у видимій області спектра саме так, як і в органічних барвників. Характерною мірою розміру тут є Фермі-довжина хвилі електрона (довжина де Бройля електрона з енергією Фермі). Для срібла вона становить ~0,5 нм. Фізика цих процесів активно вивчають. Одна з моделей, запропонованих для Ag_n , полягає в тому, що поглинання фотона переводить електрон з рівня d до порожнього рівня sp , вищого за енергію від рівня Фермі. Після втрати енергії через релаксації (механізм яких досі невідомий) рекомбінація електрона та «дірки» призводить до випромінювання світла. Для електронних переходів характерна значна сила осцилятора (що визначає ефективність поглинання світла) і високий квантовий вихід випромінювання.

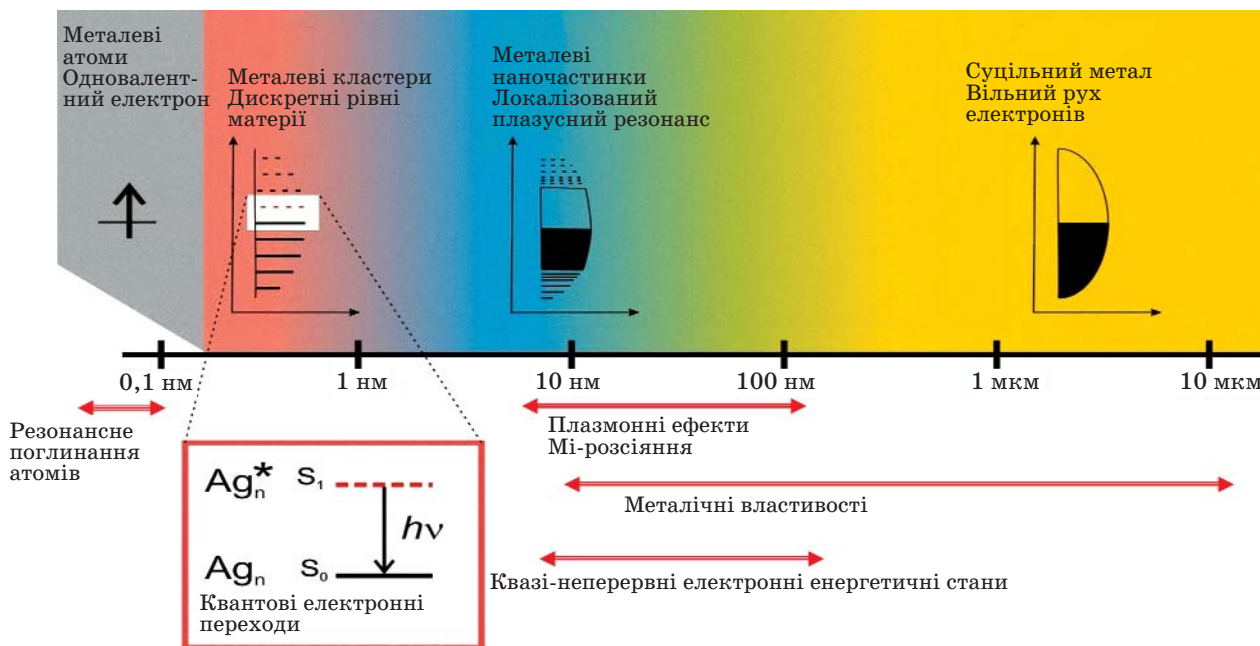


Рис. 1. Властивості матеріалів срібла залежно від їхнього розміру.

Зменшення розміру від наночастинок до кластерів з кількох атомів призводить до радикальних змін фізичних властивостей

Дослідження оптичних властивостей кластерів срібла мають довгу історію як в плані наукових досліджень, так і розроблення та вдосконалення матеріалів для фотографії [11]. Дослідження в криогенних матрицях благородних газів (аргон, криптон) показали, що навіть двох атомів достатньо для спостереження «молекулярного типу» випромінювання з часом життя в кілька наносекунд [12]. Так, для кластерів Ag_2 характерні смуги поглинання при 384 нм і емісії — 479 нм. Для кластерів Ag_3 в спектрах збудження спостерігаються відносно вузькі максимуми за 321, 386 та 492 нм, а в спектрах випромінювання — дві основні смуги за 374 та 622 нм, що відсутні в спектрах димерів. Що стосується кластерів з більшим числом атомів, то їхні властивості вивчено менше, і не існує єдиної думки дослідників щодо класифікації їхніх спектрів [13]. Проте простежується загальна тенденція зсуву спектрів поглинання і випромінювання до великих довжин хвилі зі збільшенням числа атомів Ag .

Створення та стабілізація кластерів

Наведені вище дані слід віднести до передісторії технологічних та, зокрема, біотехнологічних застосувань. Справжня історія розпочалася тоді, коли було показано можливість створення та стабілізації Ag_n -кластерів за кімнатних температур у водних розчинах дендритних полімерів [14] і молекул ДНК [15–17], які правили за матриці, тобто це молекули, які стабілізують кластери і запобігають росту їх до наночастинок.

Одержувати кластери срібла дуже просто. Увесь процес складається з одного етапу й не потребує значних витрат часу чи коштів. Тут існує декілька методів з використанням розчинних солей срібла, зокрема Ag^+NO_3^- . Дослідник має широкий набір механізмів відновлення іонів до атомів, зокрема застосування хімічних відновлювачів [17], фотовідновлення [18, 19], радіолітичне [20] і навіть ультразвукове [21] відновлення. Відновлення під дією світла відбувається за допомогою утворених у розчиннику фотоелектронів і дозволяє контролювати процес у просторі й часі, що дає значні переваги в біотехнологічних застосуваннях.

Таким чином, складність в одержанні кластерів полягає в застосуванні спеціальних матриць, які обмежують розміри кластерів срібла (Ag_{2-8}), утримують, стабілізують, а потім не дають їм можливості рости далі до наночастинок. Тому без матриць не

можливо створити стабільні кластери. Такими матрицями можуть слугувати полімерні молекули, що містять багаті на електрони атоми сірки, азоту й кисню. Саме під час взаємодії з ними відбувається стабілізація кластерів. На додаток до використаних вперше поліамідоамінових (ПАМАМ) дендримерів [14] і однитчастих сегментів ДНК (ssДНК) [15–17] було запропоновано застосовувати інші полімери, наприклад поліакрилову [22] та поліметакрилову [23] кислоти.

Низькомолекулярні речовини також можна використовувати як матриці. Зокрема, це показано для барвника тіофлавіну Т [24], похідних тіолів [5, 25, 26] та амінів [19]. Для різних біотехнологій є дуже цікавим застосування пептидів [27, 28] і протеїнів [29].

Механізм взаємодії кластерів з матрицею

Багато авторів стверджують, що за наявності певного типу стабілізаторів та матриць утворюються кластери лише певного типу. Зокрема, зі збільшенням часу опромінення спостерігається збільшення інтенсивності поглинання та флуоресценції в певних смугах, але не поява нових смуг (рис. 2). Ці спостереження дуже зручні та надійні, оскільки ані вихідні іони срібла, ані наночастинок більшого розміру не флуоресціюють. Усі матеріали, які мають здатність стабілізувати кластери, містять атоми сірки, азоту та кисню, що відомі як атоми, багаті на електрони і здатні бути їхніми донорами в комплексах з перенесенням заряду [30]. Такі центри утворення кластерів є в дендримерах [14], пептидах [28], протеїнах [29] та нуклеїнових кислотах [3, 31].

Варто відзначити, що кластери утворюються під час взаємодії з основами ДНК, а не із сахаридно-фосфатним остовом, як можна було б очікувати у разі первинної електростатичної взаємодії з іонами срібла. Важливо, що саме одноланцюгові сегменти ДНК є найкращими центрами утворення кластерів, і простежуються дуже різні спектроскопічні ефекти при зв'язуванні з різними основами [15], зокрема значна різниця в кольорі флуоресценції (рис. 3). Такі незвичайні властивості привернули увагу теоретиків [32]. Вони можуть бути корисними і в практичному плані, адже це уможливило ідентифікування одонуклеотидних мутацій [33].

Цікаво, що спостерігається відносно потужна флуоресценція кластерів, утворених у водних розчинах, тобто в умовах, коли має відбуватися її гасіння за відомим механізмом

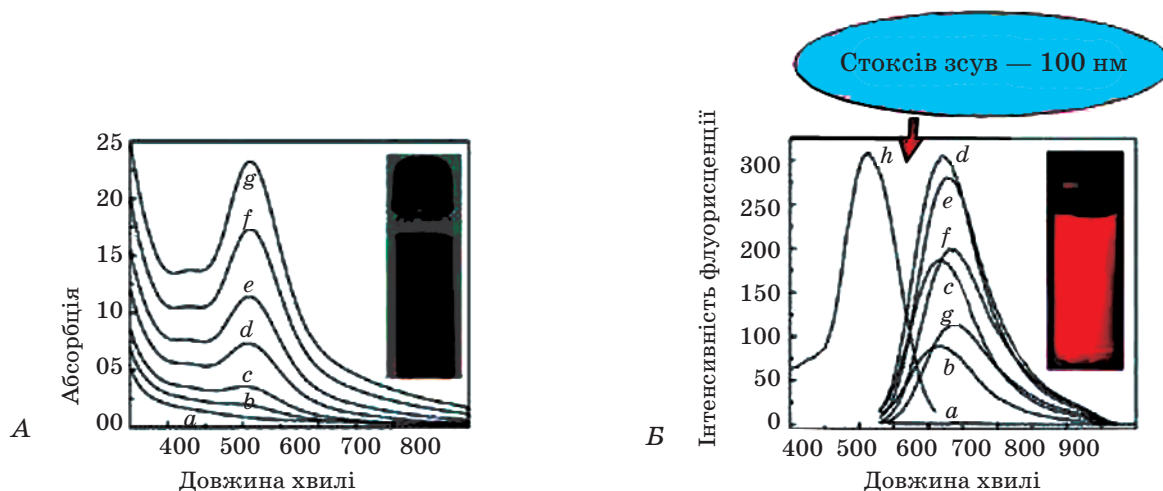


Рис. 2. Спектри поглинання (А) та флуоресценції (Б) водного розчину ПМАА (поліметакрилова кислота) і AgNO_3 за різного часу опромінювання довжиною хвилі 365 нм (у хв): а — 0; б — 5; с — 10; д — 20; е — 40; ф — 60; г — 90. Крива *h* у Б — спектр збудження, що відповідає флуоресценції при 620 нм [23]

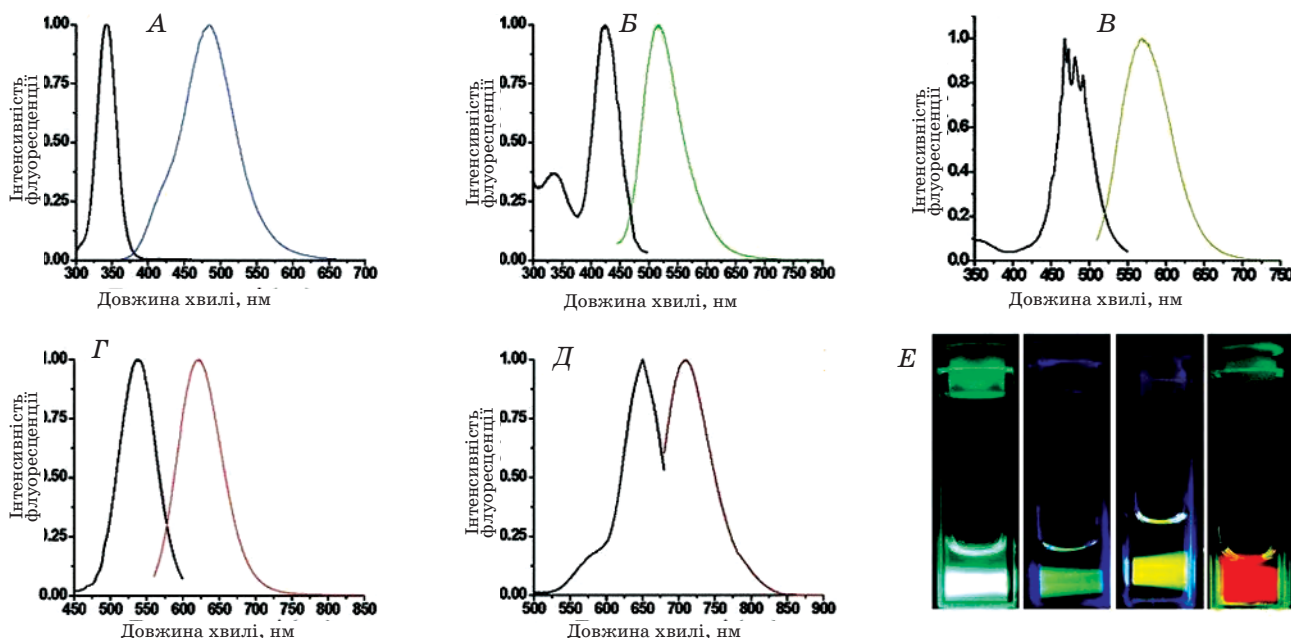


Рис. 3. Спектри поглинання і флуоресценції для різних послідовностей ssДНК, що включають кластери срібла:

А — кластери із синім випромінюванням, створені на 5'-СССТТТААСССС-3'; В — кластери із зеленим випромінюванням, створені на 5'-СССТСТТААСССС-3'; С — кластери з жовтим випромінюванням, створені на 5'-СССТТААТСССС-3'; Д — кластери з червоним випромінюванням, створені на 5'-ССТССТТСССТСС-3'; Е — кластери з ближнім ІЧ-випромінюванням, створені на 5'-СССТААТСССС-3'; Е — фото випромінювальних розчинів, що відповідають А-Г [15]

перенесення електрона на розчинник. Це свідчить про екранування кластерів від водного оточення. Іони срібла є відомими гасіями флуоресценції, але наявність їх у процесі фотовідновлення не впливає на флуоресценцію вже утворених кластерів. Відносно слабка залежність спектрів кластерів, утворених на полімерних носіях від розчинника (див. нижче), є ще одним свідченням цього. Та-

ким чином, взаємодія кластера з матрицею має бути основним чинником, що визначає спектроскопічні властивості.

Найхарактернішою з цих властивостей є значний Стоксів зсув (зсув між спектрами поглинання і випромінювання), що досягає $2500\text{--}2700\text{ см}^{-1}$, тобто порядку 100 нм (рис. 2). Природа цього зсуву наразі невідома. Проте є підстави вважати, що її природа пов'язана

із взаємодією кластерів зі своїм оточенням, а саме з утворенням комплексів з перенесенням заряду в основному стані. Сусідні атоми сірки, азоту чи кисню можуть переносити частково електронний заряд на кластери, які є його акцепторами, а утворення таких комплексів припиняє подальший ріст кластерів до наночастинок.

Матриці з олігонуклеотидів. Структурні та спектральні відмінності

Найбільш вивченими є кластери, створені на основі ssДНК. Дослідники, які використовують олігонуклеотиди як матриці для кластерів, помітили суттєву різницю в спектрах поглинання та флуоресценції залежно від гетероциклічних основ нуклеотидів, що видно з порівняння 12-членних олігонуклеотидних матриць [15]. Для послідовностей, які складаються з основ А, С та G, спостерігаються значні спектральні відмінності від основи Т, що можна пояснити в термінах різної стабільності комплексів з перенесенням заряду. Як вважають, вона корелює зі спектроскопічними властивостями, і для основи Т ці комплекси значно слабші. У цьому разі флуоресценція спостерігається в синій ділянці спектру, а в інших — значно зміщена в ділянку великих довжин хвиль. Підбором коротких послідовностей ssДНК можна варіювати колір флуоресценції в широких межах (рис. 3). За відсутності прямих даних про розмір кластерів ще не з'ясовано, чи ця різниця може бути спричинена не тільки різною взаємодією з атомами оточення, а ще й відмінностями в розмірі та структурі кластерів.

Непрямим свідченням того, що розмір

кластера відіграє дуже важливу роль у спектроскопічних властивостях, є дослідження з ДНК-шпильками (рис. 4), які є штучними олігомерними молекулами. Вони складаються в структуру, в якій утворюється дволанцюговий сегмент — «хвіст» та одноланцюгова «голівка». У даному випадку було синтезовано набір молекул типу 5'-ТАТССГТ-С_n-АССГГАТА-3', де 7 пар основ утворювали «хвіст», а послідовність з 3 до 12 цитозинів (-С_n-) — «голівки» різного розміру [34]. Інкубація в розчині з AgNO₃ в присутності відновника NaBH₄ призводила до утворення кластерів, іммобілізованих на «голівках». Як видно з рис. 4, в усіх випадках за винятком С₃ одночасно спостерігаються два типи кластерів з відмінними властивостями, а порівняння шпильок з різною довжиною «голівки» дало змогу ідентифікувати кластери чотирьох типів.

Така специфіка зв'язування Ag_n-кластерів із ssДНК і залежність спектрів флуоресценції від виду та послідовності її основ стимулювала розробку нових та модифікацію існуючих аналітичних методів. Так, сенсорна послідовність ДНК із включенням олігоцитозинової петлі може гібридизуватися з ланцюгом ДНК, який розпізнається (рис. 5), а сформований дуплекс слугуватиме матрицею для утворення кластера срібла [33]. Флуоресценція цього кластера може давати інформацію, що дозволяє селективно ідентифікувати типову одонуклеотидну мутацію, зокрема серпоподібно-клітинну анемію (рис. 6). Це свідчить про можливість широкого застосування даного явища в методах, які базуються на гібридизації ДНК.

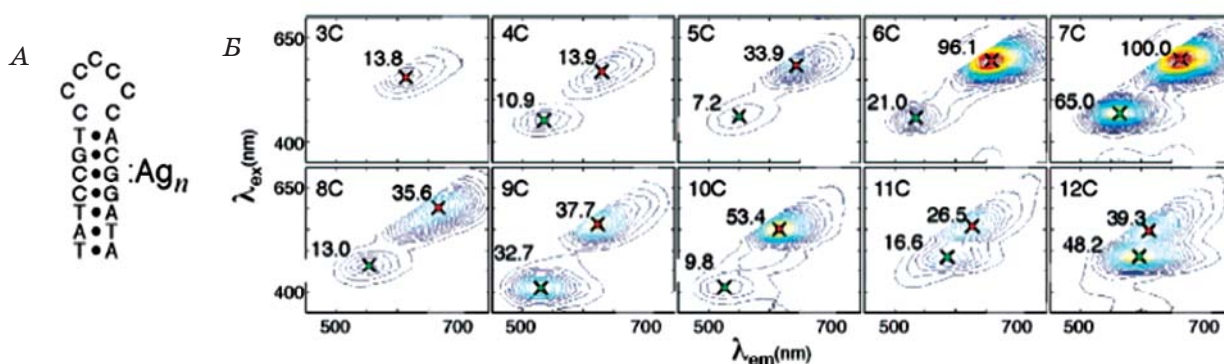


Рис. 4. Властивості кластерів, іммобілізованих на «голівках» ДНК-шпильок:

А — структура ДНК-шпильок типу 5'-ТАТССГТ-С_n-АССГГАТА-3' з різною величиною шпильок (-С_n-) з 3 < n < 12. Кластери срібла утворюються на одноланцюгових «голівках»; Б — двовимірні діаграми спектрів поглинання і флуоресценції для різних послідовностей ssДНК «голівки» різного розміру (С₃-С₁₂). «Зелені» і «червоні» максимуми позначено «Х» і зазначено їхню інтенсивність у відносних одиницях. Сірі смуги вказують на умови поглинання і випромінювання, де сигнал флуоресценції маскується світлорозсіянням [34]

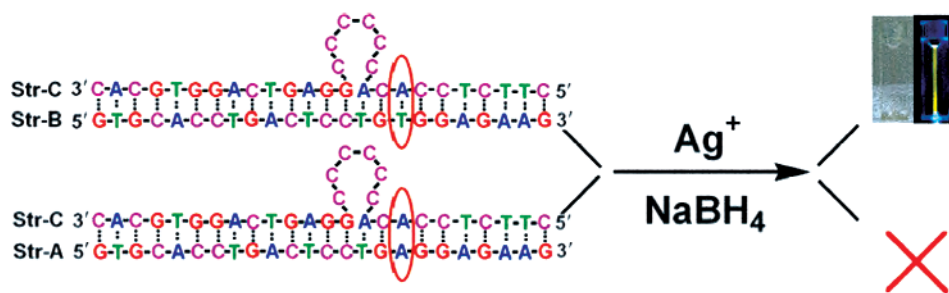


Рис. 5. Використання сенсорної ДНК з петлею оліго-С для гібридизації з аналізованою ДНК з метою пошуку мутантних форм.

Прикладом слугує мутація, що призводить до серпоподібно-клітинної анемії. Str-A — сегмент β-ланцюга гемоглобіну, Str B — його мутантної форми, а Str-C — сенсорний ДНК-сегмент, що гібридується з обома формами. Далі відбувається створення кластерів срібла на петлі оліго-С. У разі гібридизації з нормальною формою спостерігається інтенсивна флуоресценція, а з патологічною — ні [33]

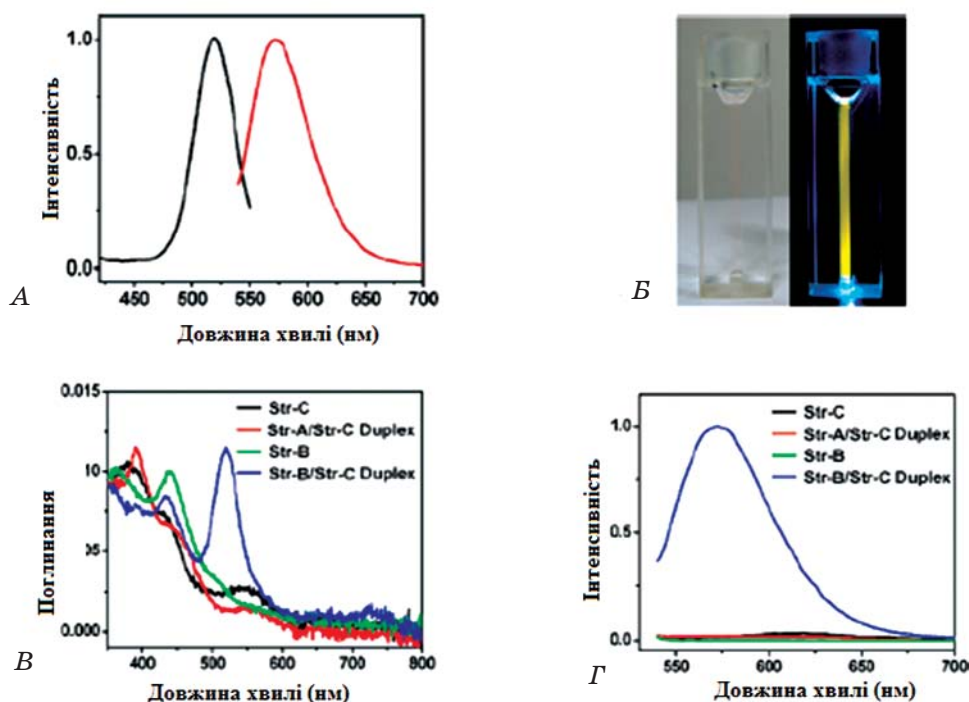


Рис. 6. Спектри збудження та флуоресценції кластерів срібла, утворених на гібридизованій структурі Str-B/Str-C (А). Фото цих флуоресцентних об'єктів (Б) і спектри поглинання (В) і флуоресценції (Г) за збудження 520 нм кластерів, синтезованих на Str-C (чорний), дуплексі Str-A/Str-C (червоний), Str-B (зелений) та дуплексі Str-B/Str-C (синій) [33]

Полімерні та дендримерні носії

Найбільш активний пошук носіїв для формування кластерів останнім часом здійснюється серед водорозчинних штучних полімерних молекул. Першими було описано флуоресцентні кластери, сформовані на ПАМAM-дендримерах (полімерах, де розгалужені гілки однакового розміру виходять з єдиного центра) з ОН-кінцевими групами. Для них характерний дуже широкий спектр флуоресценції — від 533 до 648 нм [14]. Різні полімерні композити, що утворюють

частинки (220 нм) мікрогелів [35] та молекулярні гідрогелі [22], сформовані полігліцеролом — блок-поліакриловою кислотою, вказують на необхідність наявності –COOH-груп для утворення кластерів. Під час фотохімічного відновлення тут утворюються кластери з випромінюванням у межах 600 нм.

Значно простіше та дешевше використовувати водні розчини широкодоступних полімерів, таких як поліметакрилова кислота [18]. За фотовідновлення при 365 нм тут утворюються кластери зі світінням при 620 нм з квантовим виходом 18,6%.

Пептидні та протеїнові матриці

Структури, що можуть бути створені лінійною комбінацією амінокислотних залишків у пептидах та протеїнах, і просторова організація останніх дають невичерпні можливості для створення матриць, які стабілізують кластери. У літературі існує багато даних про спорідненість деяких із цих залишків (зокрема проліну й метіоніну) до іонів срібла, проте досі не зрозуміло, чи існує залежність між зв'язуванням іонів та формуванням відновлених кластерів. Тому дослідники ідуть емпіричним шляхом, але результатів для певних узагальнень ще недостатньо.

Нещодавно було показано, що протеїн α -хімотрипсин може слугувати матрицею [29] під час хімічного відновлення іонів срібла. Даних про структуру та локалізацію цих кластерів у молекулі протеїну немає. Проте спостерігається їх інтенсивна емісія при 680 нм за збудження при 500 нм (рис. 7). Виявилося, що значний надлишок відновлювального реагента NaBH_4 відновлює дисульфідні зв'язки і призводить до часткової або повної денатурації. Однак його видалення шляхом діалізу відновлює ензимну активність зі збереженням інтенсивної флуоресценції.

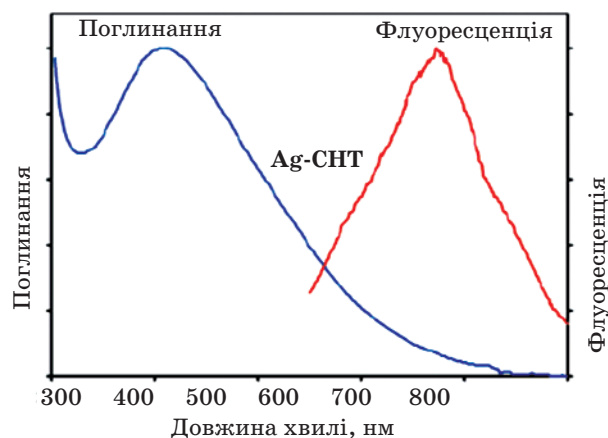


Рис. 7. Спектри поглинання і флуоресценції (збудження за 500 нм) кластерів Ag, сформованих у присутності молекул α -хімотрипсину. Використовували метод хімічного відновлення [29]

Дослідників цікавив ядерний протеїн нуклеолін, який має високу спорідненість до іонів срібла. Синтетичні пептиди, що подібні до фрагмента цього протеїну і мають у своїй структурі залишки цистеїну (С), глутамінової кислоти (Е), лізину (К) та аспарагінової кислоти (D), можуть бути ефективними матрицями [28], а за надлишку аргініну легко проникають у живі клітини.

Приготування кластерів у мікроемульсіях

Мікроскопічні краплинки води можна стабілізувати в гідрофобних розчинниках за допомогою детергентів. Вони можуть слугувати мікрореакторами для синтезу кластерів срібла. В одній з таких робіт детергентом був АОТ [синоніми: bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium salt, sulfosuccinic acid bis(2-ethylhexyl) ester sodium salt, docusate sodium], а відновлювальним агентом — гіпофосфіт натрію. При цьому утворюються кластери малого розміру — менше 10 атомів [36].

Стабілізація кластерів низькомолекулярними реагентами

Пошук низькомолекулярних стабілізаторів має на меті декілька завдань. По-перше, зробити кластери гомогенними за розмірами та композицією, що дозволило б уникнути гетерогенності в спектральних властивостях. По-друге, зменшити розмір наноконструкта, що часто складається з кількох кластерів на одній матриці, до одного стабілізованого кластера. По-третє, використовувати вільні реактивні групи стабілізатора з метою включення кластера в систему для сенсорики або ковалентного мічення різних субстратів. На момент написання цього огляду опубліковано повідомлення про декілька істотних розробок. Так, мезо-2,3-димеркаптосукцинат був використаний як відомий двовалентний SH-реагент для стабілізації хімічно відновлених (за допомогою NaBH_4) кластерів. Автори повідомили про синтез гомогенної популяції Ag_7 -кластерів [25]. В іншій роботі було синтезовано, зі стабілізацією меркаптосукцинатом, кластери Ag_7 і Ag_8 , що відрізнялися свіченням у синьо-зеленій та червоній ділянках спектра [37]. Використання ліпоєвої кислоти, що разом з іонами срібла відновлювалась NaBH_4 до дигідроліпоєвої кислоти, дало змогу створити і стабілізувати спектрально-гомогенні кластери невеликого розміру [38].

Вартим уваги є використання у процесі створення кластерів срібла фотохімічним відновленням барвника тіофлавіну Т [24]. Відомо, що багато гетероциклічних сполук, включаючи барвники, хелатують іони срібла. Проте невідомо, чи можуть вони бути матрицями для створення кластерів та стабілізувати їх.

Кластери срібла як молекулярні сенсори

Нещодавно було одержано перспективні результати [5, 38, 39] для кластерів срібла, стабілізованих молекулами дигідроліпоевої кислоти при детекції іонів ртуті (Hg^{2+}). Ці іони викликають селективне гасіння флуоресценції. Для концентрації кластерів 10^{-5} М ліміт детекції Hg^{2+} сягає таких низьких значень, як 10^{-10} М, а діапазон концентрацій, що визначаються, — 10^{-5} М. Причиною такого специфічного гасіння може бути включення Hg^{2+} в кластер срібла із перенесенням електрона з кластера на цей іон. Не виключається, однак, й утворення за участю іонів ртуті міжкластерних асоціатив.

Флуоресценція кластерів, сформованих на фрагментах ДНК, чутлива до їх взаємодії з іонами міді, причому спостерігається не гасіння, а навпаки, збільшення яскравості флуоресценції [6]. Виявляється висока се-

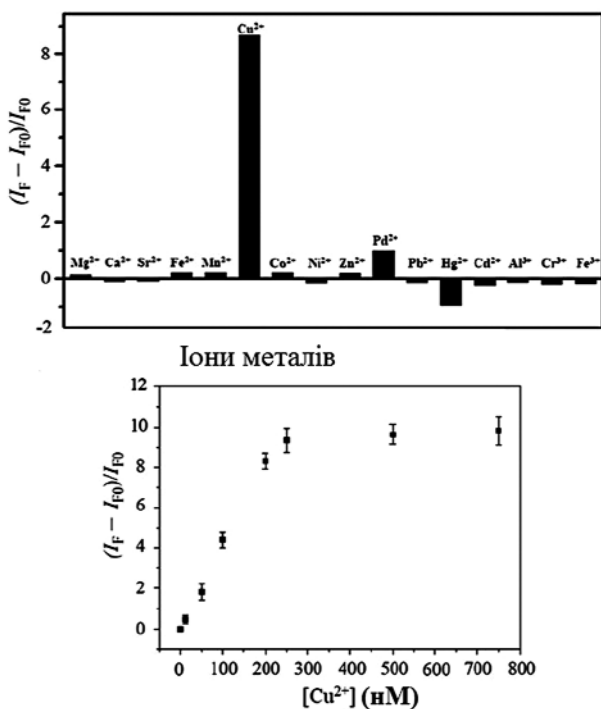


Рис. 8. Селективність та чутливість кластера DNA-Ag як сенсора на іони Cu^{2+} (а).

Концентрація іонів міді — 0,2 мМ, а кожного іншого іона металу — 10 мМ. Графік залежності відносного зростання флуоресценції від концентрації іонів міді (б) [6]

лективність до міді порівняно з іншими іонами. Ділянка детектування іонів Cu^{2+} — 10^{-8} – 10^{-6} М (рис. 8).

В іншому дослідженні [39] кластери срібла, сформовані на матриці поліметакрилової кислоти, реагують на присутність іонів Cu^{2+} в тому самому інтервалі концентрацій

гасінням флуоресценції. У цьому разі було показано, що зв'язування Cu^{2+} є оборотним. Гасіння флуоресценції цих кластерів відбувається також під впливом цистеїну, що може бути використано для визначення цієї метаболічно важливої амінокислоти [7] (рис. 9).

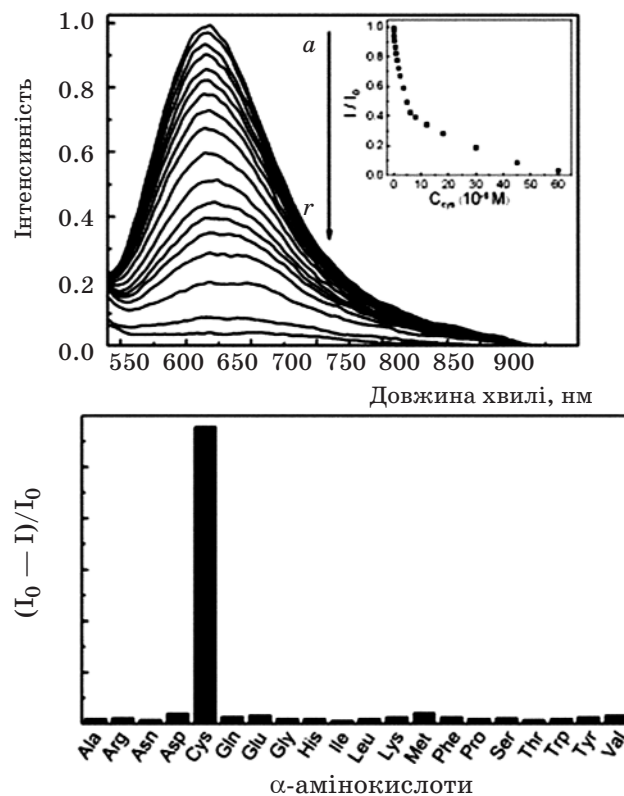


Рис. 9. Спектри флуоресценції кластерів ПМАА-Ag у присутності різних концентрацій цистеїну від 0 до $60 \cdot 10^{-6}$ М (а–г).

На вставці залежність інтенсивності флуоресценції при 615 нм від концентрації цистеїну. Знизу — відносна інтенсивність флуоресценції у присутності різних α -амінокислот [7]

Таким чином, у застосуванні кластерів атомів срібла в сенсорних технологіях робляться перші, але багатообіцяльні кроки. Найпростішим методом реєстрації сенсорної відповіді є інтенсивність флуоресценції, її зміни, що й було використано в цитованих роботах.

Застосування кластерів у клітинних дослідженнях

Кластери, сформовані на ДНК-матрицях, можуть бути ефективно використані у дослідженні клітини, чому сприяє високий квантовий вихід (до 30%) свічення в червоній ділянці спектра, де автофлуоресценція незначна [15, 16]. Так, оліго-С-кон'югат кластерів срібла, з'єднаний з авідином, дозволяє одержати зображення фіксованих

біотинізованих клітин, тимчасом як живі клітини захоплюють його за механізмом ендцитозу. Приєднання цих кон'югатів до гепаринсульфату замість авідину дає змогу спостерігати флуоресцентні ядра клітин [40].

Виявляється, інкубацією фіксованих клітин з іонами срібла можна досягти певної їх концентрації в клітині, а потім фотоопромінюванням створювати в ній флуоресцентні кластери. Для таких кластерів характерна флуоресценція в широкому діапазоні — від 500 до 700 нм [28]. Матрицею в цьому разі слугують невстановлені протеїни чи пептиди самих клітин.

Цікавим методичним прийомом може бути перенесення кластерів від однієї матриці до іншої. Це вкрай важливо під час мічення антигін, оскільки за хімічного відновлення їхні дисульфідні зв'язки, що стабілізують структуру, також відновлюються, і це призводить до денатурації. Тому було запропоновано кон'югати антигін з оліго-С мітити, інкубуючи з полімером, що містить вже створені кластери. Такий прийом дає можливість візуалізувати клітинні структури шляхом взаємодії з міченими антигінами [40, 41].

Хоча з часу перших робіт із синтезу кластерів срібла з декількох атомів у розчинах і демонстрації їх флуоресценції не минуло й 10 років, а ці кластери вже набули широ-

кого застосування. Їхні оптичні властивості схожі на ті, що спостерігаються для органічних барвників, оскільки в основі їх також є електронні переходи між квантовими енергетичними рівнями з енергіями, які відповідають поглинанню і випромінненню у видимій області спектра. Вони надто малі за розміром, мають високу яскравість випроміннення, не токсичні й фотостабільні. Їх настільки легко синтезувати, використовуючи різні фізичні та хімічні чинники для відновлення іонів срібла, що такий синтез можна легко здійснити навіть у шкільних кабінетах хімії. Необхідні для їх стабілізації матриці можуть бути різної природи, проте універсального рецепту для синтезу не існує, і дослідник мусить оптимізувати умови синтезу залежно від типу використовуваної матриці. Сенсорні технології на основі цих кластерів мають широку перспективу застосування, оскільки і положення спектрів, і їхня інтенсивність демонструють помітну залежність від молекулярного оточення, яке може слугувати основою для сенсорної відповіді. Специфіка утворення кластерів на певних матрицях може бути використана для селективного флуоресцентного мічення в біологічних системах, включаючи живі клітини. Перші успіхи надихають учених на подальші дослідження та розроблення цих систем.

ЛІТЕРАТУРА

1. Xu H., Suslick K. S. Water-soluble fluorescent silver nanoclusters // *Adv. Mater.* — 2010. — V. 22. — P. 1078–1082.
2. Diez I., Ras R. H. Few-Atom Silver Clusters as Fluorescent Reporters // A. P. Demchenko (ed.), *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II: Molecular Constructions, Polymers and Nanoparticles*, Springer Ser. Fluoresc. — 2010. — V. 9. — P. 307–332.
3. Vosch T., Antoku Y., Hsiang J. C. et al. Strongly emissive individual DNA-encapsulated Ag nanoclusters as single-molecule fluorophores // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2007. — V. 104. — P. 12616–1221.
4. Lee T. H., Gonzalez J. I., Zheng J., Dickson R. M. Single-molecule optoelectronics // *Acc. Chem. Res.* — 2005. — V. 38. — P. 534–541.
5. Guo W., Yuan J., Wang E. Oligonucleotide-stabilized Ag nanoclusters as novel fluorescence probes for the highly selective and sensitive detection of the Hg²⁺ ion // *Chem. Commun. (Camb).* — 2009. — P. 3395–3397.
6. Lan G. Y., Huang C. C., Chang H. T. Silver nanoclusters as fluorescent probes for selective and sensitive detection of copper ions // *Ibid.* — 2010. — V. 46. — P. 1257–1259.
7. Shang L., Dong S. Sensitive detection of cysteine based on fluorescent silver clusters // *Biosens. Bioelectron.* — 2009. — V. 24. — P. 1569–1573.
8. Antoku Y., Hotta J., Mizuno H. et al. Transfection of living HeLa cells with fluorescent poly-cytosine encapsulated Ag nanoclusters // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2010. — V. 9. — P. 716–721.
9. Lin C.-A. J., Lee C.-H., Hsieh J.-T. et al. Synthesis of fluorescent metallic nanoclusters toward biomedical application: Recent progress and present challenges // *J. Med. Biol. Eng.* — 2009. — V. 29. — P. 276–283.
10. Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes // *Chem. Rev.* — 2005. — V. 105. — P. 1025–1102.
11. Kreibitz U. Electronic properties of small silver particles. — Optical constants and their temperature dependence // *J. Phys. F. — Metal Phys.* — 1974. — V. 4. — P. 999–1014.

12. *Fedrigo S., Harbich W., Buttet J.* Optical response of Ag₂, Ag₃, Au₂ and Au₃ in argon matrices // *J. Chem. Phys.* — 1993. — V. 99. — P. 5712–5717.
13. *Conus F., Rodrigues V., Lecoultre S. et al.* Matrix effects on the optical response of silver nanoclusters // *Ibid.* — 2006. — V. 125. — P. 24511-1–24511-4.
14. *Zheng J., Dickson R. M.* Individual water-soluble dendrimer-encapsulated silver nanodot fluorescence // *J. Am. Chem. Soc.* — 2002. — V. 124. — P. 13982–13983.
15. *Richards C. I., Choi S., Hsiang J. C. et al.* Oligonucleotide-stabilized Ag nanocluster fluorophores // *Ibid.* — 2008. — V. 130. — P. 5038–5039.
16. *Sengupta B., Ritchie C. M., Buckman J. G. et al.* Base-directed formation of fluorescent silver clusters // *J. Phys. Chem. C.* — 2008. — V. 112. — P. 18776–18782.
17. *Petty J. T., Zheng J., Hud N. V., Dickson R. M.* DNA-templated Ag nanocluster formation // *J. Am. Chem. Soc.* — 2004. — V. 126. — P. 5207–5212.
18. *Diez I., Pusa M., Kulmala S. et al.* Color tunability and electrochemiluminescence of silver nanoclusters // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2009. — V. 48. — P. 2122–2125.
19. *Maretti L., Billone P. S., Liu Y., Scaiano J. C.* Facile photochemical synthesis and characterization of highly fluorescent silver nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* — 2009. — V. 131. — P. 13972–13980.
20. *Treguera M., Rocca F., Lelonga G. et al.* Fluorescent silver oligomeric clusters and colloidal particles // *Solid. State Sci.* — 2005. — V. 7. — P. 812–818.
21. *Xu H., Suslick K. S.* Sonochemical synthesis of highly fluorescent Ag nanoclusters // *ACS Nano.* — 2010. — V. 4. — P. 3209–3014.
22. *Shen Z., Duan H., Frey H.* Water-soluble fluorescent Ag nanoclusters obtained from multiarm star poly(acrylic acid) as «Molecular Hydrogel» templates // *Adv. Mat.* — 2007. — V. 19. — P. 349–352.
23. *Shang L., Dong S.* Facile preparation of water-soluble fluorescent silver nanoclusters using a polyelectrolyte template // *Chem. Commun. (Camb).* — 2008. — P. 1088–1090.
24. *Makarova N., Parfenov A., Baskakov I. V.* Water-soluble hybrid nanoclusters with extra bright and photostable emissions: a new tool for biological imaging // *Biophys. J.* — 2005. — V. 89. — P. 572–580.
25. *Wu Z., Lanni E., Chen W. et al.* High yield, large scale synthesis of thiolate-protected Ag₇ clusters // *J. Am. Chem. Soc.* — 2009. — V. 131. — P. 16672–16674.
26. *Cathcart N., Mistry P., Makra C. et al.* Chiral thiol-stabilized silver nanoclusters with well-resolved optical transitions synthesized by a facile etching procedure in aqueous solutions // *Langmuir.* — 2009. — V. 25. — P. 5840–5846.
27. *Adhikari B., Banerjee A.* Short-Peptide-Based Hydrogel: A Template for the In Situ Synthesis of Fluorescent Silver Nanoclusters by Using Sunlight // *Chemistry — A European Journal.* — 2010. — V. 16. — P. 13698–13705.
28. *Yu J., Patel S. A., Dickson R. M.* In vitro and intracellular production of peptide-encapsulated fluorescent silver nanoclusters // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2007. — V. 46. — P. 2028–2030.
29. *Narayanan S. S., Pal S. K.* Structural and functional characterization of luminescent silver-protein manobioconjugates // *J. Phys. Chem. C.* — 2008. — V. 112. — P. 4874–4879.
30. *Wilcoxon J. P., Abrams B. L.* Synthesis, structure and properties of metal nanoclusters // *Chem. Soc. Rev.* — 2006. — V. 35. — P. 1162–1194.
31. *Gwinn E. G., O'Neill P., Guerrero A. J. et al.* Sequence-dependent fluorescence of DNA-hosted silver nanoclusters // *Adv. Mater.* — 2008. — V. 20. — P. 279–283.
32. *Soto-Verdugo V., Metiu H., Gwinn E.* The properties of small Ag clusters bound to DNA bases // *J. Chem. Phys.* — V. 132. — 195102. (2010);doi:10.1063/1.34.19930 (10 pages).
33. *Guo W., Yuan J., Dong Q., Wang E.* Highly sequence-dependent formation of fluorescent silver nanoclusters in hybridized DNA duplexes for single nucleotide mutation identification // *J. Am. Chem. Soc.* — 2010. — V. 132. — P. 932–934.
34. *O'Neill P. R., Velazquez L. R., Dunn D. G. et al.* Hairpins with poly-C loops stabilize four types of fluorescent Ag:DNA // *J. Phys. Chem. C.* — 2009. — V. 113. — P. 4229–4233.
35. *Zhang J., Xu S., Kumacheva E.* Photogeneration of fluorescent silver nanoclusters in polymer microgels // *Adv. Mater.* — 2005. — V. 17. — P. 2336–2340.
36. *Ledo A., Martinez F., Lopez-Quintela M. A., Rivas J.* Synthesis of Ag clusters in microemulsions: a time-resolved UV-vis and fluorescence spectroscopy study // *Phys. B Condens. Matter.* — 2007. — V. 398. — P. 273–277.
37. *Rao T. U. B., Pradeep T.* Luminescent Ag₇ and Ag₈ clusters by interfacial synthesis // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2010. — V. 49. — P. 3925–3929.
38. *Adhikari B., Banerjee A.* Facile synthesis of water-soluble fluorescent silver nanoclusters and HgII sensing // *Chem. Mater.* — 2010. — V. 22. — P. 4364–4371.

39. Shang L., Dong S. Silver nanocluster-based fluorescent sensors for sensitive detection of Cu(II) // *J. Mater. Chem.* — 2008. — V. 18. — P. 4636–4640.
40. Yu J., Choi S., Dickson R. M. Shuttle-based fluorogenic silver-cluster biolabels // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2009. — V. 48. — P. 318–320.
41. Yu J., Choi S., Richards C. I. et al. Live cell surface labeling with fluorescent Ag nanocluster conjugates // *Photochem. Photobiol.* — 2008. — V. 84. — P. 1435–1439.

КЛАСТЕРЫ ИЗ НЕСКОЛЬКИХ АТОМОВ СЕРЕБРА ВО ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СЕНСОРНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ

*А. П. Демченко
М. И. Канюк*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

*E-mail: alexdem@ukr.net;
kanyukni@ukr.net*

Кластеры из нескольких атомов серебра имеют уникальные оптические свойства, позволяющие рассматривать их как эффективную замену органическим красителям в различных флуоресцентных сенсорных технологиях. Описаны их свойства и примеры использования, техника создания и стабилизации с помощью различных высокомолекулярных и низкомолекулярных матриц. В частности, очень простыми являются методы получения кластеров с применением химических восстановителей, а также восстановления под действием света.

Продемонстрировано применение кластеров серебра для мечения ДНК и создания ДНК-сенсоров на основе их гибридизации с последующим детектированием флуоресценции кластеров. Чрезвычайно быстро развиваются другие перспективные направления, в частности детектирование ионов и мечение живой клетки, как в плане фундаментальных исследований, так и учитывая широкие возможности практического применения.

Ключевые слова: флуоресценция, кластеры атомов серебра, сенсорные технологии.

CLUSTERS FROM A FEW SILVER ATOMS IN FLUORESCENT SENSORY TECHNOLOGIES

*O. P. Demchenko
M. I. Kanyuk*

Palladian Biochemistry Institute of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: alexdem@ukr.net;
kanyukni@ukr.net*

Clusters out of several silver atoms possess unique optical properties that allows considering them as efficient substitutes to organic dyes in different fluorescent sensor technologies. The properties of these clusters and examples of their applications, techniques of synthesis and stabilization in different macromolecular and low-molecular matrices were described. In particular, the methods of cluster obtaining with chemical reducing agents, as well as the recovery in response to light were very simple.

Application of silver clusters for DNA labeling and a DNA-sensors creating were demonstrated on the basis of their hybridization followed by cluster fluorescence detection. Other prospective areas of application developed extremely fast, including ion detection and living cell labeling, both in terms of basic research and in view of ample opportunities for practical application.

Key words: fluorescence, clusters of atoms of silver, sensory technologies.

ЗАКОНОМІРНОСТІ УТВОРЕННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ ІОНПРОВІДНИХ КАНАЛІВ ЦИТОЛІТИЧНИХ ПРОТЕЇНІВ ПРИ РЕКОНСТРУКЦІЇ У ШТУЧНИХ ЛІПІДНИХ БІШАРАХ

О. Я. ШАТУРСЬКИЙ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Особливу роль за патологій, які виникають унаслідок утворення цитолітичними протеїновими токсинами іонних каналів у плазматичній мембрані уражених клітин, відіграє пасивне транспортування каналами токсинів неорганічних іонів та органічних сполук, які беруть участь в обміні речовин або є важливими складовими клітини. Тому дослідження процесу утворення і функціонування іонних каналів цитолітичними токсинами є важливим для визначення будови каналного олігомера в плазматичній мембрані клітини-мішені та механізмів лізису клітини.

Цитолітична дія розглянутих у роботі протеїнових токсинів реалізується шляхом збільшення безпосереднього транспортування неорганічних іонів через нативні мембрани уражених клітин і вивільнення їхніх внутрішніх складових (протеїнів, органічних кислот тощо). Це пов'язано з утворенням токсинами іонпровідних олігомерів — каналів у ліпідному бішарі плазматичної мембрани. Реконструкція іонних каналів цитолітичних протеїнів у штучних бішарових ліпідних мембранах і ліпосомах дає можливість досліджувати їх утворення і функціонування, що важливо для визначення структури іонпровідного олігомера і механізму його токсичної дії для лікування токсичних уражень шляхом блокування струму іонів через канали токсинів. Основну увагу в огляді приділено обговоренню закономірностей утворення і властивостей нещодавно реконструйованих іонпровідних олігомерів нейро- і дерматоксичного β -токсину бактерії *Clostridium perfringens* та гемолітичних θ -токсину бактерії *Clostridium perfringens* і RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus*.

Ключові слова: бішарова ліпідна мембрана, іонні канали, β - і θ -токсин *Clostridium perfringens*, токсин RTX *Radianthus macrodactylus*.

Основну увагу в цьому огляді приділено визначенню структури і властивостей іонпровідних олігомерів цитолітичних β - і θ -токсинів *Clostridium perfringens* та RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus* [1] методом їх реконструкції у штучних ліпідних бішарах плоских бімолекулярних мембран (БЛМ) або ліпосом. Оскільки предметом досліджень є іонпровідні канали, які утворюються за олігомеризації непровідних мономерів цитотоксичних протеїнів у ліпідному бішарі, зазначений метод можна вважати типовим прикладом нанотехнології [2], призначеної для використання у фундаментальних біологічних дослідженнях класичної та медичної біохімії або біофізики.

Враховуючи те, що β -токсин бактерії *Clostridium perfringens* реалізує свій токсичний ефект, впливаючи на епітеліальні тканини та нервову систему хребетних, що призводить до появи некрозів [3, 4], підвищення кров'яного тиску, зниження ритму серцебиття, спастичних судом та раптової смерті жертви [5], а θ -токсин бактерії *Clostridium perfringens* є основним вірулентним чинником, який спричиняє гангрену [6], вибір зазначених об'єктів досліджень також видається досить актуальним для прикладного розділу біомедичних наук.

В останні 10-річчя для реконструкції дедалі ширше застосовують рекомбінантні форми цитолітичних токсинів, тому можна

вважати, що науковці, зокрема біохіміки, біофізики та молекулярні біологи, мають справу не лише з процесами, які відбуваються в просторових ділянках нанометрових розмірів, але й шляхом генетичного мутагенезу маніпулюють окремими атомами і молекулами для побудови іонпровідних структур із наперед заданими властивостями. Серед таких властивостей слід зазначити утворення олігомерних протеїнових структур з різними іонпровідними характеристиками в штучних ліпідних шарах завтовшки в дві молекули, що певною мірою відтворює реальні процеси в плазматичних мембранах уражених токсинами клітин.

Незважаючи на те, що технологію реконструкції іонних каналів у ліпідних бішарах було в основному впроваджено й модифіковано в 60–80-х роках ХХ ст., сучасні науковці дедалі частіше здійснюють дослідження каналів, які утворені окремими протеїнами в ході складних ліпідно-протеїнових взаємодій, адже ще й дотепер не з'ясовано низку ключових питань стосовно будови і функціонування окремих каналів. До них можна віднести питання про конформаційну перебудову розчиненого у водному середовищі протеїну в разі проникнення в ліпідний бішар мембрани та формування іонного каналу, структуру водної порожнини каналів, вплив різних природних і штучних чинників на утворення каналів та їхні іонпровідні властивості тощо. Окрім цього, використання БЛМ або ліпосом для реконструкції очищених каналоформерів дає змогу створювати особливі умови проведення наноекспериментів з окремим типом каналів, які не завжди є можливими під час роботи з біологічними мембранами, а саме: симетричність ліпідного складу і водно-сольового оточення по обидва боки ліпідного бішару, заданий склад мембрани, постійний мембранний потенціал, відсутність інших інтегральних протеїнів мембран тощо, чим досягається зменшення кількості неврахованих чинників впливу на об'єкти дослідження й індуковану ними провідність мембрани. Значення іонних каналів для біохімічних процесів, залежних від пасивного транспортування речовин *in vivo*, підтверджується порівняльним аналізом властивостей каналів у штучних ліпідних бішарах з безпосереднім транспортуванням речовин та зв'язаними з ним процесами на різних рівнях структурної організації живих організмів.

Загальні властивості RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus* та β - і θ -токсинів бактерії *Clostridium perfringens*

Токсин актинії RTX належить до високомолекулярних актинопоринів *Radianthus*, які виявляють цитолітичну активність. Показано, що мішенями для RTX та інших каналоформуєвальних цитотоксинів актинії є цитоплазматичні мембрани клітин еукаріотів [1]. Згідно з поділом на основі ліпідної специфічності та деяких фізико-хімічних властивостей RTX належить до групи цитолізінів актинії, які інгібуються сфінгомеліном (СМ). У даному разі гемолітична активність актинопоринів цієї групи інгібується преінкубацією з екзогенним СМ. RTX, подібно до інших актинопоринів із фракції отрути морської актинії з високою гемолітичною активністю є поліпептидом з молекулярною масою близько 20 кДа. Для амінокислотного складу RTX характерний високий вміст основних і гідрофобних амінокислот, тирозину, а також наявність чотирьох залишків триптофану, як і для більшості інших актинопоринів. Відсутність цистеїну в складі високомолекулярних *Radianthus*-цитолізінів вказує на їх належність до актинопоринів. Серед токсинів цієї групи тільки *Radianthus* RTX має N-кінцевий залишок аланіну, що зумовило наявність ще однієї назви (RTX-A) для цього токсину. Інші *Radianthus*-токсини з високою гемолітичною активністю, наприклад RTX-S або RTX-G, мали N-кінцеві залишки серину чи гліцину, відповідно [1]. Амінокислотні послідовності, визначені для вивчених *Radianthus*-актинопоринів, досить подібні. Ідентичність послідовностей RTX та іншого актинопорину RTX-S становить 89%, а з урахуванням консервативних замінів — 95%. Такий самий високий ступінь гомології було виявлено між послідовностями актинопоринів актинії *Radianthus macrodactylus*, *Hetaractis magnifica* і *Stichodactyla helianthus*, що можна пояснити належністю їх до однієї родини *Stichodactylidae*. Результати порівняльного аналізу стрічкових діаграм просторових структур різних актинопоринів також свідчать про високий ступінь їх подібності.

Показано, що молекула RTX складається з жорстко сформованого β -кору, утвореного за допомогою 12 антипаралельних ланцюжків β -складчастостей і двох коротких α -спіралей, розташованих на протилежних боках β -кору. На петлі, яка з'єднує 6-й і 7-й β -ланцюжки на C-кінцевій спіралі, розташована

ділянка, збагачена залишками триптофану і тирозину, що входить до складу сайту зв'язування актинопорину з мембраною. Основні розбіжності у візуалізованих просторових структурах актинопоринів можна побачити в частково спіралізованих N-кінцевих фрагментах молекул. Унікальний механізм токсичної дії актинопоринів, спрямований на руйнування мембран клітин-мішеней через процес утворення каналів, зумовлений специфічною комбінацією структурних елементів актинопоринів — N-кінцевої мелітиноподібної амфифільної α -спіралі та складки β -сендвіча з ароматичним кластером [1].

Слід зазначити, що до сьогодні процес утворення каналного олігомера актинопоринів, включно з RTX, остаточно не встановлено і тому невідомо, які саме фрагменти мономера токсину беруть участь у процесі олігомеризації. Не існує також одностайності серед дослідників стосовно кількості мономерів RTX, які формують каналний олігомер. Згідно з найбільш прийнятними даними у формуванні актинопоринового каналу беруть участь щонайменше чотири окремих мономери протеїну [1, 7].

Токсична дія актинопоринів базується на їхній мембранолітичній активності, в основі якої лежить здатність RTX та інших цитолізинів *Radianthus* до специфічного зв'язування з ліпідним матриксом мембран, унаслідок чого формуються потенціалзалежні катіонселективні іонні канали. Показано, що швидкість утворення RTX-каналів у мембрані залежить від присутності в її ліпідному складі СМ. Навіть дуже високі концентрації RTX та інших актинопоринів не спричиняють помітного збільшення проникності мембран, що не мають у своєму складі СМ, тоді як введення лише 5% СМ до складу мембран значно підсилює спроможність RTX до утворення каналів, а відтак й іонну проникність мембран. Існує багато різних припущень щодо специфічності впливу СМ на швидкість утворення каналів RTX та каналів інших актинопоринів, серед яких можна окремо виділити два напрями: особливий вплив СМ на плинність ліпідного бішару та специфічне протеїно-ліпідне розпізнавання у разі взаємодії RTX з СМ.

Вихід K^+ із ліпосом, модифікованих RTX, залежить від рН середовища. Збільшення виходу K^+ із ліпосом при рН вище 4 може бути пов'язано з протонуванням негативно заряджених карбоксильних груп у порожнині каналів RTX та нейтралізацією позитивно заряджених залишків лізину й аргініну, які також експоновані всередину

сформованої даним каналом водної порожнини.

Зв'язування RTX та інших високомолекулярних актинопоринів з мембраною незворотне, на відміну від низькомолекулярних цитолізинів *Radianthus*, взаємодія яких з мембраною має зворотний характер, а каналформувальна активність виявляється за концентрацій, у 100 раз вищих за діючі концентрації RTX та інших високомолекулярних актинопоринів [1].

Отвори каналів, які формує RTX в ліпідному бішарі штучних мембран та мембран еритроцитів, мають діаметр від 0,6 нм до 1,0 нм [8]. Серед інших фізіологічно важливих іонів такі канали є проникними переважно для K^+ та Na^+ . Варто зазначити, що окрім ліпідно-протеїнових взаємодій, які призводять до утворення RTX-каналів у мембранах, фармакологічна дія RTX та інших актинопоринів *Radianthus* може бути зумовлена протеїн-протеїновими взаємодіями цих токсинів з компонентами біологічних мембран і цитоскелета клітин-мішеней [1]. Можливо, загальний механізм формування каналного олігомера RTX, а також його структура неістотно відрізняються від описаного раніше для родини каналформувальних цитолізинів, до яких належить β -токсин бактерії *Clostridium perfringens* [9, 10], що робить RTX зручною моделлю для досліджень утворення і функціонування каналів у мембрані.

Відомо, що β -токсин є основним летальним фактором у штамів типу С, який вражає більшість сільськогосподарських тварин на початкових стадіях їхнього розвитку, хоча дорослі тварини також можуть бути інфіковані. Вважають, що β -токсин вражає кишечник молодих тварин на стадіях розвитку, коли його мікрофлора ще остаточно не сформувалась [5]. Порівняльним аналізом первинних структур β -токсину з іншими токсинами показано, що амінокислотна послідовність β -токсину виявляє 28% гомологічності з такою α -токсину *Staphylococcus aureus* [11]. Беручи до уваги високу ідентичність первинних структур цих токсинів, деякі дослідники вважають, що їхні мономери та олігомери також подібні між собою [3, 12]. Молекулярна маса мономера β -токсину становить 35–38 кДа [3, 13]. Функціональний олігомер β -токсину, утворений у мембранах культури клітин HL 60 має молекулярну масу 228 кДа і складається переважно із семи субодиниць, хоча може також існувати у формі гексамера (191 кДа) в рафтах клітинних мембран [3].

За допомогою кристалографічного аналізу було показано, що олігомер α -токсину складається із чотирьох доменів [10] і в поперечному перетині нагадує за формою гриб. Перший домен утворює «капельшок» гриба, складений із семи β -сендвічів та N-термінального регіону. Другий домен міститься в «ніжці» гриба, яка утворює трансмембранний іонний канал. Третій домен формує так званий обідок, який звисає з «капельшка» гриба і частково проникає у верхній шар бішарового ліпідного матриксу мембрани з позаклітинного боку. Четвертий домен утворений трикутним регіоном, через який відбувається зв'язування протомерів, з яких сформовано каналний олігомер протеїну. Відповідно до розташування консервативних амінокислотних послідовностей, характерних для α - та β -токсинів, β -токсин також має домени, тотожні за структурою і функціями з тими, що їх було описано для α -токсину [3].

Подібно до токсинів родини холестеролзалежних цитолізінів (ХЗЦ), до яких належить θ -токсин бактерії *Clostridium perfringens*, β -токсин також має тільки один цистеїновий залишок у позиції 265 [14], хоча, на відміну від θ -токсину, заміна цього залишку не впливала на активність β -токсину [15]. Більш того, послідовність амінокислот первинної структури β -токсину в проміжку між позиціями 255–276, де міститься цистеїн-265, гомологічна консервативній послідовності амінокислот α -токсину між залишками в позиціях 245–267, яка бере участь у зв'язуванні окремих протомерів α - і β -токсинів у олігомерну структуру [3]. Показано, що тирозин-266 та лейцин-268, які належать цій ділянці, також беруть участь у зв'язуванні β -токсину з рецептором. Рецептором β -токсину виступає тахікінін НК₁ [16]. Зв'язування β -токсину із цим рецептором може спричинити появу дерманекрозу дорзальної шкіри тварин.

Вважають, що основну роль в реалізації токсичності β -токсину, який ще недостатньо досліджений, відіграє його олігомерна структура [3, 12]. Олігомери β -токсину можуть утворюватися на нативних і штучних мембранах. Формування олігомерів β -токсину на мембранах клітин ендотелію ініціює вивільнення арахідонової кислоти та інозитулу [12].

Беручи до уваги те, що дотепер ще дуже мало відомо про механізм формування олігомерів β -токсину та взаємозв'язок між їх утворенням і біологічною активністю, можна припустити, що використання модельних систем

зі штучними ліпідними мембранами для вивчення олігомеризації і можливого утворення каналів та порівняльний аналіз цих результатів з тими, які вже наявні в літературі, може дати важливу інформацію про зв'язок летальної активності токсину з утворенням каналних олігомерів у мембранах клітин.

Попри те, що β -токсин і θ -токсин продукуються й виділяються назовні однією й тією самою бактерією *Clostridium perfringens* і належать до токсинів, здатних утворювати іонні канали у мембранах клітин-мішеней, їхня структура та механізм токсичної дії відрізняються. θ -токсин бактерії *Clostridium perfringens* належить до родини холестеролзалежних цитолізінів, які продукуються багатьма іншими грампозитивними патогенними бактеріями. Первинна структура ХЗЦ виявляє близько 40–70% гомологічності, що свідчить про високий ступінь ідентичності членів цієї родини токсинів. Виділені бактеріями назовні, ХЗЦ легко розчиняються у водних розчинах, де існують переважно у формі мономерів. Мономери ХЗЦ здатні швидко утворювати великі гомоолігомерні асоціати в матриксі ліпідного бішару клітин-мішеней та штучних мембран. Токсини родини ХЗЦ є першорядним об'єктом структурних досліджень, тому що їх вже досить повно охарактеризовано за допомогою біохімічних та молекулярнобіологічних методів. Однією з найважливіших причин такої уваги є те, що ХЗЦ виділяють таксономічно різні види бактерій, які можуть спричинити смертельні захворювання. Дотепер охарактеризовано близько 20 представників родини ХЗЦ [17]. Найбільш дослідженими з них є лістеріолізін О, суттєвий вірулентний фактор *Listeria monocytogenes*, який спричинює менінгіт і може призвести до передчасного припинення вагітності, θ -токсин, вірулентний фактор *Clostridium perfringens*, що зумовлює газову гангрену, та пневмолізін, основний вірулентний фактор *Streptococcus pneumoniae*, який може викликати пневмонію і менінгіт. Кожен із мономерів токсинів складається з одного поліпептидного ланцюжка з молекулярною масою від 50 кДа до 80 кДа. Високий ступінь гомологічності їхніх первинних структур дає підстави припустити, що всі ці протеїни мають дуже подібні тривимірні структури. θ -токсин *Clostridium perfringens* є високомолекулярним поліпептидом з молекулярною масою 53 кДа, який складається з 500 амінокислотних залишків [17]. За геометричною будовою θ -токсин є незвичайно видовженою молекулою

у вигляді палички. Мономер θ -токсину у водному розчині збагачений β -складчастими структурами. У складі мономера θ -токсину також є дев'ять α -спіралей. Загалом, молекула цього токсину складається із чотирьох доменів. Перший домен містить α - та β -структури; другий домен має чотири β -структури; третій домен, подібно до першого, складається з α -спіралей та β -складчастостей; четвертий домен складений у компактний сандвіч, який має тільки ланцюжки β -структур.

Відомо, що холестерол є високоспецифічним рецептором для θ -токсину та інших ХЗЦ ($K_{\text{дис}} = 10^{-9}$ М), дію якого пов'язують з концентруванням мономерів токсину навколо збагачених на холестерол ділянок мембран клітин-мішеней, що полегшує процес взаємодії мономерів та утворення каналного олігомера [18]. Це припущення підтверджується тим, що ступінь зв'язування мономерів та кількість їх в олігомерній структурі залежать від концентрації холестеролу в мембрані. Незважаючи на те, що дотепер серед дослідників існують протилежні точки зору щодо локалізації в молекулі θ -токсину сайту, відповідального за зв'язування з холестеролом, є досить переконливі докази того, що холестерол зв'язується зі збагаченою на триптофан консервативною послідовністю амінокислотних залишків четвертого домену. У четвертому домені θ -токсину також міститься єдиний на всю молекулу консервативний залишок цистеїну в позиції 459, заміна або хімічна модифікація якого викликає інактивацію токсину. Згідно з результатами досліджень кристалічної структури мономера θ -токсину, цистеїн-459 розташований між одним із β -стрендів та збагаченою триптофаном петлею, що належить до четвертого домену. Заміна або хімічна модифікація цистеїну-459 руйнує укладку щільно упакованих β -структур, серед яких він міститься, що призводить до зміни конформації петлі, збагаченої триптофаном. Такі зміни ведуть до втрати здатності цієї петлі взаємодіяти з холестеролом. Таким чином, мономер θ -токсину втрачає можливість зв'язуватись із холестеролом, що не дозволяє мономерам токсину концентруватись у збагачених на холестерол ділянках мембран та формувати каналний олігомер. Той факт, що залишок цистеїну та збагачена на триптофан С-термінальна послідовність є консервативними, свідчить про те, що аналогічні зміни відбуваються з усіма представниками родини ХЗЦ. Процес олігомеризації θ -токсину передувє лізису

клітин-мішеней і є його необхідною передумовою. Багато олігомерів різних ХЗЦ продукують подібні арко- та кільцеподібні структури, які близькі за розміром і кількістю субодиниць [18]. За результатами електронно-мікроскопічних досліджень було запропоновано унітарну модель каналу, утвореного різними ХЗЦ. Згідно з нею зовнішній діаметр вбудованого в мембрану олігомера лежить у межах від 30,0 нм до 45,0 нм залежно від кількості мономерів у структурі, яка може налічувати 40–50 одиниць. Товщина стінки олігомера становить близько 6,5 нм. Олігомер має два домени. Один із них — це компактний внутрішній домен, у якому один мономер формує контакти з відповідними ділянками іншого, а другий — видовжений зовнішній домен зі значно меншою кількістю контактів між еквівалентними ділянками сусідніх мономерів. Внутрішній домен повторюється кожні 2,4 нм уздовж внутрішньої стінки каналу. У поперечному розтині олігомер θ -токсину має форму гриба заввишки 9,0–10,0 нм. Ніжка гриба, до якої належить четвертий домен з холестеролзв'язувальними структурами, пронизує ліпідний матрикс бішару і функціонально відповідає за процес лізису клітин. Перший домен кожного мономера утворює контакт з аналогічним доменом сусіднього мономера назовні мембрани та, разом з другим і четвертим доменами, розташовується у циліндричній ніжці гриба, а третій домен розміщений у капелюшку [19]. Показано, що 50 мономерів θ -токсину утворюють гомоолігомерну іонпровідну структуру з радіусом отвору 15,0 нм [17, 18]. Таким чином, утворення каналів з великим розміром отвору в плазматичній мембрані клітин-мішеней, найімовірніше, є основною причиною токсичної дії всіх ХЗЦ.

Слід зазначити, що існують альтернативні припущення, згідно з якими θ -токсин формує отвори значно меншого внутрішнього діаметра — такого, як діаметр каналів, утворених полієновими антибіотиками амфотерицином В, ністатином і філіпіном, що становить близько 0,6–0,8 нм [19]. Беручи до уваги те, що на електронних мікрофотографіях олігомери θ -токсину та інших ХЗЦ окрім замкнених кільцевих структур також формують незамкнені аркоподібні утворення, можна припустити, що порожнини каналів θ -токсину відрізняються від водних порожнин на зразок щільного β -барильця, внутрішня поверхня якого з усіх боків вистелена ланцюжками β -складок протеїну. Натомість, порожниною каналу

θ -токсину може бути вузька щілина між β -складками, що пронизують клітинну мембрану, та молекулами матриксу її ліпідного бішару.

Механізми токсичної дії актинопорину RTX та бактеріальних β - і θ -токсинів *Clostridium perfringens*

Для цитолітичних токсинів, до яких належать токсин актинії *Radianthus macrodactylus*, а також β - і θ -токсини бактерії *Clostridium perfringens*, цитотоксична функція здійснюється переважно через зв'язування токсину з плазматичною мембраною клітин-мішеней і наступним формуванням трансмембранного каналного олігомера. Лізис клітинної мембрани і смерть клітини відбуваються завдяки протіканню іонів, води й інших фізіологічно важливих речовин всередину і назовні клітини через водні порожнини каналних олігомерів, які утворились у мембрані.

Основними мішенями для RTX є цитоплазматичні мембрани клітин евкаріотів. Найбільш специфічне зв'язування з RTX відбувається за присутності СМ у ліпідному шарі зовнішньої мембрани клітин-мішеней [1]. Згідно із сучасними поглядами на роль СМ у процесі взаємодії RTX з ліпідним бішаром мембран уведення цього ліпиду до складу мембран, які містять холестерол (що характерно для евкаріотів), має призводити до щільнішого упакування ліпідів і формування ліпідних мікродоменів, рафтів, що сприяють розділенню фаз у мембрані. Існує припущення, що утворені при цьому дефекти ліпідного бішару мембрани полегшують контакт токсину з ліпідом, унаслідок чого концентрація поліпептиду, необхідна для формування каналного олігомера, може знижуватися. Окрім цього, за допомогою калориметричних досліджень було показано, що й СМ також здатен до специфічного неопосередкованого зв'язування з молекулою RTX. В експериментах з модифікації тіней еритроцитів людини і собаки шляхом оброблення з RTX показано, що крім ліпідів цей токсин ще зв'язується з протеїновими компонентами еритроцитарної мембрани [20]. Залежна від процесу денатурації певних мембранних протеїнів форма кривих, які було одержано на калориметрі від препаратів тіней еритроцитів собак і людини, змінювалась після оброблення цих препаратів цитолізином RTX. Одним з протеїнів, для якого було визначено денатурацію, є актин, струк-

турний протеїн еритроцитарного цитоскелета. Можливо, локальні деформації ліпідного бішару, які мають місце в процесі утворення каналів RTX у мембранах еритроцитів, призводять до змін в організації їхнього ліпідного матриксу, в результаті чого відбувається порушення зв'язку актину з мембраною. Не виключено, що вбудовування RTX в еритроцитарну мембрану прискорює трансмембранну міграцію амінофосфоліпідів із внутрішнього шару в зовнішній, що також призводить до порушення зв'язку актину з мембраною. Це порушення та поява локальних дефектів у матриксі ліпідного бішару мембран є факторами, які доповнюють деструкцію мембран евкаріотів, зумовлену утворенням водних порожнин актинопорину, що є основою його токсичної дії. Згідно з результатами, одержаними на штучних і нативних мембранах, канал RTX має діаметр близько 0,6–1,0 нм [1, 8]. Вольт-амперна характеристика одиничного каналу в асиметричних умовах, за яких вхідний струм утворювали іони калію, а вихідний — іони натрію, має лінійний характер, що свідчить про близьку для K^+ і Na^+ селективність RTX-каналу.

Таким чином, після зв'язування RTX з біологічною мембраною утворюються довгоживучі іонпровідні канали, що призводить до зникнення градієнта K^+ на мембрані. Наслідком цього процесу є те, що червона кров'яна клітина-мішень втрачає потенціал спокою і стає проникною для гемоглобіну, і це стає причиною деструкції плазматичної мембрани.

θ -токсин бактерій *Clostridium perfringens* є іншим цитолізином, який також вражає клітини евкаріотів. Подібно до актинопоринів основою токсичної дії θ -токсину є формування каналів у плазматичній мембрані клітин-мішеней [17]. Слід зазначити, що холестерол, який виступає однією з основних характерних складових мембран евкаріотів, у випадку θ -токсину відіграє багатофункціональну роль. Окрім того, що цей ліпід визнано високоспецифічним рецептором для θ -токсину і всіх інших представників родини ХЗЦ, він ініціює олігомеризацію та вбудовування каналного олігомера в мембрану, а також стабілізує структуру трансмембранного каналу, сформованого токсином. Відомо, що всі ХЗЦ, до яких належить θ -токсин, мають схожі механізми токсичної дії. Після взаємодії з холестеролом, що міститься в плазмалемі клітин-мішеней, відбувається олігомеризація мономерів токсину з наступним вбудовуванням сформованого

на мембрані каналного олігомера в товщу матриксу її ліпідного бішару, супроводжуваним утворенням трансмембранного іонпровідного каналу, що призводить до ушкодження мембрани. Первинне зв'язування мономерів токсину з мембраною відбувається в збагачених на холестерол ділянках, що ініціює процес зближення протомерів і їх взаємодію з утворенням олігомерної структури на поверхні мембрани. Причому ступінь взаємодії мономерів токсину та розмір утвореного ними олігомера залежить від концентрації холестеролу в ліпідному бішарі мембрани [18, 19]. Отвори каналів θ -токсину та інших ХЗЦ мають діаметри, які перевищують 15 нм, що дозволяє широко використовувати ці токсини як мембрано-пермеалізуючі агенти для потреб клітинної біології [17].

Слід зазначити, що дотепер не існує одностайності серед дослідників стосовно структури водної порожнини каналу θ -токсину та її розмірів. За даними електронної мікроскопії внутрішній діаметр кільцеподібних структур, утворених олігомером θ -токсину в мембранах ліпосом, які містять холестерол, становить близько 20 нм [19], що підтверджується високою іонною провідністю одиничних каналів θ -токсину в плоских бішарових мембранах аналогічного ліпідного складу [21]. Натомість, діаметр провідних структур, утворених θ -токсином у мембранах фібробластів людини, не перевищує той, що його було визначено для каналів полієнових антибіотиків, амфотерицину В та ністатину, — 0,6–0,8 нм, що приблизно дорівнює розміру молекули сахарози [19]. Беручи до уваги явну розбіжність провідностей θ -токсинових каналів, визначену на нативних мембранах фібробластів і плоских бішарових мембранах, а також наявність незамкнених аркоподібних олігомерів, які виявляються разом з кільцевими на електронних мікрофотографіях, можна припустити, що окрім великих водних порожнин, утворених цим токсином, існує й інший тип іонпровідних структур, у яких трансмембранний струм іонів проходить через щілини в матриксі ліпідного бішару на межі ліпідів і β -складчастостей трансмембранного домену θ -токсину.

Цитотоксичний механізм β -токсину, який також продукує бактерія *Clostridium perfringens*, дотепер остаточно не визначено. Більш того, незрозуміло, чи β -токсин взагалі діє як цитолізін для всіх типів біологічних мембран, які він може модифікувати. До 2003 р. існувала лише одна публікація,

в якій висловлювалось припущення про те, що вплив β -токсину на клітини 407 кишечника хребетних може бути результатом його цитолітичної дії [12]. Деякі дослідники вважають, що така дія β -токсину насправді є результатом незначних домішок у його препараті й не пов'язана із самим токсином [5]. Думка про те, що β -токсин, подібно до цитолізину, здатен до каналотворення, висловлювались на підставі досить слабкої 10% -ї ідентичності його первинної структури з такою, що була визначена для α - і γ -гемолізіну та лейкоцидину із *Stafilococcus aureus* [10, 11].

Нещодавно було показано, що β -токсин зумовлює вивільнення арахідонової кислоти та інозитолу із клітин ендотелію людини, що супроводжується утворенням різного розміру отворів трансмембранних каналів у плазматичній мембрані клітин-мішеней [12]. Беручи до уваги невизначеність більшості дослідників щодо цитолітичної активності β -токсину, а також те, що із впливом β -токсину пов'язують некроз певних тканин людей і хребетних тварин, у пізніших роботах було досліджено дію токсину на культуру клітин HL 60 [3]. Виявилось, що β -токсин спричинює набрякання і лізис цих клітин. Оброблення клітин β -токсином призводило до витоку K^+ назовні, натомість іони Ca^{2+} , Na^+ і Cl^- надходили всередину клітин. Зазначені події досягали свого максимального розвитку перед лізисом плазмалеми. За допомогою інкубації клітин HL 60 з β -токсином було доведено утворення двох типів олігомерів — гептамеру і гексамеру — в ділянках плазматичних мембран, які задовольняли критеріям рафтів. Блокування зв'язування β -токсину з мембранними рафтами з використанням метил- β -циклодекстрану або холестеролоксидази унеможливило появу вхідного струму K^+ , індукованого β -токсином, і наступне розбухання та лізис зовнішньої мембрани клітин HL 60. Таким чином, зв'язування β -токсину з рафтами клітинних мембран і вбудовування його каналного олігомеру в плазматичну мембрану є необхідними умовами цитолітичної дії. Високоспецифічна взаємодія β -токсину з нативною мембраною відбувається опосередковано через механізм, в якому задіяний тахікініновий рецептор НК₁ [16]. Зважаючи на те, що вхідний потік Ca^{2+} всередину клітин-мішеней повністю блокувався молекулами поліетиленгліколю 600 і 1 000, було зроблено висновок, що діаметр отвору каналу, утвореного β -токсином у мембрані клітин HL 60, становить близько

1,3 нм. Показано, що з двох типів олігомерів, які β -токсин утворює в рафтах цих клітин, тільки гептамер здатен формувати функціональний іонний канал у біологічній мембрані [3].

Дослідження іонних каналів природних або рекомбінантних цитолітичних токсинів та їхньої можливої ролі у лізисі уражених токсинами клітин за допомогою реконструкції в штучних ліпідних бішарах

Оскільки дія всіх розглянутих в цьому огляді цитотоксинів може бути опосередкованою через утворення іонних каналів у плазматичних мембранах клітин-мішеней, для перевірки цього припущення і визначення впливу низки фізіологічно важливих чинників на вбудовування та функціонування іонпровідних каналів зазначених токсинів у ліпідному бішарі мембрани досліджували їхню взаємодію зі штучними ліпідними бішарами БЛМ і ліпосом. З огляду на те, що утворення катіонних каналів у ліпідному бішарі плазматичної мембрани є одним з необхідних етапів, які передують лізису враженої токсинами клітини, особливий інтерес становлять дослідження іонселективних властивостей каналів, реконструйованих у плоску бімолекулярну ліпідну мембрану, — БЛМ. Дослідження іонпровідних властивостей модифікованих токсинами БЛМ є простим та інформативним методом визначення утворення і властивостей різних іонпровідних протеїнових олігомерів. Для дослідження взаємодії плоского ліпідного бішару з очищеними каналоформерами часто використовують електронейтральні БЛМ, сформовані з розчину фосфатидилхоліну в суміші з холестеролом у співвідношенні 2:1, відповідно. Суміш ліпідів розчиняють у неполярному розчиннику, наприклад в декані або *n*-гептані, а потім наносять на отвір діаметром 0,18–0,6 мм у тefлоновому або делриновому стаканчику, розміщеному в комірці зі скла чи плексигласу. Окрім зазначеного типу БЛМ дослідники також використовують так звану «суху» БЛМ, сформовану із двох ліпідних моношарів по різні боки отвору стаканчика [22]. Для запобігання ефекту поляризації у водно-солевих розчинах провідність мембрани вимірюють хлоросрібними електродами, які занурені у водний розчин 2 М KCl з агаровими містками, розміщеними з різних боків БЛМ. Потенціал зовні тefлонового або делринового

стаканчика (цис-сторона) зазвичай задається відносно потенціалу внутрішнього об'єму (транс-сторона), який приймають рівним віртуальному 0 мВ (рис.).

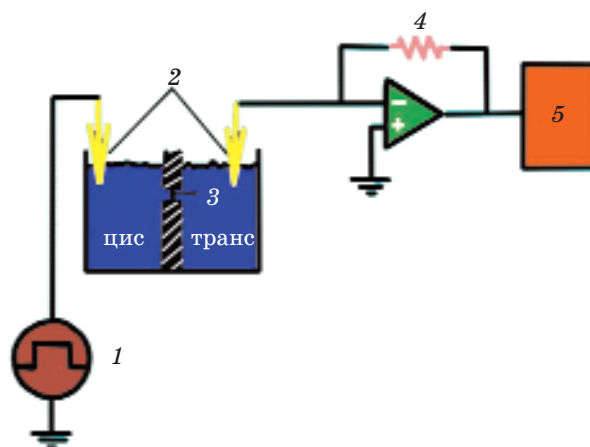


Рис. Схему експериментального приладу для визначення провідності плоских бішарових мембран, модифікованих каналоформувальними сполуками:

- 1 — джерело напруги;
- 2 — електроди;
- 3 — бішарова мембрана у водно-солевому розчині;
- 4 — прилад для електричних вимірів;
- 5 — самописець

Для досліджень будови зв'язаного з мембраною олігомера θ -токсину використовують також штучний бішар ліпосом, утворених обробленням ультразвуком або пропусканням суміші ліпідів через мембранні фільтри з певним розміром пор, що зумовлює уніфікований розмір отриманих на ньому ліпосом [18]. Враховуючи те, що в разі плоского бішару БЛМ або шароподібного замкнутого бішару ліпосом молекули цитолітичних протеїнів вбудовуються і потім функціонують у нанопросторі ліпідного бішару, можна вважати, що модифіковані олігомерами цитолітичних токсинів ліпосоми, як і БЛМ, є об'єктами порівняльних методів досліджень.

Хоча більшість досліджень гемолітичного RTX-токсину проводили на препаратах токсину, ізольованих із гомогенату тканин актинії *Radianthus macrodactylus* [1, 7], у випадках β - і θ -токсинів бактерії *Clostridium perfringens* досить часто дослідники послуговуються рекомбінантними формами цих протеїнів. Так, у роботах [23–25] рекомбінантні β - і θ -токсини бактерії *Clostridium perfringens* отримували експресією в електрокомпетентних клітинах бактерії *Escherichia coli*. Для цього у разі досліджень будови

зв'язаного з мембраною олігомеру θ -токсину ген його безцистеїнового похідного, в якому цистеїн-459 було замінено на аланін, клонували у вектор експресії pTrcHisA (Invitrogen, США) з використанням сайтів BamHI та EcoRI. Похідні θ -токсину, у яких методом точкового мутагенезу досліджувану амінокислоту заміняли на цистеїн, мітили флуоресцентним барвником йодоацетамід-N,N'-диметил-N-(йодоацетил)-N'-(7-нітробенз-2-оксо-1,3-діазоліл)етилендіамін — NBD (Molecular probes, Eugene, США), який утворював ковалентні зв'язки з цистеїном. Якщо після вбудовування в бішар ліпосом замінена на цистеїн амінокислота міченого барвником мутанта θ -токсину містилась поза ліпідним оточенням, флуоресценція барвника знижувалась під дією молекул водно-сольового оточення мембрани. У протилежному разі, коли досліджувана амінокислота була в товщі бішару, флуоресценція, навпаки, збільшувалась. Таким чином, метод точкового мутагенезу давав змогу визначати структурні перетворення певних ділянок розчиненого у водному середовищі мономера рекомбінантного θ -токсину під час взаємодії з ліпідним бішаром мембрани ліпосом.

Ще одним прикладом поєднаного використання точкового мутагенезу і БЛМ було розглянуте в роботі дослідження іонпровідних властивостей рекомбінантного β -токсину бактерії *Clostridium perfringens*, для якого зменшення здатності до каналотворення після заміни залишку аргініну-212 на аспартат супроводжувалось значним збільшенням LD^{50} , визначеної на мишах. У цьому разі поєднання двох наукових методів дослідження допомогло дійти висновку про тісний зв'язок іонпровідної спроможності досліджуваного протеїну з його токсичністю [25].

Вбудовування іонних каналів цитолітичних токсинів у ліпідний бішар і фактори впливу на каналотворення

Окрім важливого значення для подальших досліджень будови і функцій каналу, факт реконструкції є також досить інформативним сам по собі. Так, уперше проведена реконструкція каналів RTX-токсину актинії *Radianthus macrodactylus* та β -токсину бактерії *Clostridium perfringens* у БЛМ довела здатність цих токсинів до утворення іонних каналів у ліпідному бішарі плазматичних мембран і дозволила припустити, що утворення каналів може бути причиною токсичної дії цих протеїнів [8, 25]. Це припущення

дістало подальше підтвердження у вже розглянутому вище випадку з реконструкцією рекомбінантного β -токсину в БЛМ, для якого заміна аргініну 212 на аспартат в гені β -токсину зумовила значне підвищення LD^{50} рекомбінантного токсину в мишей і майже позбавляла його здатності формувати канал [25]. Таким чином, хімічний склад β -токсину є важливим чинником впливу на його каналотворення і токсичну дію.

Збіг форми найбільшого піку провідностей гістограми одиничних каналів θ -токсину *Clostridium perfringens* з формою піку на денситометричній трасі розподілу його олігомерів, одержаних на SDS-агарозному гелі, дає підстави вважати, що іонпровідним є саме олігомер токсину, а не розчинені у воді мономери або невеликі олігомери на зразок димерів [18]. Причому, з огляду на те, що олігомер θ -токсину *Clostridium perfringens* збільшував провідність БЛМ стрибкоподібно, а не поступово, було зроблено висновок, що олігомеризація цього токсину на поверхні мембрани передуює вбудовуванню готового олігомеру через всю товщу бішару, яке супроводжується появою мембранного струму.

Виходячи з одержаних результатів можна стверджувати, що двовалентні катіони значно прискорюють підвищення трансмембранного струму переважно через збільшення швидкості вбудовування в БЛМ каналів, утворених RTX- та β -токсинами [8, 25]. Оскільки іонпровідні структури цих токсинів утворені олігомерами, можна припустити, що двовалентні катіони сприяють змінам структури непровідних мономерів, які полегшують процес утворення четвертинної структури в ліпідному бішарі мембрани. Також можливо, що двовалентні катіони здатні індукувати або підсилювати розділення фаз у ліпідному бішарі. При цьому зростає кількість динамічних дефектів, чим може полегшуватися вбудовування протеїну в мембрану. Враховуючи отримані на БЛМ дані, активуючим впливом двовалентних катіонів на утворення каналів можна пояснити сприяння вивільненню арахідонової кислоти з клітин HUVEC, яке відбувалось під впливом β -токсину в середовищі з Ca^{2+} [12], та активацію двовалентними катіонами гемолізу еритроцитів токсином RTX [25].

Ще одним чинником істотного впливу на швидкість утворення RTX-каналів є наявність сфінгомеліну (СМ) у ліпідному складі бішару. Оскільки відомо, що мембрани, які містять СМ, характеризуються вираженим

розділенням фаз, то вважають, що в основі дії двовалентних катіонів і СМ на вбудовування RTX у мембрану лежать подібні процеси [8].

Іншим фактором, який впливав як на швидкість вбудовування поодиноких каналів цитолітичних токсинів, так і на їхню провідність, був мембранний потенціал. β -Токсин значно інтенсивніше вбудовувався в мембрану за негативного потенціалу [25], що може свідчити про існування в трансмембранному домені цього протеїну негативно зарядженої іоногенної групи, яка стимулює процес залежного від потенціалу утворення каналів.

Ріст провідності БЛМ, індукованої утворенням каналів RTX, відбувається незалежно від знака потенціалу, хоча кількість каналів, вбудованих в БЛМ за одиницю часу, збільшувалась зі зниженням абсолютної величини потенціалу [8].

Молекулярний механізм вбудовування в бішарову мембрану і формування каналу для θ -токсину бактерії *Clostridium perfringens* досить детально було показано на ліпосомах [17]. Для безпосереднього визначення оточення, в якому міститься та чи інша амінокислота у зв'язаному з мембраною олігомері цього токсину, залишок досліджуваної амінокислоти було заміщено на цистеїн і ковалентно модифіковано, щоб з'єднати сульфгідрильну групу цистеїну з флуоресцентним барвником NBD [23]. Такий підхід вимагав безцистеїнового мутанта θ -токсину. Тому в таких роботах використовували рекомбінантний протеїн — безцистеїнове похідне, у якому єдиний природний цистеїн-459 замінено на аланін, що не спричинило змін у функціональному стані протеїну. NBD було вибрано як флуоресцентний зонд тому, що інтенсивність його емісії і тривалість життя суттєво зростає в переходом з водного оточення в гідрофобне середовище ліпідного бішару. Після порівняння інтенсивності флуоресценції зв'язаних з мембраною і мічених NBD мутантів θ -токсину і їхніх водорозчинних мономерів було виявлено палітру значень інтенсивності, які узгоджуються з розгортанням α -спіралі ділянки у проміжку між залишками 288 і 311 в амфіпатичну β -шпильку в матриксі ліпідного бішару мембрани холестеролвмісних ліпосом [24]. Отримані результати дають підстави вважати, що амінокислоти зазначеної ділянки утворюють у мембрані амфіпатичну β -складчастість, один бік якої повернутий у водне середовище порожнини каналу, а другий — у ліпідний бішар. Більш

того, ці результати збігалися з результатами аналогічних експериментів, проведених раніше з іншою ділянкою θ -токсину між серином-190 і аспарагіном-217 [23], що свідчить про участь обох цих ділянок у процесі утворення трансмембранних шпильок. Отже, мономер θ -токсину розгортає дві пари α -спіралей у дві пари β -складок при вбудовуванні в ліпідний бішар мембрани, на відміну від відомих дотепер каналоформувань токсинів інших родин, у трансмембранному домені яких міститься лише одна пара амфіпатичних α -спіралей [26] або одна β -шпилька [27]. Оскільки основні властивості, характерні для амфіпатичної β -шпильки, є консервативними у всіх ХЗЦ зі встановленою первинною структурою, вірогідно, що наявність двох β -шпильок, що пронизують бішар мембрани, буде показано для усіх представників цієї родини токсинів.

Іонпровідні властивості цитотоксинових каналів і чинники, які на них впливають

Відомо, що механізм дії багатьох каналоформувань токсинів залежить від іонпровідних властивостей каналів, утворених цими токсинами в плазматичній мембрані клітин-мішеней. Тому наступним етапом досліджень цитолітичних токсинів після вбудовування було визначення іонпровідних властивостей утворених в ліпідному бішарі каналів під дією різних факторів середовища і штучних чинників впливу. Для з'ясування ролі токсинів каналів у біохімічних процесах, які відбуваються на різних рівнях структурної організації враженого токсином організму, особливу увагу приділяли впливу змін хімічного складу токсинів, що досліджувалось за допомогою рекомбінантних форм токсинів на модифікованих токсинами біологічних і штучних мембранах та тваринах.

Дослідження залежності провідності каналів RTX-токсину від температури навколишнього водно-сольового середовища показали, що енергія активації провідності каналів RTX у БЛМ, оточеній розчином 100 мМ KCl, практично не залежала від співвідношення компонентів мембрани і були близькі до такої для провідності каналів α -латроінсектотоксину із отрути каракурта [28, 29]. Останній факт може свідчити про схожі розміри отворів каналів, утворених RTX та α -латроінсектотоксином в БЛМ, що дістало подальше підтвердження при визначенні

впливу коркових блокаторів метонієвого ряду та новітнього блокатора пасивного транспортування іонів — хлориду 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(β-гідроксіетил)гіазолію (ДМГТ) [28].

Безпосереднє транспортування іонів каналами RTX- та β-токсину залежало від мембранного потенціалу та іонного складу середовища навколо модифікованого токсинами БЛМ. Гемолітичний токсин актинії RTX утворював у мембрані катіонні канали, переважно селективні до K^+ та Na^+ , що може мати наслідком збільшення пасивного транспортування цих іонів через плазматичні мембрани еритроцитів у разі вбудовування RTX-каналів [8]. Деякі дослідники вважають, що вихід іонів калію з еритроцитів каналами RTX-токсину спричинює значне збільшення осмотичного тиску на плазматичну мембрану ураженої клітини, що призводить до її розриву і є основною причиною індукованого RTX гемолізу [1].

Безпосереднє транспортування іонів β-токсिनними каналами також є вибіркоким тільки для одновалентних катіонів (Na^+ , K^+), що може спровокувати незворотну деполяризацію збудливої мембрани автономних і периферичних нервово-м'язових сполучень хребетних після утворення в них каналів β-токсину. Як і в разі з RTX-токсином, утворення β-токсिनних каналів у плазматичній мембрані клітин культури HL 60 також збільшувало трансмембранні потоки K^+ і Na^+ і призводило до набрякання та лізису клітини, що може бути причиною некротичного ентериту у свійських тварин [3].

Той факт, що на відміну від RTX та низки інших токсинів β-токсिनний канал можна було заблокувати лише іонами цинку [25], свідчить про певну відмінність структури катіонселективного сайту цього каналу від інших.

Окрім цього, причиною певних розбіжностей вибіркової до іонних блокаторів і провідності токсинних каналів у БЛМ можуть бути різні геометричні розміри їхніх водних порожнин. Тому важливу роль відігравали дослідження впливу різних молекул неелектролітів (поліетиленгліколі, сахароза тощо) на провідність каналів цитолітичних токсинів з метою визначення і порівняння розміру отворів іонпровідних олігомерів у мембрані.

Препарати β-токсину утворювали в БЛМ два основних піки провідності — при 110 і 60 пСм [25]. Було показано, що пасивне транспортування K^+ через пори β-токсинних каналів з провідністю 110 і 60 пСм най-

краще блокувалось молекулами поліетиленгліколів з приблизними гідродинамічними радіусами 1,27 і 1,11 нм [25] відповідно або, згідно з іншими джерелами, 1,3 і 1,6 нм [3]. Це свідчить про утворення двох типів каналних олігомерів (гепта- і гексамерів), характерних для цитолітичних токсинів на зразок α-гемолізину. Причому, лише більший за розміром гептамер з молекулярною масою 228 кДа вбудовується в ліпідний бішар клітин внутрішнього епітелію хребетних HL 60, тоді як менший за молекулярною масою і, ймовірно, розміром отвору каналу гексамер (191 кДа) не функціональний через те, що залишається в ліпідному рафті клітини [3]. Варто зазначити, що досить великі розміри отворів обох олігомерів β-токсину дозволяють відбуватись не лише деполяризації плазматичної мембрани вражених клітин завдяки безпосередньому транспортуванню іонів (K^+ , Na^+), але також і вивільненню з них вторинних посередників арахідонової кислоти та інозитулу, що може впливати на зміну внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} і внаслідок цього на нервову передачу в автономній і периферійній нервових системах хребетних [5, 25]. Серед симптомів враження β-токсином нервової системи хребетних, що пов'язані з деполяризацією нервових тканин або дефіцитом інозитулу, — раптові передсмертні скорочення м'язів у мишей, зміна артеріального тиску і ритму серцебиття. Окрім цього, нестача арахідонової кислоти та інозитулу, що в зміненому вигляді входять до складу фосфоліпідів клітинної мембрани, порушує обмін ліпідів і може спричинити порушення цілісності епітеліальних клітин, викликаючи появу різних некрозів.

Радіус вхідного отвору каналу RTX було визначено шляхом аплікації блокаторів метонієвого ряду на індукований токсинном трансмембранний потік K^+ . Оскільки з усього ряду використаних алкіламоніїв тетрабутиламоній з радіусом молекули 0,55 нм був найефективнішим, можна вважати, що внутрішній радіус каналу RTX такий самий [8]. Паралельно проведене визначення розмірів отвору α-латроінсектотоксिनного каналу (0,53 нм) [28] підтвердило зроблене раніше припущення про те, що іони калію долають однаковий активаційний бар'єр у порожнинах каналів α-латроінсектотоксину і RTX через подібний розмір їхнього внутрішнього діаметра. З огляду на розмір молекули гемоглобіну ефективний радіус отвору каналу, здатного забезпечити вихід гемоглобіну з еритроцита через внутрішню порож-

нину каналу, має бути не меншим, ніж 3,35 нм [8], що набагато перевищує визначений розмір отвору каналу RTX. Дані про розмір отвору каналу RTX підтверджують гіпотезу про те, що спричинений RTX лізис еритроцитів, найімовірніше, пов'язаний з осмотичним шоком внаслідок виходу K^+ із враженої клітини [1] або руйнуванням плазматичної мембрани в результаті вбудовування багатьох каналів [8], що також порушує цитоскелет клітини [1].

Натомість, іонні канали ще одного гемолітичного протеїну — θ -токсину бактерії *Clostridium perfringens* утворювали в плоскій фосфоліпідній мембрані з холестеролом майже не вибірккові одиничні канали дуже високої провідності — 4–6 нСм [18, 21], що свідчить про великий розмір їхніх отворів. Останнє припущення підтверджувалось даними електронної мікроскопії, згідно з якими радіус внутрішнього отвору кільцеподібної гомоолігомерної іонпровідної структури становить приблизно 15 нм [17, 18]. Той факт, що каналний олігомер θ -токсину складений з багатьох (50) мономерів, також свідчить про утворення цим токсином іонних каналів з великим розміром отвору, який згідно з даними [17, 18] у 5 разів більший за розмір молекули гемоглобіну. Імо-

вірно, значний розмір отвору θ -токсिनного каналу і є основною причиною його цитолітичної дії. Останнє припущення підтверджується тим, що цей протеїн може значно ефективніше за гемолітичні токсини з меншим розміром отворів каналу руйнувати еритроцити, спричинюючи порушення кровообігу, внаслідок чого швидше утворюються глибокі некротичні зміни уражених тканин, які можуть стати причиною хірургічного втручання [17].

Таким чином, реконструкція або відтворення процесів побудови і функціонування іонних каналів природного токсину RTX активності *Radianthus macrodactylus* та рекомбінантних, генетично змінених шляхом внесення точкових мутацій, β - і θ -токсинів бактерії *Clostridium perfringens* дала можливість визначити механізми утворення цими протеїнами каналів у ліпідному бішарі мембрани, їхню структуру та можливу роль у процесах, що зумовлюють лізис клітин або впливають на нервово-м'язову передачу. Окрім цього, реконструкція іонних каналів цитолітичних токсинів, є важливим етапом, що необхідний для створення засобів лікування токсичних уражень шляхом блокування струму іонів через канали токсинів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Монастырская М. М. Исследование структуры и мембранолитического действия пороформирующих токсинов актиний: Автореф. дис. докт. хим. наук.: 02. 00. 10 / Тихоокеанский ин-т биоорг. химии, Владивосток, 2006. — 51 с.
2. Хартманн У. Очарование нанотехнологии. — Бином: Лаборатория знаний, 2010. — 173 с.
3. Nagahama M., Hayashi S., Shinsuke M. et al. Biological activities and pore-formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells // J. Biol. Chem. — 2003. — V. 278, N 38. — P. 36934–36941.
4. Vidal J. E., McClane B. A., Saputo J. et al. Effects of *Clostridium perfringens* Beta-Toxin on the Rabbit Small Intestine and Colon // Infect. Immun. — 2008. — V. 76. — P. 4396–4404.
5. Tweten R. K. *Clostridium perfringens* beta toxin and *Clostridium septicum* alpha toxin: their mechanisms and possible role in pathogenesis // Veterinary Microbiology. — 2001. — V. 82. — P. 1–9.
6. Flanagan J. J., Tweten R. K., Johnson A. E., Heuck A. P. Cholesterol Exposure at the Membrane Surface Is Necessary and Sufficient to Trigger Perfringolysin O Binding // Biochemistry. — 2009. — V. 48, N 18. — P. 3977–3987.
7. Клышко Е. В., Ильина А. П., Лихацкая Г. Н. Актинопорины: структура и функция // Вестник ДВО РАН. — 2004. — № 3. — С. 45–53.
8. Чантурия А. Н., Шатурский О. Я., Лушкова В. К. и др. Взаимодействие токсина морской актинии *Radianthus macrodactylus* с бислойными фосфолипидными мембранами // Биол. мембраны. — 1990. — Т. 7. — С. 763–769.
9. Anderluh G., Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (*Anthozoa: Actiniaria*) // Toxicon. — 2002. — V. 40, N 2. — P. 111–124.
10. Gouaux E. alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins // J. Struct. Biol. — 1998. — V. 121, N 2. — P. 110–122.
11. Hunter E. S., Brown J. E., Oyston P. C. F. et al. Molecular genetics analysis of beta-toxin

- of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus* // *Infect. Immun.* — 1993. — V. 61, N 9. — P. 3958–3965.
12. *Steinthorsdottir V., Halldorsson H., Andersson O. S.* *Clostridium perfringens* beta-toxin forms multimeric transmembrane pores in human endothelial cells // *Microb. Pathog.* — 2000. — V. 28. — P. 45–50.
 13. *Carvalho A. V. A., Heneine L. G. D., Assis R. A. et al.* Production and purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C // *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* — 2006. — V. 58, N 2. — P. 276–278.
 14. *Hunter E. S., Brown J. E., Oyston P. C. F. et al.* Molecular genetics analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus* // *Infect. Immun.* — 1993. — V. 61, N 9. — P. 3958–3965.
 15. *Steinthorsdottir V., Fridriksdottir V., Gunnarsson E. et al.* Site-directed mutagenesis of *Clostridium perfringens* beta-toxin — expression of wild type and mutant toxins in *Bacillus subtilis* // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1998. — V. 158. — P. 17–23.
 16. *Nagahama M., Morimitsu S., Kihara A. et al.* Involvement of tachykinin receptors in *Clostridium perfringens* beta-toxin-induced plasma extravasation // *Br. J. Pharmacol.* — 2003. — V. 138. — P. 23–30.
 17. *Tweten R. K.* Cholesterol-dependent cytolysins, a family of a versatile pore — forming toxins // *Infect Immun.* — 2005. — V. 73, N 10. — P. 6199–6209.
 18. *Shepard L. A., Shatursky O., Johnson A. E. et al.* The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane β -hairpins // *Biochemistry.* — 2000. — V. 39. — P. 10284–10293.
 19. *Rossjohn J., Feil S. C., McKinstry W. J. et al.* Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form // *Cell.* — 1997. — V. 89, N 5. — P. 685–692.
 20. *Monastyrnaya M. M., Kozlovskaya E. P., Elyakov G. B.* Hemolysins from sea anemones: investigation of mechanism of action // *J. Toxicol.* — 1990. — V. 9, N 1. — P. 82.
 21. *Menestrina G., Bashford C. L., Pasternak C. A.* Pore-forming toxins: experiments with *S. aureus* alpha-toxin, *C. perfringens* theta-toxin and *E. coli* haemolysin in lipid bilayers, liposomes and intact cells // *Toxicon.* — 1990. — V. 28, N 5. — P. 477–491.
 22. *Ide T., Ichikawa T.* A novel method for artificial lipid-bilayer formation // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2005. — V. 21, N 4. — P. 672–677.
 23. *Rossjohn J., Shepard L. A., Heuck A. P. et al.* Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an alpha-helical to beta-sheet transition identified by fluorescence spectroscopy // *Biochemistry.* — 1998. — V. 37, N 41. — P. 14563–14574.
 24. *Shatursky O. Ya., Heuck A. P., Shepard L. A. et al.* The mechanism of membrane insertion for a thiol-activated cytolysin: a new paradigm for pore-forming toxins // *Cell.* — 1999. — V. 99. — P. 293–299.
 25. *Shatursky O. Ya., Bayles R., Rogers M. et al.* *Clostridium perfringens* beta-toxin forms potential-dependent, cation-selective channels in lipid bilayers // *Infect. Immun.* — 2000. — V. 68, N 10. — P. 5546–5551.
 26. *Oh K. J., Zhan H., Cui C. et al.* Organization of diphtheria toxin T domain in bilayers: a site-directed spin labeling study // *Science.* — 1996. — V. 273, N 5276. — P. 810–812.
 27. *Benson E. L., Huynh P. D., Finkelstein A. et al.* Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel // *Biochemistry.* — 1998. — V. 37, N 11. — P. 3941–3948.
 28. *Shatursky O. Ya., Volkova T. M., Romanenko O. V., Grishin E. V.* Vitamin B₁ thiazole derivative reduces transmembrane current through ionic channels formed by toxins from black widow spider venom and sea anemone in planar phospholipids membranes // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2007. — V. 1768. — P. 207–217.
 29. *Shatursky O. Ya., Pashkov V. N., Bulgacov O. V., Grishin E. V.* Interaction of α -latroinsectotoxin from *Latrodectus mactans* venom with bilayer lipid membranes // *Ibid.* — 1995. — V. 1233. — P. 14–20.

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ
И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
ИОНПРОВОДЯЩИХ КАНАЛОВ
ЦИТОЛИТИЧЕСКИХ ПРОТЕИНОВ
ПРИ РЕКОНСТРУКЦИИ
В ИСКУССТВЕННЫХ
ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ**

О. Я. Шатурский

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Особую роль при патологиях, возникающих вследствие образования цитолитическими токсинами протеинов ионных каналов в плазматической мембране пораженных клеток, играет пассивная транспортировка каналами токсинов неорганических ионов и органических соединений, которые принимают участие в обмене веществ или являются важными составляющими клетки. Поэтому исследование процесса образования и функционирования ионных каналов цитолитическими токсинами является важным для определения строения канального олигомера в плазматической мембране клетки-мишени и механизмов лизиса клетки.

Цитолитическое действие рассмотренных в работе протеиновых токсинов осуществляется путем увеличения непосредственной транспортировки неорганических ионов через нативные мембраны пораженных клеток и высвобождения их внутренних компонентов (протеинов, органических кислот и т. п.). Это связано с образованием токсинами ионпроводящих олигомеров — каналов в липидном бислое плазматической мембраны. Реконструкция ионных каналов цитолитических протеинов в искусственных бислоидных липидных мембранах и липосомах дает возможность исследовать их образование и функционирование, что важно для определения структуры ионпроводящего олигомера и механизма его токсического действия с целью лечения токсических поражений путем блокирования тока ионов через каналы токсинов. Основное внимание в обзоре уделено обсуждению закономерностей образования и свойств сравнительно недавно реконструированных ионпроводящих олигомеров нейро- и дерматоксичного β -токсина бактерии *Clostridium perfringens*, а также гемолитических θ -токсина бактерии *Clostridium perfringens* и RTX-токсина *Radianthus macrodactylus*.

Ключевые слова: бислоидная липидная мембрана, ионные каналы, β - и θ -токсины *Clostridium perfringens*, RTX-токсин *Radianthus macrodactylus*.

**CHANNEL FORMATION
AND FUNCTIONING REGULARITIES
FOR CYTOTOXIC PORE-FORMING
PROTEINS UNDER RECONSTRUCTION
INTO ARTIFICIAL LIPID BILAYERS**

O. Ya. Shatursky

Palladian Institute of Biochemistry
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: olegshatursky@biochem.kiev.ua

Passive transporting of inorganic ions and organic compounds, that take part in metabolism or are the important cell constituents plays a special role in pathologies resulting from cytotoxic proteins channel creation into a target cells plasma membrane. Therefore, research of cytotoxic proteins channel creation and functioning is important for determination of a channel oligomer structure in a target cells plasma membrane and the mechanisms of cell destruction.

Cytolytic effect of protein toxins reviewed is carried out via direct transporting increase of inorganic ions through the native membranes of the target cells and release of their interior components (toxic protein channels). It is associated with formation of ion-conducting oligomers — channels in lipid bilayer of plasma membrane — by toxins. These pore-forming proteins reconstruction into bilayer lipid membranes and liposomes allows to research their channel formation and functioning that provides a possibility to investigate the cytolytic protein pore structure and action mode aiming cells lysis prevention via blocking of ionic current across toxin channels. Most of the review is focused on regularity of creation and properties for relatively recent reconstructed ion-conductive oligomers of neuro- and dermatotoxic β -toxin from bacteria *Clostridium perfringens*, another haemolytic θ -toxin of *Clostridium perfringens* and actoporine RTX of *Radianthus macrodactylus*.

Key words: bilayer lipid membrane, ion channel, *Clostridium perfringens* β - and θ -toxin, *Radianthus macrodactylus* RTX toxin.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

УДК 577.113.4:546.28:546.212

ГИДРАТНЫЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА И ДНК

В. В. Туров¹
В. Н. Барвинченко¹
Т. В. Крупская¹
В. М. Гунько¹
В. Ф. Чехун²

¹Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
НАН Украины, Киев

²Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев

E-mail: v_turov@ukr.net

Кремнеземы широко используют в биомедицине не только в качестве сопутствующих веществ, придающих лекарственным формам требуемые физико-химические свойства, но и как самостоятельное лекарственное средство с выраженным детоксицирующим эффектом, хорошо зарекомендовавшее себя при лечении пищевых отравлений, бактериальных заражений и раневых инфекций.

Создана наноконструктивная система на основе высокодисперсного кремнезема, модифицированного адсорбированной ДНК. Свойства композита изучены методами ЯМР-спектроскопии, термогравиметрии, ИК-спектроскопии. Проведены биометрические исследования композита SiO₂-ДНК на суспензию клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, что наноконструктив обладает достаточной биоактивностью, поскольку может существенно ускорять процессы жизнедеятельности хлебопекарских дрожжей. Детально изучены гидратация композита SiO₂-ДНК и влияние на нее среды органических растворителей. Обнаружено несколько форм межфазной воды, в том числе и слабоассоциированной, которая практически не образует водородных связей с соседними молекулами. Показано, что при варьировании температуры или введении в систему органических веществ происходят взаимопревращения между разными формами межфазной воды. Высказано предположение, что именно слабоассоциированная форма воды может быть ответственна за биосовместимость с клетками.

Ключевые слова: наноконструктив кремнезем-ДНК, гидратация, сильно- и слабоассоциированная вода, суспензия клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

Кремнеземы широко используют в биомедицинских целях не только в качестве сопутствующих веществ, придающих лекарственным формам требуемые физико-химические свойства, но и как самостоятельное лекарственное средство с выраженным детоксицирующим эффектом, хорошо зарекомендовавшее себя при лечении пищевых отравлений, бактериальных заражений и раневых инфекций [1–3]. В последние годы разрабатываются технологии использования пористых кремнеземов как средств направленной доставки лекарственных препаратов, предполагающие создание в плочных образцах кремнезема наноразмерных каналов, в которые может быть внедрен лекарственный препарат [4–6]. В дальнейшем благодаря диффузионным процессам или физическому воздействию (электрофо-

рез) препарат перемещается в контактирующую с пленкой ткань или биологическую жидкость. Для той же цели можно использовать также сильно гидратированные полимерные и биополимерные молекулы [7]. Весьма перспективными материалами для направленной доставки фармпрепаратов могут стать композиты, созданные на основе нанокремнезема, модифицированного адсорбированной ДНК. Хотя сама ДНК плохо растворяется в воде, ее молекулы легко формируют гелевую (или микрогелевую) структуру, связывающую большое количество воды. Адсорбционное закрепление полимера на поверхности кремнезема может осуществляться механохимической активацией смеси твердых частиц полимера и SiO₂ в присутствии некоторого количества воды или органического растворителя [8, 9]. При

этом высокая механическая нагрузка позволяет равномерно распределять полимер по поверхности кремнеземной матрицы, создавая большую площадь контакта поверхности субстрата с внешней средой, а его многоцентровое связывание с поверхностью обеспечивает стабильность композита в течение длительного времени. Фармакологические свойства композита будут во многом определяться строением водно-органических смесей на его поверхности.

Ранее, при определении состояния воды в порошках твердой ДНК методом низкотемпературной ^1H ЯМР-спектроскопии [10–12], было показано, что вода, адсорбированная молекулами ДНК, находится в кластерном состоянии, причем одновременно могут наблюдаться несколько типов кластеров, отвечающих воде с разной ассоциированностью (принимающей участие в формировании разных типов водородно-связанных комплексов). Состояние воды существенно изменяется с варьированием температуры и в присутствии органической среды. При этом основными типами межфазной воды в ДНК следует считать ее слабоассоциированные формы (WAW, молекулы которой либо вообще не образуют водородных связей, либо участвуют в формировании малых кластеров, содержащих 2–4 молекулы [10]), сильноассоциированную воду (SAW, каждая молекула которой участвует в формировании не менее двух водородных связей), и воду, взаимодействующую с электронодонорными центрами молекул ДНК или органической среды (ASW). Целью настоящей работы было исследование гидратных свойств нанокompозита, созданного на основе высокодисперсного кремнезема и ДНК в среде органических растворителей. Предполагалось, что такие композитные материалы могут быть использованы для селективного связывания биологически активных веществ в разбавленных растворах и биосредах, а также в качестве носителя лекарственных препаратов.

Материалы и методы

В качестве минеральной составляющей нанокompозита был выбран высокодисперсный кремнезем (ВДК, Аэросил А-300, с удельной поверхностью $300 \text{ м}^2/\text{г}$, Калушского опытно-экспериментального завода Института химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины). Для приготовления нанокompозита препарат лиофилизированной ДНК, выделенной из молок лососевых рыб (Sigma), перемешивали с порошком ВДК, добавляя

фиксированное количество воды, и подвергали механохимической активации в течение 20 мин. После этого полученный композит сушили при $60 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. На рис. 1 приведены микрофотографии порошка и водной суспензии нанокompозита, где видно, что его частицы представляют собой агломераты микронного размера.

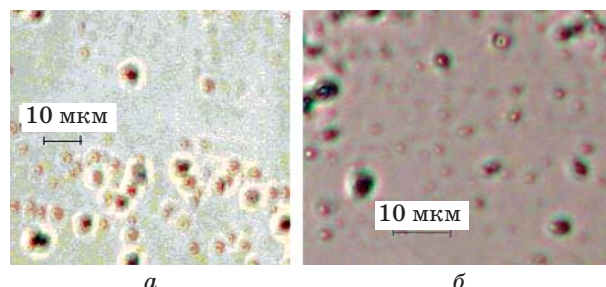


Рис. 1. Микрофотографии порошка нанокompозита SiO_2 -ДНК (а) и его водной суспензии (б)

В качестве органической среды использовали дейтерированные растворители — CDCl_3 , C_6D_6 , CD_3CN , а также смеси CDCl_3 и C_6D_6 с дейтерированными формами ацетонитрила, ДМСО и пиридина. Дейтерированные аналоги растворителей были выбраны с целью предотвращения появления в спектрах ^1H ЯМР интенсивных сигналов жидких органических веществ.

Спектры ЯМР снимали на ЯМР-спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц. Температуру регулировали с точностью $\pm 1 \text{ К}$, используя термopриставку Bruker VT-1000. Для предотвращения переохлаждения суспензий спектры ^1H ЯМР незамерзающей воды записывали при нагревании суспензий, предварительно охлажденных до температуры 210 К.

Способ определения характеристик межфазных слоев воды с помощью ^1H ЯМР-спектроскопии подробно изложен в [10–12]. Он базируется на влиянии межфазной границы на температуру фазового перехода вода–лед. Благодаря адсорбционным взаимодействиям температура замерзания воды на границах раздела понижена. Свободная энергия льда с понижением температуры изменяется по линейному закону [13]:

$$\Delta G = -0,036(273 - T). \quad (1)$$

Площадь, ограниченная кривой $\Delta G(C_{uw})$ [$C_{uw}(T)$ — температурная зависимость концентрации незамерзшей воды], определяет величину межфазной энергии (γ_s), которая равна модулю суммарного понижения свободной энергии воды, обусловленного присутствием границы раздела фаз:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (2)$$

где C_{uw}^{\max} — общее количество незамерзающей воды при $T = 273 \text{ }^\circ\text{K}$.

На зависимостях $\Delta G(C_{uw})$ обычно могут быть выделены участки, относящиеся к слабосвязанной (WBW) и сильносвязанной (SBW) воде. При этом под WBW понимают ту часть незамерзающей воды, свободная энергия которой лишь немного понижена ($-\Delta G \leq 0,5-0,8 \text{ кДж/моль}$) в результате адсорбционных взаимодействий, и замерзает она при $T > 250-260 \text{ K}$. SBW ($-\Delta G > 0,8 \text{ кДж/моль}$) может не замерзать даже при сильном охлаждении суспензии [10, 12]. Количественные (C_{uw}^s и C_{uw}^w для SBW и WBW, соответственно) и энергетические (ΔG^s и ΔG^w) характеристики слоев связанной воды могут быть получены экстраполяцией соответствующих участков зависимостей к осям абсцисс и ординат.

Процесс замерзания воды во внутриклеточных полостях или карманах в макромолекулах может быть описан уравнением Гиббса–Томсона [10, 14]:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R} = \frac{k}{R}, \quad (3)$$

где $T_m(R)$ — температура плавления льда, локализованного в порах (пустотах) радиусом R , $T_{m,\infty}$ — температура плавления объемного льда, ρ — плотность твердой фазы, σ_{sl} — энергия взаимодействия твердого тела с жидкостью (посредством водородных связей), ΔH_f — объемная энтальпия плавления, k — константа. Это уравнение может быть использовано для расчета распределений по размерам пор (заполненных связанной водой пустот) на основе зависимостей $C_{uw}(T)$. Зависимость $\Delta G(C_{uw})$ можно преобразовать в распределение незамерзающей воды по изменением свободной энергии Гиббса $\Delta C_{uw}(\Delta G)$, где ΔC_{uw} — инкрементальная функция температуры.

Поскольку время поперечной релаксации протонов в твердых телах, к которым относятся биополимерные молекулы ДНК, лед и ВДК на несколько порядков меньше, чем для жидкостей или воды, физически адсорбированной на нанокompозите [15], в спектрах ^1H ЯМР могут регистрироваться исключительно сигналы протонов молекул адсорбированной воды.

Для исследования биоактивности полученного нанокompозита использовали сухие хлебопекарские дрожжи *Saccharomyces*

cerevisiae (производства ЗАО «Энзим», Украина), которые культивировали в 17%-м растворе сахарозы при $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Активность суспензии дрожжевых клеток определяли по кинетике выделения углекислого газа в процессе их брожения при фиксированном содержании питательных веществ [16]. Выделившийся углекислый газ определяли количественно. В начале опыта колбу со средой, дрожжами и затвором взвешивали на технических весах с точностью до $0,01 \text{ г}$. Далее реакцию колбу взвешивали периодически, что позволяло определять массу выделившегося углекислого газа за определенный промежуток времени. Достоверность полученных результатов обеспечивалась повторением измерений и статистическим вычислением среднего значения.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 приведены результаты термogravиметрических исследований нанокompозита ДНК– SiO_2 , снятые на дериватографе марки Q-1500D (Венгрия) в воздушной среде при скорости нагрева 10 градус/мин . Показаны (а) кривые относительного изменения массы от температуры (ТГ), производная от изменения массы по температуре, dm/dT (ДТГ) и характеризующая поглощение или выделение тепла исследуемым образцом (ДТА). При этом рост кривой ДТА свидетельствует об эндо-, а уменьшение — об экзотермических эффектах, происходящих в процессе термолиза. Показаны (б) зависимость этих величин от времени нагрева, потеря массы относительно массы исходной навески (в). На кривой потери массы (ТГ) регистрируется перегиб в области $120 \text{ }^\circ\text{C}$, который отвечает удалению физически адсорбированной воды. При этом потеря массы составляет 3% мас. Полная потеря массы образцом нанокompозита при нагреве его до $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ составляет 8,1% мас. Следовательно, количество остаточной воды в образце было 3% мас, а содержание полимерной составляющей в композите — 6,1% мас.

При создании минерально-полимерных композитов с помощью механохимической активации возможна адсорбция полимера на поверхности, которая происходит с участием активных центров поверхности кремнезема, либо образование механической смеси, характеризующейся присутствием в ней слабо связанных между собой частиц кремнезема и ДНК. С целью определения взаимодействия компонентов в композитной системе

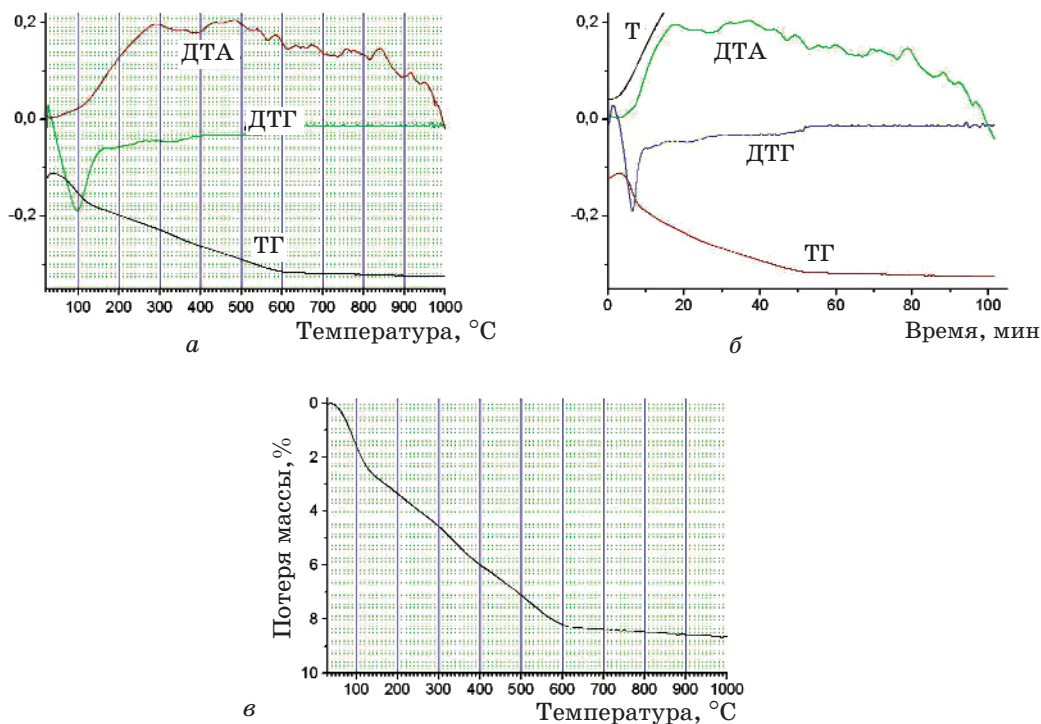


Рис. 2. Результаты термогравиметрических исследований нанокompозита, приготовленного на основе ВДК и ДНК:

- а — кривые относительного изменения массы от температуры (ТГ), dm/dT (ДТГ) и направления теплового потока (ДТА);
- б — их зависимость от времени нагрева;
- в — кривая потери массы относительно исходной навески

были проведены ИК-спектроскопические исследования (однолучевой Фурье-спектрометр фирмы Thermo Nicolet Nexus FT-IR, Германия, таблетки в виде пресованных порошков с КВг при соотношении компонентов 1 : 5). Их основой служили измерения изменения интенсивности полосы остаточных гидроксильных групп кремнезема ($\nu = 3750 \text{ см}^{-1}$) до и после механохимической активации.

На рис. 3 представлены результаты исследования исходного кремнезема, порошка ДНК и нанокompозита SiO_2 -ДНК, содержащего 6% мас ДНК. Подробное отнесение полос в ИК-спектрах ДНК приведено в [17]. Поглощение в области частот, отвечающее $3800\text{--}2200 \text{ см}^{-1}$, относится преимущественно к поглощению молекул свободной и связанной воды. На его фоне видны слабоинтенсивные полосы, обусловленные CH_3 , CH_2 , CH , NH_2 и NH - группами дезоксирибозы и оснований. Наиболее интенсивные из них 3350 , 2210 и 2280 см^{-1} относятся к NH_2 и NH - группам оснований. В области спектра, отвечающей $1750\text{--}1250 \text{ см}^{-1}$, находится большая группа интенсивных полос валентных колебаний сопряженных связей азотистых гетероциклов, экзоциклических $\text{C}\text{--}\text{O}$ - связей

и деформационных колебаний NH_2 и NH - групп оснований. В области $1250\text{--}1090 \text{ см}^{-1}$ наблюдается выраженная группа полос колебаний сахарофосфатного остова. Две наиболее интенсивные из них — 1230 см^{-1} и 1090 см^{-1} — могут быть отнесены к антисимметричному и симметричному валентным колебаниям $\text{O}_2\text{P}\text{--}\text{O}_3$.

Сигнал силанольных групп, не участвующих в образовании водородных связей (с молекулами воды или другими активными центрами), наблюдается в виде узкой характеристической полосы с $\nu = 3750 \text{ см}^{-1}$ [18, 19]. Интенсивность этой полосы в нанокompозите существенно меньше, чем в исходном кремнеземе. Если учесть, что полимерная составляющая в композите составляет всего 6,1 % мас, в то время как для полного покрытия полимера разных типов поверхности нанокремнезема А-300 обычно требуется на порядок больше полимера [10], можно сделать вывод, что большая часть присутствующей в образце ДНК распределяется по поверхности кремнезема таким образом, что ее электронодонорные группы формируют водородно-связанные комплексы с силанольными группами. Это обеспечивает высокую энергию связывания биополимера с поверхностью и формирование стабильного композита SiO_2 -ДНК.

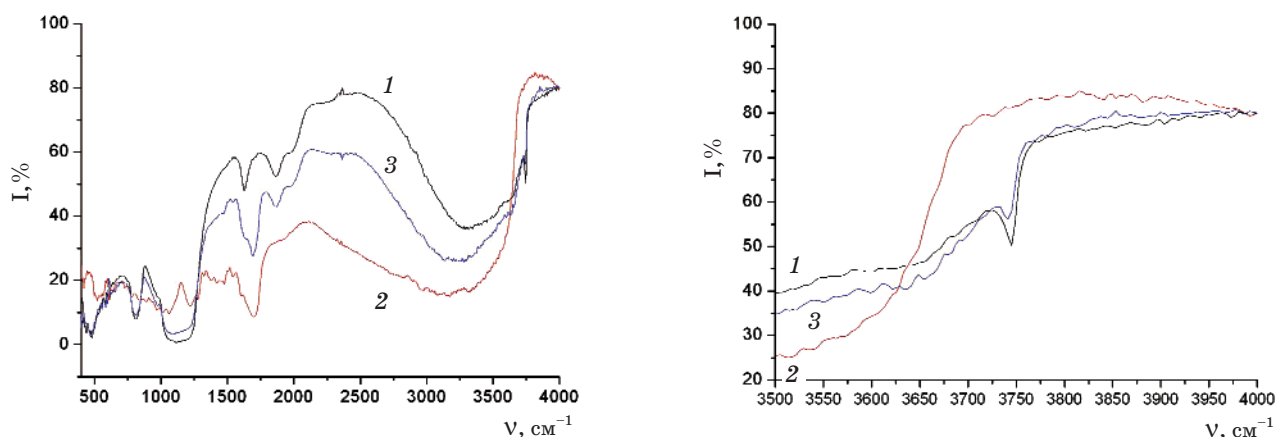


Рис. 3. ИК-спектры исходного кремнезема (1), порошка ДНК (2) и нанокompозита SiO₂-ДНК (3), снятые в таблетках с KBr при соотношении компонентов 1:5

На рис. 4 приведены снятые при разных температурах спектры ¹H ЯМР воды, связанной синтезированным нанокompозитом, содержащим 50% мас (а) и 3% мас воды в среде дейтерохлороформа (б), дейтеробензола (в) и дейтероацетонитрила (г). В 5%-й суспензии основной сигнал имеет химический сдвиг 4,5–5 м. д., что совпадает со значением химического сдвига жидкой воды и отвечает сильноассоциированной воде, в которой каждая молекула участвует в формировании 2,5–3,0 водородных связей [10]. При большом усилении в спектрах становятся наблюдаемыми слабоинтенсивные сигналы в области 1,2–1,7 м. д., которые могут быть связаны с наличием небольшого количества слабоассоциированной воды (на каждую ее молекулу приходится менее одной водородной связи), и в области 7 м. д., вероятно, обусловленной молекулами воды, взаимодействующей с сильными электронодонорными центрами, способными к формированию комплексов с перенесенным протоном. Точное измерение интенсивности этих сигналов на фоне интенсивного сигнала SAW затруднительно. Качественная оценка показывает, что их интенсивность не превышает 0,2% от интенсивности сигнала SAW.

Для нанокompозита, насыщенного водой при 50 °С (C_{H₂O} = 3% мас), помещенного в среду слабополярного органического растворителя — хлороформа, в спектрах ¹H ЯМР отдельно регистрируются сигналы сильно- и слабоассоциированной воды. С понижением температуры их интенсивность уменьшается за счет вымерзания воды. Причем интенсивность сигнала SAW ослабевает значительно сильнее, чем сигнала WAW (рис. 4), т. е. свободная энергия WAW понижена адсорбционными взаимодействиями

с поверхностью композита в большей степени, чем SAW. В спектрах регистрируется также сигнал непродейтерированной составляющей хлороформа с химическим сдвигом δ_H = 7,2 м. д.

В среде бензола при 280 К (рис. 4, в), количество WAW существенно повышается (примерно вдвое) по сравнению с ее количеством в среде CDCl₃. Однако с понижением температуры концентрация слабоассоциированной воды быстро снижается (рис. 5). Одновременно уменьшается и относительно узкий сигнал непродейтерированного жидкого бензола (δ_H = 7,2 м. д.), который замерзает (T_{пл} = 280 К) и практически перестает регистрироваться в спектрах. Твердый бензол находится в состоянии молекулярного кристалла. Его сигнал может наблюдаться в виде очень широкого сигнала с химическим сдвигом δ_H = 7,2 м. д. Таким образом, возможность существования воды в слабоассоциированном состоянии связана с наличием жидкой фазы неполярного органического растворителя (рис. 4, в). На рис. 4, в в спектрах присутствует также сигнал тетраметилсилана (ТМС), добавляемого во многие дейтерорастворители в качестве стандарта химического сдвига (δ_H = 0 м. д.).

При замене бензола ацетонитрилом (полярность которого значительно выше) вид спектров воды, связанной с поверхностью композита, существенно изменяется. Концентрация слабоассоциированной воды становится намного большей, чем сильноассоциированной, вплоть до температуры замерзания жидкого ацетонитрила (233 К). При более низкой температуре, как и в случае бензола, интенсивность сигнала WAW быстро уменьшается с понижением температуры, и он перестает регистрироваться

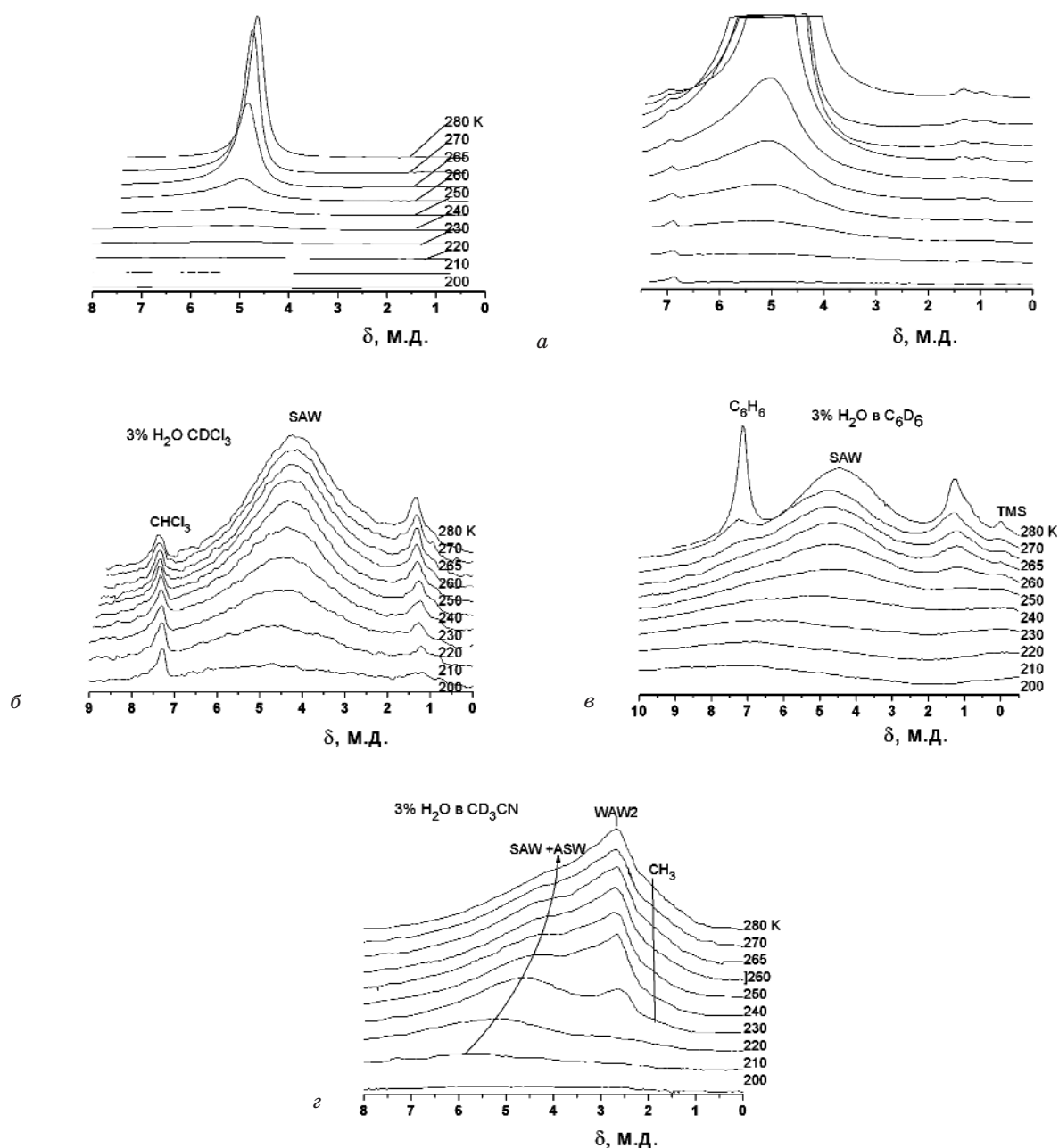


Рис. 4. Снятые при разных температурах спектры ^1H ЯМР воды, в суспензиях нанокompозита SiO_2 -ДНК в воде при $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}} = 50\%$ мас (а), CDCl_3 (б), C_6D_6 (в) и CD_3CN (г) при $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}} = 3\%$ мас

в спектрах при $T < 220$ К (рис. 4, г). Химический сдвиг слабоассоциированной воды в среде ацетонитрила несколько больше ($\delta_{\text{H}} = 2,5$ м.д.), чем в среде слабополярных растворителей. Это позволяет предполагать возможность существования в композите SiO_2 -ДНК двух ее форм — WAW1 и WAW2. Вероятно, WAW2 отвечает несколько более упорядоченным кластерам воды, которые стабилизируются полярной средой. Химический сдвиг сигнала SAW с ростом температуры уменьшается от 6 м.д. при 200 К до 4 м.д. при 280 К. Такая резкая зависимость

$\delta_{\text{H}}(T)$ может быть связана с возможностью существования воды как в виде кластеров сильноассоциированной воды, так и в виде водородно-связанных комплексов $\text{HO-H}\dots\text{N-CCD}_3$ (ASW), локализованных в среде жидкого ацетонитрила. Поскольку в спектрах присутствует только один сигнал, следует предполагать наличие быстрого молекулярного обмена между этими состояниями [15]. При замерзании ацетонитрила химический сдвиг SAW становится заметно большим, чем для жидкой воды. Это может быть обусловлено формированием водородных связей

между молекулами воды, расположенными снаружи кластеров SAW, и молекулами ацетонитрила. В результате среднее координационное число воды увеличивается. Слабоинтенсивный широкий сигнал в области $\delta_H = 2$ м.д. следует относить к сигналу метильных групп непродейтерированной составляющей ацетонитрила.

На рис. 5 представлена температурная зависимость концентраций разных форм воды, полученная на основе измерения интенсивности сигналов в спектрах 1H ЯМР, а на рис. 6 — рассчитанные в соответствии с формулой (3) распределения по размерам кластеров SAW. При содержании в нанокompозите 50% мас воды средний размер кластеров составляет 4 нм. Для нанокompозита, содержащего 3% мас адсорбированной воды в среде слабополярных растворителей, средний размер кластеров SAW близок к 1 нм.

На рис. 7, 8 приведены снятые при разных температурах спектры 1H ЯМР воды, адсорбированной нанокompозитом SiO_2 -ДНК в смесях хлороформа и бензола с электронодонорными растворителями — ацетонитрилом, ДМСО и пиридином при $C_{H_2O} = 3$ и 6% мас. В бинарной смеси 2:1 $CDCl_3/CD_3CN$ (рис. 7, а) кроме сигналов CH_3 и CH групп ацетонитрила и хлороформа отдельно регистрируются SAW (или SAW+ASW), WAW1 и WAW2. Сигнал WAW1 слабо изменяется с понижением температуры, в то время как сигнал WAW2 проявляет способность как к уменьшению за счет замерзания воды при $T < 230$ К, так и к росту из-за перехода в слабоассоциированное состояние части воды, идентифицируемой как SAW+ASW (рис. 7, а, б).

В смеси $CDCl_3/DMCO-d_6$ (рис. 6, б, в) сигнал метильных групп ДМСО точно совпадает с химическим сдвигом WAW2. О присутствии в суспензии кроме WAW1 также

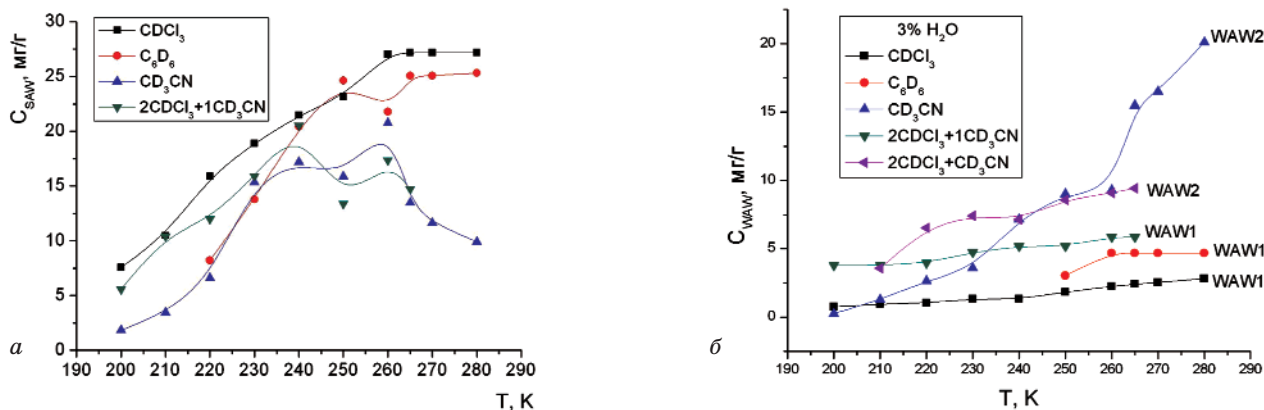


Рис. 5. Температурная зависимость концентрации сильно- и слабоассоциированной воды в нанокompозите SiO_2 -ДНК, содержащем 3% мас воды в среде органических растворителей для сильноассоциированной (а) и слабоассоциированной (б) воды

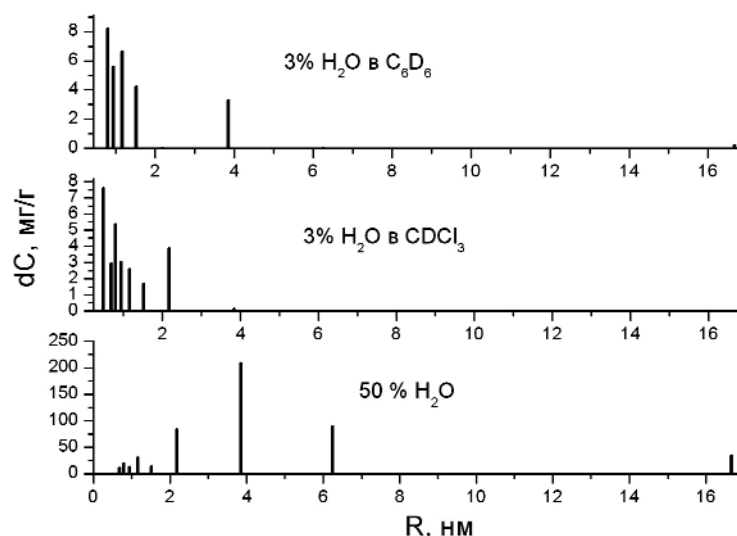


Рис. 6. Распределение по размерам кластеров сильноассоциированной воды в нанокompозите SiO_2 -ДНК

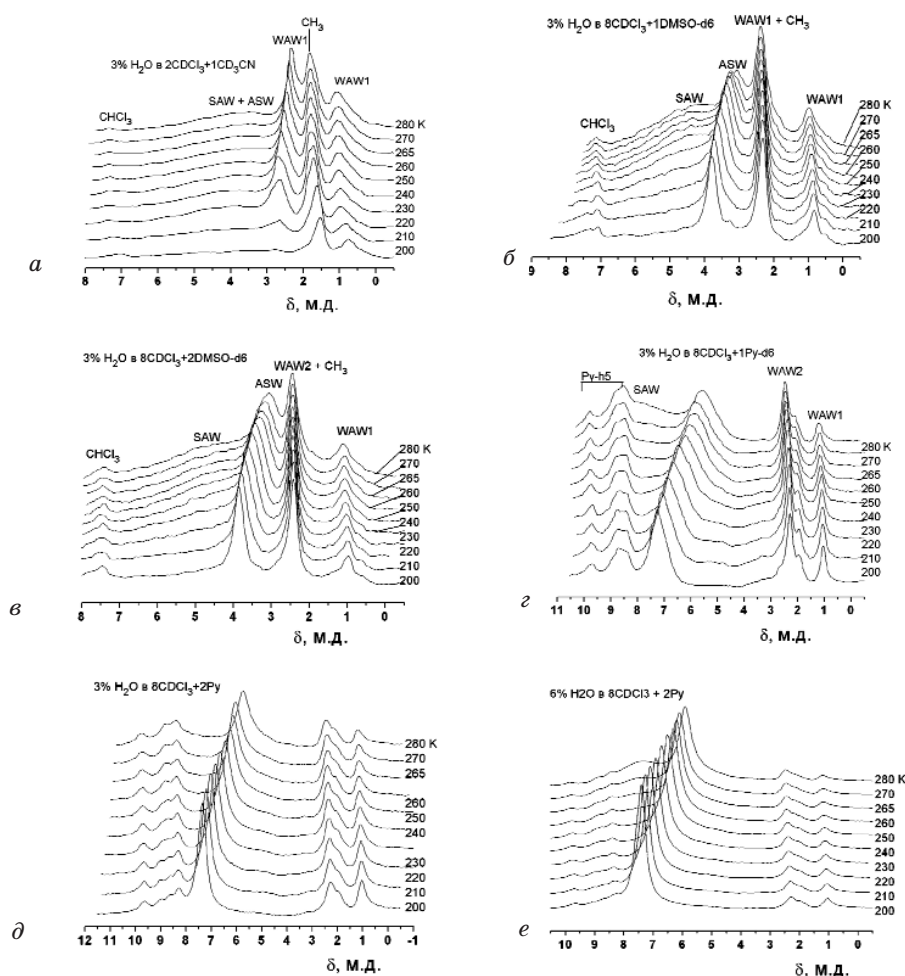


Рис. 7. Снятые при разных температурах спектры ^1H ЯМР воды, адсорбированной наноккомпозитом SiO_2 -ДНК в суспензии CDCl_3 с добавками электронодонорных органических растворителей: *a* — CD_3CN ; *б, в* — DMCO-d6 ; *г, д, е* — Py-d5 при содержании воды в образцах 3% мас (*a-д*) и 6% мас (*е*)

и WAW2 свидетельствует температурное изменение интенсивности сигнала с химическим сдвигом $\delta_{\text{H}} = 2,5$ м.д. Однако, в отличие от смеси $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{CN}$, рост сигнала WAW2 происходит не с увеличением, а с понижением температуры, т. е. с ростом температуры часть WAW2 трансформируется в ASW, которая регистрируется отдельно от SAW (рис. 6, б, в). Как и WAW2, с ростом температуры около 280 К SAW имеет тенденцию к уменьшению за счет перехода воды в жидкую фазу, где она существует в виде водородно-связанных комплексов $\text{HO-H}\dots\text{O}=\text{S}(\text{CD}_3)_2$ (ASW). С возрастанием концентрации ДМСО (рис. 6, в) концентрация SAW уменьшается, а ASW — растет. Химический сдвиг SAW практически не отличается от такового жидкой воды.

При замене ДМСО пиридином (рис. 7, г-е) в спектрах отдельно регистрируются сигналы WAW1 и WAW2. Раздельная регистрация сигналов SAW и ASW зависит от температуры и соотношения концентраций компонен-

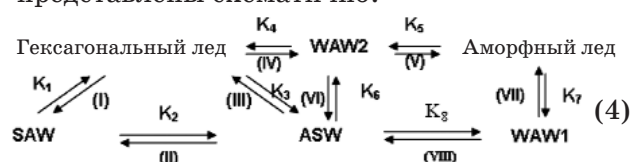
тов. Вероятно, SAW легко замерзает, т. е. является слабосвязанной, поэтому регистрируется только при относительно высокой температуре. Обращает на себя внимание большая величина химического сдвига как для SAW, так и для ASW ($\text{HO-H}\dots\text{NC}_5\text{H}_5$). Она может достигать $\delta_{\text{H}} = 7,5$ м.д., что несколько больше, чем для тетраординированной воды, формирующей кристаллы гексагонального льда [20]. Это может быть связано со способностью молекул пиридина переходить в протонированное состояние [21]. Учитывая, что кластеры SAW относятся к межфазной воде, связанной частицами наноккомпозита, а ASW — к воде, растворенной в органической фазе, можно предположить, что ионы пиридина формируются как на поверхности, так и в жидкой органической среде. Понижение температуры стабилизирует комплексы с перенесенным протоном. Соответственно химический сдвиг ASW смещается в область слабых магнитных полей.

Поскольку при $T < 280$ К бензол легко замерзает, в смесях органических растворителей, приготовленных на основе бензола, состояние межфазной воды зависит не только от соотношения концентраций компонентов, но и от фазового состояния дисперсионной среды, о котором можно судить по присутствию в спектрах сигналов протонов непродейтерированной составляющей органических растворителей. В спектрах нанокompозита, помещенного в смесь 3:3 C_6D_6/CD_3CN , сигнал СН-групп бензола наблюдается при $T > 230$ К, а CH_3 -групп ацетонитрила — при $T > 250$ К (рис. 8, а). Следовательно, дисперсионная среда замерзает как единая фаза после начала кристаллизации бензола. При 280 К в спектрах отдельно регистрируются сигналы SAW и WAW1. Концентрация слабоассоциированной воды примерно вдвое меньше, чем сильноассоциированной. Замерзание органической фазы сопровождается уменьшением интенсивности сигнала WAW и его смещением в слабые магнитные поля таким образом, что при $T < 240$ К имеет место трансформация $WAW1 \leftrightarrow WAW2$. С повышением концентрации ацетонитрила (рис. 8, б) доля слабоассоциированной воды увеличивается за счет снижения концентрации SAW.

В смесях $C_6D_6/DMCO$ (рис. 8, в, г) дисперсионная среда находится в замерзшем (или частично замерзшем) состоянии уже при $T < 270$ К. Это вызывает значительное уширение сигналов межфазной воды. При

$C_6D_6/DMCO$, равном 5:1, в спектрах отдельно регистрируются сигналы SAW и WAW1, интенсивность которых близка (рис. 8, в). С ростом концентрации DMCO его растворимость в твердом бензоле уменьшается (о чем свидетельствует появление сигнала протонов метильных групп). Происходит также перераспределение интенсивности между сигналами SAW и WAW1 в сторону повышения вклада SAW. При $T = 280$ К сигнал SAW имеет тенденцию к уширению, которая, вероятно, обусловлена появлением ASW.

В общем виде процессы, происходящие в гидратированном порошке нанокompозита SiO_2 -ДНК в среде органических растворителей при температуре ниже 273 К, могут быть представлены схематично:



В среде слабополярных органических растворителей ($CDCl_3$, C_6D_6) с понижением температуры наблюдается процесс (I) — замерзание сильноассоциированной воды. Методами рентгеновской спектроскопии показано, что при замерзании водно-органических систем при температуре $T > 200$ К вода переходит в форму гексагонального льда [21]. Замерзание слабоассоциированной воды (WAW1) происходит только при очень

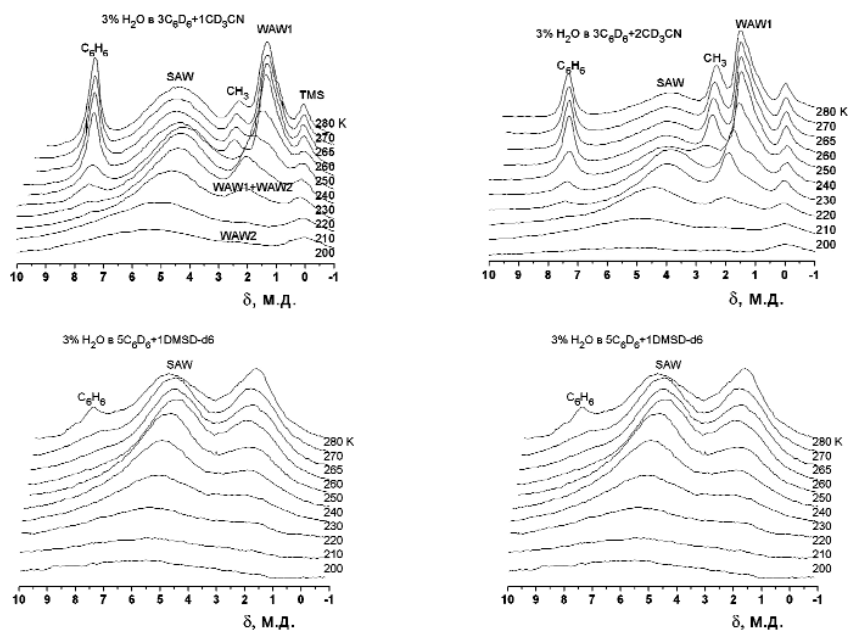


Рис. 8. Снятые при разных температурах спектры 1H ЯМР воды в суспензиях нанокompозита SiO_2 -ДНК в C_6D_6 , содержащих добавки электронодонорных растворителей: CD_3CN (а, б) и $DMCO-d_6$ (в, г) при содержании адсорбированной воды 3% мас

низкой температуре, что позволяет предполагать наличие равновесия (VII). При введении в дисперсионную среду электронодонорных веществ (CD_3CN , $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) при разной температуре и соотношении концентраций компонентов могут реализовываться равновесия (II)–(VI). Температурная зависимость изменения концентрации SAW, ASW, WAW1 и WAW2 для гидратированного порошка нанокompозита SiO_2 -ДНК в смешанных средах, приготовленных на основе хлороформа, приведена на рис. 8, 9, а на основе бензола — рис. 10. Несмотря на то, что эти растворители являются слабополярными из-за высокой температуры замерзания в суспензиях, приготовленных на основе бензола, в широком температурном интервале возможно замерзание дисперсионной среды. Таким образом, можно было сравнить влияние на межфазную воду жидкой и твердой фаз с регулируемыми гидрофильными характеристиками.

В смесях хлороформа с наиболее слабым электронодонорным растворителем — ацетонитрилом с понижением температуры наблюдается уменьшение интенсивности сигналов SAW+ASW, WAW1 и WAW2 (рис. 5, 7, а). Поскольку изменение интенсивности слабоассоциированных форм воды относительно невелико, можно сделать вывод, что имеют место процессы (V) и (VII). Химический сдвиг SAW не превышает 4 м. д., что свидетельствует о совместной регистрации сигналов SAW и ASW, между которыми имеет место быстрый молекулярный обмен, т. е. на межфазной границе нанокompозита реализуются равновесия (I), (II) и (III). В присутствии ДМСО (рис. 7, б, в и 9, а, б) молекулярный обмен между SAW и ASW замедляется, и сигналы этих форм воды регистрируются раздельно. С понижением температуры существенно уменьшается только интенсивность сигнала SAW [процесс (I)]. Большой разброс точек на кривых зависимостей $C_{uw}(T)$ (рис. 9) обусловлен снижением точности определения площади пиков ЯМР при необходимости интегрирования нескольких близко расположенных сигналов с разной шириной. Из рис. 8 следует, что концентрация слабоассоциированных форм воды (WAW1 + WAW2) достигает 10 мг/г, что составляет около трети всей связанной воды. Следовательно, в отличие от исходного кремнезема [10], нанокompозит SiO_2 -ДНК способен стабилизировать значительное количество слабоассоциированных форм воды.

В присутствии пиридина (рис. 9, в, г) при $T > 250$ К рост концентрации ASW происхо-

дит синхронно с уменьшением концентрации SAW, что свидетельствует о наличии равновесия (II). Кроме того, с понижением температуры наблюдается ощутимый рост концентрации WAW1, который может происходить за счет перехода в слабоассоциированное состояние некоторой части воды, растворенной в жидкой среде [равновесие (VIII)]. Возможны также и более сложные превращения с участием разных форм воды, выделить которые невозможно из-за относительно малой точности определения интенсивности сигналов разных типов кластеров межфазной воды.

При добавлении в CDCl_3 (рис. 6) ДМСО или пиридина распределение по размерам кластеров сильноассоциированной воды, связанной нанокompозитом SiO_2 -ДНК, существенно изменяется (рис. 9, д). С ростом концентрации полярной добавки или увеличением ее электронодонорной способности проявляется тенденция к увеличению размера кластеров SAW. Так, если в среде чистого CDCl_3 размер кластеров SAW не превышал 2 нм (рис. 6), то рост концентрации ДМСО и замена его на Py (пиридин) сопровождается появлением кластеров, размер которых может достигать 16,6 нм (рис. 9, д). Однако двукратное увеличение концентрации воды в присутствии Py привело к росту количества кластеров воды размером 1,5–4 нм.

В случае, когда основным компонентом дисперсионной среды является бензол, в зависимости от температуры гидратированный порошок нанокompозита SiO_2 -ДНК может находиться в жидкой или твердой среде. О таянии смеси органических растворителей ($\text{C}_6\text{D}_6 + \text{CD}_3\text{CN}$ или $\text{C}_6\text{D}_6 + \text{ДМСО}$) свидетельствует появление в спектрах (рис. 8) сигналов метильных групп электронодонорной добавки. На рис. 10 приведена температурная зависимость изменения концентрации разных форм воды для дисперсионных сред, приготовленных на основе бензола с добавками CD_3CN (а, б) и ДМСО (в, г). В присутствии CD_3CN зависимость $C_{\text{SAW}}(T)$ имеет сложный вид. В широком температурном интервале ($T > 240$ К) регистрируется рост концентрации сильноассоциированной воды с понижением температуры. При этом в спектрах фиксируется сигнал WAW1, а после замерзания дисперсионной среды — сигнал WAW2. С понижением температуры C_{SAW} и C_{WAW2} уменьшаются за счет замерзания воды в результате смещения равновесий (I) и (IV). Наиболее вероятным путем трансформации WAW1–WAW2 может быть последовательное осуществление процессов

(VI) и (VIII). Причиной уменьшения с ростом температуры величины C_{SAW} может служить смещение равновесия (II). При этом, хотя сигнал ASW не регистрируется в спектрах (возможно, из-за его большой ширины), растворенная в дисперсионной среде вода может присутствовать в виде сольватных структур, локализованных преимущественно на межфазных границах частиц нанокompозита, что объясняет малую подвижность молекул этого типа воды.

При замене ацетонитрила на ДМСО (характеризующегося более высокой температурой замерзания) в спектрах идентифицируются только широкие сигналы WAW1 и SAW (или SAW+ASW) (рис. 7). Зависимость $C_{SAW}(T)$ и $C_{WAW1}(T)$ (за исключением участка, отвечающего $T > 260$ К для образца с соотношением концентраций органических компонентов 5:1) изменяется симбатно, что позволяет предположить наличие взаимосвязи между C_{WAW1} и количеством неза-

мерзшего вещества (SAW, ASW, C_6H_5 , ДМСО), локализованного вблизи межфазной границы нанокompозита. Эта особенность поведения межфазной воды позволяет рассчитывать распределения по размерам кластеров незамерзающей воды не только для SAW, но и для WAW1 (рис. 10, ∂). При этом для кластеров слабоассоциированной воды фиксируются достаточно большие радиусы кластеров (вплоть до 16,6 нм). Вероятно, эти значения характеризуют водно-органические структуры, в состав которых входят кластеры WAW1, находящиеся в незамерзшем состоянии. После их замерзания сигнал слабоассоциированной воды (включенной в твердую органическую матрицу) перестает регистрироваться в спектрах, аналогично тому, как это происходит с сигналами метильных групп твердых ДМСО или ацетонитрила.

Можно ожидать, что полученные различия в строении слоев воды на межфазных границах нанокompозитов будут сказываться

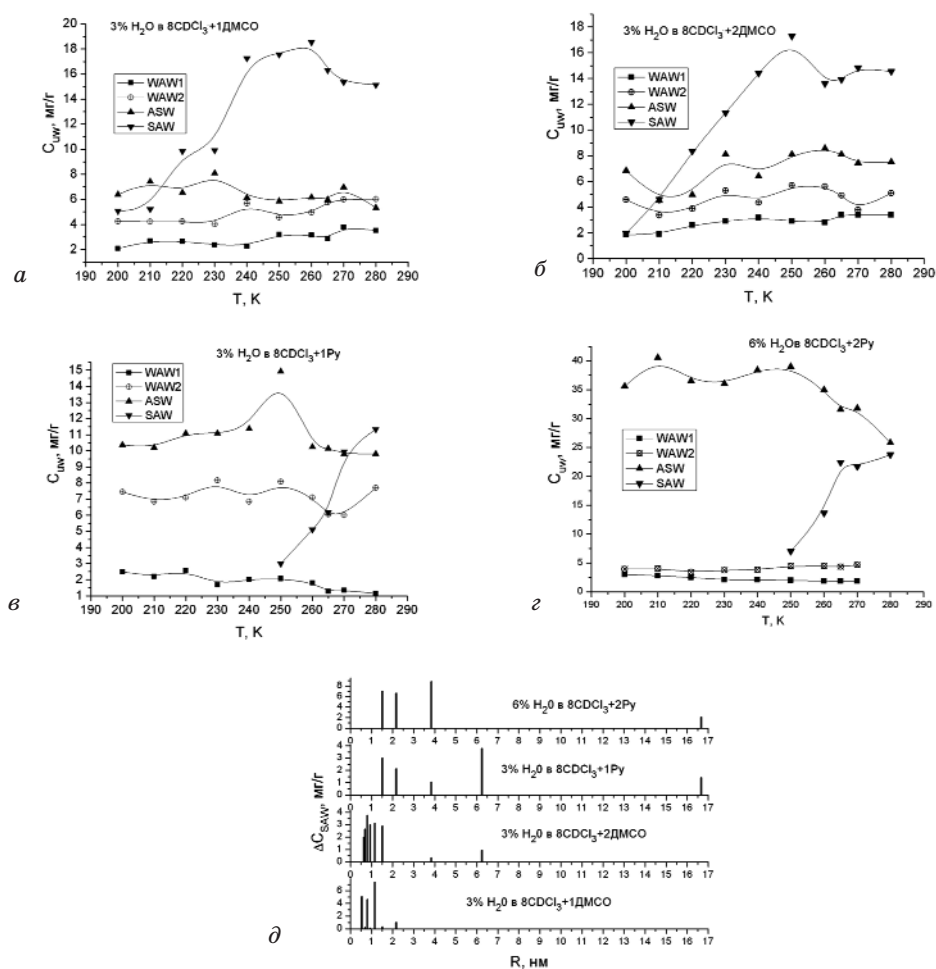


Рис. 9. Температурная зависимость концентрации разных форм воды, связанной с нанокompозитом SiO_2 -ДНК в среде смешанных растворителей: $CDCl_3$ +ДМСО (а, б) и $CDCl_3$ +Py (в, з), а также рассчитанные на их основе распределения по размерам кластеров SAW (д)

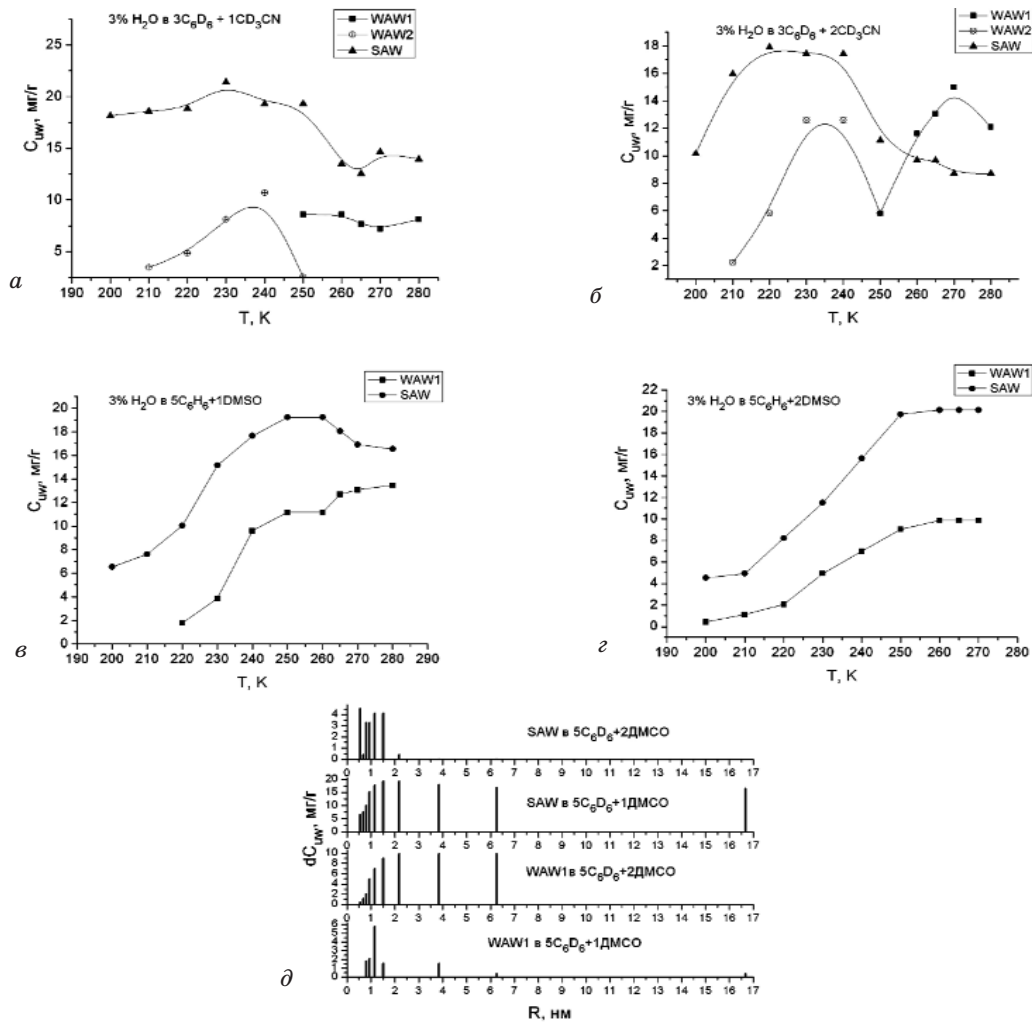


Рис. 10. Температурная зависимость концентрации разных форм воды, связанной с наноккомпозитом SiO₂-ДНК в среде смешанных растворителей: C₆D₆+CD₃CN (а, б) и CDCl₃+DMCO (в, г), а также рассчитанные на их основе распределения по размерам кластеров SAW и WAW1 (д)

и на их биологической активности при контакте с клетками или микроорганизмами [22]. С этой целью было изучено влияние исследуемых материалов на параметры газовой выделительной дрожжевыми клетками *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae — штамм пекарских дрожжей, обладающих типичными видовыми свойствами. Они представляют собой однородные по морфологии, овальные клетки, обладающие толстой клеточной стенкой и типичной для эукариот структурой [17]. Дрожжевые клетки обладают способностью к регулированию биохимических процессов в зависимости от условий их культивирования. Регуляторные механизмы, определяющие скорость роста дрожжей, присутствуют на многих уровнях организации дрожжевой клетки и функционируют в зависимости от состава питательной среды.

Нами было исследовано влияние наноккомпозита SiO₂-ДНК и его составляющих на

жизнедеятельность суспензии дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Определялись абсолютные величины и динамика выделения углекислого газа в процессе брожения. Измерение количества CO₂, выделившегося в результате процесса брожения, проводилось при фиксированной температуре (T = 37 °C), исходной массе дрожжевых клеток и количестве питательных веществ (глюкозы). В качестве контроля использовали суспензию клеток, не содержащих ДНК или частиц нанодисперсного кремнезема. Исследовалась биоактивность наноккомпозита SiO₂-ДНК и его компонентов, взятых в том же количестве, в каком они присутствовали в композите, а также биологическая активность разных концентраций ДНК и чистого кремнезема (табл.). На рис. 11 приведены кинетические кривые выделения углекислого газа дрожжевыми клетками в течение первых 10 ч процесса брожения.

Биоактивность нанокompозита SiO₂-ДНК и его компонентов, а также разных концентраций ДНК и чистого кремнезема

№ п/п	Исследованные соединения	Масса навески вещества, г	Интегральное выделение углекислого газа	
			10 ч	32 ч
1	контроль		3,28	3,15
2	ДНК	0,003	3,36	3,21
3		0,006	2,68	2,62
4		0,012	2,86	2,77
5		0,018	2,86	2,77
6		0,038	2,67	2,60
7		SiO ₂	0,031	3,29
8	0,047		3,70	3,12
9	0,063		3,45	2,94
10	0,094		3,86	3,2
11	0,125		3,89	3,18
12	0,189		4,49	2,81
13	0,06 г ДНК на поверхности SiO ₂	0,002	3,22	2,87
14		0,005	2,92	2,64
15		0,01	3,00	2,71
16		0,05	3,10	2,77
17		0,1	3,57	3,09
18		0,15	3,78	3,22
19		0,2	4,27	3,67
20		0,25	3,98	3,44

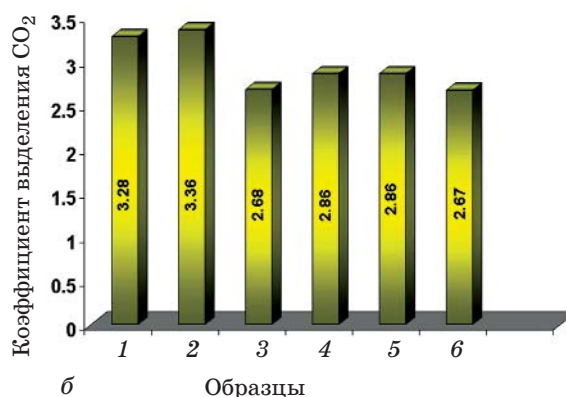
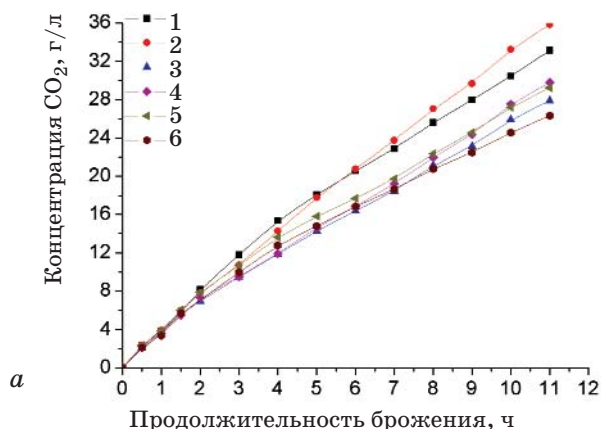


Рис. 11. Кинетические кривые выделения углекислого газа дрожжевыми клетками в течение 10 ч (а): 1 — контроль; в присутствии ДНК с разной концентрацией: 2 — 0,003 г; 3 — 0,006 г; 4 — 0,012 г; 5 — 0,018 г; 6 — 0,038 г; интегральные количества выделенного CO₂ (б)

Из полученных результатов (рис. 11, табл.) следует, что при введении в дрожжевую суспензию чистой ДНК на протяжении первых 2 ч брожения выделение CO₂ происходит одинаково для всех исследуемых образцов, независимо от концентрации ДНК. В течение следующих двух часов хорошо прослеживается угнетающее действие ДНК, после чего в образце с минимальным количеством ДНК (0,003 г) происходит некоторое активирование процесса газовой выделению, ко-

торое со временем увеличивается (рис. 11). Для больших концентраций ДНК такой эффект не наблюдается, имеет место стабильное угнетение метаболизма клеток в суспензии, которое слабо зависит от концентрации ДНК.

На рис. 12, а приведены кинетические кривые выделения углекислого газа суспензией дрожжевых клеток в присутствии композита SiO₂-ДНК и его компонентов. Из рисунка видно, что на начальной стадии брожения (до 2 ч) активный процесс газовой выделению про-

исходит практически одинаково для образцов, содержащих наноккомпозит SiO₂-ДНК, и взятый в том же количестве индивидуальный ВДК. В присутствии нативной ДНК (взятой в том же количестве, в каком она содержалась в наноккомпозите) на начальной стадии регистрируется незначительное уменьшение (по сравнению с контролем) выделения CO₂, что может быть обусловлено стадией приспособления клеток к новым компонентам среды. После 2-часового культивирования суспензии дрожжевых клеток с чистой ДНК фиксируется стабильное уменьшение газовой выделения. Это свидетельствует о существенном ингибирующем влиянии ДНК на процессы клеточного метаболизма. При введении в суспензию чистого кремнезема или наноккомпозита SiO₂-ДНК наблюдается значительное повышение газовой выделения, которое максимально в первые 10 ч процесса брожения. Следовательно, иммобилизация ДНК на поверхности кремнезема существенно уменьшает ее негативное влияние на дрожжевые клетки. На рис. 12, б представлена диаграмма интегрального газовой выделения за первые 10 ч брожения. Из рисунка видно, что наибольшая активность выделения углекислого газа наблюдается в присутствии кремнезема (0,189 г), тогда как при введении в суспензию наноккомпозита SiO₂-ДНК (0,2 г) имеет место тенденция к некоторому уменьшению выделения CO₂. Возможно, закрепленная на поверхности кремнезема ДНК несколько препятствует его взаимодействию с мембранными протеинами дрожжевых клеток, что замедляет процессы клеточного метаболизма.

Таким образом, можно констатировать, что наноккомпозит SiO₂-ДНК способствует процессам жизнедеятельности суспензии хлебопекарских дрожжей по сравнению с контролем и нативной ДНК, что свидетельствует о его высокой биологической активности и совместимости с клеточными структурами. Это дает основание к дальнейшему его тестированию при контакте с более сложными биологическими объектами.

Адсорбционное модифицирование поверхности нанокремнезема полинуклеотидами влечет за собой структурную дифференциацию адсорбированной на нем воды, которая для сильногидратированного (C_{H₂O} = 50% мас) композита выражается в появлении в спектрах ¹H ЯМР наряду с сигналом сильноассоциированной воды (SAW) с химическим сдвигом δ_H = 4,5 м. д. сигналов слабоассоциированных форм воды (WAW), регистрируемых в области δ_H = 1–2 м. д. Для слабогидратированных образцов (C_{H₂O} = 3–6% мас) наноккомпозита в среде органических растворителей концентрация WAW может достигать трети от общего количества адсорбированной воды. Обнаружена возможность существования двух типов слабоассоциированной воды — WAW1 и WAW2, различающихся по величине химического сдвига (δ_H = 1,3 и 2,5 м. д., соответственно). Слабоассоциированные формы воды присутствуют в виде двух типов кластерных структур, различающихся средним числом водородных связей, приходящихся на каждую молекулу воды. В присутствии электронодонорных растворителей в спектрах может фиксироваться также сигнал воды, растворенной в жидкой фазе (ASW), находящейся

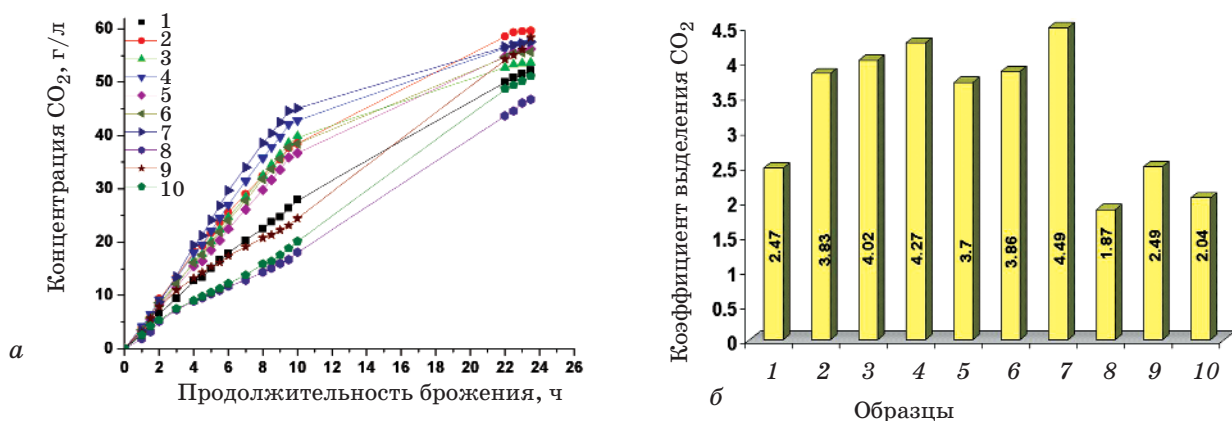


Рис. 12. Кинетические кривые выделения углекислого газа дрожжевыми клетками в присутствии наноккомпозита SiO₂-ДНК и соответствующих концентраций его составных — SiO₂ и ДНК за 25 ч (а) и интегральные количества выделившегося CO₂ в течение 10 ч (б): 1 — контроль, 2 — SiO₂-ДНК (0,05 г); 3 — SiO₂-ДНК (0,1 г); 4 — SiO₂-ДНК (0,2 г); 5 — SiO₂ (0,047 г); 6 — SiO₂ (0,094 г); 7 — SiO₂ (0,189 г); 8 — ДНК (0,018 г); 9 — ДНК (0,038 г); 10 — ДНК (0,075 г)

в виде водородно-связанных комплексов с электронодонорными центрами органических молекул. Концентрация ASW увеличивается с ростом температуры, количеством электронодонорной добавки и ростом ее электронодонорных способностей. Между разными формами межфазной воды возможно протекание реакции молекулярного обмена и взаимопревращения. Кроме заморзания воды с образованием гексагонального льда ($SAW \leftrightarrow Ice$, $ASW \leftrightarrow Ice$ и

$WAW \leftrightarrow Ice$), зарегистрирована возможность реакций $SAW \leftrightarrow ASW$, $ASW \leftrightarrow WAW2$, $WAW1 \leftrightarrow ASW \leftrightarrow WAW2$.

Работа выполнена при поддержке Украинского научно-технологического центра (проект № 3832) и международного гранта 7-й Европейской рамочной программы (FP7-IRSES «Compositum»), Marie Curie Action, PEOPLE, International Research Staff Exchange Scheme (IRSES).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния* / Под ред. А. А. Чуйко. — К.: Наук. думка, 2003. — 375 с.
2. *Вильцанюк А. А., Герашенко И. И.* Энтеросорбция в комплексном лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости. — Харьков, 2009. — 128 с.
3. *Энтеросорбция* / Под ред. Н. А. Белякова. — Л.: Центр сорбционных технологий, 1991. — 336 с.
4. *Anglin E. J., Cheng L., Freeman W. R., Sailov M. J.* Sailor Porous silicon in drug delivery devices and materials // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2008. — V. 60, N 11. — P. 1266–1277.
5. *Coffer J. L., Whitehead M. A., Nagesha D. K. et al.* Porous silicon-based scaffolds for tissue engineering and other biomedical applications // *Phys. Status Solidi A-Appl. Mat.* — 2005. — V. 202, N 8. — P. 1451–1455.
6. *Charnay C., Begu S., Tourne-Peteilh C. et al.* Inclusion of ibuprofen in mesoporous templated silica: drug loading and release property // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 2004. — V. 57, N 3. — P. 533–540.
7. *Hamidi M., Azadi A., Rafiei P.* Hydrogel nanoparticles in drug delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2008. — V. 60. — P. 1638–1649.
8. *Gun'ko V. M., Voronin E. F., Nosach L. V. et al.* Adsorption and migration of poly(vinyl pyrrolidone) at a surface of fumed silica // *Adsorp. Sci. Technol.* — 2006. — V. 24, N 2. — P. 143–157.
9. *Gun'ko V. M., Voronin E. F., Nosach L. V. et al.* Nanocomposites with fumed silica/ poly(vinyl pyrrolidone), prepared with low content of solvents // *App. Surf. Sci.* — 2006. — V. 253, N 5. — P. 2801–2811.
10. *Гулько В. М., Туров В. В., Горбик П. П.* Вода на межфазной границе. — К.: Наук. думка, 2009. — 694 с.
11. *Gun'ko V. M., Turov V. V., Bogatyrev V. M. et al.* Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces // *Adv. Col. Interf. Sci.* — 2005. — V. 118, N 1–3. — P. 125–172.
12. *Turov V. V., Leboda R.* Application of 1H NMR Spectroscopy Method for Determination of Characteristics of Thin Layers of Water Adsorbed on the Surface of Dispersed and Porous Adsorbents // *Ibid.* — 1999. — V. 79, N 2–3. — P. 173–211.
13. *Термодинамические свойства индивидуальных веществ* / Под ред. В. П. Глушкова. — М.: Наука, 1978. — 495 с.
14. *Petrov O. V., Furo I.* NMR cryoporometry: Principles, application and potential // *Progr. NMR Spectr.* — 2009. — V. 54. — P. 97–122.
15. *Abragam A.* The Principles of Nuclear Magnetism. — Oxford University Press: Oxford, UK, 1961. — 264 p.
16. *Соловйова В. П., Сотникова О. П., Лотух Т. Д.* Експериментальне вивчення біостимуляторів з природної сировини // Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / Під ред. О. В. Стефанова. — К.: МОЗ України, ДФЦ, Авіценна, 2001. — С. 497–502.
17. *Векишин Н. Л.* Биофизика ДНК-актиноциновых нано-комплексов. — Пушкино: Фотон-век, 2009. — 192 с.
18. *Киселев А. В., Лыгин В. И.* Применение инфракрасной спектроскопии для исследования строения поверхностных химических соединений и адсорбции // *Усп. хим.* — 1962. — Т. 31, № 3. — С. 351–384.
19. *Киселев А. В., Лыгин В. И.* Инфракрасные спектры поверхностных соединений и адсорбированных веществ. — М.: Наука, 1972. — 460 с.
20. *Kinney D. R., Chaung I-S., Maciel G. E.* Water and the Silica Surface As Studied by Variable Temperature High Resolution 1H NMR // *J. Am. Chem. Soc.* — 1993. — V. 115, N 15. — P. 6786–6794.
21. *Грагеров И. П., Погорельый В. К., Франчук И. Ф.* Водородная связь и быстрый протонный обмен. — К.: Наук. думка, 1978. — 214 с.
22. *Крупская Т. В., Барвинченко В. Н., Туров В. В.* Изучение природы стимулирующего воздействия нанокремнезема на клеточные объекты // *Химия, физика и технология поверхности.* — 2008. — Вып. 14 — С. 511–523.

ГІДРАТНІ ВЛАСТИВОСТІ КОМПОЗИТНОГО МАТЕРІАЛУ НА ОСНОВІ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ ТА ДНК

V. V. Туров¹
V. M. Барвінченко¹
T. V. Крупська¹
B. M. Гунько¹
B. Ф. Чехун²

¹Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка
НАН України, Київ

²Інститут експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького
НАН України, Київ

E-mail: v_turov@ukr.net

Кремнеземи широко використовують у біомедицині не тільки як супутні речовини, що надають лікарським формам необхідних фізико-хімічних властивостей, але і як самостійний лікарський засіб з вираженим детоксикуючим ефектом, що добре зарекомендував себе при лікуванні харчових отруєнь, бактерійних заражень і ранових інфекцій.

Створено нанокompatитну систему на основі високодисперсного кремнезему, модифікованого адсорбованою ДНК. Властивості композиту вивчено методами ЯМР-спектроскопії, термогравиметрії, ІЧ-спектроскопії. Проведено біометричні дослідження впливу композиту SiO₂-ДНК на суспензію клітин *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, що нанокompatит виявляє значну біоактивність, оскільки може істотно прискорювати процеси життєдіяльності хлібопекарських дріжджів. Детально вивчено гідратацію композиту SiO₂-ДНК та вплив на неї середовища органічних розчинників. Виявлено кілька форм міжфазної води, у тому числі й слабоасоційованої, яка практично не утворює водневих зв'язків із сусідніми молекулами. Показано, що за варіювання температури чи введення в систему органічних речовин відбуваються взаємоперетворення між різними формами міжфазної води. Висловлено припущення, що саме слабоасоційована форма води може бути відповідальною за біосумісність із клітинами.

Ключові слова: нанокompatит кремнезем-ДНК, гідратація, сильно- та слабоасоційована вода, суспензія клітин хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*.

HYDRATED PROPERTIES OF COMPOSITE MATERIAL BASED ON NANOSILICA AND DNA

V. V. Turou¹
V. M. Barvinchenko¹
T. V. Krupska¹
V. M. Gun'ko¹
V. F. Chekhun²

¹Chuiko Institute of Surface Chemistry
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

²Kavetski Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of the National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: v_turov@ukr.net

Silica is widely used in biomedicine not only as concomitant matter giving dosage forms the required physical and chemical properties but also as independent medication with the expressed detoxicated effect proved itself to be active at treatment of the food poisonings, bacterial and wound infections.

A nanocomposite system was prepared with finely dispersed silica modified by adsorbed DNA. Nanocomposite properties were studied using NMR spectroscopy, thermogravimetry, and infrared spectroscopy. A biometric study of SiO₂-DNA composite influence was carried out for suspended *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. It was shown that the composite possesses a significant bioactivity since it can substantially accelerate the processes of vital functions of bakery yeasts. Hydration of SiO₂-DNA composite and influence of organic solvent media were studied in detail. It was found out some forms of interfacial water including weakly associated water that practically does not form the hydrogen bonds with neighboring molecules. It was shown that interconversion of different forms of interfacial water occurs at varying temperature or addition of organic compounds. It was assumed that weakly associated water could affect the biocompatibility of nanoparticles with respect to cells.

Key words: Silica-DNA nanocomposite, hydration, strongly and weakly associated water, suspension of *Saccharomyces cerevisiae* cells.

МЕТАБОЛІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ПОРОСЯТ ЗА УМОВ ЗГОДОВУВАННЯ ЇМ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ДРІЖДЖІВ *Saccharomyces cerevisiae*, ЯКА МІСТИТЬ БІОКОМПЛЕКСИ ХРОМУ

Р. Я. Іскра¹
М. В. Гончар^{2,3}
Г. І. Нечай^{1,2}
І. Я. Максимович¹

¹Інститут біології тварин НААН України, Львів
²Інститут біології клітини НАН України, Львів
³Заміський факультет біотехнології,
Жешувський університет, Кольбушова, Польща

E-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

У природному середовищі хром є переважно у двох валентних станах: шестивалентному (хромати та біхромати) і тривалентному (сполуки Cr³⁺). Хромати широко використовують у промисловості, у процесах виробництва сталі, сплавів чавуну, обробки деревини та дублення шкіри. Є багато даних про токсичну, мутагенну й канцерогенну дію Cr(VI).

З'ясовано дію біокомплексів Cr(III) з культуральної рідини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на обмін протеїнів та вуглеводів, а також систему антиоксидантного захисту в крові поросят у період відлучення від свиноматок. Встановлено, що введення до раціону поросят культуральної рідини, яка містить біокомплекси хрому, спричинює зменшення вмісту сечовини та глюкози у плазмі крові, збільшення концентрації загального протеїну, активності ензимів лактатдегідрогенази, каталази і глутатіонпероксидази та вмісту відновленого глутатіону в еритроцитах крові. Не було виявлено суттєвих відмінностей між показниками тварин, що споживали культуральну рідину дріжджів, яка містила Cr(III) у формі природно-синтезованих біокомплексів, і таку, до складу якої входив хелатований Cr(III).

Ключові слова: поросята, дріжджі, біокомплекси хрому, протеїн, лактатдегідрогеназа, відновлений глутатіон, ензими антиоксидантного захисту.

У природному середовищі хром є переважно у двох валентних станах: шестивалентному (хромати та біхромати) і тривалентному (сполуки Cr³⁺). Хромати широко використовують у промисловості, у процесах виробництва сталі, сплавів чавуну, обробки деревини та дублення шкіри. У літературі є багато даних про токсичну, мутагенну й канцерогенну дію Cr(VI) [1]. Цитотоксичність Cr(VI) вивчено недостатньо, проте велика кількість досліджень показує, що Cr(VI) індукує оксидативний стрес, ушкодження ДНК, апоптоз клітин і модифіковану експресію генів [1, 2]. Через високу токсичність і канцерогенність хромати дуже небезпечні для навколишнього середовища і здоров'я людини [3], тому актуальною проблемою є розроблення ефективних методів детоксикації сполук хрому(VI). На відміну від сполук хрому з вищою валентністю, похідні Cr(III) не є такими токсичними [4], а в малих кількостях вони потрібні вищим організмам. Cr(III) має важливе значення

для активності інсуліну, що в свою чергу позначається на метаболізмі протеїнів, жирів і вуглеводів. Він активує ензими вуглеводного обміну, знижує рівень ліпідів у плазмі крові, стимулює процес включення амінокислот у молекули протеїнів [2, 5].

Відновлення Cr(VI) до Cr(III) може відбуватися за участю мікроорганізмів [6, 7]. Важливими редуцентами хрому (VI) є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* [7].

Відомо, що аніони хромату транспортуються у мікробні клітини сульфатспецифічними пермеазами і можуть відновлюватись до сполук Cr(III) клітинними редуруючими системами, через ензиматичні й неензиматичні шляхи. Найпотужнішими неензиматичними відновниками хроматів є аскорбінова кислота, глутатіон і цистеїн [7, 8]. Нещодавно показано, що дріжджі відіграють важливу роль у детоксикації хромату позаклітинною редуцією: Cr(VI) → Cr(V) → Cr(III) з утворенням двох типів стабільних Cr(III)-біохелатованих комплексів [9, 10].

Важливою практичною проблемою є збереження позитивної динаміки росту поросят після відлучення їх від свиноматок [11, 12]. У період відлучення поросята зазнають стресу, який зумовлений власне відлученням, перегрупуванням у зв'язку зі зміною типу живлення, послабленням імунітету, що має наслідком відставання їх у рості та розвитку [13].

Одним із чинників, що справляє позитивний вплив на фізіологічний стан поросят під час відлучення, є повноцінне живлення, збалансоване за складом вітамінів та мікроелементів, серед яких важливого значення в останні роки набуває хром. Додавання хрому може здійснюватись у формі погано засвоюваних неорганічних солей або синтетичних комплексів, зокрема трипіколінату хрому, запропонованого для згодовування ягнятам, телятам та свиням [14–16]. Головною фізіологічною функцією хрому є його опосередкований вплив на дію інсуліну [17, 18]. Хром — компонент фактора толерантності глюкози, який позитивно впливає на її засвоєння клітинами, покращуючи зв'язування інсуліну з відповідним рецептором [17]. Тому хром виявляє низку метаболічних ефектів, більшість з яких стосується змін у толерантності глюкози і опосередковується участю елемента в механізмах дії інсуліну. Дефіцит хрому в організмі людей та тварин може призвести до порушень дії інсуліну [18].

З метою поліпшення засвоєння глюкози крові в стресовий період можна використовувати добавки хрому до раціону тварин. Під час стресу в плазмі крові збільшується вміст кортизолу, порушується метаболізм глюкози, посилюється виділення хрому із сечею [19]. Згодовування дослідним телятам комбікорму з додавання хромовмісних дріжджів [20, 21] або комплексних сполук хрому [20] супроводжувалося зменшенням вмісту кортизолу в сироватці крові. Незважаючи на позитивний ефект у разі введення хрому в раціон телят, у поросят не отримано однозначних результатів.

Метою наших досліджень було з'ясувати дію Cr(III) у формі природно-синтезованих біокомплексів, що містяться в культуральній рідині дріжджів *S. cerevisiae*, інкубованих попередньо з хроматом та хромом Cr(III), на деякі метаболічні характеристики клітин крові поросят під час годівлі їх зазначеними джерелами хрому(III).

Матеріали і методи

Методи отримання природно-синтезованих біокомплексів, що містяться в культуральній рідині дріжджів

Для одержання культуральної рідини дріжджів, збагаченої сполуками Cr(III), використовували промисловий штам дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* «Ензим». Дріжджі вирощували на роторному шейкері при 250 об/хв, температурі 29 °С, у колбах Ерленмеєра (0,5 л), в 100 мл середовища Беркгольдера з таким мінеральним складом (г/л): KH_2PO_4 — 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,1; залізо у вигляді солі Мора в концентрації 0,2 мг/л та 0,1% дріжджового екстракту «Діфко».

Дріжджові клітини в логарифмічній фазі росту (перша доба) збирали центрифугуванням при 3 000 об/хв, стерильно переносили в свіже середовище, до якого додавали у відповідних кількостях сполуки хрому.

1. *Отримання природно-синтезованих біокомплексів Cr(III) відновленням хромату.* Інкубацію клітин дріжджів (1 мг/мл) з 1 мМ хроматом калію проводили до повного зникнення хромату. Вміст залишкового хромату в культуральній рідині під час інкубації визначали колориметрично дифенілкарбазидним методом [10]. Після інкубації культуральну рідину відділяли від клітин центрифугуванням та заморожували. У процесі заморожування природно-синтезовані біокомплекси Cr(III) сконцентровувались у верхній частині «кріоконцентрату», який під час розморожування відбирали й заморожували повторно [10]. Після кожного циклу заморожування-розморожування відбувалось концентрування біокомплексів Cr(III). Вміст Cr(III) у концентратах виявляли після мінералізації їх аліквоти з використанням пергідролу в кислому середовищі. Концентрацію Cr(III) в мінералізованих зразках визначали із застосуванням хромазуролу S [22].

Для отримання препаратів, які згодовували тваринам, концентрати, що містили біокомплекси Cr(III): 9–10 мМ, у перерахунку на Cr(III), ліофілізували.

2. *Одержання біохелатів неорганічного Cr(III).* Інкубацію клітин дріжджів (1 мг/мл) проводили з 1 мМ хлориду хрому. Рівень хелатування визначали за доступністю Cr(III) в реакції з хромазуролом S [22]. За рівня біохелатування 90–95% культуральну рідину відбирали й заморожували. Біохелати неорганічного Cr(III) збирали «кріоконцентруванням», як описано вище, та ліофілізували для виготовлення препаратів, які безпосередньо

вводили тваринам. Аліквоти «кріоконцентратів» біохелатів Cr(III) мінералізували, визначали в них вміст Cr(III) в реакції з хромазуролом S, який становив 5–6 мМ.

Характеристика дослідних груп тварин

Дослідження проводили на свинофермі учбового господарства Львівського національного аграрного університету на поросятах великої білої породи масою 8,0–10,0 кг під час відлучення їх від свиноматок у 30-денному віці.

Було відібрано 3 групи поросят: контрольна і 2 дослідні. Контрольна група поросят отримувала комбікорм, збалансований за всіма необхідними мікроелементами та вітамінами [23]. Дослідним групам згодували комбікорм з препаратами сконцентрованої ліофілізованої культуральної рідини дріжджів. 1-й дослідній групі призначали препарат, який містив Cr(III) у формі природно-синтезованих біокомплексів, у дозі 250 мкг/кг корму, в перерахунку на Cr(III). Характеристику біокомплексів було наведено нами раніше [24]. 2-га дослідна група споживала препарат сконцентрованої ліофілізованої культуральної рідини дріжджів, яка містила хелатований Cr(III). Тваринам згодували біохелати Cr(III) в дозі 250 мкг/кг корму, в перерахунку на Cr(III). Тривалість уведення препаратів становила 40 діб: з 20- до 60-добового віку.

Визначення деяких метаболічних характеристик клітин крові поросят

Матеріалом для дослідження слугували проби крові поросят, відібрані за 5 діб до їх відлучення, та на 3-тю, 10-, 20- та 30-ту добу після відлучення. Визначали вміст хрому в плазмі крові методом атомно-абсорбційної спектрометрії, активність ензимів протеїнового і вуглеводного обміну, антиоксидантної системи в крові поросят. Вміст протеїну, сечовини та глюкози, відновленого глутатіону, активність гексокінази, лактатдегідрогенази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-

пероксидази визначали загальноновизнаними методами [25]. Активність амінотрансфераз — на біохімічному аналізаторі «Біотронік-Н2000».

Результати та обговорення

Згодовування дослідним групам поросят комбікорму з препаратом дріжджів, що містив Cr(III) у формі природно-синтезованих біокомплексів, зумовлює підвищення вмісту хрому в крові тварин через додаткове надходження його з кормом. У поросят до відлучення в контрольній та дослідних групах концентрація мікроелемента в плазмі крові істотно не відрізнялась (табл. 1).

На 3-тю добу після відлучення поросят другої дослідної групи спостерігається достовірно більша (на 19%) концентрація хрому у тварин контрольної групи. У поросят 1-ї та 2-ї дослідних груп на 10-ту, 20- і 30-ту добу після відлучення від свиноматок концентрація хрому в плазмі крові достовірно більша порівняно з тваринами контрольної групи на 13–26%. Порівняння результатів досліджень 1-ї та 2-ї дослідних груп не виявило суттєвих міжгрупових різниць.

Як відомо, хром(III) посередньо лімітує синтез протеїнів [5]. У результаті проведених нами досліджень з'ясовано, що загальний вміст протеїну в плазмі крові поросят контрольної групи у період з 20- до 60-добового віку істотно не змінюється.

За 5 діб до відлучення поросят від свиноматок не було встановлено достовірної різниці вмісту загального протеїну плазми крові у поросят контрольної та обох дослідних груп (табл. 2).

Проте після відлучення поросят від свиноматок концентрація загального протеїну плазми крові достовірно відрізняється у тварин дослідних та контрольної груп. Так, концентрація загального протеїну в плазмі крові поросят на 3-тю і 10-ту добу після відлучення 1-ї та 2-ї дослідних груп порівняно з поросятами контрольної групи була достовірно вищою на 12–20%. На 20-ту і 30-ту

Таблиця 1. Вміст хрому в плазмі крові поросят, мкг/л ($M \pm m$, $n = 3$)

Група	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	0,32±0,02	0,21±0,01	0,24±0,01	0,38±0,01	0,37±0,02
1-ша дослідна	0,33±0,03	0,24±0,01	0,28±0,01**	0,44±0,01**	0,42±0,01**
2-га дослідна	0,32±0,02	0,25±0,01**	0,29±0,01**	0,48±0,02***	0,42±0,01**

Примітка. У цій та інших таблицях статистична достовірність різниць між показниками у тварин дослідної групи порівняно з контрольною: * — $P < 0,05$; ** — $P < 0,01$; *** — $P < 0,001$.

Таблиця 2. Вміст загального протеїну в плазмі крові, г/л ($M \pm m, n = 3$)

Група тварин	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	53,7±2,04	51,8±0,73	53,6±0,64	56,2±1,47	56,6±0,72
1-ша дослідна	57,4±1,63	60,4±1,03**	60,3±1,05**	60,3±1,97	57,0±2,18
2-га дослідна	57,0±0,73	62,7±0,33***	63,5±0,86***	62,9±2,40*	59,6±1,03*

добу в другій дослідній групі спостерігалась достовірно більша концентрація загального протеїну плазми крові, відповідно на 11% та 5%, порівняно з поросятами контрольної групи.

У тварин 2-ї дослідної групи концентрація загального протеїну плазми крові на всіх етапах післястресових досліджень була дещо більша, ніж у першій дослідній групі, що можна пояснити впливом біокомплексів Cr(III), утвореними як у процесі відновлення хромату, так і під час хелатування екзогенного неорганічного хрому(III) [26].

Інсулін завдяки поліпшенню зв'язувальної здатності з рецепторами клітин за допомогою хром(III)-вмісного пептиду хромодуліну [27] більш повною мірою виявляє свою біологічну дію — посилення синтезу протеїну в клітинах.

У процесі дослідження активності амінотрансфераз плазми крові досліджуваних поросят не було встановлено достовірних різниць між тваринами контрольної та обох дослідних груп упродовж усього періоду досліджень (табл. 3). Визначення активності амінотрансфераз плазми крові в сучасній медицині є важливим клінічним тестом, який свідчить про функціональний стан печінки, зокрема про руйнацію під впливом токсичних речовин чи патогенних чинників гепатоцитів, які, руйнуючись, викидають в кров різні ензими, серед яких є й амінотрансферази. З отриманих нами результатів можна зробити висновок, що згодовувани поросяттам препарати культуральної рідини

дріжджів, що містять хром, не спричиняють токсичного ефекту на організм дослідних тварин.

Як відомо, недостатнє надходження енергоємних субстратів у організм поросят, спричинене їхнім стресовим станом, призводить до накопичення в організмі продуктів проміжного обміну — сечовини, сечової кислоти, аміаку, кетонових тіл [26].

Досліджуючи концентрацію сечовини в плазмі крові поросят дослідних та контрольної груп, яка характеризує інтенсивність катаболізму амінокислот у печінці (табл. 4), не виявили достовірних різниць за 5 діб до відлучення та на 3-тю добу після відлучення поросят від свиноматок. Слід зауважити, що вміст досліджуваного метаболіту в плазмі крові після відлучення збільшується порівняно з періодом досліджень до відлучення, що свідчить про процеси посиленого катаболізму амінокислот, спричиненого стресовими чинниками.

Концентрація сечовини в плазмі крові поросят після їх відлучення від свиноматок у 1-й та 2-й дослідних групах достовірно менша порівняно з поросятами контрольної групи на 10-ту добу відповідно на 8% та 6%, на 20-ту добу — на 18% та 14%.

Отже, з цього можна зробити висновок, що додавання препаратів культуральної рідини дріжджів, які містять хром, сприяє нормалізації обміну амінокислот в організмі, порушеного під впливом стресового стану.

Таблиця 3. Активність амінотрансфераз у плазмі крові, мкмоль/л на год ($M \pm m, n = 3$)

Група тварин	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Аланінамінотрансфераза					
Контрольна	0,785±0,062	0,647±0,032	0,764±0,024	0,633±0,030	0,630±0,033
1-ша дослідна	0,685±0,036	0,693±0,006	0,810±0,062	0,669±0,060	0,712±0,031
2-га дослідна	0,667±0,014	0,664±0,024	0,815±0,011	0,570±0,017	0,664±0,013
Аспаратамінотрансфераза					
Контрольна	0,505±0,006	0,470±0,023	0,636±0,034	0,447±0,007	0,442±0,011
1-ша дослідна	0,506±0,033	0,512±0,033	0,630±0,018	0,472±0,012	0,420±0,021
2-га дослідна	0,420±0,007	0,490±0,031	0,647±0,028	0,421±0,007	0,427±0,009

Таблиця 4. Вміст сечовини у плазмі крові, ммоль/л ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 дів до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	4,23±0,05	6,11±0,05	6,35±0,03	6,43±0,03	5,93±0,05
1-ша дослідна	4,31±0,07	6,13±0,04	5,87±0,04***	5,27±0,06***	5,74±0,06
2-га дослідна	4,36±0,04	6,04±0,03	5,97±0,04**	5,53±0,10***	5,66±0,09

Вважають, що енергетичні потреби поросят раннього віку на 80% забезпечуються за рахунок вуглеводів. Відомо, що в період післястресової адаптації основним джерелом енергії для поросят є глюкоза та амінокислоти з розгалуженим ланцюгом. Поряд із цим відомо, що за додаткового введення в організм тварин препаратів хрому посилюються процеси вуглеводного обміну [5].

Дослідження концентрації глюкози плазми крові поросят обох дослідних та контрольної груп до відлучення від свиноматок не встановило міжгрупових достовірних різниць (табл. 5).

Проте вже на 3-тю добу після відлучення поросят контрольної групи від свиноматок концентрація глюкози плазми крові збільшується порівняно з її вмістом перед відлученням. Це зумовлено стресовим станом тварин, під час якого в організмі посилюється розклад глікогену.

Поряд із цим концентрація глюкози в плазмі крові поросят 1-ї та 2-ї дослідних груп достовірно менша, ніж у контрольній групі тварин, на 3-тю, 10- і 20-ту добу після відлучення на 10–15%, що свідчить про стресостійкість тварин після відлучення внаслідок дії сполук хрому.

Механізм зменшення концентрації глюкози в плазмі крові поросят обох дослідних груп під впливом хрому зводиться до більш інтенсивного її використання шляхом гліколізу

та синтезу глікогену. Хромомодулін, до складу якого входить хром, активує інсулінові мембранні рецептори, унаслідок чого інсулін краще зв'язується з рецепторами на клітинних мембранах і довше здатен виявляти свій біологічний ефект [5].

Концентрація вільної глюкози в клітині порівняно невелика, проте більша частина глюкози в клітинах організму міститься у фосфорильованій формі. Цей процес каталізується гексокіназою — ензимом, що запускає гліколіз. Активність гексокінази в лізатах еритроцитів крові поросят 2-ї дослідної групи на 3-тю добу після відлучення достовірно більша на 20% за активність ензиму в тварин контрольної групи (табл. 6).

На 10-ту, 20- та 30-ту добу після відлучення поросят обох дослідних груп спостерігали тенденцію до збільшення активності гексокінази в гемолізатах порівняно з активністю ензиму в тварин контрольної групи.

Досліджуючи активність лактатдегідрогенази в лізатах еритроцитів крові тварин до відлучення контрольної та обох дослідних груп, встановили приблизно однаковий її рівень. Однак, вже на 3-тю добу після відлучення поросят від свиноматок відбувається збільшення активності досліджуваного ензиму в крові тварин 2-ї дослідної групи на 23% порівняно з активністю ензиму в тварин контрольної групи (табл. 7).

Таблиця 5. Вміст глюкози у плазмі крові, ммоль/л ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 дів до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	4,88±0,46	7,48±0,24	6,48±0,42	6,09±0,10	5,65±0,07
1-ша дослідна	5,73±0,12	6,32±0,16**	5,48±0,10**	5,34±0,17***	5,43±0,04
2-га дослідна	4,94±0,14	6,42±0,07***	5,47±0,05**	5,46±0,20**	5,43±0,05

Таблиця 6. Активність гексокінази в лізатах еритроцитів крові, нмоль/(хв · мг протеїну) ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 дів до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	1,85±0,06	1,57±0,21	1,33±0,10	1,38±0,09	1,38±0,09
1-ша дослідна	1,84±0,08	1,84±0,07	1,51±0,20	1,56±0,09	1,40±0,19
2-га дослідна	1,54±0,02	1,88±0,12*	1,66±0,18	1,55±0,01	1,55±0,21

Таблиця 7. Активність лактатдегідрогенази в лізатах еритроцитів крові, нмоль/(хв · мг протеїну) ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	12,7±1,59	10,6±0,46	8,1±0,03	4,7±0,23	8,6±0,83
1-ша дослідна	11,7±0,40	11,6±0,49	10,2±0,02***	6,5±0,29**	10,5±0,29
2-га дослідна	14,2±0,71	13,2±0,65*	11,6±0,78**	5,9±0,62	10,3±0,52

На 10- і 20-ту добу після відлучення поросят від свиноматок у першій та другій дослідних групах активність лактатдегідрогенази достовірно перевищує на 25–40% відповідні показники в гемолізатах тварин контрольної групи.

Порівняння рівня активності лактатдегідрогенази між 1-ю та 2-ю дослідними групами показує, що активність досліджуваного ензиму дещо більша у тварин 2-ї дослідної групи порівняно з поросятами 1-ї дослідної групи. Особливо яскраво ці зміни виражені на 3-тю та 10-ту добу після відлучення, що можна пояснити дією природно-синтезованих біокомплексів Cr(III).

Збільшення активності гексокінази та лактатдегідрогенази в лізатах еритроцитів під впливом препарату культуральної рідини дріжджів, що містить біокомплекси хрому, свідчить про посиленій гліколіз у зв'язку з енергетичними потребами. Механізм посилення активності досліджуваних ензимів вуглеводневого обміну під впливом хрому пояснюється активуванням цієї ланки обміну речовин інсуліном.

Важливу роль в живому організмі відіграє пентозофосфатний шлях розщеплення глюкози, де утворюються NADPH та пентози. Дослідження активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в лізатах еритроцитів

крові поросят не виявило міжгрупових достовірних розбіжностей у тварин обох дослідних та контрольної груп на всіх етапах досліджень (табл. 8).

У період відлучення поросят від свиноматок спостерігається досить високий рівень активності антиоксидантних ензимів у крові. Очевидно, це пов'язано з активацією обмінних процесів, зміною парціального тиску кисню в тканинах поросят і необхідністю запобігання посиленню процесів пероксидного окиснення ліпідів за цих умов.

Ключовим ензимом у ланці ензиматичного антиоксидантного захисту є супероксиддисмутаза, яка каталізує дисмутацію супероксиду в кисень і пероксид водню. Активність ензиму в лізатах еритроцитів крові поросят достовірно не відрізнялась у тварин контрольної та обох дослідних груп упродовж усього періоду досліджень (табл. 9). Це, у свою чергу, можна пояснити відсутністю в дослідних групах тварин надлишкового утворення токсичних радикалів $O_2^{\cdot-}$.

Пероксид водню як побічний продукт окисних реакцій знешкоджується каталазою. Рівень активності ензиму в лізатах еритроцитів крові поросят контрольної та обох дослідних груп за 5 діб до відлучення від свиноматок однаковий, без достовірних змін (табл. 10).

Таблиця 8. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в лізатах еритроцитів крові, нмоль/(хв · мг протеїну) ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	6,56±0,099	5,39±0,169	5,37±0,155	4,77±0,226	4,77±0,226
1-ша дослідна	5,92±0,281	5,16±0,572	5,37±0,330	4,43±0,236	4,43±0,236
2-га дослідна	6,26±0,224	6,23±0,282	5,48±0,093	4,32±0,147	4,32±0,147

Таблиця 9. Активність супероксиддисмутази в лізаті еритроцитів крові, ум. од./мг протеїну ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	15,5±0,36	8,6±0,34	10,3±0,87	16,9±0,55	14,9±0,08
1-ша дослідна	17,5±0,89	7,9±0,59	12,2±1,75	13,5±2,64	14,9±0,15
2-га дослідна	15,5±0,33	8,9±0,57	13,5±1,46	13,2±1,20	14,8±0,12

Таблиця 10. Активність каталази в лізатах еритроцитів крові, ммоль/(хв · мг протеїну) ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	3,55±0,33	3,65±0,23	2,99±0,02	2,82±0,04	2,82±0,03
1-ша дослідна	3,62±0,40	4,53±0,07**	3,52±0,20*	2,81±0,07	2,80±0,02
2-га дослідна	3,57±0,08	4,22±0,04**	3,52±0,02***	2,87±0,19	2,81±0,13

Після відлучення поросят від свиноматок активність каталази достовірно більша на 15–24% в крові тварин 1-ї та 2-ї дослідних груп на 3-тю та 10-ту добу порівняно з активністю в крові тварин контрольної групи.

Важливою ланкою в ензиматичній системі антиоксидантного захисту є глутатіонпероксидаза, яка каталізує реакції усунення токсичних гідропероксидів за допомогою їх редукції глутатіоном. Встановлено, що на 3-тю і 10-ту добу після відлучення поросят активність ензиму в гемолізатах тварин 1-ї та 2-ї дослідних груп достовірно зростає на 14 — 20% відносно аналогічної активності у тварин контрольної групи (табл. 11).

Збільшення активності ензимів антиоксидантного захисту в еритроцитах крові поросят дослідних груп свідчить про поліпшення функціонального стану ензиматичної ланки антиоксидантного захисту за умов згодування біологічно активних форм хрому.

Основним компонентом глутатіонової системи антиоксидантного захисту є відновлений глутатіон. Встановлено, що після відлучення поросят від свиноматок концентрація відновленого глутатіону в лізатах еритроцитів нижча, ніж до відлучення (табл. 12). Проте у поросят 1-ї та 2-ї дослідних груп на 3-тю, 10- і 20-ту добу після відлучення концентрація відновленого глутатіону в гемолізатах є достовірно більшою порівняно

з його концентрацією у поросят контрольної групи. Поряд із цим, зіставляючи міжгрупові різниці показників 1-ї та 2-ї дослідних груп, виявили, що вміст відновленого глутатіону в тварин 1-ї дослідної групи дещо більший, ніж у поросят 2-ї дослідної групи.

Збільшення концентрації відновленого глутатіону, беззаперечно, є позитивним ефектом, що може забезпечити потреби ензиматичної ланки антиоксидантного захисту у вмісті активного антиоксиданту, для знешкодження токсичних інтермедіатів оксидативних процесів, особливо під час стресових станів.

Таким чином, одержані результати досліджень дають підстави вважати можливим використання продуктів життєдіяльності дріжджів, що багаті на біокомплекси з хромом, як джерела цього мікроелемента в раціоні свиней. Встановлено, що введення культуральної рідини, яка містить біокомплекси хрому до раціону поросят, сприяє активації процесів синтезу протеїну, гліколізу та системи антиоксидантного захисту в крові. Водночас не було виявлено різниці в показниках між тваринами обох дослідних груп, що свідчить про можливість використання препаратів культуральної рідини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, інкубованих попередньо з хроматом Cr(VI) та хромом Cr(III), як компонента кормів у годівлі молодняка сільськогосподарських тварин.

Таблиця 11. Активність глутатіонпероксидази в лізатах еритроцитів крові, мкмоль/(хв · мг протеїну) ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	51,1±3,91	45,0±1,76	46,8±2,36	33,7±1,60	33,9±1,32
1-ша дослідна	52,5±1,77	52,6±1,48**	54,5±2,02*	33,0±1,33	33,1±1,15
2-га дослідна	46,6±2,06	54,0±0,89**	53,8±2,15*	32,0±1,02	32,6±0,84

Таблиця 12. Вміст відновленого глутатіону в лізатах еритроцитів крові, ммоль/л ($M \pm m, n = 3$)

Група	За 5 діб до відлучення	Доба після відлучення			
		3-тя	10-та	20-та	30-та
Контрольна	0,88±0,02	0,36±0,006	0,44±0,02	0,35±0,01	0,49±0,02
1-ша дослідна	0,89±0,03	0,56±0,08**	0,52±0,01**	0,47±0,01***	0,53±0,01
2-га дослідна	0,87±0,02	0,42±0,01**	0,54±0,02**	0,44±0,02**	0,52±0,01

ЛІТЕРАТУРА

1. *Alcedo J. A., Wetterhahn K. E.* Chromium toxicity and carcinogenesis // *Int. Rev. Exp. Pathol.* — 1990. — N 31. — P. 85–108.
2. *Anderson R. A.* Stress effects on chromium nutrition of human and farm animals // *Biotechnology in the Feed Industry. Proc. Alltech's 10th Annual Symposium.* (T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds). — Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK. — 1994. — P. 267–274.
3. *De Flora S., Wetterhahn K. E.* Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity // *Life Chem. Rep.* — 1989. — N 7. — P. 169–244.
4. *Boleman S. L., Boleman S. J., Bidner T. D. et al.* Effect of chromium tripicolinate on growth, body composition, and tissue accretion in pigs // *J. Anim. Sci.* — 1995. — N 73. — P. 2033–2042.
5. *Сологуб Л. І., Антоняк Г. Л., Бабич Н. О.* Хром в організмі людини і тварин. Біохімічні, імунологічні та екологічні аспекти. — Львів: Євровіт, 2007. — 128 с.
6. *Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S. et al.* Interactions of chromium with microorganisms and plants // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2001. — V. 25, N 3. — P. 335–347.
7. *Plus R.* Chromium. Mineral Levels in Animal Health. — British Columbia, Canada: Sherpa International, 1988. — P. 61–62.
8. *Mertz W.* Chromium in human nutrition: A review // *J. Nutr.* — 1993. — V. 123. — P. 626–633.
9. *Ksheminska H., Fedorovich D., Honchar T. et al.* Yeast tolerance to chromium depends on extra-cellular chromate reduction and Cr(III)-chelation // *Food Technol. Biotechnol.* — 2008. — V. 46, N 4. — P. 420–427.
10. *Ksheminska H. P., Honchar T. M., Gayda G. Z., Gonchar M. V.* Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures // *Cent. Eur. J. Biol.* — 2006. — V. 1, N 1. — P. 137–149.
11. *Desmoulin B., Aumaitre A., Peiniau J.* Influence du poids a 10 jours et de l'age a la castration des porcelets males sur la croissance et la qualite des carcasses a l'abattage // *Ann. Zootech.* — 1990. — V. 39. — P. 219–227.
12. *Hardy B.* Diets for young pigs // *Neonatal survival and growth. Occasional Publication no. 15.* British Society of Animal production, UK. — 1992. — P. 99–107.
13. *Pluske J. R., Williams I. H., Aherne F. X.* Nutrition of the neonatal pig. // *Development and survival.* CAB International, Wallingford, UK. — 1995. — P. 187–235.
14. *Kitchalong L., Fernandez J. M., Bunting L. D. et al.* Chromium picolinate supplementation in lamb rations: effects on performance, nitrogen balance, endocrine and metabolic parameters // *J. Anim. Sci.* — 1993. — V. 71 (Suppl. 1) — P. 291.
15. *Bunting L. D., Fernandez J. M., Thompson Jr. D. L. et al.* Influence of chromium picolinate on glucose usage and metabolic criteria in growing Holstein calves // *Ibid.* — 1994. — V. 72 — P. 1591–1599.
16. *Amoikon E. K., Fernandez J. M., Southern L. L. et al.* Effect of chromium tripicolinate on growth, glucose tolerance, insulin sensitivity, plasma metabolites, and growth hormone in pigs // *Ibid.* — 1995. — V. 73 — P. 1123–1130.
17. *Anderson R. A.* Chromium. Trace elements in human and animal nutrition // *Academic Press, Inc., New York, NY.* — 1987. — V. 1. — P. 225–244.
18. *Mertz W.* Chromium in human nutrition: a review // *J. Nutr.* — 1993 — V. 123. — P. 626–633.
19. *Mowat D. N., Chang X., Yang W. Z.* Chelated chromium for stressed feeder calves // *Can J. Anim. Sci.* — 1993 — V. 73 — P. 49–55.
20. *Chang, X., Mowat D. N.* Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves // *Ibid.* — 1992. — V. 70 — P. 559–565.
21. *Moonsie-Shageer S., Mowat D. N.* Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents, and immune status of stressed feeder calves // *Ibid.* — 1993. — V. 71 — P. 232–238.
22. *Honchar T. M., Ksheminska H. P., Patsay I. O. et al.* Assay of chromium(III) in microbial cultures using Chromazurol S and surfactants // *Біотехнологія.* — 2008. — Т. 1, N 4. — P. 64–67.
23. *Калашников А. П., Фисинин В. И., Щеголов В. В. и др.* Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных. Справочник. — М.: Россельхозакадемия, 2003. — 456 с.
24. *Fedorovych D. V., Gonchar M. V., Ksheminska H. P. et al.* Mechanisms of chromate detoxification in yeasts // *Microbiol. Biotechnol.* — 2009. — N 7. — P. 15–21.
25. *Влізло В. В., Федорук Р. С., Макара І. А. та ін.* Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині. Довідник. — Львів: ВМС, 2004. — 400 с.
26. *Понд У. Д., Хаунт К. А.* Биология свиньи: Пер. с англ. — М.: Колос, 1983. — 334 с.
27. *Cefalu W. T., Hu F. B.* Role of chromium in human health and in diabetes // *Diabetes Care.* — 2004. — V. 27, N 11. — P. 2741–2751.

**МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
КРОВИ ПОРОСЯТ ПРИ СКАРМЛИВАНИИ
ИМ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ
ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*,
СОДЕРЖАЩЕЙ БИОКОМПЛЕКСЫ ХРОМА**

*Р. Я. Искра*¹
М. В. Гончар^{2,3}
Г. И. Нечай^{1,2}
*И. Я. Максимович*¹

¹Институт биологии животных
НААН Украины, Львов

²Институт биологии клетки НАН Украины,
Львов

³Загородный факультет биотехнологии,
Жешувский университет, Кольбушова, Польша

E-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

В естественной среде хром находится преимущественно в двух валентных состояниях: шести- (хроматы и бихроматы) и трехвалентном (соединения Cr³⁺). Хроматы широко используют в промышленности, в процессах производства стали, сплавов чугуна, обработки древесины и дубления кожи. В литературе есть много данных о токсичном, мутагенном и канцерогенном действии Cr(VI).

Выяснено действие Cr(III) из культуральной жидкости дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на обмен протеинов и углеводов, а также систему антиоксидантной защиты в крови поросят в период отлучения от свиноматок. Установлено, что введение в рацион поросят культуральной жидкости, которая содержит биокомплексы хрома, способствует уменьшению содержания мочевины и глюкозы в плазме крови, увеличению концентрации общего протеина, активности лактатдегидрогеназы, каталазы и глутатионпероксидазы и содержания восстановленного глутатиона в эритроцитах крови. Не было выявлено существенных различий между показателями у животных, которым скармливали культуральную жидкость дрожжей, содержащую Cr(III) в форме естественно-синтезированных биокомплексов, и жидкость, в состав которой входил хелатированный Cr(III).

Ключевые слова: поросята, дрожжи, биокомплексы хрома, протеин, лактатдегидрогеназа, энзимы антиоксидантной защиты.

**METABOLIC INDICES OF PIGLETS BLOOD
AT FEEDING OF CULTURAL LIQUID
OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae*
CONTAINING CHROMIUM
BIOCOMPLEXES**

*R. Ya. Iskra*¹
M. V. Gonchar^{2,3}
H. I. Nechay^{1,2}
*I. Ya. Maksymovych*¹

¹Institute of Animal Biology
of the National Academy of Agricultural
Sciences of Ukraine, Lviv

²Institute of Cell Biology of the National
Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

³Branch Campus of the Faculty
of Biotechnology, Rzeszow University,
Kolbuszowa, Poland

E-mail: inenbiol@mail.lviv.ua

In natural environment chrome is mainly in two valency states: six- (chromates and bichromates) and trivalent (Cr³⁺ compounds). Chromates are widely used in industry, in the process of steel production, cast-iron alloys, treatment of wood and leather tanning. There is a lot of information about toxic, mutagenic and carcinogenic action of Cr(VI).

The effect of chromium in cultural liquid of the yeast *Sacharomices cerevisiae* on protein and carbohydrate metabolisms as well as a system of antioxidant protection in piglets' blood after weaning was investigated. It was found that culture liquid addition to the piglets diet containing biocomplexes of chromium led to reduction of urea and glucose in blood plasma, increase of total protein, activity of enzymes lactate dehydrogenase, catalase and glutathione peroxidase and reduced glutathione content in erythrocytes of blood.

No significant differences between animal parameters that were fed culture — liquid of the yeast containing Cr(III) in the form of synthesized biocomplexes and one containing chromium as chelant were found.

Key words: piglets, yeast, chromium, protein, lactate dehydrogenase, antioxidant protection enzymes.

УДК 57.083.1:615.322

ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ЭКСТРАКТОМ *Ungernia victoris*

Т. П. Перерва
А. Ю. Мирюта
А. С. Дворник
Л. П. Можилевская
В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Киев

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Оптимизация состава питательных сред считается одним из способов повышения выхода биомассы бактериальных клеток, а также целевого продукта при культивировании штаммов продуцентов всех видов и назначений. В связи с развитием биотехнологической промышленности все большее значение приобретает поиск новых компонентов питательных сред, их оптимального соотношения с базисным составом среды и соответствия свойствам культивируемого объекта.

Добавление экстракта *Ungernia victoris* к бактериальной питательной среде оптимизирует ее состав и позволяет повысить выход биомассы *E. coli*. На LB-среде статистически достоверное превышение выхода биомассы штаммов M17 и NB101 наблюдается только для более высоких концентраций экстракта (5–10%), в то время как выход биомассы штамма JM109 повышается на всех испытанных концентрациях (0,5–10%). Наиболее высокий выход биомассы всех трех штаммов соответствует концентрации экстракта 10%. Влияние экстракта *U. victoris* на рост бактериальных штаммов на обогащенной среде отличается от его воздействия на эти же штаммы на LB-среде. Прирост биомассы происходит при низких концентрациях экстракта (0,25–1%) и не столь значителен, как на LB-среде. Начиная с концентрации экстракта от 2% и до 10% наблюдается тенденция снижения выхода биомассы для штаммов M17 и NB101 и более низкого прироста биомассы JM109 по сравнению с концентрациями 0,25–1%. Таким образом, при помощи растительного экстракта можно достичь увеличения выхода биомассы бактерий как на бедной, так и на обогащенной среде. Оптимальное количество прибавляемого экстракта колеблется в зависимости от состава среды и особенностей объекта выращивания.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, растительные экстракты, питательные среды.

В последнее время прослеживается четкий переход от эмпирического подхода к выбору среды культивирования с использованием уже готовых наборов различных биотехнологических фирм, в частности Athena Enzyme Systems, Балтимор (США), до систем расчета, позволяющих четко определить количество и оптимальное соотношение отдельных компонентов питательной среды. В качестве примера можно привести метод Плакетт-Бермана (Plackett-Burman design), разработанный еще в 1946 г. [1] и нашедший успешное применение в наши дни [2]. Широкое распространение получил также так называемый метод поверхностного ответа (response surface method), без которого в настоящее время не обходится почти ни одна серьезная биотехнологическая работа, связанная с выращиванием бактериальных культур [3]. Метод позволяет рассчитать наиболее приемлемое количество дополнительного компонента или смеси, вносимых в питательную среду в качестве добавок. Традиционно такими

добавками выступают продукты животного происхождения — кислотные и энзиматические гидролизаты казеина, энзиматические гидролизаты мяса и препараты типа дрожжевого экстракта [4]. Вещества растительного происхождения используют не столь широко, хотя соевый гидролизат находит применение в микробиологической практике, в том числе в медицинской микробиологии, в частности для обнаружения различных O-серотипов *E. coli* в продуктах животного происхождения [5] или наработки плазмидсодержащих штаммов с целью получения рекомбинантного протеина [6]. В бактериологической диагностике коклюша также давно известна и часто применяется картофельно-глицероловая среда [7].

В то же время продукты растительного происхождения, составляющие базис целых отраслей фармакологической, косметологической и пищевой индустрии, еще недостаточно используются в микробиологической практике, несмотря на то, что в них обнаружен ряд биологически

активных веществ, обладающих антибактериальными, антивирусными, антигрибковыми, антипаразитарными, антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами [8–10].

В проведенных нами ранее исследованиях было показано, что экстракты, полученные из биомассы культивированных *in vitro* клеток некоторых лекарственных растений, также обладают антимуtagenной, антиканцерогенной и противоопухолевой активностью, тестируемой в нескольких фаговых и бактериальных системах [11–17]. Кроме обнаружения этой активности мы установили, что компоненты растительных экстрактов связываются с протеинами-поринами наружной мембраны *E. coli* [18], т. е. в соответствии с данными литературы [19, 20] те из них, размер которых не превышает 600 Да, могут проникать внутрь бактериальной клетки через поровые каналы. Биологический эффект таких веществ в этой системе легче всего отследить по изменениям роста и накоплению биомассы бактерий. В данной работе мы изучали накопление биомассы трех штаммов *E. coli* — M17, HB101 и JM109 в присутствии одного из растительных экстрактов, а именно *U. victoris*, выбранного нами, поскольку его свойства, в том числе и механизм проникновения в бактериальную клетку, были наиболее детально исследованы нами ранее [11, 13, 17, 18]. С одной стороны, повышение выхода биомассы могло бы свидетельствовать о включении в бактериальный метаболизм мелких гидрофильных компонентов растительного экстракта, а с другой — дало бы основание рассматривать растительный экстракт как добавку к питательной среде, оптимизирующую качество последней.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использованы штаммы *E. coli* M17 (колибактерин — аптечный препарат) и два лабораторных штамма JM109 — e14(McrA⁻) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk⁻ mk⁺) surE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^cZΔM15] и HB101 — supE44 ara14 galK2 lacY1 Δ(gpt-proA)62 rpsL20 (Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ(mcrC-mrr) HsdS⁻(r⁻ m⁻), полученных из Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино-на-Оке (Россия).

Питательные среды. Бактерии выращивали на питательной среде LB (Luria-Bertani) [21] или на обогащенной питательной среде M9 [21] следующего состава: на 1 л среды триптона — 10 г; дрожжевого экстракта — 5 г; Na₂HPO₄ — 6 г; KH₂PO₄ — 3 г; NH₄Cl — 1 г; NaCl — 0,5 г; 1M MgSO₄ — 2 мл; 1M CaCl₂ — 0,1 мл; 20% -й глюкозы — 10 мл.

Растительный экстракт прибавляли до концентрации 0,5–10% для среды Luria-Bertani и 0,25–10% для среды на солевой основе M9. Диапазон концентраций был подобран так, чтобы в него вошли как низкие концентрации (0,25–1%), наиболее приемлемые для технологического выращивания, так и высокие (2–10%), важные с точки зрения максимального влияния экстракта в составе бедной и обогащенной сред. Каждую культуру выращивали в течение 18–24 ч при 37 °С, после чего ресуспендировали в соотношении 1:100 в такой же питательной среде, распределяли по пробиркам и вносили растительный экстракт в заданных концентрациях. В качестве контроля использовали эту же бактериальную суспензию, но без экстракта. После этого все культуры выращивали в течение 18–24 ч при температуре 37 °С с аэрацией.

Растительный экстракт получали в виде 40% -й этанольной вытяжки, используя конечное соотношение спирт : биомасса — 3 : 1. Экстракт упаривали при помощи вакуумно-ротационного испарителя при температуре 40 °С почти до сухого остатка и растворяли в стерильной дистиллированной воде до исходного объема. Как источник экстракта использовали биомассу клеток *Ungernia victoris* Vved. ex Artjuschenko из семейства *Amaryllidaceae* (штамм UV-2, коллекционный № 10, ККК ИМБиГ НАН Украины, Киев) — далее экстракт *U. victoris*.

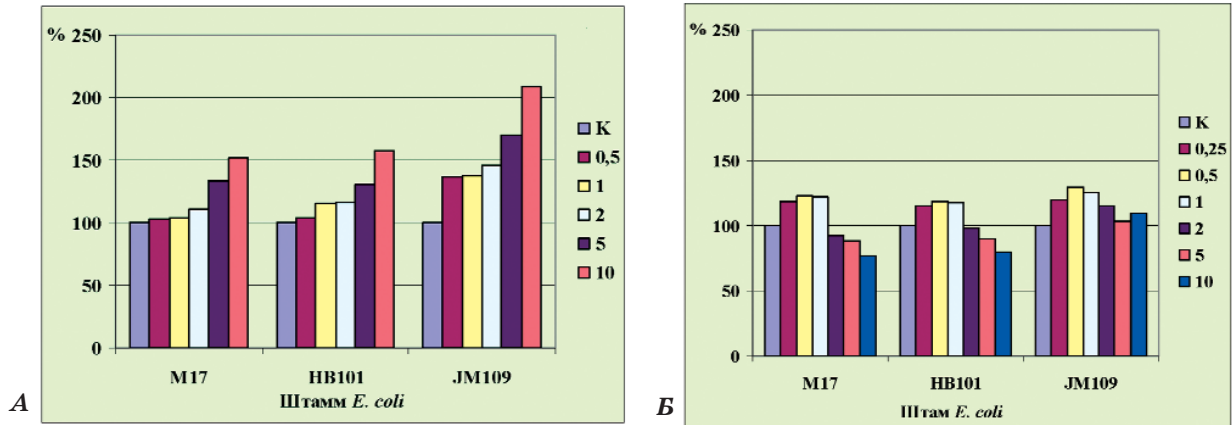
Статистическая обработка данных. Результаты опытов обрабатывали статистически на основании общепринятых методов [22].

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов по влиянию экстракта *U. victoris* на выход биомассы *E. coli* представлены на рисунке.

Как следует из приведенных данных, добавление экстракта *U. victoris* к обеим средам приводит к статистически достоверному повышению выхода биомассы всех трех использованных штаммов. Это свидетельствует о влиянии растительного экстракта на метаболизм бактерий и подтверждает возможность проникновения его компонентов внутрь неповрежденной бактериальной клетки.

Таковыми компонентами могут быть моносахариды, представленные у рода *Ungernia* галактозой, глюкозой, маннозой, арабинозой, рамнозой, а также ряд микроэлементов, в том числе Cu, Zn, Co, Mn, Mo, Al, количество которых зависит от состава почвы или искусственной питательной среды для выращивания культуры клеток *in vitro* [23].



Влияние экстракта *Ungernia victoris* на выход биомассы штаммов M17, HB101 и JM109 на среде LB (A) и на обогащенной среде на солевой основе M9 (B):

по оси ординат даны значения прироста биомассы бактериальных клеток, выраженные в % относительно контрольного варианта (К), выращенного на питательной среде без прибавления растительного экстракта. Столбики разных цветов соответствуют вариантам питательной среды с содержанием экстракта в диапазоне 0,25–10% от объема

Мелкие гидрофильные компоненты растительных экстрактов могут быть представлены также ди- и трисахаридами и аминокислотами. В предшествующей работе [18] мы показали, что экстракт *U. victoris*, полученный нашим методом, содержит протеиновых веществ 4,25 мг/мл, углеводов 15,5 мг/мл и алкалоидов 0,25 мг/мл. Молекулы массой не более 600 Да проникают в бактериальную клетку через каналы протеинов-поринов [19, 20], что влечет за собой эффекты самого различного и даже противоположного характера, например падение рецепторной активности клетки для OmpC- и OmpF-зависимых бактериофагов и повышение ее для ЛПС-зависимых. Последнее свидетельствует о включении компонентов растительного экстракта в углеводный обмен бактериальной клетки, что, очевидно, сказывается и на уровне выхода биомассы выращиваемой культуры.

Установлено, что на среде LB превышение выхода биомассы наблюдается при более высоких концентрациях экстракта для штаммов M17 и HB101 (5–10%), тогда как статистически достоверное превышение биомассы штамма JM109 происходит на всех испытанных концентрациях экстракта (от 0,5 до 10%) с тенденцией постепенного увеличения выхода от низких концентраций экстракта к высоким. Наиболее высокий выход биомассы всех трех штаммов на LB-среде соответствует концентрации экстракта *U. victoris* 10%. Такой эффект можно объяснить, очевидно, составом LB-среды, которая содержит только компоненты, необходимые для поддержания жизнедеятельности бакте-

рий, но в ней отсутствуют источники углерода и буферной системы; обогащение такой среды существенно повышает ее способность обеспечивать прирост бактериальной биомассы. Что касается разницы, наблюдаемой в ответе штамма JM109 по сравнению со штаммами M17 и HB101, то наиболее вероятно, что она обусловлена особенностями генетической структуры и физиологическими свойствами этих штаммов.

Влияние экстракта *U. victoris* на рост бактериальных штаммов на обогащенной среде отличается от его воздействия на эти же штаммы на LB-среде. Прирост биомассы наблюдается при низких концентрациях экстракта (0,25–1%) и не столь значителен, как на LB-среде. Начиная с концентрации экстракта от 2% и до 10% прослеживается тенденция снижения выхода биомассы для штаммов M17 и HB101 и более низкий прирост биомассы JM109 по сравнению с концентрациями 0,25–1%. Этот результат подтверждает многочисленные данные, согласно которым существует некий оптимум насыщения среды питательными компонентами, превышение которого быстро приводит к угнетению роста культуры из-за накопления в среде продуктов ее жизнедеятельности [24]. Интересно, что, как и на LB-среде, штамм JM109 более активно накапливает свою биомассу, что указывает на связь этого показателя с эффектом обогащения питательной среды и генетической организацией выращиваемого объекта.

Несмотря на то, что в данной работе мы отслеживаем только прирост биомассы, а не наработку целевого протеина, есть достаточ-

ные основания считать, что эти два параметра хорошо коррелируют между собой. Так, сравнение выхода биомассы клеток и рекомбинантного протеина вируса Денге на средах LB, TB (триптонный бульон), SB (бульон на соевом гидролизате) и TY (триптон + дрожжевой экстракт) показало, что повышение выхода целевого протеина четко соответствует приросту клеточной биомассы на единицу объема среды [6].

Таким образом, при помощи растительного экстракта можно достичь увеличения

выхода биомассы многих бактериальных штаммов на средах разнообразного состава, хотя очевидно, что оптимальное количество прибавляемого экстракта будет колебаться в зависимости от состава базисной среды и особенностей объекта выращивания.

Исходя из полученных в настоящей работе данных, можно предположить также, что не только экстракт *U. victoris*, но и другие растительные экстракты способны оказывать стимулирующее влияние на рост многих бактериальных культур и могут успешно использоваться в промышленной микробиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Plackett R. L., Burman J. P. The design of optimum multifactorial experiments // *Biometrika*. — 1946. — V. 33, N 4. — P. 305–322.
2. Deshmukh D. V., Puranik P. R. Application of Plackett-Burman design to evaluate media components affecting antibacterial activity of alkaliphilic *Cyanobacteria* isolated from Loran lake // *Turk. J. Biochem.* — 2010. — V. 35, N 2. — P. 114–120.
3. Adinarayana K., Ellaiyah P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus sp* // *J. Pharmaceut. Sci.* — 2002. — V. 5, N 3. — P. 272–278.
4. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. — М.: Мир, 1967. — 367 с.
5. Catarama T. M. G., O'Hanlon K. A., Duffy G. et al. Optimization of enrichment and plating procedures for the recovery of *Escherichia coli* 0111 and 026 from minced beef // *J. Appl. Microbiol.* — 2003. — V. 95. — P. 949–957.
6. Tripathi N. K., Shrivastva A., Biswal K. S., Lakshmana Rao P. V. Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli* // *Industr. Biotechnol.* — 2009. — V. 5, N 3. — P. 179–183.
7. Лабинская А. С. Практическое руководство по микробиологическим методам исследования. — М.: Гос. издат. мед. лит., 1963. — 463 с.
8. Hayatsu H., Negishi T., Arimoto S. Dietary inhibitors against mutagenesis and carcinogenesis // *Proc. Third Intern. Conf. Mech. Antimutag. Anticarcin.* — Plenum Press, New York. — 1993. — P. 387–418.
9. Ikken Y., Morales P., Maetinez A. et al. Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test // *J. Agr. Food Chem.* — 1999. — V. 47. — P. 3257–3264.
10. Negi P. S., Jayaprakash G. K., Jena B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts // *Food Chem.* — 2003. — V. 80. — P. 393–397.
11. Дворник А. С., Перерва Т. П., Кунах В. А. Скринінг препаратів, отриманих із культури тканин лікарських рослин, на антимутагенну активність у системі *Escherichia coli* — бактеріофаг λ // *Цитология и генетика*. — 2002. — Т. 36, № 2. — С. 3–10.
12. Мирюта Г. Ю., Дворник А. С., Можилевська Л. П., Перерва Т. П. Вивчення біологічної активності рослинних екстрактів у системі трансформації *Escherichia coli* плазмідною ДНК // *Biopolymers and Cell*. — 2003. — V. 19, N 6. — С. 525–529.
13. Дворник А. С., Перерва Т. П., Можилевська Л. П., Кунах В. А. Вивчення активності рослинних екстрактів у системі нестабільних мутантів *Escherichia coli* // *Цитология и генетика*. — 2004. — Т. 38, № 4. — С. 9–13.
14. Мирюта А. Ю., Перерва Т. П., Можилевська Л. П., Кунах В. А. Влияние экстракта культивируемых клеток *Ungernia victoris* и катионов некоторых металлов на эффективность трансформации клеток *Escherichia coli* плазмидной ДНК // *Там же*. — 2005. — Т. 39, № 6. — С. 34–40.
15. Перерва Т. П., Мирюта А. Ю., Можилевская Л. П. Бактериальная тест-система для первичного скрининга препаратов на антиканцерогенную и антимутагенную активность // *Вісник Укр. т-ва генетиків і селекціонерів*. — 2007. — Т. 5, № 1–2. — С. 55–61.
16. Перерва Т. П., Дворник А. С., Мирюта А. Ю. и др. Бактериальная тест-система для первичного скрининга веществ с потенциальной противоопухолевой активностью // *Цитология и генетика*. — 2007. — Т. 41, № 4. — С. 59–65.
17. Мирюта А. Ю., Перерва Т. П. Биологическая активность экстракта *Ungernia victoris* в системе CaCl_2 — трансформации *Escherichia coli* в присутствии модуляторов кальциевых каналов // *Там же*. — 2008. — Т. 42, № 4. — С. 45–48.
18. Перерва Т. П., Мирюта А. Ю., Мойса Л. Н. и др. Взаимодействие растительных экстрактов *Ungernia victoris*, *Rhodiola rosea* и *Polyscias filicifolia* с бактериальной клеткой // *Там же*. — 2010. — Т. 44, № 4. — С. 34–40.
19. Nicaido H., Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability // *Microbiol. Rev.* — 1985. — P. 1–32.
20. Benz R., Bauer K. Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-ne-

- gative bacteria. Review on bacterial porins // Eur. J. Biochemistry. — 1988. — V. 176. — P. 1–19.
21. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
22. Плохинский Н. А. Биометрия. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. — 367 с.

23. Хамидходжаев С. А. Лекарственные растения рода унгернии в Средней Азии // «ФАН» Узб. ССР. — 1982. — 148 с.
24. Lee S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* // Trends Biotechnol. — 1996. — V. 14, N 1. — P. 98–105.

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ЕКСТРАКТОМ *Ungernia victoris*

Т. П. Перерва, Г. Ю. Мирюта,
А. С. Дворник, Л. П. Можилевська,
В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології та генетики
НАН України, Київ

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Оптимізація складу живильних середовищ вважається одним із засобів підвищення виходу біомаси бактеріальних клітин, а також цільового продукту при культивуванні штамів продуцентів усіх видів і призначень. У зв'язку з розвитком біотехнологічної промисловості дедалі більшого значення набуває пошук нових компонентів живильних середовищ, їх оптимального співвідношення з базисним складом середовища і відповідності властивостям культивованого об'єкту.

Додавання екстракту *Ungernia victoris* до бактеріального живильного середовища оптимізує його склад і дає змогу підвищити вихід біомаси *E. coli*. На LB-середовищі статистично достовірне перевищення виходу біомаси штамів M17 та HB101 спостерігається тільки для вищих концентрацій екстракту (5–10%), тоді як вихід біомаси штаму JM109 підвищується на всіх випробуваних концентраціях (0,5–10%). Найвищий вихід біомаси всіх трьох штамів відповідає концентрації екстракту 10%. Вплив екстракту *U. victoris* на ріст бактеріальних штамів на збагаченому середовищі відрізняється від його впливу на ці самі штами на LB-середовищі. Приріст біомаси відбувається за низьких концентрацій екстракту (0,25–1%) і не такий значний, як на LB-середовищі. Починаючи з концентрації екстракту від 2% і до 10% спостерігається тенденція зниження виходу біомаси для штамів M17 та HB101 і нижчого приросту біомаси JM109 порівняно з концентраціями 0,25–1%. Таким чином, за допомогою рослинного екстракту можна досягти підвищення виходу біомаси бактерій як на бідному, так і на збагаченому середовищі. Оптимальна кількість доданого екстракту коливається залежно від складу середовища та особливостей об'єкта вирощування.

Ключові слова: *Escherichia coli*, рослинні екстракти, живильні середовища.

OPTIMIZATION OF BACTERIAL NUTRIENT MEDIA BY *Ungernia victoris* EXTRACT

T. P. Pererva, A. Yu. Miryuta,
A. S. Dvornik, L. P. Mozhylevskaya,
V. A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: kunakh@imbg.org.ua

Optimization of culture media is considered to be one of the ways to increase biomass output of bacterial cells as well as a base product at cultivation of all types and purposes.

In connection with the development of the biotechnology industry, search of the new components of nutrient solution and their optimum ratio with the base composition of the medium and corresponding properties of the cultivated object is becoming increasingly important.

Addition of *Ungernia victoris* extract to bacterial nutrient medium optimizes its composition and enables to increase production of *E. coli* biomass. Statistical reliable exceeding of biomass production of M17 and HB101 strains in LB medium occurs only at higher concentrations of extract (5–10%) while biomass production of JM109 strain increases at all tested concentrations (0,5–10%). The highest biomass yield of all three strains corresponds to extract concentration of 10%. The influence of *U. victoris* extract on growth of bacterial strains in enriched medium differs from its influence on the same strains in LB medium. Biomass increase happens at low concentrations of extract (0.25–1%) and it is not such significant as its increase in LB medium. Starting with extract concentration from 2% and to 10%, the tendency towards biomass decrease for M17 and HB101 strains and lower biomass increase for JM109 strain as compared with 0.25–1% concentrations takes place. Thus, it is possible to get improvement of bacterial biomass production by means of plant extract using both poor and enriched medium. Optimal quantity of the added extract fluctuates depending on medium composition and peculiarities of object of growth.

Key words: *Escherichia coli*, plant extracts, nutrient media.

СУПЕРСИНТЕЗ РОЗЧИННОГО ПРОТЕЇНУ — ПРОДУКТУ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА, ЩО МІСТИТЬ ІМУНОДОМІНАНТНІ ДІЛЯНКИ ГЛІКОПРОТЕЇНУ G ВІРУСУ ГЕРПЕСУ 2-ГО ТИПУ, У БАКТЕРІЙНІЙ СИСТЕМІ *Escherichia coli*

Л. М. Коршун¹
Л. М. Мойса¹
Г. В. Ковтонюк¹
Л. О. Ганова^{1,2}
О. К. Кисельова¹
М. Я. Співак²

¹АТЗТ НВК «Діапроф-Мед», Київ

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

E-mail: KL2004@ukr.net

На сьогодні в усьому світі значно зросла розповсюдженість інфекцій, спричинених вірусами простого герпесу типів 1 та 2. Захворювання, спричинені вірусом герпесу 2-го типу, проходять у більш тяжкій формі, з частішими рецидивами та ускладненнями порівняно з тими, які зумовлені збудником 1-го типу. Тому при проведенні клініко-лабораторних досліджень важливого значення набуває диференційна діагностика між цими двома типами вірусу.

Мета роботи полягала в оптимізації умов бактеріальної експресії рекомбінантного протеїну, що містить імунодомінантні ділянки глікопротеїну G вірусу простого герпесу 2 типу, в клітинах *Escherichia coli* та отримання високоочищеного препарату, придатного для використання у складі імуносорбенту при розробленні діагностичних тест-систем.

Встановлено, що рекомбінантний поліпептид накопичується у клітинах бактерій як у розчинній формі, так і у вигляді тілець включень. Показано вплив складу живильного середовища, температури експресії та концентрації ППТГ на рівень накопичення гетерологічного протеїну та його імунохімічні властивості. Зменшення концентрації ППТГ до 0,1 мМ за температури культивування продуцента при 37 °С із використанням середовища ТВ (1,2% бактотриптон, 2,4% дріжджового екстракту, 55 мМ гліцеролу, 17 мМ КН₂РО₄, 72 мМ К₂НРО₄, рН 7,2) дає змогу досягти найвищого показника біосинтезу розчинного протеїну.

Цільовий продукт очищали з використанням технологій афінної хроматографії. Питомий вихід очищеного протеїну із клітинного супернатанта за оптимізованих умов становив 78,74% від загальної кількості рекомбінантного протеїну в клітині.

Імунохімічні властивості протеїну GST-HSV2gG оцінювали за допомогою імуноензимної тест-системи. Результати досліджень свідчать про перспективність його використання при розробленні тест-систем для діагностики вірусу герпесу 2-го типу.

Ключові слова: рекомбінантні протеїни, експресуючі вектори, вірус простого герпесу людини 2-го типу, імуноензимний аналіз, *Escherichia coli*.

На сьогодні в усьому світі значно зросла розповсюдженість інфекцій, спричинених вірусами простого герпесу типів 1 та 2 (ВПГ-1 та ВПГ-2, відповідно). Згідно зі звітами ВОЗ, у дорослого населення ВПГ-1 виявляється в 98–99%, а ВПГ-2 — у 20–25% [1]. Як свідчать епідеміологічні дослідження, проведені за останні 30 років, поширеність герпетичної інфекції залежить від віку, соціально-економічного статусу досліджуваних осіб, географічного розташування країни тощо [2].

Більшість людей інфіковані одним або двома типами ВПГ, який зберігається в організмі впродовж усього життя. Слід зауважити, що захворювання, спричинені вірусом герпесу 2-го типу, мають більш тяжкий перебіг, з частішими рецидивами та ускладненнями порівняно з тими, які зумовлені збудником 1-го типу [2–4]. Особливу загрозу інфекція становить для вагітних жінок, оскільки в результаті трансплацентарної передачі ВПГ-2 смертність у новонароджених у разі розвитку герпетичних енцефалітів та

менінгітів становить близько 70% [5]. Тому під час проведення клініко-лабораторних досліджень важливого значення набуває диференційна діагностика між цими двома типами вірусу.

Встановлено, що геноми ВПГ-1 та ВПГ-2 мають 83% гомології ДНК, що призводить до ідентичності 85% амінокислотної послідовності деяких протеїнів. Так, ВПГ-1 та ВПГ-2 містять у складі оболонки 11 глікопротеїнів [6, 7], що дають перехресну реактивність, яка ускладнює серологічну діагностику захворювань. Відкриття глікопротеїну G (gG) у середині 1980-х років дозволило вирішити цю проблему завдяки типоспецифічним розбіжностям у структурі цього протеїну для ВПГ-1 та ВПГ-2 [6–8].

Сучасна діагностика ВПГ ґрунтується на прямому виділенні вірусу з клінічного матеріалу, а також на серологічних методах. Ідентифікацію вірусу проводять з використанням культур клітин або лабораторних тварин. Однак останні методи є досить трудомісткими, високовартісними та тривалими і не завжди можуть бути типоспецифічними щодо ВПГ-1 та ВПГ-2. Серед рутинних лабораторних досліджень найпоширенішим є метод твердофазного імуноензимного аналізу (ІЕА), що дає змогу виявляти вірусспецифічні антигени або вірусспецифічні антитіла класів M та G залежно від виду біологічного матеріалу [9].

У процесі розроблення комерційних ІЕА-діагностичних тест-систем як антигени застосовують отримані з лізатів заражених культур нативні протеїни ВПГ або їхні рекомбінантні аналоги [10–12]. Використання лізатних протеїнів забезпечує високу чутливість методу, проте не є високоспецифічним і, крім того, пов'язане з багатьма біологічними ризиками. У сучасному біотехнологічному виробництві для одержання рекомбінантних протеїнів застосовують різні біологічні системи: мікроорганізми, клітинні лінії комах, рослин та ссавців, багатоклітинні організми тощо. Одне з провідних місць серед зазначених об'єктів належить бактеріям *Escherichia coli*. Це зумовлено тим, що генетичні, молекулярно-біологічні, біохімічні та фізіологічні властивості цього мікроорганізму досить детально вивчено, а в разі використання таких штамів-продуцентів рівень біосинтезу цільового протеїну може становити десятки відсотків від сумарних клітинних протеїнів.

Мета роботи полягала в оптимізації умов бактеріальної експресії рекомбінантного протеїну, що містить імунодомінантні

ділянки глікопротеїну G вірусу простого герпесу 2-го типу, у клітинах бактерій *Escherichia coli* та отримання високоочищеного препарату, придатного для використання у складі імуносорбенту при розробленні діагностичних ІЕА тест-систем.

Матеріали і методи

Бактеріальні культури та експресуючі вектори. Штам-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG було створено на основі вектора pET28a (Novagen) клонуванням послідовності глутатіон-S-трансферази (GST) та фрагментів імунодомінантних ділянок глікопротеїну G ВПГ-2 з використанням експресуючої системи реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3) [*E. coli* B F⁻ dcm ompT hsdS (*r_B m_B*) gal λ (DE3)]. В одержаній генно-інженерній конструкції транскрипція клонованого гена контролюється промотором гена 10 фага T7, а біосинтез цільового продукту індукується за допомогою ізопропіл-β-D-тіогалактопіранозиду (ІПТГ).

Готували компетентні клітини та здійснювали їх трансформацію рекомбінантною плазмідною згідно зі стандартними протоколами [13]. Отриману суміш бактерій висівали на агаризоване середовище LB (1% бактотриптон, 0,5% дріжджового екстракту, 1% NaCl, 1,5% агару «Дифко»), що містило селективний антибіотик канаміцин в кінцевій концентрації 25 мкг/мл. Для відбору найбільш продуктивного клону зразки біомас аналізували за допомогою електрофорезу в денатуруючих умовах з використанням 12% ПААГ у присутності 1% SDS з наступним забарвленням гелю розчином Кумасі R-250 за методом Леммлі [14].

Культивування штаму-продуцента. Бактеріальну культуру, вирощену з найпродуктивнішого клону впродовж 16–18 год за температури 30 °C з використанням середовища LB у присутності селективного антибіотика, пересівали на свіже живильне середовище в розведенні 1:30. Подальшу інкубацію клітин проводили при температурі 25 °C і 37 °C в умовах інтенсивного перемішування (220 об/хв) та аерації. Для одержання біомаси продуцента застосовували такі живильні середовища: LB (1% бактотриптон, 0,5% дріжджового екстракту, 1% NaCl, рН 7,2), ТВ (1,2% бактотриптон, 2,4% дріжджового екстракту, 55 мМ гліцеролу, 17 мМ КН₂РО₄, 72 мМ К₂НРО₄, рН 7,2) та середовище № 3 оригінального складу (сольова основа М9 з додаванням 1% гідролізату казеїну, 0,5% дріжджового

екстракту та 1% глюкози, рН 7,4). Динаміку росту бактеріальної культури контролювали, вимірюючи оптичну густину (ОГ) на спектрофотометрі (Ultrospec 2000) за довжини хвилі 600 нм, і на фазі експоненційного росту клітин у живильне середовище додавали ІПТГ для індукції біосинтезу цільового протеїну. Після завершення культивування бактеріальну суспензію збирали центрифугуванням при 8 000 g протягом 10 хв.

Отримання очищеного препарату рекомбінантного протеїну. Для виділення рекомбінантного протеїну осад бактеріальних клітин ресуспендували в лізуючому буфері, що містив 0,1 мг/мл лізоциму, 0,1% Тритону Х-100, 1 мМ PMSF, 0,2 М NaCl, рН 8,0. Клітинну суспензію тричі заморожували-відтаювали, додавали ДНК-азу (Sigma, США) в кінцевій концентрації 6 од/мл у присутності 20 мМ MgSO₄. Після інкубації протягом 1 год бактеріальну суспензію обробляли ультразвуком на дезінтеграторі УЗДН-А (6 разів по 10 с). Надосадову рідину та тільця включень розділяли центрифугуванням при 11 000 g упродовж 25 хв за 10 °С. Тільця включень, попередньо відмиті в буферних розчинах, що містили детергенти (0,5% Тритону Х-100, 0,1% Твін-20), розчиняли в буфері, що містив 8 М сечовини, 20 мМ натрій-фосфату та 0,2 М NaCl, рН 8,0.

Хроматографічне очищення рекомбінантного протеїну здійснювали за допомогою хроматографічної системи Bio-Rad (США) із застосуванням методів іммобілізованої металоафінної хроматографії (IMAX) з використанням сорбенту IDA-toyoperl (TOSOH, Японія), попередньо активованим іонами нікелю згідно з інструкцією фірми-виробника. Елюцію протеїну проводили способом ступінчастої хроматографії з різними концентраціями імідазолу (40–200 мМ). У разі накопичення протеїну в клітинах *E. coli* в розчинному вигляді його подальше доочищення здійснювали методом афінної хроматографії з використанням сорбенту глутатіон-сефарози (Amersham, США), а елюцію — за допомогою розчину 10 мМ відновленого глутатіону і 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Концентрацію протеїну вимірювали біуретовим методом, а якість очищення оцінювали за допомогою електрофорезу в 12%-му ПААГ-SDS.

Оцінювання імунохімічних властивостей протеїнових фракцій. Для тестування застосовували внутрішньовиробничу панель сироваток крові (ВВП, «Діапроф-Мед»), зразки якої містять (16 сироваток) і не містять (14 сироваток) антитіла класів G до

ВІП-2. Усі зразки панелі було попередньо досліджено та підтверджено в імуноензимних тест-системах Herpes Simplex Virus HSV-Type 2 IgG-ELISA (Ltd. Nova Tec, Німеччина) та HSV 2-IgG (Ltd. Immulite, США).

Якісні характеристики рекомбінантного протеїну оцінювали за допомогою тест-системи у форматі непрямого ІЕА. Для приготування імуносорбенту використовували полістиролові 96-лункові планшети (Nunc, Данія), в лунки яких сорбували досліджувані зразки в 50 мМ карбонат-бікарбонатному буфері (рН 9,6). Специфічні імунні комплекси антиген-антитіло виявляли з використанням мишачих моноклональних антитіл, мічених пероксидазою, що розпізнають IgG людини.

Як проявник імуноензимної реакції використовували хромоген тетраметилбензидин (ТМБ), розведений у цитратному буфері з додаванням перексиду водню. Реакцію зупиняли додаванням 0,5 М сірчаної кислоти. ОГ визначали на спектрофотометрі Labsystems Multiskan (Фінляндія) у двоххвильовому режимі 492/620 нм.

Результати ІЕА розраховували за формулою (1):

$$A = (cp.OG^+) / (cut\ off),$$

де в числівнику показник $(cp.OG^+)$ — середнє значення позитивних сироваток, а в знаменнику величина $cut\ off = (cp.OG^-) + 0,2$, де $(cp.OG^-)$ — середнє значення негативних сироваток. Кожну досліджувану сироватку тестували в чотирьох повторах.

Статистичне оцінювання одержаних результатів виконували стандартними методами з використанням *t*-критерію Стьюдента за допомогою програмного забезпечення *Microsoft Excel*.

Результати та обговорення

На основі використання вектора рЕТ28а раніше нами було створено рекомбінантну плазмиду рЕТ28-GST-HSV2gG, продуктом експресії якої в клітинах штаму-реципієнта *E. coli* BL21(DE3) є гібридний поліпептид, що містить афінний тег у вигляді шести гістидинових залишків *His6-tag* та амінокислотну послідовність глутатіон-S-трансферази, зливу з імунодомінантними ділянками глікопротеїну G ВІП-2 (GST-HSV2gG).

На початковому етапі досліджень проводили скринінг трансформованих бактеріальних клітин для відбору найбільш продуктивного клону. Дані електрофореграми (рис. 1) наочно свідчать, що лише у 25% трансфор-

мантів спостерігали суперсинтез цільового продукту. Відібрані клони було перевірено на плазмідну стабільність та величину рівня експресії в ході декількох пересівів культури продуцента.

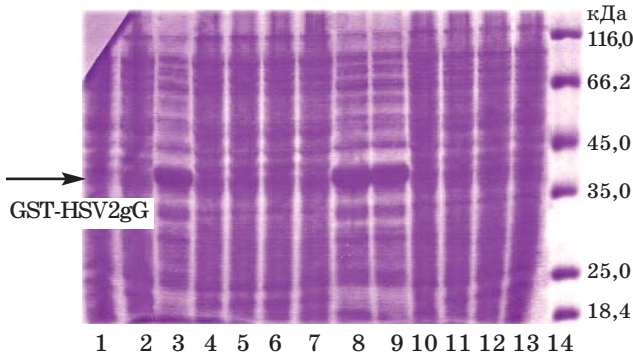


Рис. 1. Електрофореграма зразків біомас клонів-трансформантів *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG, отриманих після індукції 1 мМ IPTG протягом 3,5 год: зразок № 10 — лізат вихідних клітин штаму-реципієнта *E. coli* BL21(DE3); зразок № 14 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

Відомо, що клітини бактерій *Escherichia coli* широко застосовують для одержання рекомбінантних протеїнів як для наукових досліджень, так і з комерційною метою. Проте, незважаючи на велику кількість отриманих знань щодо механізмів біосинтезу та нагромадження гетерологічних протеїнів, а також відомостей про те, що утворення вторинних метаболітів залежить від складу середовища, яке використовують для росту культур мікроорганізмів [15], на думку деяких авторів, ще недостатньо уваги приділяється дослідженням впливу складу живильних середовищ на процес накопичення рекомбінантних протеїнів [16]. У своїх роботах вони переконливо довели, що склад середовища може суттєво впливати як на вихід біомаси і рівень накопичення рекомбінантних протеїнів, так і на їхні якісні характеристики. Тому моніторинг складу середовищ слід розглядати як рутинну частину оптимізації біотехнологічних процесів.

Таблиця 1. Загальний вихід біомаси та очищеного препарату протеїну GST-HSV2gG залежно від типу живильного середовища, використаного для культивування штаму-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG

Тип живильного середовища	Загальний вихід біомаси, г/л	Вихід очищеного протеїну після лізису біомаси, мг/г		Вихід очищеного протеїну, мг/л	
		із супернатанта	із фракції тілець включень	із супернатанта	із фракції тілець включень
LB	2,1	9,6	4,4	19,2	8,8
ТВ	4,0	12,5	4,3	50,0	17,2
Середовище №3	5,1	8,4	5,3	42,8	27,0

Результати наших досліджень повністю підтверджують такий підхід. Встановлено, що склад живильного середовища впливає не лише на загальний вихід біомаси, але й на властивості цільового продукту. Так, згідно з наведеними в табл. 1 даними, вихід біомаси при культивуванні продуцента на середовищі LB за температури 37 °C становив 2,1 г, на середовищі ТВ — 4,0 г, а в разі його вирощування на середовищі № 3 цей показник дорівнював 5,1 г біомаси в розрахунку на 1 л живильного середовища.

Електрофоретичний аналіз протеїнових фракцій, отриманих у процесі виділення та очищення, показав, що гетерологічний протеїн GST-HSV2gG накопичується в клітинах бактерій *E. coli* BL21(DE3) як у вигляді тілець включень, так і в розчинній формі (рис. 2). При цьому найвищий рівень накопичення його в розчинному вигляді спостерігали на середовищі ТВ — 12,5 мг на 1 г біомаси або 50 мг у розрахунку на одиницю об'єму (1л) культурального середовища (табл. 1). Молекулярна маса цільового протеїну збігалася з теоретично розрахованою і становила 35,4 кДа.

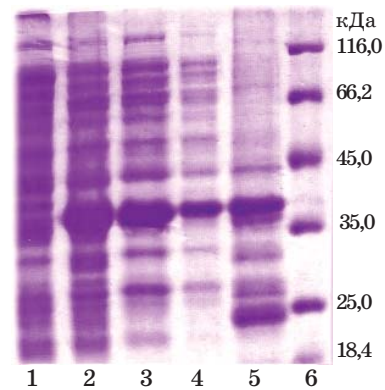


Рис. 2. SDS-ПААГ-аналіз співвідношення протеїнових фракцій рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG у клітинах штаму-продуцента за умов його культивування з використанням середовища ТВ при температурі 37 °C:

1 — лізат клітин штаму-реципієнта *E. coli* BL21(DE3); 2 — сумарні протеїни індукованих клітин; 3 — супернатант після лізису біомаси; 4 — зразок відмивки тілець включень; 5 — фракція тілець включень, розчинених у буфері з 8М сечовиною; 6 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

Отримані нами результати досліджень, які показали, що процес мікробного синтезу рекомбінантного протеїну відбувається як у розчинній формі, так і у вигляді нерозчинних тілець включень, зумовили необхідність оцінити його біологічні властивості за критерієм ІЕА-специфічної активності. На рис. 3 наведено дані порівняльного оцінювання імунохімічної активності очищених препаратів протеїнів із цих фракцій у разі використання їх у складі імуносорбенту імуноензимної тест-системи. Для кількісної оцінки величини активності рекомбінантного протеїну застосовували показник А, який розраховували за формулою (1). На діаграмі добре видно, що відповідні показники активності мали достовірно вищі значення для протеїну, виділеного з клітинного супернатанта після лізису біомаси, порівняно із фракцією тілець включень ($P < 0,05$). Ця залежність спостерігалася для всіх типів живильних середовищ, використаних для культивування продуцента.

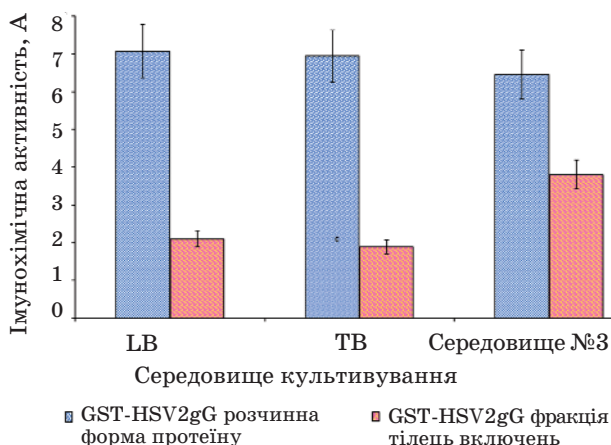


Рис. 3. Порівняльна оцінка імунохімічної активності очищених препаратів рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG, отриманих із розчинної та нерозчинної фракцій клітинної біомаси штаму-продуцента залежно від типу культурального середовища

Таку різку зміну якісних властивостей протеїну у формі тілець включень можна пояснити тим, що агрегація молекул у клітинах бактерій впливає на його структурно-функціональні характеристики, призводячи до зниження активності, а наступне застосування денатуруючих фізико-хімічних агентів у процесі рефолдингу посилює цей негативний вплив [17].

Як відомо з літератури, суперсинтез розчинних протеїнів значною мірою залежить від особливостей генно-інженерної конструкції продуцентів та умов їх культивування [18, 19].

Так, наприклад, ПТТГ може впливати на запуск механізму транскрипції клонованого гена та рівень експресії цільового протеїну, а також на метаболізм клітини-хазяїна [20], гальмуючи ріст бактерій [21, 22]. Відомо, що величина накопичення продукту мікробного синтезу не завжди пропорційна часу його експресії [22]. Температура вирощування продуцента теж є важливим чинником, що впливає на вихід експресованого клітиною чужого для неї протеїну [23]. Як правило, у більшості випадків зниження температури після індукції біосинтезу призводить до підвищення рівня накопичення розчинного протеїну [19]. Слід зауважити, що наявність послідовності глутатіон-S-трансферази як афінного партнера у складі рекомбінантної молекули є одним із факторів, що можуть посилювати розчинність злитих із GST поліпептидів [24, 25]. Тому наступні етапи нашої роботи передбачали проведення оптимізації умов бактеріальної експресії з метою отримання максимального виходу розчинної фракції рекомбінантного поліпептиду GST-HSV2gG з урахуванням вищенаведених технологічних підходів.

Як уже зазначалося, найвищий рівень біосинтезу розчинної форми протеїну під час культивування продуцента *E. coli BL21 (DE3) / pET28-GST-HSV2gG* спостерігали на середовищі TB, тому його використовували в подальших дослідженнях. Насамперед вивчали динаміку накопичення рекомбінантного продукту в клітинах бактерій залежно від температури експресії (25 °C і 37 °C) та в присутності різних концентрацій ПТТГ (0,1 мМ і 1мМ). Як свідчать результати, наведені на рис. 4, максимальний вихід цільового протеїну спостерігали через 3,5 год після індукції ПТТГ незалежно від температурного режиму культивування продуцента.

Варто зазначити, що співвідношення фракцій протеїну в розчинній та нерозчинній формі в процесі біосинтезу залежить як від температури експресії протеїну, так і від концентрації ПТТГ. На рис. 5 добре видно, що за умов культивування продуцента при температурі 25 °C спостерігається стійка тенденція до збільшення рівня накопичення протеїну в розчинному вигляді з використанням вищої концентрації індуктора 1мМ ПТТГ порівняно з концентрацією 0,1 мМ. З іншого боку, як впливає з табл. 2, за умов проведення бактеріальної експресії при температурі 37 °C найвищого виходу очищеного протеїну із супернатанта після лізису біомаси (26,3 мг/г) було досягнуто з використанням 0,1 мМ ПТТГ, який перевищував у 2,7 раза вихід протеїну (9,8 мг/г) при концентрації 1 мМ ПТТГ.

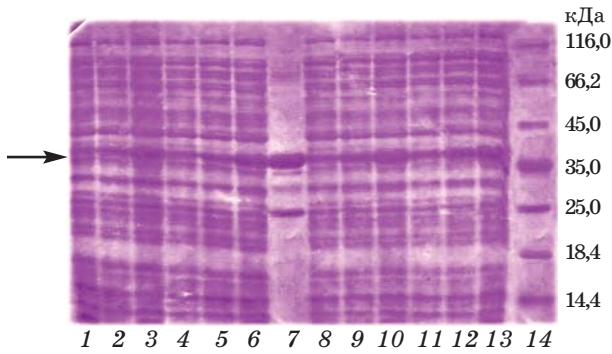


Рис. 4. Динаміка мікробного синтезу рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG залежно від температури культивування продуцента з використанням середовища ТВ при 25 °C (треки 1–6) та 37 °C (треки 8–13)

у присутності різних концентрацій ППТГ: 0,1 мМ ППТГ — треки 1, 2, 3 та 8, 9, 10; 1 мМ ППТГ — треки 4, 5, 6 та 11, 12, 13 впродовж 1 год (треки 1, 4, 8, 11), 2 год (треки 2, 5, 9, 12) та 3,5 год після індукції ППТГ (треки 3, 6, 10, 13); 7 — хроматографічно очищений протеїн GST-HSV2gG; 14 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

Як уже зазначалося, рекомбінантна плазміда pET28-GST-HSV2gG містить у своєму складі імунодомінантні ділянки глікопротеїну G ВПГ-2 та послідовності двох афінних партнерів — *His6-tag* і GST в N-кінцевій ділянці молекули. Шестигістидиновий тег часто застосовують у процесі одержання рекомбінантних протеїнів, оскільки він має декілька очевидних переваг: невеликий розмір, що не впливає на властивості гібридного протеїну, а також досить сильну взаємодію з деякими іонами перехідних металів (Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}), що дає змогу здійснювати очищення за допомогою методу іммобілізованої металоафінної хроматографії [26, 27]. Послідовність глутатіон-S-трансферази, окрім функції підвищення рівня синтезу цільового протеїну в розчинній формі, також виконує роль афінного тегу. Це дає змогу проводити процес доочищення протеїну на глутатіонсефарозі завдяки утворенню комплексу між глутатіоном сорбенту

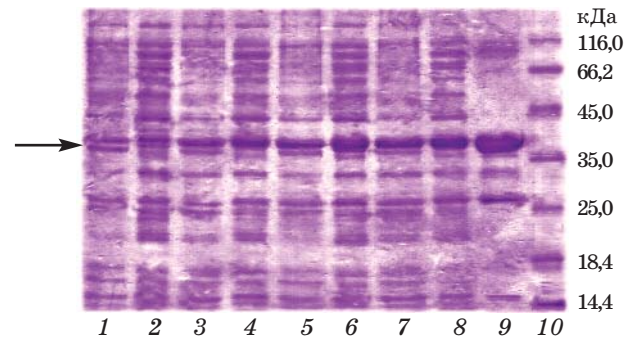


Рис. 5. Вплив різних температурних режимів на рівень експресії розчинної фракції (треки 2, 4, 6, 8) та нерозчинних тілець включень (треки 1, 3, 5, 7) рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG у клітинах штаму-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG:

за умов його культивування з використанням середовища ТВ при 25 °C (треки 1–4) та 37 °C (треки 5–8), індукованих 0,1 мМ ППТГ (треки 1, 2, 5, 6) та 1 мМ ППТГ (треки 3, 4, 7, 8) упродовж 3,5 год після індукції; 9 — хроматографічно очищений протеїн GST-HSV2gG; 10 — протеїни-маркери молекулярної маси (Fermentas)

та GST-послідовністю протеїну. Елюцію цільового протеїну із сорбенту в даному разі здійснюють за допомогою розчину відновленого глутатіону.

У нашій роботі на першому етапі очищення протеїну GST-HSV2gG застосовували метод IMAx з використанням сорбенту IDA-toyorearl, активованого іонами нікелю. Хроматограму очищення цільового протеїну з розчинної фракції лізату біомаси подано на рис. 6, А. Очищену на IDA-toyorearl протеїнову фракцію (рис. 6, Б, трек 3) далі наносили на колонку з глутатіонсефарозою. Питомий вихід очищеного препарату протеїну з клітинного супернатанта за оптимізованих умов становив 78,74% загальної кількості рекомбінантного протеїну в клітині. Слід зазначити, що такий двоступеневий підхід до розроблення технології очищення з використанням сорбентів IDA-toyorearl та глутатіонсефарози дав можливість значно підвищити специфічність IEA, не призводячи

Таблиця 2. Вихід очищеного рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG, експресованого в клітинах штаму-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pET28-GST-HSV2gG залежно від температури культивування та концентрації ППТГ у живильному середовищі ТВ

Температурний режим культивування штаму-продуцента	Вихід очищеного протеїну, мг/г біомаси			
	0,1 мМ ППТГ		1 мМ ППТГ	
	із супернатанта після лізису біомаси	із фракції тілець включень	із супернатанту після лізису біомаси	із фракції тілець включень
25 °C	5,4	8,1	11,9	7,3
37 °C	26,3	7,1	9,8	3,4

до зменшення його чутливості (дані не наведено). При цьому, як свідчать дані табл. 3, якісні характеристики протеїну GST-HSV2gG були зіставними з показником активності (показник А) комерційного аналога HSV2-gG2c виробництва LTD.Viral Therapeutics (США), використаного як референс-зразок ($P > 0,05$).

Таблиця 3. Порівняльна оцінка якісних характеристик очищеного з клітинного супернатанта протеїнового препарату GST-HSV2gG та комерційного аналога HSV2-gG2c (виробництво LTD.Viral Therapeutics, USA) у разі використання їх у складі імуносорбенту діагностичної тест-системи

Рекомбінантний протеїн	Імунохімічна активність, А	P
GST-HSV2gG	6,66 ± 0,47	$P > 0,05$
HSV2-gG2c	6,88 ± 0,51	

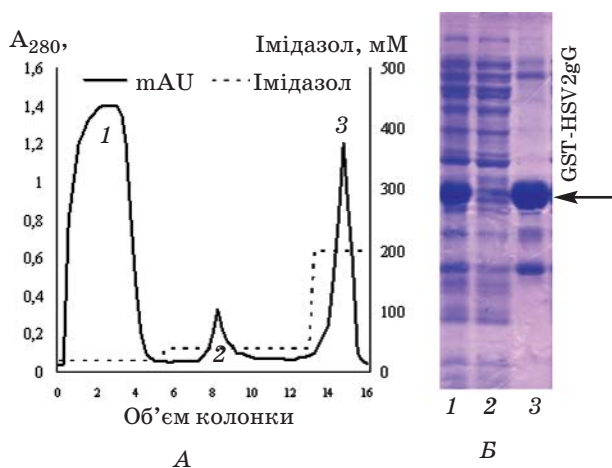


Рис. 6. IMAx-профіль очищення на сорбенті IDA-touorear1 зразків рекомбінантного протеїну GST-HSV2gG, отриманих із розчинної фракції лізату біомаси (А):

1 — протеїни, що не зв'язались із сорбентом; 2 — неспецифічно зв'язані із сорбентом клітинні протеїни; 3 — цільовий протеїн;

SDS-ПААГ-аналіз зразків хроматографічних фракцій (Б):

1 — супернатант після лізису біомаси; 2 — протеїни, що не зв'язались із сорбентом, 3 — хроматографічно очищений протеїн GST-HSV2gG

ЛІТЕРАТУРА

1. Дранник Г. М., Свідро О. В. Torch-інфекції: герпес // Клин. имун. алл. инфектол. — 2006. — № 1. — С. 3–17.
2. Казмирчук В. Е., Мальцев Д. В. Клиника, диагностика и лечение герпесвирусных инфекций человека. — К.: Феникс, 2009. — 248 с.
3. Gorander S., Svennerholm Bo., Liljeqvist J.-A. Secreted portion of Glycoprotein G of Herpes

Simplex Virus Type 2 Is a Novel Antigen for Type-Discriminating Serology // J. Clin. Microbiol. — 2003. — V. 41, N 8. — P. 3681–3686.

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що одержаний із розчинної фракції високоочищений препарат протеїну GST-HSV2gG за своїми імунохімічними характеристиками є перспективним для використання у складі імуносорбенту з метою розроблення вітчизняних імуноензимних тест-систем для діагностики вірусу герпесу людини 2-го типу.

Встановлено, що рекомбінантний протеїн, який містить імунодомінантні ділянки глікопротеїну G вірусу герпесу 2-го типу, злиті з послідовністю глутатіон-S-трансферази, накопичується в клітинах бактерій *Escherichia coli* як у розчинній формі, так і у вигляді тілець включень. Показано вплив складу живильного середовища, температури експресії та концентрації ІПТГ на рівень накопичення гібридного протеїну та його імунохімічні властивості. Визначено оптимальні умови експресії розчинної фракції протеїну в клітинах продуцента: середовище ТВ, температура експресії — 37 °С, концентрація ІПТГ — 0,1 мМ, час культивування після індукції — 3,5 год.

Рекомбінантний поліпептид очищали двоступенево за допомогою технологій іммобілізованої металоафінної та афінної хроматографії з використанням сорбентів IDA-touorear1 та глутатіон-сефарози, відповідно. Питомий вихід високоочищеного препарату з клітинного супернатанта за оптимізованих умов становив 78,74% від загальної кількості рекомбінантного протеїну в клітині.

Результати досліджень імунохімічних властивостей розчинного протеїну GST-HSV2gG свідчать про перспективність його використання в складі імуносорбенту під час розроблення імуноензимних тест-систем для діагностики вірусу герпесу 2-го типу.

4. Munday P. E., Vuddamalay J., Slomka M. J., Brown D. W. G. Role of type specific herpes simplex virus serology in the diagnosis and management of genital herpes // Sex. Transm. Infect. — 1998. — V. 74. — P. 175–178.

5. Al-Sulaiman A. M., Valley P. J., Klapper P. E. Comparative Performance of a Novel Herpes Simplex Virus Type 2-Specific Enzyme-Linked immunosorbent Assay Using a Targeted Chain Oligopeptide, peptide 55 // Clin. Vac. Immunol. — 2009. — V. 16, N 6. — P. 931–934.
6. Whitley R. J., Roizman B. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? // J. Clin. Invest. — 2002. — V. 110, N 2. — P. 145–151.
7. Dolan A., Jamieson F. E., Cunningham C. et al. The Genome Sequence of Herpes Simplex Virus Type 2 // J. Virol. — 1998. — V. 72, N 3. — P. 2010–2021.
8. William L. H., Connie L., Ashley R. Use of a Glycoprotein G-Based Type-Specific Assay to Detect Antibodies to Herpes Simplex Virus Type 2 Among Persons Attending Sexually Transmitted Disease // Sex. Transm. Dis. — 2001. — V. 28, N 2. — P. 99–104.
9. Reddy S. M., Balakrishnan P., Uma S. et al. Performance of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits Using Recombinant Glycoprotein G2 Antigen for Detection of Herpes Simplex Virus Type 2 Specific Antibodies // Clin. Diagn. Lab. Immun. — 2005. — V. 12, N 2. — P. 359–360.
10. Ashley R. L., Wald A. Genital Herpes: Review of the Epidemic and Potential Use of Type-Specific Serology // Clin. Microbiol. Rev. — 1999. — V. 12, N 1. — P. 1–8.
11. Ikoma M., Liljevist J.-A. Groen J., Glazenburg K. L. The T.H. Use of a Fragment of Glycoprotein G-2 Produced in the baculovirus Expression System for Detecting Herpes Simplex Virus Type 2-specific Antibodies // J. Clin. Microbiol. — 2002. — V. 40, N 7. — P. 2526–2532.
12. Jamalidoost M., Soleimanjahi H., Fotouhi F., Meshkat Z. Amplification and Cloning of Herpes Simplex Virus Type 2 Glycoprotein G from an Iranian Isolate // Pakist. J. Biol. Sci. — 2007. — V. 10, N 6. — P. 955–958.
13. Маниатис Т., Фршч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
14. Laemmli U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
15. Підгорський В. С., Гутинська Г. О., Пирог Т. П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу — К.: Наук. думка, 2010. — 328 с.
16. Broedel S. E., Parciak S. J., Jones W. R. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E. coli* // Techn. Bull. — 2001. — V. 2. — P. 1–8.
17. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В. и др. Суперсинтез альфа-2b интерферона человека в клетках *Escherichia coli* в растворимой форме с использованием системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7 // Біополімери і клітина. — 2003. — Т. 19, № 4. — С. 367–373.
18. Sorensen H. P., Mortensen K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* // Microb. Cell Fact. — 2005. — V. 1. — P. 62–76.
19. Zhang D., Wei P., Fan L., Lian J. High-level soluble expression of HIGF-1 fusion protein in recombinant *Escherichia coli* // Proc. Biochem. — 2010. — V. 45. — P. 1401–1405.
20. Lian J. Z., Ding S. H., Cai J. et al. Improving aquaporin Z expression in *Escherichia coli* by fusion partners and subsequent condition optimization // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 82. — P. 463–470.
21. Peng L., Xu Z. N., Fang X. M., Cen P. L. High-level expression of soluble human Beta-Defensin-2 in *E. coli* // Proc. Biochem. — 2004. — V. 82. — P. 199–205.
22. Baharum S. N., Rahman RNZRA, Basri M. Chaperone-dependent gene expression of organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain S5 // Ibid. — 2010. — V. 45. — P. 346–354.
23. Hartinger D., Heintl S., Schwartz H. E. Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA 144 for Deamination of hydrolyzed Fumonisin B // Microb. Cell Fact. — 2010. — V. 9. — P. 62–76.
24. Rabhi-Essaffi I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon — as a GST-fusion protein in *E. coli* // Prot. Eng. Design Select. — 2007. — V. 12. — P. 201–209.
25. Esposito D., Chatterjee D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags // Cur. Opin. Biotechnol. — 2006. — V. 17. — P. 353–358.
26. Gaberc-Porekar V., Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography // J. Biochem. Biophys. Meth. — 2001. — V. 49. — P. 335–360.
27. Карбовский Л. Л., Савчук А. Н., Волков Г. Л. Подходы к получению рекомбинантных фармацевтических белков на примере фрагмента стрептокиназы // Биофарм. журн. — 2010. — Т. 2, № 2. — С. 9–14.

**СУПЕРСИНТЕЗ РАСТВОРИМОГО
ПРОТЕИНА — ПРОДУКТА ЭКСПРЕССИИ
ГЕНА, СОДЕРЖАЩЕГО ИММУНОДОМИНАНТНЫЕ
УЧАСТКИ ГЛИКОПРОТЕИНА
G ВИРУСА ГЕРПЕСА 2-ГО ТИПА,
В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ
*Escherichia coli***

Л. Н. Коршун¹, Л. Н. Мойса¹, Г. В. Ковтонюк¹,
Л. А. Ганова^{1,2}, Е. К. Киселева¹, Н. Я. Спивак²

¹АОЗТ НПК «Диaproф-Мед», Киев

²Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: KL2004@ukr.net

Сегодня во всем мире значительно возросла распространенность инфекций, вызванных вирусами простого герпеса типов 1 и 2. Заболевания, вызываемые вирусом герпеса 2-го типа, протекают в более тяжелой форме, с более частыми рецидивами и осложнениями, чем те, которые обусловлены возбудителем 1-го типа. Поэтому при проведении клинико-лабораторных исследований большое значение имеет дифференциальная диагностика между этими двумя типами вируса. Цель работы заключалась в оптимизации условий бактериальной экспрессии рекомбинантного протеина, содержащего иммунодоминантные области гликопротеина G вируса простого герпеса 2-го типа, в клетках *Escherichia coli* и получение высокоочищенного препарата, пригодного для использования в составе иммуносорбента при разработке диагностических тест-систем.

Установлено, что рекомбинантный полипептид GST-HSV2gG накапливается в клетках бактерий как в растворимой форме, так и в виде телец включений. Показано влияние состава питательной среды, температуры экспрессии и концентрации ИПТГ на уровень накопления гетерологичного протеина и его иммунохимические свойства. Уменьшение концентрации ИПТГ до 0,1 мМ при температуре культивирования продуцента 37 °С с использованием среды ТВ (1,2% бactoтриптона, 2,4% дрожжевого экстракта, 55 мМ глицерола, 17 мМ КН₂РO₄, 72 мМ К₂НРO₄, рН 7,2) позволяет получать наиболее высокий показатель биосинтеза растворимого протеина.

Целевой продукт очищали с использованием технологий аффинной хроматографии. Удельный выход очищенного протеина с клеточного супернатанта при оптимизированных условиях составлял 78,74 % от общего количества рекомбинантного протеина в клетке.

Иммунохимические свойства протеина GST-HSV2gG оценивали с помощью иммуноэнзимной тест-системы. Результаты исследований свидетельствуют о перспективности его использования при разработке тест-систем для диагностики вируса герпеса 2-го типа.

Ключевые слова: рекомбинантные протеины, экспрессирующие векторы, вирус простого герпеса человека 2-го типа, иммуноэнзимный анализ, *Escherichia coli*.

**SUPERSYNTHESIS OF PRODUCT GENE
EXPRESSION SOLUBLE PROTEIN,
WHICH INCLUDES IMMUNODOMINANT
REGIONS OF GLYCOPROTEIN G
HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2
IN THE BACTERIAL *Escherichia coli* SYSTEM**

L. M. Korshun¹, L. M. Moysa¹, G. V. Kovtonjuk¹,
L. O. Ganova^{1,2}, O. K. Kiselyova¹, M. J. Spivak²

¹JSC «Diaprof-Med», Kyiv

²Institute of Microbiology and Virology
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: KL2004@ukr.net

The spread of infections caused by herpes simplex virus types 1 and 2 has increased significantly worldwide now. Diseases caused by herpes virus type 2 occurring in more heavy form, with frequent recurrences and complications compared with those caused by agent type 1. When clinical and laboratory tests were carried out, differential diagnosis between these two types of virus became more important. Purpose of the work was optimizing conditions of the bacterial expression of recombinant protein containing immunodominant regions of glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 in the *Escherichia coli* cells and obtaining of the highly purified preparation suitable for use in the immunosorbent composition to the development of diagnostic test kits.

It was found that recombinant protein GST-HSV2gG accumulated both in a soluble form and as insoluble inclusion bodies in bacterial cells. Influence of media composition, expression temperature and IPTG concentration on the level accumulation of the heterologous protein and its immunochemical properties was shown. The maximum level of the soluble protein biosynthesis was reached when the bacteria had been cultivated with use the TB medium (1,2 % bacto-tryptone, 2,4 % yeast extract, 55 mM glycerol, 17 mM КН₂РO₄, 72 mM К₂НРO₄, pH 7,2) at 37 °C with decreasing concentration IPTG up to 0,1 mM.

The target protein was purified by affinity chromatography technologies. Under the optimized conditions the yield of the purified soluble protein was up to 78.74 % relative to total recombinant protein.

The immunochemical properties of GST-HSV2gG protein was estimated by ELISA. The results suggested that it might be applicable for the development of the diagnostic kits for the detection of herpes simplex virus type 2.

Key words: recombinant proteins, expression vectors, herpes simplex virus type 2, ELISA test, *Escherichia coli*.

УДК 611.127–002.4.085:612.59

МОДЕЛИРОВАНИЕ НЕКРОЗА МИОКАРДА С ПОМОЩЬЮ КРИОТЕХНОЛОГИИ

И. В. Слета
Н. А. Чиж
С. Е. Гальченко
Б. П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Ежегодно в нашей стране регистрируется около 50 тыс. новых случаев инфаркта миокарда. Совершенствование способов профилактики и лечения этой патологии должно базироваться на адекватных экспериментальных моделях.

В работе рассмотрены биотехнологические этапы воспроизведения некроза миокарда у крыс с использованием криомедицинских методов. Изучена зависимость полученных результатов от оперативного доступа, диаметра криоапликатора и длительности криовоздействия. Установлена зависимость величины зоны крионекроза миокарда от параметров криовоздействия.

Показана высокая точность воспроизведения топографии и размеров зоны некроза миокарда с использованием гистологических и ЭКГ-методов, а также возможность формирования субэпикардального и трансмурального некроза миокарда, что чрезвычайно важно для доклинического изучения различных методов лечения.

Исследования патологических изменений сердца в динамике показали, что в зоне криовоздействия в миокарде развивалась воспалительная реакция, которая в свою очередь сменялась процессами фибротизации с формированием соединительнотканного рубца.

Ключевые слова: некроз миокарда, моделирование, криодеструкция.

Ежегодно в нашей стране регистрируется около 50 тыс. новых случаев инфаркта миокарда [1]. Инфаркт миокарда (ИМ) — одна из форм некроза миокарда, вызванная нарушением притока крови через пораженные артерии. Совершенствование способов профилактики и лечения ИМ может базироваться на адекватных экспериментальных моделях [2–4].

В экспериментальных исследованиях в качестве моделей ИМ для создания «коронарогенных» некрозов выполняют эмболизацию или перевязку коронарных артерий [2], для формирования «некоронарогенных» некрозов вводят химические или гормональные препараты, а также проводят электрокоагуляцию [3] или криодеструкцию сердца [5, 6].

Высокая летальность и отсутствие точной повторяемости повреждения сердца при использовании существующих моделей ИМ побуждают исследователей искать новые варианты моделирования ИМ, позволяющие стандартизировать зону поражения.

Цель настоящей работы — разработать биотехнологический метод получения прогнозируемой зоны некроза миокарда (НМ) методом локальной криодеструкции.

Материалы и методы

Исследования выполнены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.04, Киев) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Эксперименты проведены на 106 беспородных крысах-самках массой 180–250 г. Модель НМ создавали хирургическим способом на животных под эфирным наркозом на спонтанном дыхании. Перед вхождением в грудную полость накладывали 2 провизорных шва (рис. 1), что позволяло быстро ее ушить после криовоздействия и таким образом снизить риск послеоперационных осложнений, включая пневмоторакс.

Криовоздействие на сердце производили азотным криоинструментом с температурой рабочей поверхности аппликатора $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 2). После криодеструкции сердца грудную полость быстро и герметично ушивали. С целью профилактики пневмоторакса шприцем удаляли воздух из грудной полости.

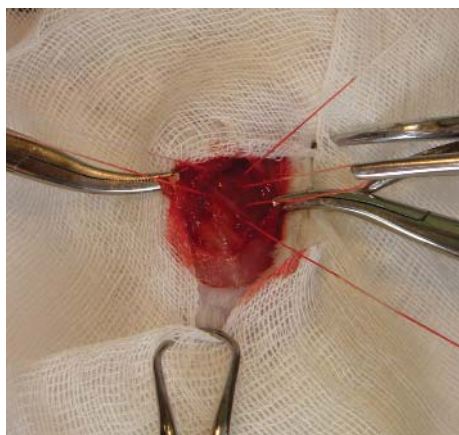


Рис. 1. Наложение провизорных швов перед криовоздействием на сердце

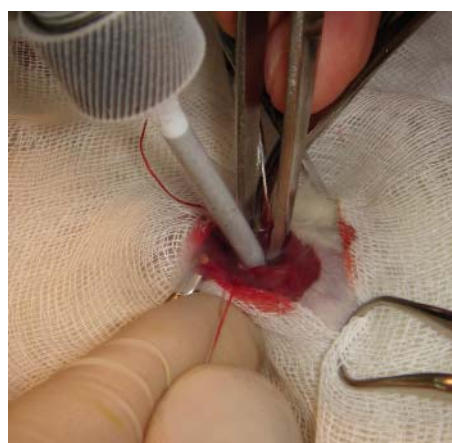


Рис. 2. Проведение криовоздействия на сердце

Отработку параметров криовоздействия проводили в 2 этапа.

1-й этап — выбор диаметра аппликатора (15 крыс). Животные были разделены на 3 группы, по 5 крыс в каждой, с использованием криоаппликаторов диаметром 7 мм, 5 мм и 3 мм. Длительность криовоздействия на сердце составляла 10 с, а оперативный доступ осуществляли в 4–5-м межреберьях. Критерием оценки выбора диаметра криоаппликатора служил показатель летальности животных.

2-й этап — определение зависимости функциональных и морфологических изменений сердца от локализации и экспозиции криовоздействия (91 крыса). Для получения НМ в различных топографических областях сердца оперативный доступ осуществляли в 4–5-м или в 5–6-м межреберьях.

При проведении 2-го этапа эксперимента животные были разделены на 3 группы:

1-я группа (контроль) — животные с торакотомией без криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях;

2-я группа — животные после криовоздействия на левый желудочек при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях;

3-я группа — животные после криовоздействия на верхушку сердца при оперативном доступе в 5–6 межреберьях.

Животные 2-й и 3-й групп по длительности криовоздействия на сердце разделили на 3 подгруппы: А — 10 с; Б — 15 с; В — 30 с.

Группа интактных животных (норма) — 7 крыс.

Функциональную способность миокарда исследовали электрокардиографически. Электрокардиограммы (ЭКГ) животных регистрировали на аппаратно-программном комплексе «Поли-Спектр» («Нейрософт»,

Россия) до операции, в первые минуты после операции и через 1, 7, 14 и 30 сут после операции. Амплитуду устанавливали на 20 мм, а скорость записи — на 50 мм/с. По ЭКГ определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС) в 1 мин, оценивали ритм и проводили анализ комплекса QRS–Т.

Морфологическую картину миокарда изучали на 1-, 7-, 14- и 30-е сут после криовоздействия по гистологическим срезам, окрашенным гематоксилином и эозином. Визуально определяли степень воспалительной реакции и формирования соединительнотканного рубца в зоне криовоздействия. Глубину очагов криодеструкции миокарда рассчитывали с помощью компьютерной программы Bio Vision 4.0.

Статистическую обработку результатов проводили параметрическим методом Стьюдента–Фишера с использованием t-критерия и непараметрическим методом ANOVA. Количественные данные представлены в средних величинах и средних квадратичных отклонениях. Расчет показателей выполняли с помощью SPSS 17.0 для Windows.

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе эксперимента крионекроз, полученный при воздействии на сердце криоаппликатором диаметром 7 мм, приводил к 100% -й летальности животных, а при диаметре 5 мм летальность крыс составляла 60%. Применение криоаппликатора диаметром 3 мм способствовало образованию зоны криоповреждения сердца с отсутствием летальности животных во всей группе. В связи с этим дальнейшие эксперименты по моделированию НМ осуществляли с помощью криоаппликатора диаметром 3 мм.

На 2-м этапе эксперимента исследование ЭКГ у интактных крыс и крыс перед операцией по моделированию НМ (норма) показало, что у всех животных был правильный синусовый ритм с ЧСС 420 ± 25 в 1 мин, отсутствовали нарушения проводимости и изменения в комплексе QRS-T (рис. 3).

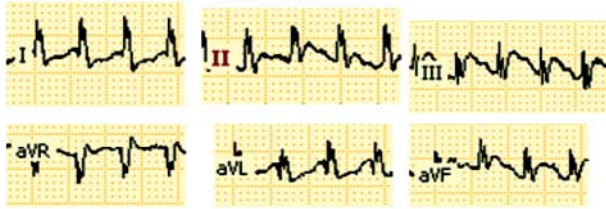


Рис. 3. ЭКГ крысы в норме

В ранние сроки после операции у животных 1-й группы (контроль) наблюдали увеличение зубца Т. Ритм синусовый правильный, ЧСС составляла $402 \pm 16,0$ в 1 мин (таблица). Во все остальные сроки наблюдения существенных нарушений в электрокардиограммах у животных этой группы выявлено не было (рис. 4, а, б).

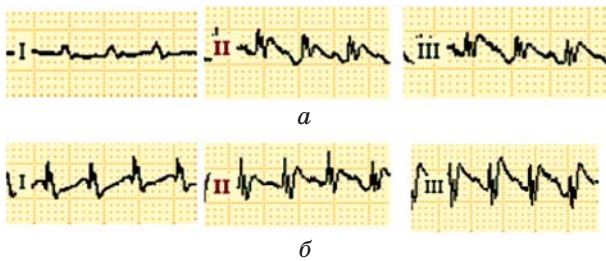


Рис. 4. ЭКГ крыс после торакотомии (контроль) в 4-5-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

Криовоздействие на сердце при оперативном доступе в 4-5-м межреберьях (2-я группа) с экспозицией 10 с (подгруппа А) и 15 с (подгруппа Б) приводило к образованию на боковой поверхности левого желудочка сердца зон оледенения, диаметр которых

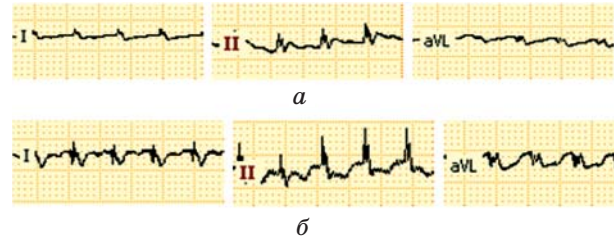


Рис. 5. ЭКГ крыс после 10 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4-5-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

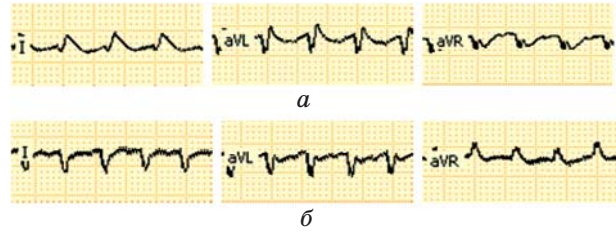


Рис. 6. ЭКГ крыс после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4-5-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

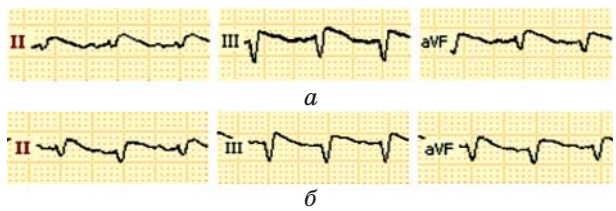


Рис. 7. ЭКГ крыс после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 5-6-м межреберьях:
а — непосредственно после криовоздействия;
б — через 1 сут после криовоздействия

соответствовал размерам криоапликатора (3 мм). Глубина криоповреждения сердца животных подгруппы А достигала $0,18 \pm 0,03$ мм, а Б — $0,28 \pm 0,02$ мм. При исследовании ЭКГ сразу после окончания оперативного вмешательства в подгруппах А и Б частота сердечных сокращений была на 16% и 19% меньше нормы (с достоверностью $P < 0,05$, таблица).

Динамика частоты сердечных сокращений крыс после криовоздействия на сердце

Группы	Срок наблюдения, сут				
	После операции	1	7	14	30
Норма	420±25				
Контроль	402±16,0	412±15,7	408±19,5	417±10,9	415±14,5
Подгруппа А	354±9,0 ^{1,2}	427,5±9,9	420±19,9	420±10,6	417±16,3
Подгруппа Б	348±12,2 ^{1,2}	416±14,5	418±15,5	429±19,6	429±19,3
Подгруппа В	325±10,7 ^{1,2}	389±19,9	401±16,2	400±15,3	407±13,4

Примечание: ¹ — различие достоверно относительно нормы, $P < 0,05$; ² — различие достоверно относительно контроля, $P < 0,05$.

Отмечали снижение амплитуды зубцов R, появление q-зубца и отрицательных зубцов T в I и avL-отведениях, что свидетельствовало о развитии у животных этих подгрупп субэпикардального ИМ (рис. 5). При увеличении времени криовоздействия на сердце до 30 с (подгруппа В) увеличивалась и глубина криоповреждения сердца — до $0,42 \pm 0,05$ мм. При этом ЭКГ соответствовала картине трансмурального ИМ в тех же топографических областях со снижением ЧСС до $325 \pm 10,7$ [4]. Появление зубца Q в I и avL-отведениях сопровождалось увеличением сегмента ST (рис. 5, а).

Криовоздействие на сердце при оперативном доступе в 5–6-м межреберьях (3-я группа) с экспозицией 10 с (подгруппа А), 15 с (подгруппа Б) и 30 с (подгруппа В) приводило к образованию зон криоповреждения на верхушке сердца, объемы которых аналогичны зонам соответствующих подгрупп 2-й группы. ЭКГ во II, III и avF-отведениях показали, что у животных подгрупп А и Б сразу же после операции появлялись признаки ишемического повреждения сердца, а у животных подгруппы В — изменения, характерные для трансмурального инфаркта миокарда с появлением Q-зубца в этих отведениях (рис. 7, а).

Через 1 сут после криовоздействия зоны криоповреждения сердца макроскопически у животных всех групп имели четкие границы, были отечны, с синюшным оттенком. Исследование гистологических препаратов сердца крыс показало, что применяемое криовоздействие привело к образованию трех биологически значимых зон: I — зона криоповреждения, в которой отмечали участки некроза и паранекроза сердечной мышцы с выраженными дистрофическими явлениями; II — пограничная зона, окружающая зону криоповреждения, в которой уже заметны признаки воспалительной реакции; III — периферические участки сердца, морфологическая картина которых практически не отличалась от нормы.

Изменения электрокардиограмм, отмеченные непосредственно после операции, сохранялись и через 1 сут. Данные ЭКГ свидетельствовали о развитии ишемических повреждений в переднебоковой поверхности сердца подгрупп А и Б животных 2-й группы (рис. 5, б), в заднедиафрагмальных областях и верхушке сердца подгрупп А и Б животных 3-й группы. ЧСС у животных 2-й и 3-й групп имела одинаковую динамику. Через 1 сут после оперативного вмешательства сохранялся правильный синусовый ритм,

а ЧСС восстанавливалась до показателей нормы (таблица).

У животных подгруппы В 2-й и 3-й групп электрокардиографические изменения подтверждали наличие трансмурального ИМ в тех же топографических областях, т. е. в переднебоковой поверхности сердца животных 2-й группы (рис. 6, б) и заднедиафрагмальных областях и верхушке сердца животных 3-й группы (рис. 7, б). Особенностью ЭКГ животных 2-й группы подгруппы В было появление на 1-е сут отрицательных зубцов T и реципрокных изменений в avR-отведении (рис. 6, б.).

Исследование ЭКГ животных на 7-, 14- и 30-е сут после операции показало, что электрокардиографическая картина, зарегистрированная на 1-е сут, сохранялась на протяжении всего срока наблюдения во всех экспериментальных группах (рис. 8). Появление аритмий и экстрасистол не отмечали. Частота сердечных сокращений варьировала в пределах значений нормы. При этом амплитуды Q-зубцов после 30 с криовоздействия (подгруппы В во 2-й и 3-й группах) сохранялись на одном уровне.

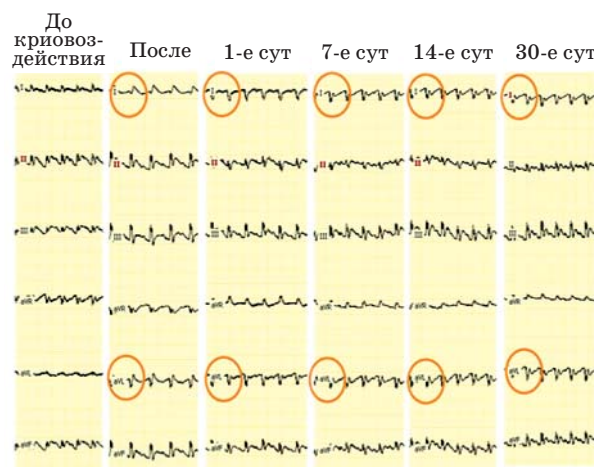


Рис. 8. Динамика ЭКГ в течение 30 сут после 30 с криовоздействия на сердце при оперативном доступе в 4–5-м межреберьях

Исследование гистологических препаратов сердца крыс после криовоздействия дает основания утверждать, что ремоделирование миокарда проходило по классическому пути — от асептического воспаления до формирования соединительнотканного рубца (1–30-е сут) [4]. Объемы зон крионекроза, пограничных зон миокарда и морфологические изменения в них у животных подгрупп А, Б и В 2-й группы были аналогичны объемам зон и морфоструктурным изменениям миокарда у животных 3-й группы соответ-

вующих подгрупп. Гистологические картины сердца животных подгрупп А, Б и В отличались вовлечением в воспалительный процесс различных по глубине слоев миокарда.

Через 7 сут после 10 и 15 с криовоздействия наблюдали зоны реактивного воспаления, сопровождавшиеся развитием лейкоцитарной инфильтрации. Очаги деструкции и воспалительной реакции характеризовались разрушением пучков кардиомиоцитов, дилатацией сосудов и скоплением нейтрофилов (рис. 9).

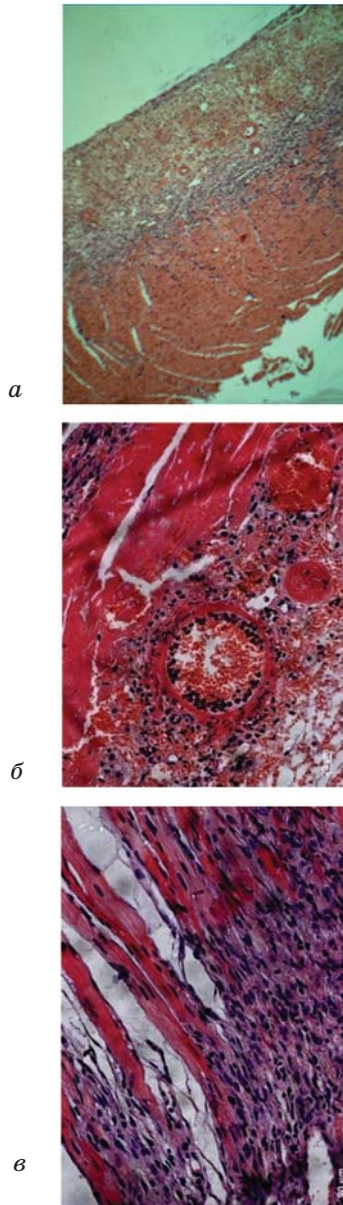


Рис. 9. Очаг некроза миокарда после 15 с криовоздействия на сердце, 7 сут:
а — формирование четкой зоны крионекроза миокарда, об. $\times 10$, ок. $\times 10$;
б — стаз и тромбоз микрососудов;
в — расслоение пучков кардиомиоцитов, об. $\times 40$, ок. $\times 10$. Гематоксилин-эозин

После 30 с криовоздействия сердца наблюдали формирование трансмурального некроза миокарда. На рис. 10 представлены участки полной деструкции миокарда с геморрагиями и клеточной инфильтрацией всего поперечника боковой стенки левого желудочка.

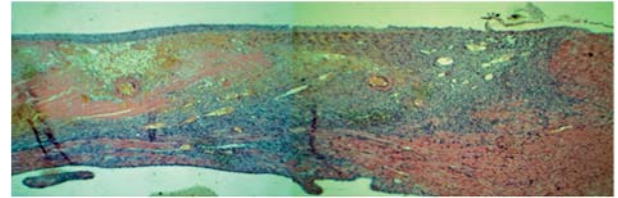


Рис. 10. Очаг некроза миокарда после 30 с криовоздействия на сердце, 7 сут. Полная деструкция миокарда боковой стенки левого желудочка.
 Гематоксилин-эозин. Об. $\times 10$, ок. $\times 10$

Благоприятным исходом НМ является организация соединительнотканного рубца. В наших исследованиях на 14-е сут в зоне криовоздействия воспалительная реакция сменялась процессами фибротизации с формированием рыхлой соединительной ткани. На месте погибших кардиомиоцитов начал формироваться соединительнотканый каркас с большим количеством фибробластов в стадии коллагенообразования. Сохранялось полнокровие микрососудов. В отдельных участках отмечались диапедез и скопление макрофагов вокруг сосудов микроциркуляторного русла (рис. 11).

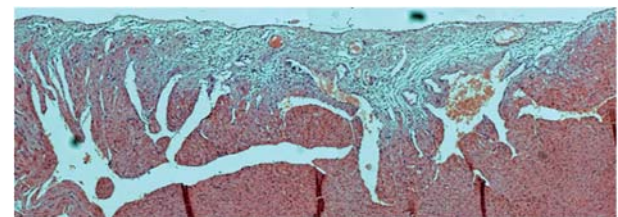


Рис. 11. Формирование соединительнотканного рубца в зоне 15 с криовоздействия на сердце, 14 сут.
 Гематоксилин-эозин. Об. $\times 10$, ок. $\times 10$

Продолжение реконструктивной фазы отмечали и через 30 сут после криовоздействия. Имели место признаки прогрессирующего фиброза с формированием соединительнотканых тяжей по ходу поврежденных артериальных сосудов. Фиброзная ткань состояла из созревших коллагеновых волокон, которые формировали соединительнотканый рубец (рис. 12).

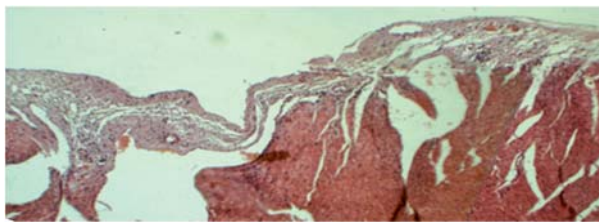


Рис. 12. Формирование соединительнотканного рубца в зоне 15 с криовоздействия на сердце, 30 сут. Гематоксилин-эозин. Об. x10, ок. x10

Следовательно, во всех группах после криодеструкции сердца развивались признаки острого некроза миокарда, которые имели отчетливую и закономерную динамику на протяжении всего срока наблюдения.

Моделирование некроза миокарда криохирургическим методом не может претендовать на точное воспроизведение развития клинических событий при ИМ у человека. Поскольку в наших исследованиях было проведено криовоздействие на миокард здоровых животных, атеросклеротический процесс в коронарных артериях и ишемическая стадия, предшествующие возникновению некроза миокарда в клинике, при этом отсутствовали. Предлагаемая модель ИМ может вызывать интерес у исследователей и врачей в тех случаях, когда развитие острого ИМ происходит без явного атеросклеротического процесса в коронарных сосудах, в частности

при спазме участка венечной артерии или на этапе терапии после применения реканализирующих препаратов.

Таким образом, установлено, что при криохирургическом методе моделирования некроза миокарда наблюдается минимальное количество осложнений и высокая повторяемость повреждения сердечной мышцы при заданных параметрах криовоздействия.

Определены параметры криовоздействий, при которых формируется субэпикардальный и трансмуральный некроз миокарда.

Крионекроз миокарда с прогнозируемой зоной повреждения сердечной мышцы может быть моделью для доклинических испытаний фармакологических препаратов кардиотропного действия и исследований, направленных на изучение ремоделирования миокарда при применении клеточной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабушкина А. В. Инфаркт миокарда: от фундаментальных исследований — к практическим достижениям (по материалам X Национального конгресса кардиологов Украины) // Укр. мед. часопис. — 2009. — Т. 53, № 5. — С. 10–13.
2. Давыденко В. В., Матюков А. А., Цупкина Н. В. и др. Влияние аутотрансплантации различных клеток костного мозга на функциональное состояние миокарда кролика после инфаркта // Клет. трансплантол. и ткан. инж. — 2007. — Т. 11, № 2. — С. 52–61.
3. Дремина Н. Н., Шурыгина И. А., Лушникова Е. Л. и др. Влияние эндотелиального фактора роста на постинфарктное ремоделирование миокарда крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2009. — Т. 148, № 9. — С. 330–336.
4. Шилов А. М. Инфаркт миокарда (Патофизиологические и клинические аспекты). — М.: Миклош, 2009. — 164 с.
5. Bos E. J., Mees B. E., Waard M. C. et al. A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation // J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2005. — V. 289. — P. 1291–1300.
6. Murry C. E., Wiserman R. W., Schwartz S. M. et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis // J. Clin. Invest. — 1996. — V. 98. N 11. — P. 2512–2523.

МОДЕЛЮВАННЯ НЕКРОЗУ МІОКАРДА ЗА ДОПОМОГОЮ КРІОТЕХНОЛОГІЇ

*I. В. Слета
М. О. Чиж
С. Є. Гальченко
Б. П. Сандомирський*

Інститут проблем кріобіології
та кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

Щорічно в нашій країні реєструється близько 50 тис. нових випадків інфаркту міокарда. Удосконалення способів профілактики і лікування цієї патології має базуватися на адекватних експериментальних моделях.

У роботі розглянуто біотехнологічні етапи відтворення некрозу міокарда у щурів з використанням кріомедичних методів. Вивчено залежність отриманих результатів від оперативного доступу, діаметра кріоаплікатора і тривалості кріодії. Встановлено залежність величини зони кріонекрозу міокарда від параметрів кріодії.

Показано високу точність відтворення топографії і розмірів зони некрозу міокарда з використанням гістологічних та ЕКГ-методів, а також можливість формування субепікардіального і трансмурального некрозу міокарда, що вкрай важливо для доклінічного вивчення різних методів лікування.

Дослідження патологічних змін серця в динаміці показало, що в зоні кріодії в міокарді розвивалася запальна реакція, яка, у свою чергу, змінювалася процесами фібротизації з формуванням сполучнотканинного рубця.

Ключові слова: некроз міокарда, моделювання, кріодеструкція.

MYOCARDIUM NECROSIS MODELING BY CRIOTECHNOLOGY

*I. V. Sleta
N. A. Chizh
S. Ye. Galchenko
B. P. Sandomirsky*

Institute of Problems of Cryobiology and
Cryomedicine of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

E-mail: cryo@online.kharkov.ua

About 50 thousand of new cases of myocardial infarction are registered in our country annually. Perfection of methods of prophylaxis and treatment of this pathology should be based on adequate experimental models.

In the paper the technological stages of myocardium necrosis simulation in rats using cryomedical methods were reviewed. The influence of the obtained results on surgery access, diameter of cryoapplicator and cryoeffect duration was studied. The dependence of the myocardium cryonecrosis zone volume on the cryoeffect parameters was established.

Reproducing with high accuracy of topography and dimensions of myocardium necrosis zone using histological and ECG methods was shown and the possibility of formation of subepicardial and transmural myocardium necrosis was demonstrated as it is extremely important for pre-clinical study of different treatment methods.

Investigations of heart pathological changes in dynamics shown that an inflammatory reaction was developed in the zone of cryoeffect in myocardium, which in its turn was changed under the fibrotization processes with formation of connective tissue cicatrix.

Key words: myocardium necrosis, modeling, cryodestruction.

ВПЛИВ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ НА ЖИТТЕЗДАТНІСТЬ ДРІЖДЖІВ *Pichia anomala*

С. М. Шульга
О. О. Тігунова
А. Ф. Ткаченко
Н. Є. Бейко
А. І. Хоменко

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки»
НАН України, Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Збереження мікроорганізмів у колекціях чистих культур є актуальною проблемою. Існує багато методів збереження бактерій, але жоден з них не дає 100% -го захисту від мутацій, змін властивостей мікроорганізмів або їх загибелі. На життєздатність мікроорганізмів у процесі ліофілізації впливає низка факторів: умови культивування (рН і температура), вік культури, концентрація клітин, склад захисного середовища і метаболічна активність. Оптимізація цих процесів дозволяє зберегти до 80–90% життєздатних клітин. Для культури *Pichia anomala* визначено умови культивування, фази росту, в якій дріжджі виявляють найбільшу стійкість до несприятливих умов ліофілізації. Оптимізовано склад захисного середовища, що дало змогу досягти максимального (до 95%) збереження життєздатних клітин після ліофілізації. Високий рівень життєздатних клітин після заморожування відзначено у дріжджовій суспензії з 36 до 48 год росту. Визначено оптимальну температуру і термін зберігання ліофілізованих дріжджів з максимальною кількістю життєздатних клітин.

Ключові слова: дріжджі *Pichia anomala*, ліофілізація, захисне середовище, життєздатність клітин.

Традиційні методи підтримання культур мікроорганізмів зводяться до їх вирощування на багатих живильних середовищах із частими пересівами. При цьому спостерігаються мутаційні зміни і автоселекція, які часто призводять до втрати важливих фізіолого-біохімічних властивостей. Тривале зберігання культур мікроорганізмів без втрати властивостей продуцентів можливе, якщо різко припинити перебіг усіх процесів у клітині, тобто перевести її в стан, близький до анабіозу [1–3].

Відомо багато способів зберігання культур мікроорганізмів: періодичні пересіви, зберігання в 25% -му розчині гліцеролу при температурі –20 °С, у дистильованій воді, під вазеліновим маслом на агаризованому середовищі та в ліофілізованому стані. Жоден з відомих способів не є універсальним [4–6].

Під час ліофілізації у більшості мікроорганізмів відбувається часткова загибель клітин, а в деяких випадках — зміна їхніх властивостей [7–8]. Окрім того, характеристики ліофілізованих культур (кількість життєздатних клітин, залишкова вологість, структура сухого матеріалу та ін.) залежать від правильного проведення кожної операції і визначаються, у свою чергу, фізіологічними

та технологічними властивостями мікроорганізму, який підлягає ліофілізації. У зв'язку з цим існує необхідність визначення впливу різних чинників на життєздатність дріжджів *Pichia anomala* за їх ліофілізації.

Мета даної роботи — вивчення впливу умов культивування, віку культури та перенесення мікробних клітин в захисні середовища різного складу на життєздатність дріжджів *Pichia anomala* за ліофільного висушування.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були дріжджі *Pichia anomala* штаму L-1 з «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин харчової та сільськогосподарської біотехнологій» Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України.

Культури зберігали на солодовому агарі (8% сухих речовин, у тому числі 2% агару).

Дріжджі культивували глибинним періодичним способом на качалках (240 об/хв) при температурі 30 °С в колбах ємністю 0,75 дм³ з 0,05 дм³ живильного середовища такого складу (г/дм³): Н₂НCONH₂ — 1,0; КН₂РО₄ — 1,0; MgSO₄ · 7H₂O; FeCl₃ —

0,05; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,05; меляса — 60,0; рН 5,8. Культури висівали зі скошеного солодового агару, переносячи дріжджові клітини в колбу ємністю 0,25 дм³ із 0,1 дм³ стерильного живильного середовища, та культивували на шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) зі швидкістю перемішування 200 об/хв та за температури 30 °С протягом 24 год. Посівний матеріал, виготовлений таким методом, вміщували в колби ємністю 0,5 дм³ з 0,2 дм³ середовища. Як джерело вуглеводів використовували мелясу в кількості 60 г/дм³.

Дріжджі вирощували в біореакторі для культивування мікроорганізмів — АКЛ — 10М (Росія). Інокулят вирощували тим самим методом, що й посівний матеріал, і вносили у кількості 10%.

Склад окремих компонентів середовища змінювався залежно від поставленого завдання.

Кислотність середовищ визначали на рН-метрі — рН-150М (Білорусь).

Для одержання желатози 10%-й розчин желатини готували на бідистильованій воді та автоклавували протягом 1 год. Одержаний розчин желатози фільтрували і згодом використовували для приготування захисних середовищ.

Для отримання суспензії дріжджів культуральну рідину осаджували центрифугуванням і ресуспендували в захисних середовищах до концентрації $6,5 \cdot 10^6$ клітин/дм³. Для дослідження ефективності захисного середовища було використано метод, за яким пряме виявлення зв'язаної води можна замінити визначенням порівняльної гідрофільності, зокрема залишкової вологості в біологічних препаратах за їх одночасної ліофілізації [9, 10].

Для з'ясування впливу захисного середовища на життєздатність клітин після ліофілізації досліджували захисні середовища такого складу (%): глюкоза або цукроза — 1,0; 10,0; 30,0; желатоза — 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; агар — 0,2.

Дріжджі вносили в захисне середовище з розрахунку концентрації клітин $6,5 \cdot 10^6$ клітин/дм³, потім дріжджову суспензію в кількості 5 см³ вміщували в пеніцилінові флакони.

Одержані зразки заморожували в низькотемпературному холодильнику LAB 11/EL19LT фірми Elcold (Данія) за температури -80 °С. Заморожені зразки переносили в спеціальних касетах в попередньо охолоджену камеру (температура конденсатора -50 °С) ліофільної сушарки CRUODOS-50 фірми TELSTAR (Іспанія). Тривалість висушування становила 24 год.

Під час підготовки ліофілізованого матеріалу для досліджень слід було виконати дві умови: максимально точно відновити попередній (до висушування) об'єм матеріалу та вивести живі клітини зі стану анабіозу. Для виконання цих умов ліофілізований матеріал доводили дистильованою водою до об'єму $5 \cdot 10^{-3}$ дм³ і витримували за кімнатної температури в дистильованій воді протягом 30 хв.

Кількість клітин (живих і мертвих) виваховували за методикою, викладеною в роботі [11].

Підрахунок загальної кількості клітин дріжджів у культуральній рідині проводили за допомогою камери Горяєва з паралельним розсівом у чашки Петрі з сусло-агаром. Життєздатність дріжджів *Pichia anomala* штаму L-1 визначали за кількістю підрахованих колоній на чашках Петрі після двох діб культивування [12].

Після регідратації дріжджі піддавали глибинному культивуванню упродовж двох діб.

У процесі ліофілізації мікроорганізми іноді залишаються життєздатними, але з порушеними обмінними функціями клітин, що призводить до зниження фізіологічної активності.

Дріжджі *Pichia anomala* — продуцент ліпідів, тому їхню фізіологічну активність встановлювали за кількістю накопиченої біомаси і синтезом ліпідів.

Біомасу визначали таким способом: осад після центрифугування культуральної рідини протягом 30 хв при 5 000 g висушували в бюксах за температури 105 °С до незмінної маси (у трьох повторях) з подальшим зважуванням висушеної наважки дріжджів на вагах RADWAG WPS 4000/C/1 (Польща).

Для обчислення кількості ліпідів висушену біомасу (наважка 10 г) вкладали в пакетик з фільтрувального паперу та зважували. Потім пакетик вносили до екстрактора і герметично з'єднували всі частини апарата. Колбу апарата ставили у киплячу водяну баню. Через верх холодильника проводили послідовне екстрагування діетиловим ефіром і сумішшю хлороформ + етанол в апараті Сокслета протягом 5–6 год. Дріжджову масу, яка залишилась після першої екстракції, піддавали обробленню 10%-ю HCl на киплячій водяній бані впродовж 3 год, після чого тими самими розчинниками екстрагували частину ліпідів, яка залишилась.

Після екстракції пакетик з матеріалом висушували спочатку при 20–30 °С (за кімнатної температури), а потім при 100–105 °С. Зважували і за різницею між

масою до та після екстрагування визначали кількість жиру.

Кількість цукрів вираховували за стандартом СОУ.15.9-37-240 2005 р.

Ефективність синтезу ліпідів оцінювали за показником жирового коефіцієнта (дорівнює кількості мг ліпідів/мг цукрів $\times 100$).

Усі досліди проводили в трьох повторах, статистичне оброблення результатів виконували згідно з [13]. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Збереження життєздатності та інших біологічних властивостей мікроорганізмів залежить від багатьох чинників: віку культури (деякі види мікроорганізмів найбільш стійкі до заморожування [14] наприкінці логарифмічної стадії та на початку стаціонарної фази росту), концентрації клітин, складу захисного середовища, активності метаболічних процесів тощо.

Нами досліджено вплив віку дріжджової культури на життєздатність клітин під час заморожування й визначено тривалість фаз росту дріжджових клітин за їх культивування в рідкому середовищі. Початок логарифмічної фази зафіксовано на 7–8-й год, а початок стаціонарної — на 28-й год культивування. У середині кожної фази розвитку культури відбирали біомасу і відповідно до наведеної вище методики піддавали заморожуванню. Результати визначення життєздатності заморожених дріжджів наведено на рис. 1.

Високий рівень збереження життєздатних клітин після заморожування відзначено в дріжджовій суспензії лише з 36-ї до 48-ї год росту. Після 48 год життєздатність

клітин починала знижуватись. Цей факт можна пояснити тим, що на кріостійкість суспензії впливає різний фізіологічний стан клітин, співвідношення чутливих і стійких особин в популяції культури. Окрім того, стійкість залежить від хімічного складу клітин, передусім плазматичної мембрани.

Результати проведених досліджень дозволили встановити оптимальний вік культури (42 год росту) для збереження життєздатності клітин після заморожування.

На життєздатність мікроорганізмів на етапах заморожування і висушування впливають також умови їх культивування. Суттєвий вплив на кріорезистентність та життєздатність клітин за глибинного культивування мікроорганізмів під час висушування справляють рН і температура середовища.

Результати проведених експериментів дали змогу вивчити, як впливає рН середовища на життєздатність дріжджових клітин (табл. 1).

Оптимальним для синтезу біомаси є рН 5,5, кількість життєздатних клітин — 75,7% за максимального накопичення біомаси — 4,0 гАСБ/дм³. Якщо рН середовища становить 6,0, синтез біомаси знижується до 3,9 гАСБ/дм³, однак процес накопичення ліпідів триває і вміст їх досягає 2,0 г/гАСБ.

Також можна зробити висновок, що зміна рН середовища від 5 до 6 не має значного впливу на кількість ліпідів.

Таким чином, ліпіди як важливі компоненти цитоплазматичних мембран, так само як трегалоза і глікоген, виконують роль резервного матеріалу [15] і виявляють захисну дію стосовно біологічних мембран під час ліофілізації.

Досліджено вплив температури культивування дріжджів на біомасу та накопичення ліпідів (рис. 2).

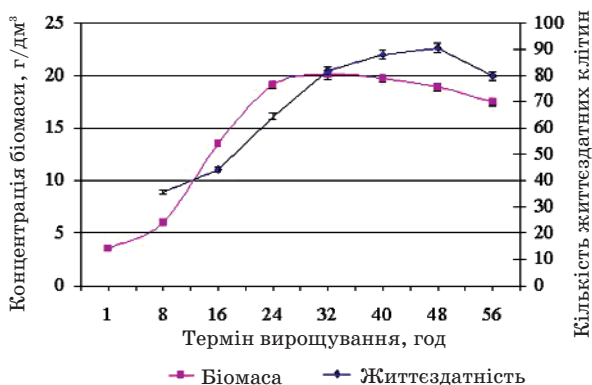


Рис. 1. Синтез біомаси та життєздатність дріжджів залежно від фаз росту

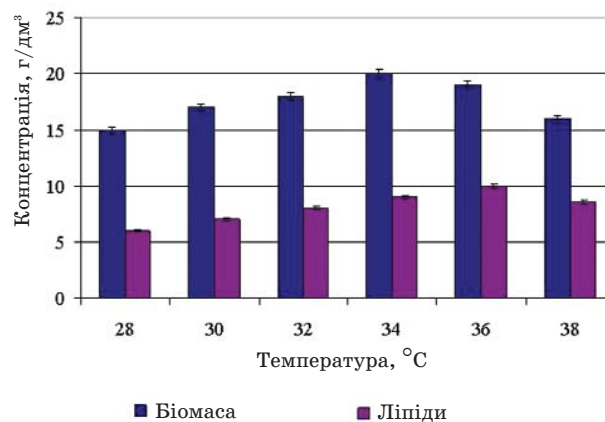


Рис. 2. Вплив температури на накопичення ліпідів *Pichia anomala* штаму L-1

Таблиця 1. Вплив рН середовища на виживаність дріжджових клітин

рН	Біомаса, гАСБ*/дм ³	Вміст ліпідів, г/гАСБ	Кількість живих клітин		
			До ліофілізації, КУО · 10 ⁹	Після ліофілізації, КУО · 10 ⁹	Вживаність, %
4,0	2,40±0,10	1,30±0,01	6,00±0,12	2,20±0,04	33,9
4,5	3,00±0,05	1,60±0,02	6,50±0,11	1,80±0,01	27,7
5,0	3,40±0,08	1,80±0,01	6,90±0,14	3,00±0,06	43,5
5,5	4,00±0,07	1,80±0,03	7,50±0,13	5,00±0,11	72,5
6,0	3,90±0,10	2,00±0,01	7,40±0,15	5,60±0,09	75,7
6,5	3,60±0,06	1,90±0,02	7,00±0,10	3,00±0,05	59,4
7,0	3,00±0,08	1,70±0,01	6,50±0,09	2,60±0,03	40,0

Примітка. АСБ — абсолютно суха біомаса.

Підвищення температури від 28 °С до 34 °С зумовлювало збільшення накопичення біомаси. З підвищенням температури до 38 °С синтез біомаси зменшувався, однак синтез ліпідів продовжувався і максимальна кількість ліпідів спостерігалася за температури 36 °С.

Кількість життєздатних клітин після ліофілізації значною мірою залежить від складу захисних середовищ.

Вживаність дріжджових клітин під час ліофілізації можна збільшити, підбираючи захисні середовища до оптимального їх складу і співвідношення компонентів у середовищі, що запобігають або зменшують інтенсивність деструктивних процесів.

Існують загальні вимоги до захисних середовищ. Вони мають бути гідрофільними (речовини, які не зв'язують воду, не є захисними для мікроорганізмів за їх ліофілізації) і не містити солей (для цього їх готують на дистильованій або бідистильованій воді). Крім того, слід запобігати потраплянню солей із середовища культивування разом з мікробною масою. Для цього перед змиванням мікробної маси захисним середовищем потрібно видалити конденсаційну воду з пробірок, в яких вирощували культуру.

Дослідження різних захисних середовищ допомогло підібрати середовища, до складу яких входили вуглеводи (глюкоза і сахароза як гідрофільні речовини), желатина й агар (як колоїди), що максимально захищали клітини мікроорганізму від шкідливого впливу ліофілізації і не мали антигенних властивостей. Ці середовища можна вважати гідрофільними, але вміст зазначених речовин не повинен бути надмірним. Занадто великий вміст гідрофільних речовин уповільнює процес висушування, створює підвищену залишкову вологість і зменшує розчинність сухого препарату. Тобто вміст цих речовин має лише забезпечувати оптимальну залишкову вологість [16].

Було досліджено гідрофільність дріжджових суспензій залежно від концентрації в них глюкози і цукрози (табл. 2).

З даних таблиці видно, як змінювалася залишкова вологість кінцевого матеріалу залежно від вмісту вуглеводів і їхньої концентрації за одних і тих самих умов ліофілізації. З використанням глюкози та цукрози в кількості 10% одержали показники залишкової вологості 2,85 і 1,94%, відповідно. Для подальшої роботи з підбору захисного середовища для ліофілізації дріжджів як гідрофільний компонент було обрано цукрозу в концентрації 10%.

Окрім наявності речовин, від яких залежить гідрофільність матеріалу, в середовищі мають бути ще й речовини, які максимально захищають клітини мікроорганізму від шкідливого впливу заморожування і висушування.

У роботі [17] показано, що желатоза здатна захищати мікроорганізми від згубної дії процесів заморожування та ліофілізації. Найбільш цінними властивостями желатози в захисних середовищах було те, що вона забезпечувала ліофільну структуру сухого матеріалу і, на відміну від желатини, була не дуже в'язкою, не утворювала гелів навіть за високої концентрації і не мала антигенних властивостей.

Нами досліджено вплив різних концентрацій желатози на кількість життєздатних дріжджових клітин після ліофілізації. Результати подано в табл. 3.

Таблиця 2. Порівняльна гідрофільність суспензії *Pichia anomala* залежно від концентрації глюкози та цукрози

Захисне середовище з глюкозою, %	Залишкова вологість, %	Захисне середовище з цукрозою, %	Залишкова вологість, %
1	19,67	1	18,11
10	2,85	10	1,94
30	40,43	30	50,33

Таблиця 3. Вплив концентрації желатози на кількість дріжджових клітин в сухому матеріалі

Концентрація желатози, %	Кількість мікроорганізмів КУО · 10 ⁹		Життєздатність, %	Залишкова вологість, %
	До ліофілізації	Після ліофілізації		
5	4,90±0,06	2,35±0,01	47,9	4,0
6	5,10±0,09	3,21±0,02	63,0	2,9
7	5,00±0,10	3,36±0,05	67,2	3,0
8	5,60±0,10	4,60±0,09	82,1	3,1
9	5,50±0,11	4,20±0,06	81,8	2,8
10	5,40±0,08	5,20±0,12	96,3	1,9
11	5,00±0,04	4,20±0,08	96,0	2,0

Дані таблиці свідчать, що концентрацію желатози в захисному середовищі потрібно було довести до 10%, щоб забезпечити максимальну фіксацію клітин дріжджів у сухому матеріалі і запобігти надмірному висушуванню клітин (залишкова волога — на рівні 1,9%).

За результатами досліджень оптимізовано склад захисного середовища, яке містило такі компоненти (%): глюкоза — 10,0; желатоза — 10,0; агар — 0,02.

Для визначення часу зберігання без значної втрати життєздатності та фізіологічної активності дріжджових клітин після ліофілізації слід вивести їх з анабіотичного стану. Якщо не забезпечити оптимальних умов виведення клітин з анабіозу, то одержані дані щодо життєздатності мікроорганізму будуть занижені.

Особливе значення під час зберігання ліофілізованих мікроорганізмів мають температурні умови. Чим вища температура зберігання культур, тим швидше знижувалась кількість життєздатних клітин мікроорганізмів. Між температурою зберігання ліофілізованих мікроорганізмів і швидкістю відмирання спостерігалась певна залежність (рис. 3).

У разі зберігання зразків ліофілізованих дріжджів упродовж місяця за температури 6 °С кількість життєздатних клітин не зменшувалась порівняно з вихідною культурою, а з підвищенням температури — поступово знижувалась і за температури 34 °С втрачалося приблизно 13%. Відповідно і кількість синтезованих ліпідів зменшувалась з підвищенням температури.

Спостереження за сухим матеріалом дріжджів, одержаним з урахуванням усіх чинників, які позитивно впливали на процес ліофілізації культури, показали, що під час зберігання за температури 6 °С протягом року (рис. 4) життєздатність дріжджів наприкінці року досягала 94–95%. За кімнатної

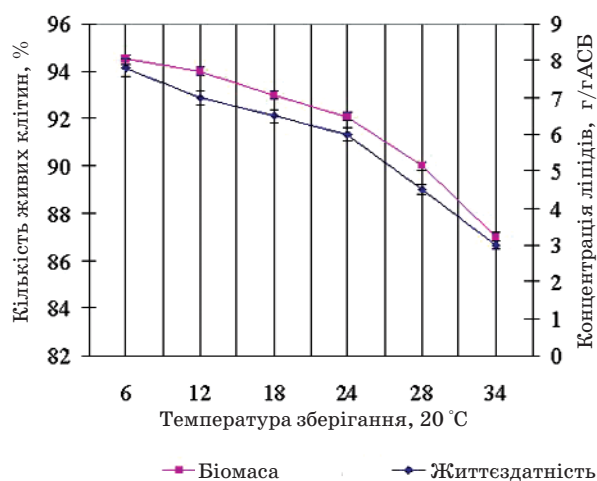


Рис. 3. Вплив температури зберігання на життєздатність і синтез ліпідів ліофілізованих дріжджів

температури (20 °С) кількість життєздатних клітин поступово зменшувалась і через рік зберігання становила 90%.

Дослідженнями процесу ліпидоутворення ліофілізованих дріжджів під час зберігання протягом року встановлено, що синтез ліпідів наприкінці терміну зберігання зменшився на 5% за температури зберігання 6 °С і на 10% за кімнатної температури (рис. 4). Відповідно змінювалась і величина жирового коефіцієнта. Це є важливим чинником для зберігання продуцента в ліофільному стані впродовж року.

З'ясовано, що для зберігання ліофілізованих дріжджів *Pichia anomala* протягом року з концентрацією 93–95% життєздатних клітин, стабільною фізіологічною активністю і синтезом ліпідів потрібно:

- перед заморожуванням культивувати дріжджі протягом 48 год за температури 36 °С і рН 6,0;
- переносити дріжджі в захисне середовище такого складу (%): цукроза — 10,0; желатоза — 10,0; агар — 0,2.

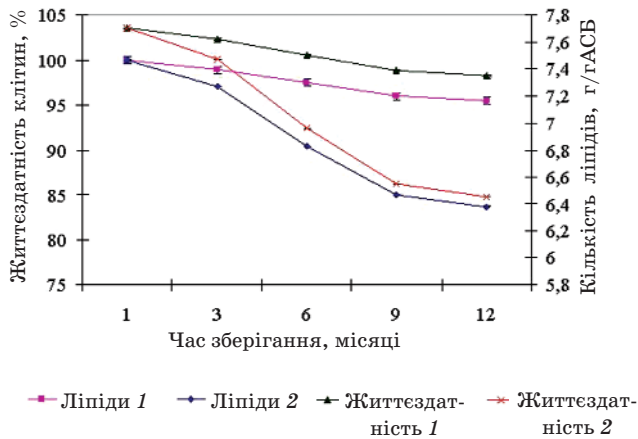


Рис 4. Порівняльна характеристика ліофілізованих дріжджів при різних температурах зберігання упродовж року:

1 — за температури 6 °C;
2 — 20 °C

ЛІТЕРАТУРА

1. Мацкевич Н. В. Спонтанная изменчивость и карриология несовершенных грибов. — М.: Наука, 1981. — 184 с.
2. Филиппова С. М., Кузнецов В. Ю., Бадяутдинов Д. Н. и др. Изучение внутрипопуляционных спонтанных морфологических вариантов *Streptomyces oligocarpophilus* ISP5589 // Микробиология. — 1999. — Т. 68, № 3. — С. 375–382.
3. Ганбаров Х. Г., Абдулгамидова С. М. Изучение внутрипопуляционных морфо-культуральных изменений дрожжевых грибов, хранившихся в коллекции культур // Вестн. Бакин. гос. ун-та, сер. биол. наук. — 2007. — № 1. — С. 42–46.
4. Куплетская М. Б., Аркадьева З. А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ // Микробиология. — 1997. — Т. 66, № 2. — С. 283–288.
5. Стоянова Л. Г., Аркадьева З. А. Сравнения способов хранения молочнокислых бактерий // Там же. — 2000. — Т. 69, № 1. — С. 98–104.
6. Fernandez-Segovia I., Escriche A., Fuentes A., Serra I. A. Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods // Int. J. Food Microbiol. — 2007. — V. 116, Is. 1. — P. 64–72.
7. Михайлова Р. В., Семашко Т. В., Лобанок А. Т., Осока О. М. Спонтанная изменчивость *Penicillium feniculosum* — продуцента глюкозооксидазы // Микол. фитопатол. — 2001. — Т. 35, Вып. 3. — С. 73–79.
8. Абдулгамидова С. М., Ганбаров Х. Г. Выживаемость дрожжевых культур при хранении в коллекции на сусло-агаре // Сб. научн. тр. Ин-та микробиол. НАН Азербайджана. — Баку, 2007. — Т. 4. — С. 34–39.
9. Абдулгамидова С. М. Сравнительная эффективность различных методов длительного хранения дрожжей // Вісн. Харків. нац. ун-ту ім. В. Н. Каразіна. Сер.: біол. — 2008. — Вип. 8, № 828. — С. 132–136.
10. Бланков Б. И., Клебанов Д. Л. Применение лиофилизации в микробиологии. — М.: Изд-во мед. лит-ры, 1961. — 263 с.
11. Бабьева И. В., Голубева В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. — М., 1979. — С. 120.
12. Луста К. А., Фихте Б. А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Ред. В. К. Ерошин. — Пуццино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. — С. 186.
13. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 300 с.
14. Осадчая А. И., Кудрявцев В. А., Софронова Л. А. Влияние некоторых факторов на криорезистентность и сохранение жизнеспособности при лиофилизации культур *Vacillus subtilis* // Биотехнология. — 2002. — Т. 3. — С. 45–54.
15. Квасников Е. И., Щелокова И. Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования / Отв. ред. Смирнов В. В.; АН УССР. Ин-т микробиол. вирусол. им. Д. К. Заболотного. — К.: Наук. думка. — 1991. — 328 с.
16. Данилова М. В., Надирова И. М., Кудрявцев В. И. Лиофилизация бактерий / Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. — М.: Наука. — 1967. — С. 131.
17. Похилено В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Изв. высш. уч. зав. Поволж. рег. — 2009. — № 4. — С. 99–121.

**ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ
НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ
*Pichia anomala***

*С. М. Шульга
Е. А. Тигунова
А. Ф. Ткаченко
Н. Е. Бейко
А. И. Хоменко*

ГУ «Институт пищевой биотехнологии
и геномики» НАН Украины, Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Сохранение микроорганизмов в коллекциях чистых культур является актуальной проблемой. Существует много методов сохранения бактерий, но ни один из них не дает 100% -й защиты от мутаций, изменений свойств микроорганизмов или их гибели. На жизнеспособность микроорганизмов при лиофилизации влияет ряд факторов: условия культивирования (рН и температура), возраст культуры, концентрация клеток, состав защитной среды и метаболическая активность. Оптимизация этих процессов позволяет сохранить до 80–90% жизнеспособных клеток. Для исследуемой культуры *Pichia anomala* определены условия культивирования, фаза роста культуры, при которой дрожжи проявляют наибольшую устойчивость к неблагоприятным условиям процесса лиофилизации. Оптимизирован состав защитной среды, что позволило получить после процесса лиофилизации максимальное (до 95,5%) сохранение жизнеспособных клеток. Высокий уровень жизнеспособных клеток после замораживания отмечен в дрожжевой суспензии с 36 до 48 ч роста. Определены оптимальная температура и срок сохранения лиофилизированных дрожжей с максимальным количеством жизнеспособных клеток.

Ключевые слова: дрожжи *Pichia anomala*, лиофилизация, защитная среда, жизнеспособность клеток.

**LYOPHILIZATION EFFECT
ON *Pichia anomala*
YEASTS VIABILITY**

*S. M. Shulga
O. O. Tigonova
A. F. Tkachenko
N. E. Beyko
A. I. Khomenko*

State organization «Institute of Food
Biotechnology and Genomics» of the National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Saving microorganisms in clean culture collections is an actual problem. There is a lot of methods to save bacteria, but none of them give 100% protection from mutation, changing microorganism properties or their death. A lot of factors influence on microorganism survival: cultivation factors (pH and temperature), culture age, cell concentration, protection medium consistency and metabolic activity. Optimization of this process enables to have about 80–90% survival cells. Cultivation factors, culture grown phase for the investigated *Pichia anomala* culture, were determined, in which yeasts showed the most stability for unfavorable conditions of lyophilization process. Composition of the protective environment were optimized that enabled us to obtain maximum (up to 95.5%) saving of the viable cells after the lyophilization process. High level of the viable cells was observed after freezing in the yeast suspension from 36 to 48 hours of growth. The optimum temperature and time saving of lyophilized yeast with the highest number of the viable cells were determined.

Key words: *Pichia anomala* yeasts, liophilization, protective environment, cell viability.

УДК 581.143.6

СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *Nicotiana tabacum* L. ПРИ СТРЕССЕ

Л. Е. Сергеева
Л. И. Бронникова
Е. Н. Тищенко

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

E-mail: oltyko@gmail.com

Проблема стрессоустойчивости растений — одна из наиболее фундаментальных и является предметом исследований на всех иерархических уровнях. В настоящее время она стала еще более актуальной из-за обеднения дикой и культивируемой флоры, вызванного нарушениями (нередко необратимыми) окружающей среды и климатических условий.

Получены Cd-резистентные клеточные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.), обладающие комплексной устойчивостью к разным типам засоления и водному дефициту. Из них выделены варианты (С. №1 и С. №6), растущие на средах, которые содержат трехкратно-летальную дозу ионов кадмия. Клеточные линии продолжали расти в условиях действия летальных доз ионов кадмия, солей морской воды, сульфата натрия, маннита. При этом относительный прирост биомассы каллуса был наивысшим на среде с ионами Cd^{2+} и превышал этот показатель в нормальных условиях. Изучали содержание свободного пролина в клетках в период их активного развития. Уровень свободного пролина у клеточной линии С. №1 при культивировании на всех селективных средах превышал контрольные показатели. У линии С. №6 при выращивании на среде с добавлением Na_2SO_4 уровень пролина был ниже контрольных данных. Максимальное содержание пролина в клетках обеих линий зафиксировано при выращивании на среде с маннитом. Колебания содержания пролина могут быть показателем жизнедеятельности организма в стрессовых условиях. Высказывается предположение о различных механизмах процесса адаптации Cd-устойчивых линий табака к засолению, что может быть обусловлено эпигенетическими изменениями.

Ключевые слова: *N. tabacum* L., клеточные линии, ионы кадмия, осмотический стресс, устойчивость.

Проблема стрессоустойчивости растений — одна из наиболее фундаментальных и является предметом исследований на всех иерархических уровнях. В настоящее время она стала еще более актуальной из-за обеднения дикой и культивируемой флоры, вызванного нарушениями (нередко необратимыми) окружающей среды и климатических условий. Возникает потребность в растениях, способных не только выдерживать неблагоприятные условия, но и активно им противостоять, т. е. функционировать при стрессе. Очевидно, мониторинг таких феноменов в природных ценозах, а особенно их идентификация среди полученных в результате разнообразных биотехнологических экспериментов генотипов, должны базироваться на гарантированных маркерах устойчивости.

Одним из таких показателей может быть содержание свободного пролина. Установле-

на положительная корреляция между содержанием свободного пролина и солеустойчивостью генотипов и гибридов тыквы [1, 2]. Некоторые авторы даже настаивают на стимулирующем действии NaCl на продуцирование глутамата для последующего синтеза пролина [3]. Аналогичное явление прослеживается и при изучении клеточных культур *in vitro* [4]. Отмечено возрастание уровня пролина, связанное с устойчивостью к водному стрессу [5]. В ряде публикаций показана зависимость содержания свободного пролина от действия тяжелых металлов. Так, способность хрустальной травки расти в водной культуре при высоких концентрациях ионов меди или цинка сопровождалась накоплением пролина [6]. Устойчивость к ионам никеля и кадмия также связывают с накоплением пролина [7, 8]. Следует, однако, отметить, что в указанных экспериментах

количество используемых стрессоров, во-первых, не достигало летальных пределов, во-вторых, не была исследована динамика колебаний содержания пролина, что, по нашему мнению, не позволяет установить происхождение данного соединения, а это особенно важно, учитывая фиксированное (во всех публикациях) снижение биомассы тестируемых объектов. В предыдущих публикациях мы сообщали о получении клеточных линий табака, устойчивых к летальным концентрациям ионов Cd^{2+} [9, 10]. Эти линии также росли и пролиферировали при добавлении в культуральные среды летальных доз солей морской воды, сульфата натрия (20 г/л) или маннита (145 г/л). Такие комплексно устойчивые феномены выделены впервые, более того, из них получены фертильные растения, в которых сохраняется перекрестная устойчивость к различным типам засоления и водному дефициту.

Ранее нами было установлено, что комплексная устойчивость клеточных линий табака к различным типам осмотического стресса сопряжена со значительным повышением содержания пролина. При этом имела значение только сила, но не тип стресса [11]. Поэтому представлялось логичным изучить роль пролина у Cd-устойчивых клеточных линий при культивировании на различном стрессовом фоне.

Материалы и методы

Устойчивые клеточные линии табака (*Nicotiana tabacum* L.) сорта Самсун отбирали на селективных средах, содержащих 50 мкМ ионов Cd^{2+} (летальная концентрация для клеточных культур табака дикого типа). За время пассирования (более 6 мес) отобранные клоны не только не снижали темп роста, но среди них были выделены варианты (С. №1 и С. №6) с повышенным уровнем устойчивости, растущие в присутствии 150 мкМ данных ионов. Эти клеточные линии переносили на селективные среды, содержащие 20 г/л солей морской воды или сульфата натрия либо 0,8М (145 г/л) маннита. На селективных и контрольной средах устойчивые клеточные линии культивировали при постоянной перемене типа стрессового давления. При этом чередования: стресс А — стресс В, стресс А — контроль, контроль — стресс В всегда было произвольным во избежание адаптации.

Определение свободного пролина производили по модифицированной методике Чинарда [12]. Навеску каллусной ткани расти-

рали в 10 мл 3,0% -го раствора сульфосалициловой кислоты для осаждения протеинов. Гомогенат фильтровали. К 2,0 мл фильтрата приливали 2,0 мл нингидринового реактива, приготовленного без нагревания (1,25 г нингидрина, 30 мл ледяной уксусной кислоты, 20 мл 6 М раствора H_3PO_4), и 2,0 мл ледяной уксусной кислоты. Реакционную смесь инкубировали в течение 1 ч на водяной бане при 100 °С, после чего быстро охлаждали до комнатной температуры, переносили в делительную воронку с 4,0 мл толуола и встряхивали. Верхний окрашенный слой (хромофор) колориметрировали против толуола при длине волны $\lambda = 520$ нм. Концентрацию пролина (X) рассчитывали по формуле:

$$X = a \cdot c \cdot v \cdot 100 / a^1 \cdot v^1 \cdot n \cdot 1000,$$

где a — экстинкция опытного раствора; a^1 — экстинкция стандарта; c — концентрация стандарта (мкг); v — разведение (10 мл); n — навеска; v^1 — объем, взятый для цветной реакции (2 мл); 100 — расчет в %; 1 000 — перевод мкг в мг. Стандартную кривую строили по кристаллическому пролину.

Поскольку содержание свободного пролина существенно варьирует в течение суток и зависит от возраста культуры, отбор проб для анализа производили от 8 до 9 ч утра (время максимального синтеза). Уровень аминокислоты определяли на 14- и 21-й дни пассажа; ранее было отмечено, что максимальные абсолютные величины параметра приходятся именно на этот срок [11].

Эффективность — относительный прирост биомассы (Δm), который определяли:

$$\Delta m = (m_k - m_n) / m_n,$$

где m_n , m_k — масса каллуса в начале и конце пассажа соответственно.

Измерения проводили в трехкратной биологической и двукратной аналитической повторностях и статистически обрабатывали.

Результаты и обсуждение

Уровень свободного пролина — динамический параметр, изменяющийся даже в нормальных условиях. Ранее нами был исследован характер флуктуаций в течение пассажа в норме и при стрессе у устойчивых и неустойчивых культур [11, 13]. Установлено, что абсолютная величина данного параметра как таковая, вне привязки к конкретному функциональному состоянию клетки, неинформативна. Содержание пролина в культивируемом каллусе определяли

на 14- и 21-й дни пассажа. Известно, что с 7-го по 14-й день культура клеток проходит стадию логарифмического роста. Это период максимального клеточного деления, следовательно, и максимального использования аминокислот, в том числе пролина, для синтеза протеиновых компартментов. С 14-го дня культура вступает в стадию стационарного роста, которая длится до 21-го дня. Далее начинается старение культуры, ускоряющееся пропорционально исчерпанию ресурсов. Поэтому измерение пролина на 14- и 21-й дни пассажа, по нашему мнению, наиболее адекватно отражает состояние культивируемых клеток в период максимальной физиологической активности.

На диаграммах, представленных на рис. 1, отображено содержание свободного пролина у различных растущих клеточных культур табака, культивируемых в нормальных условиях и на различных селективных средах, а также относительный прирост их биомассы, измеренный в конце пассажа.

Из диаграмм следует, что при культивировании в нормальных условиях (рис. 1, а) содержание свободного пролина в клетках невысокое; существенного различия между культурами дикого типа (контроль) и Cd-устойчивыми вариантами не наблюдалось. Рост клеточных культур в норме аналогичен.

При перенесении устойчивых клеточных линий в селективные условия уровень пролина (относительно параметра, измеренного в нормальных условиях) возрастал. На первый план выступает реакция взаимодействия генотип/среда (G/E).

Селективная среда с ионами кадмия (рис. 1, б). Эта среда содержала 150 мкМ ионов Cd²⁺. Такая концентрация в три раза превосходила летальную дозу, при которой проводилась селекция на устойчивость. Однако исследовавшиеся клеточные линии табака не только продолжали расти в таких жестких условиях, но и отличались максимальным показателем относительного прироста биомассы, превосходящим даже показатель, зафиксированный при выращивании Cd-устойчивых вариантов на контрольной среде. Уровень свободного пролина превышал контрольные значения в 1,6–1,9 раза на 14-й день и более чем в 3 раза — на 21-й день. Столь существенное увеличение содержания аминокислоты в одно и то же время не следует, по нашему мнению, считать следствием стрессовых реакций, учитывая активный рост каллуса. Более вероятно происшедшая в клетках под действием ионов

кадмия стимуляция активности ряда ферментов синтеза пролина по глутаматному пути [14]. Образовавшийся пролин в период активного клеточного деления, вероятно, используется для синтеза протеинов. В пользу такого предположения свидетельствуют данные об увеличении общего числа рибосом и содержании полисом после обработки прорастающих семян гороха ионами кадмия [15]. Вместе с тем имеются данные, указывающие на угнетение роста и снижение уровня пролина пропорционально увеличению концентрации ионов кадмия [16]. Однако в этих случаях были использованы не летальные дозы ионов. Далее с прекращением деления и переходом клеток в стадию стационарного роста (14–21-й дни пассажа) пул пролина возрастал. Генотипических различий в реакции между устойчивыми клеточными линиями не отмечалось.

Селективные среды с солями морской воды и сульфатом натрия (рис. 1, в, г). Устойчивые к ионам кадмия клеточные линии табака росли в присутствии летальных концентраций солей морской воды и Na₂SO₄ (модели сульфатно-хлоридного и сульфатного засоления). Относительный прирост биомассы каллуса, культивируемого при засолении, существенно уступал этому показателю, измеренному у линий, помещенных на среды с ионами кадмия. По темпу роста при засолении устойчивые линии С. №1 и С. №6 отличались незначительно. В то же время содержание свободного пролина указывало на различия в реакции взаимодействия G/E. У линии С. №1 уровень свободного пролина в клетках был аналогичным при культивировании на солевом фоне и в присутствии ионов кадмия (рис. 1, б, в, г). В условиях засоления стабильность содержания пролина в пассаже сохранялась. У линии С. №6, помещенной на засоление, уровень пролина в клетках был более динамичным. Очевидно, Cd-устойчивые линии С. №1 и С. №6 по-разному адаптируются к засолению. Линию С. №1 можно со значительной степенью вероятности отнести к условной категории «пролинпротекторных», т. е. таких, у которых накопление пролина при засолении является основным показателем солеустойчивости. На эту характеристику, особенно сочетающуюся (как в настоящем эксперименте) со снижением относительного прироста биомассы, указывают и другие источники [11, 17]. Учитывая полифункциональную роль пролина при стрессе, в данном случае его можно рассматривать как осморегулирующее соединение [18]. В вакуолях

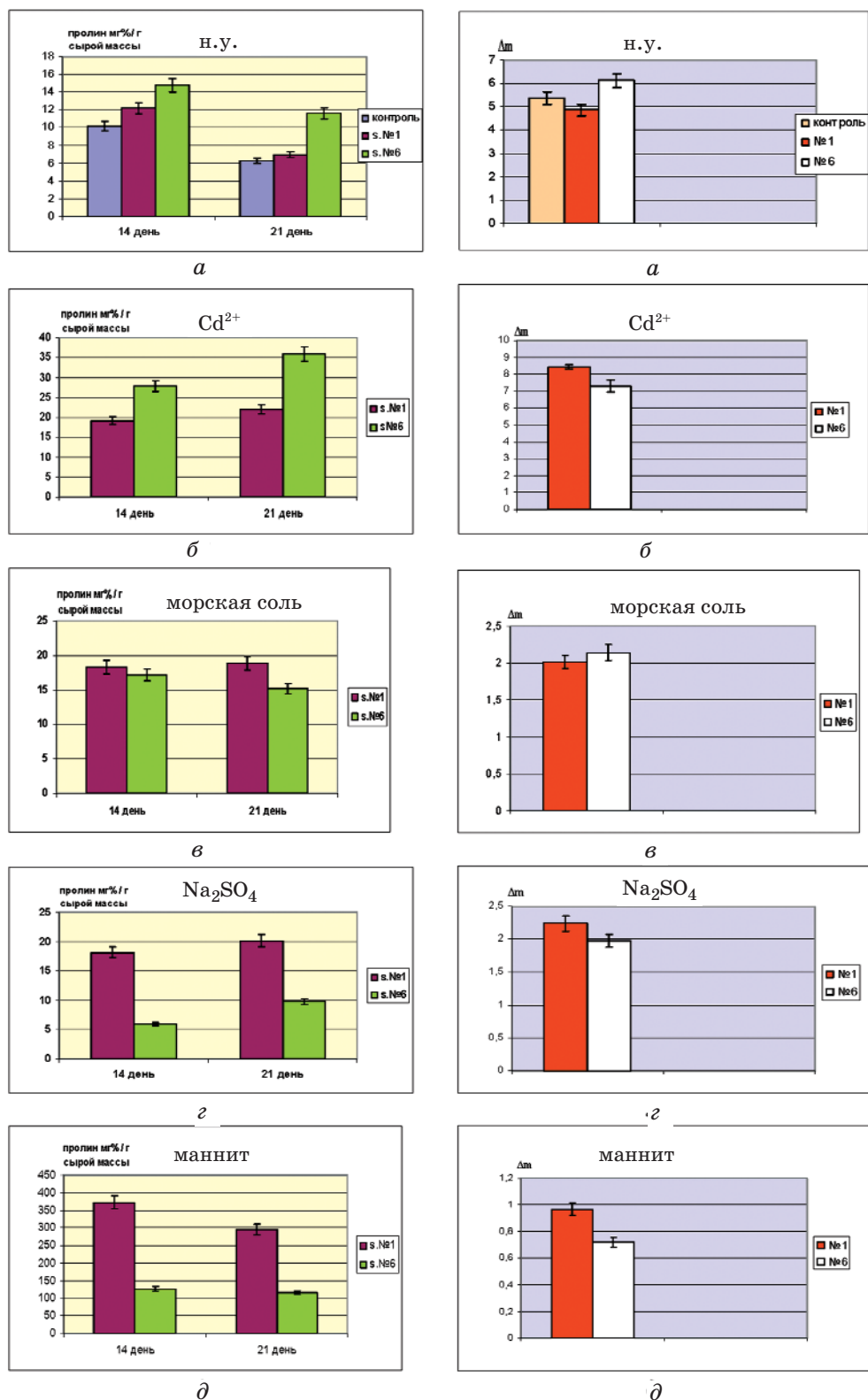


Рис. 1. Влияние условий культивирования на содержание свободного пролина и рост биомассы (Δm) клеточных линий табака №1 и №6:

- а — нормальные условия;
- б — селективная среда, содержащая 150 мкМ Cd^{2+} ;
- в — селективная среда, содержащая 2,0% солей морской воды;
- г — селективная среда, содержащая 2,0% Na_2SO_4 ;
- д — селективная среда, содержащая 0,8 М маннита

клеток при засолении накапливается значительное количество ионов Na^+ , что направлено на защиту компартментов цитоплазмы. В наших экспериментах этот факт также был установлен. Для стабилизации осмотического потенциала в цитоплазме клеток увеличивается уровень пролина [11]. При этом реакция клеток на засоления различного типа единообразна, что можно рассматривать как аргумент осморегулирующей составляющей пролина.

Cd-устойчивая клеточная линия табака С. №6 реагирует на засоление по-иному. Если при выращивании клеток на среде с солями морской воды содержание пролина в них незначительно отличается от контрольных показателей, то при культивировании в условиях сульфатного засоления оно ниже (рис. 1, в, з). Это может свидетельствовать о минорной роли пролина в солеустойчивости линии. Очевидно, в клетках задействованы другие протекторные соединения, в частности биогенные амины. Ранее было установлено, что ионы кадмия могут стимулировать синтез полиаминов: путресцина, спермина, спермидина [15]. Эти соединения существенно повышают солеустойчивость растений [19, 20]. С другой стороны, они же могут ингибировать синтез пролина [20]. В связи с этим предполагается наличие различных способов процесса адаптации Cd-устойчивых линий табака к засолению, что может быть отражением эпигенетических изменений.

Селективная среда с маннитом (рис. 1, д). Селективную среду, содержащую маннит, используют для моделирования водного стресса *in vitro*. Cd-устойчивые клеточные линии табака стабильно росли на селективной среде, содержащей летальную для контроля концентрацию соединения, однако Δm в этих условиях был наименьшим. Снижение биомассы, отмечавшееся и ранее, характерно для высокоустойчивых клеточных линий [11, 17]. Такие клетки отличаются измененной морфологией: вместо цилиндрической клетка приобретает сферическую форму, вследствие чего снижается объем клетки. Такая обратимая адаптивная реакция способствует поддержанию осмотического баланса при стрессе [17]. Аналогичный феномен роста наблюдали у устойчивого к 20,0%-му ПЭГ-10 000 средиземноморского галофита *Atriplex halimus* L. в присутствии 100 мкМ CdCl_2 [21]. В то же время уровень свободного пролина в клетках в этом варианте опыта был наивысшим (рис. 1, д). Очевидно, в этом случае пролин выступает

как водоудерживающая молекула [18]. Поэтому вполне объяснимо, что на 14-й день отмечали максимальное значение показателя: для делящихся клеток особенно необходимо поддержание их водного баланса. По абсолютной величине содержание свободного пролина в клетках тестированных линий существенно различалось, однако сходная динамика его изменений в пределах пассажа может свидетельствовать о реализации одних механизмов устойчивости.

В последнее время изучению роли пролина в растениях придается особое значение [20–22]. Собственная метаболическая система этой аминокислоты отличается специфическими особенностями, позволяющими рассматривать пролин как «стрессовый субстрат», в частности: 1) участием пролина при передаче стрессовых сигналов; 2) значительным доступным пулом свободного пролина; 3) реализацией специфических стрессовых функций в процессе метаболизма пролина [23]. В ряде случаев пролин рассматривается как облигатный источник углерода для цикла трикарбоновых кислот [24]. В нашем эксперименте Cd-устойчивые линии росли на всех селективных средах (рис. 2). При этом содержание свободного пролина, его аккумуляция/расходование соответствовало функциональному состоянию клеток: делению/растяжению.

Методом клеточной селекции неоднократно отбирали линии с комплексной устойчивостью к различным осмотическим стрессам. Однако летальные дозы ионов тяжелых металлов для этой цели использовали в единичных случаях [13]. Преимущество настоящего метода состоит в том, что в результате создаются предпосылки для гарантированного отбора вариантов, адаптирующихся к действию конкретного стрессора, т. е. отличающиеся физиологической устойчивостью, показателем которой может быть содержание свободного пролина в динамике.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что клеточные линии табака, отобранные на селективных средах, содержащих летальные дозы ионов кадмия, характеризуются устойчивостью к солевому стрессу; содержание свободного пролина может служить показателем адаптации к конкретному типу засоления: хлоридному, сульфатно-хлоридному; колебания этого показателя могут свидетельствовать об адаптации организма в условиях стресса.

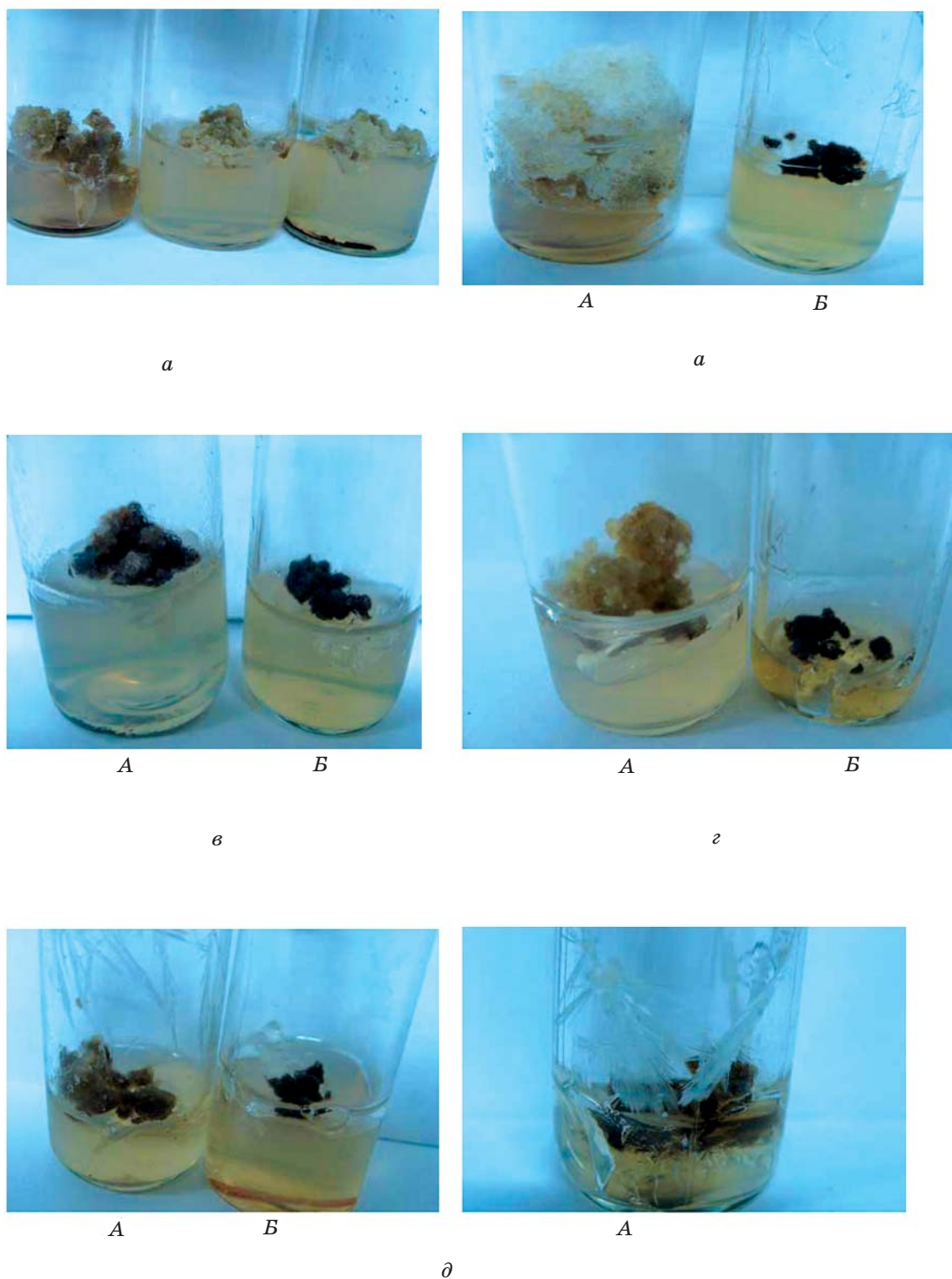


Рис. 2. Культивирование клеточных культур табака *in vitro*:

- А — устойчивая линия №1;
- Б — контроль, дикий тип;
- а — нормальные условия;
- б — селективная среда, содержащая 150 мкМ Cd^{2+} ;
- в — селективная среда, содержащая 2,0% солей морской воды;
- г — селективная среда, содержащая 2,0% Na_2SO_4 ;
- д — селективная среда, содержащая 0,8 М маннита

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhou J.-G., Zhu Y.-I., Liu G.-W et al. Физиологическая и биохимическая характеристики гибрида *Cucurbita moschata* при NaCl-стрессе взрослых растений // Xibei zhiwu xuebao — Acta Bot. Boreali Occid. Sin. — 2007. — V. 27, N 10. — P. 2052–2058.
2. Wang R., Chen G.-L., Song W. et al. Влияние NaCl-стресса на содержание катионов у растений двух разновидностей тыквы // Zhiwu shengli yu fenzish. Xuebao — J. Plant. Phys. Mol. Biol. — 2006. — V. 32, N 1. — P. 94–98.
3. Skopelitis D. S., Paranychanakis N. V., Paschalidis K. A. et al. Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine // Plant Cell. — 2006. — V. 18, N 10. — P. 2767–2781.
4. Sumithra K., Jutur P. P., Dalton C. B., Reddi A. R. Salinity induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: Responses of antioxidative and proline metabolism // Plant Growth Reg. — 2006. — V. 50, N 1. — P. 11–22.
5. Zhang M.-S., Tan F., Zhang Q.-T., Yang Y.-H. Physiological indices and selection of methods on rapid identification for sweet potato drought resistance // Agric. Sci. China. — 2005. — V. 4, N 1. — P. 826–832.
6. Холодова В. П., Волков К. С., Кузнецов В. В. Адаптация к высоким концентрациям солей меди и цинка растений хрустальной травки и возможность их использования в целях фиторемедиации // Физиол. раст. — 2005. — Т. 52, № 6. — С. 848–858.
7. Tandon P. K., Srivastava M. Effect of cadmium and nickel on metabolism during early stages of growth in gram (*Cicer arietinum* L.) seeds // Ind. J. Agr. Biochem. — 2004. — V. 17, N 1. — P. 31–34.
8. Qin G.-Q., Yan C. L., Wei L. L. Влияние кадмиевого стресса на содержание таннина в проростках *Vandelia candel* // Shengtai xuebao — Acta Ecol. Sin. — 2006. — V. 26, N 10. — P. 3366–3371.
9. Sergeeva L. E., Poretskaya E. I. Cell selection: from cells heavy metal resistance to plant resistance to osmotic stresses «Plant Abiotic Stress tolerance» Int. Conf. February, 8–11 2009, Vienna, Austria, Proc. Doc., Vienna: 2009. — P. 161.
10. Патент на корисну модель 27918 Україна А01Н/04. Спосіб одержання стійких до осмотичного стресу клітинних ліній рослин методами клітинної селекції / Л. Є. Сергеева, С. І. Михальська, О. М. Тищенко. — Заявл. 25.04.2007; опубл. 26.11.2007, бюл. №19.
11. Сергеева Л. Е. Изменения культуры клеток под действием стресса. — К.: Логос, 2001. — 100 с.
12. Андрющенко В. К., Саянова В. В., Жученко А. А. и др. Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tourn* // Изв. АН МССР. — 1981. — № 4. — С. 55–60.
13. Сергеева Л. Е., Михальская С. И., Порецкая Е. И. Роль свободного пролина в поддержании солеустойчивости клеточных линий табака и сои, отобранных на селективных средах с ионами бария // Физ. биохим. культ. раст. — 2008. — Т. 40, № 6. — С. 532–535.
14. Pavlikova D., Pavlik K. M., Staszko L. et al. The effect of potentially toxic elements and sewage sludge on the activity of regulatory enzyme glutamate kinase // Plant Soil Envir. — 2007. — V. 53, N 5. — P. 201–206.
15. Мельничук Ю. П. Влияние ионов кадмия на клеточное деление и рост растений. — К.: Наук. думка, 1990. — 148 с.
16. Shekhawat G. S., Verma K., Jana S. et al. In vitro biochemical evaluation of cadmium tolerance mechanism in callus and seedlings of *Brassica juncea* // Protoplasma. — 2010. — V. 239. — P. 31–38.
17. Niu X., Bressan R. A., Pardo J. M. Ion homeostasis in NaCl stressed environments // Plant. Physiol. — 1995. — V. 109, N 3. — P. 735–742.
18. Кузнецов В. В., Шевякова Н. И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиол. раст. — 1999. — Т. 46, № 2. — С. 305–320.
19. Chen X.-Q., Yu B.-J., Liu Y.-L. Взаимосвязь выносливости к хлоридам и накопления полиаминов у *Glycine max*, *Glycine soja* и их гибридных проростков // Zhiwu shengli yu fenzish. — J. Plant Phys. Mol. Biol. — 2007. — V. 33, N 1. — P. 46–52.
20. Sergiev I., Alexieva V., Yanov S., Karanov E. Effect of atrazine and spermine on free proline content and some antioxidants in pea (*Pisum sativum* L.) plants // Докл. Българ. АН. — 2000. — V. 53, N 1. — P. 63–66.
21. Lefevre I., Marshal G., Ghanem M. E. et al. Cadmium has contrasting on polyethylene glycol — sensitive and resistant cell lines in the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. // J. Plant Physiol. — 2010. — V. 167, N 5. — P. 365–374.
22. Phang J. M., Pandhare J., Liu J. The metabolism of proline as microenvironmental stress structure // J. Nutrition Suppl. — 2008. — P. 166–172.
23. Kavi Kishor P. B., Sangam S., Amrutha R. N. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Cur. Sci. — 2005. — V. 88, N 3. — P. 424–428.
24. Errabii T., Gandonou C. B., Essalmani H et al. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought — induced osmotic stress and its subsequent relief // Afr. J. Biotechnol. — 2006. — V. 5, N 6. — P. 1488–1493.

**ВМІСТ ВІЛЬНОГО ПРОЛІНУ
ЯК ПОКАЗНИК ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ
КЛІТИННОЇ КУЛЬТУРИ
Nicotiana tabacum L. ПІД ЧАС СТРЕСУ**

*Л. Є. Сергеева
Л. І. Броннікова
О. М. Тищенко*

Інститут фізіології рослин і генетики НАН
України, Київ

E-mail: oltykjo@gmail.com

Проблема стресостійкості рослин — одна з найбільш фундаментальних і є предметом досліджень на всіх ієрархічних рівнях. На цей час вона стала ще актуальнішою через збіднення дикої і культивованої флори, спричиненого порушеннями (часто необоротними) навколишнього середовища і кліматичних умов.

Отримано Cd-резистентні клітинні лінії тютюну (*Nicotiana tabacum* L.), яким притаманна комплексна стійкість до різних типів засолення та водного дефіциту. З них виділено варіанти (С. № 1 та С. № 6), що ростуть на середовищах з дозою іонів кадмію, яка втричі перевищує летальну. Клітинні лінії підтримували ріст в умовах дії летальних доз іонів кадмію, солей морської води, сульфату натрію, маніту. При цьому відносний приріст біомаси калусу обох ліній був найвищим на середовищі з іонами Cd²⁺ і перевищував цей показник за нормальних умов. Вивчали вміст вільного проліну в клітинах в період їх активного розвитку. Рівень вільного проліну в клітинній лінії — С. № 1 під час вирощування на селективних середовищах перевищував контрольні показники. У лінії С. № 6 у разі культивування на середовищі з додаванням Na₂SO₄ рівень проліну був нижчий за контрольні дані. Максимальний вміст проліну в клітинах обох ліній зафіксовано на середовищі з манітом. Коливання рівня проліну можуть бути показником життєздатності організму за стресових умов. Висловлюється припущення про різні способи процесу адаптації Cd-стійких ліній тютюну до засолення, що може бути зумовлено епігенетичними змінами.

Ключові слова: *N. tabacum* L., клітинні лінії, іони кадмію, осмотичний стрес, стійкість.

**THE FREE PROLINE CONTENT
AS THE VIABILITY INDEX
OF *Nicotiana tabacum* L. CELL CULTURE
UNDER STRESS CONDITIONS**

*L. E. Sergeeva
L. I. Bronnikova
E. N. Tishchenko*

Institute of Plant Physiology and Genetics
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: oltykjo@gmail.com

Problem of plant resistance to stress is one of the most fundamental and is a scope of researches on all hierarchical levels. Currently, it has become more urgent due to the depletion of wild and cultivated flora caused by violations (often irreversible) of ambient and environmental conditions.

Cd-resistant cell lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) S. No. 1, and S. No. 6 were affected by cadmium ions, sea water salts, sodium sulfate and mannitol in lethal doses. These lines went on growing under pressure of any stress substance. Relative mass growth of calli was the greatest during cultivation on selective media with the addition of Cd²⁺-ions and exceeded this parameter measured at normal conditions. Free proline contents was investigated in periods of cell active development. During cultivation on all the selective media, free proline levels of the cell lines S. No. 1 exceeded benchmarks. Proline level was smaller than test data when S. No. 6 lines were cultivated on medium containing Na₂SO₄. Peaks of the free proline contents were in both cell lines during their development on mannitol-containing medium. Free proline content fluctuation could be an indicator of an organism vital factor under stress conditions. The concept about different adaptation of Cd-resistant lines of tobacco to salinity is suggested.

Key words: *N. tabacum* L., cell lines, cadmium ions, osmotic stress, resistance.

УДК 637.33

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТІВ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА МОРОЗИВА

Г. Є. Поліщук
О. В. Гулак
А. В. Згурський
М. М. Антонюк

Національний університет харчових технологій, Київ

E-mail: milknuft@bigmir.net

Першочерговим завданням молочної промисловості є виробництво якісних і безпечних для здоров'я населення продуктів. Незважаючи на стрімкий розвиток вітчизняної харчової промисловості та розширення асортименту молочних продуктів із застосуванням харчових добавок, в інноваційних технологіях дедалі більше переважають поняття «збагачення» та «натуральність». Ця тенденція зумовлює зростання попиту на молочні продукти, збагачені рослинними добавками.

У статті наведено результати мікробіологічних досліджень водних екстрактів рослин, які містять фенольні сполуки й можуть бути використані у виробництві морозива. Виявлено антимікробну активність екстрактів гібіскусу, троянди, котовника та лаванди стосовно патогенних тест-культур. Антимікробну дію найбільш ефективних екстрактів троянди та гібіскусу можна пояснити більшою кількістю фенольних сполук (0,149 та 0,140 мг/см³) порівняно з екстрактами лаванди та котовника (0,085 і 0,132 мг/см³). Проведено перевірку щодо відповідності мікробіологічних показників морозива молочного та молочно-овочевого з рослинними екстрактами вимогам ДСТУ. Доведено, що використання рослинних екстрактів поліпшує мікробіологічні показники сумішей та морозива різних видів. Селективність антимікробного впливу досліджуваних екстрактів щодо спороутворювальних мікроорганізмів матиме практичне значення в технології виготовлення морозива для суттєвого поліпшення його мікробіологічних показників.

Ключові слова: рослинні екстракти, антимікробна активність, виробництво морозива.

Першочерговим завданням молочної промисловості є виробництво якісних і безпечних для здоров'я населення продуктів.

Незважаючи на стрімкий розвиток вітчизняної харчової промисловості та розширення асортименту молочних продуктів із застосуванням харчових добавок, в інноваційних технологіях дедалі більше переважають поняття «збагачення» та «натуральність». Ця тенденція зумовлює зростання попиту на молочні продукти, збагачені рослинними добавками. Адже натуральні інгредієнти містять біологічно-активні речовини природного походження, виявляють технологічну функціональність і є визнаними мікронутрієнтами. Саме до таких рецептурних складників можна віднести рослинні екстракти [1, 2].

Найбільш оригінальним за органолептичними властивостями серед молочних десертів є морозиво із застосуванням рослинних екстрактів. Асортиментний ряд такого продукту на сьогодні досить обмежений,

оскільки для одержання водних витяжок застосовують лише чай чорний (ГОСТ 1937, ГОСТ 1938), чай зелений (ГОСТ 3716), цикорій (ТУ У 22331884/006-2000) та каву натуральну (ГОСТ 6805) відповідно до ТТІ 31748658-1-2007 до ДСТУ 4733:2007, 4734:2007, 4735:2007.

З огляду на це науковцями кафедри технології молока та молочних продуктів Національного університету харчових технологій було удосконалено технологію виготовлення морозива із застосуванням рослинних екстрактів за рахунок використання принципово нових видів сировини — гібіскусу, троянди, лаванди та котовника.

Для розроблення нових видів морозива на молочної основі було обрано типові рецептури морозива молочного та морозива молочно-овочевого. Для морозива останнього виду як овочеву основу запропоновано гарбуз відповідно до ДСТУ 3190-95 «Гарбузи продовольчі свіжі. Технічні умови». Технологічна та харчова сумісність гарбуза

з молочною сировиною зумовлена достатньо низьким вмістом органічних кислот (рН 6,30–6,65), високим і різноманітним вмістом вітамінів (В1, В2, РР, С, К, Т, β-каротин) та мікроелементів (Na, К, Са, Mg, Р, F), наявністю значної кількості вуглеводів (75–85%), підвищеною засвоюваністю каротиноїдів у присутності жиру [3, 4].

Попередньо авторами було вивчено функціонально-технологічні властивості рослинної сировини та оптимізовано технологічний процес отримання екстрактів, встановлено мінімально необхідний вміст сухих екстрактивних речовин для забезпечення оригінальних смаку, аромату і кольору готового продукту, розроблено рецептури нових видів морозива підвищеної біологічної цінності [5]. Однак, розробляючи та впроваджуючи нові технології, особливу увагу слід приділяти вивченню можливих шляхів мікробіологічної контамінації продукту протягом усього технологічного циклу його виробництва.

Морозиво на молочній основі є сприятливим середовищем для росту мікроорганізмів у зв'язку з високою поживною цінністю рецептурних компонентів, майже нейтральним рН (~6,0–6,5) і тривалим зберіганням (до 12 міс.). Мікрофлора морозива в кількісному та якісному відношенні формується в процесі його виробництва. Пастеризація — основний тепловий процес у технології морозива, який застосовують для знищення сторонньої мікрофлори в продукті. Подальші технологічні операції (охолодження, визрівання суміші) можуть лише інгібувати ріст залишкової мікрофлори. Проте слід враховувати, що суміші для виробництва морозива можуть бути контаміновані після пастеризації мікробіологічно забрудненими інгредієнтами, а також у разі недотримання санітарних норм виробництва на подальших етапах технологічного процесу. Це вкрай важливо у технології м'якого морозива, оскільки в його виробництві відсутній процес загартування, який може слугувати одним із чинників пригнічення розвитку або повного знищення залишкової мікрофлори [6].

Вторинне бактеріальне обсіменіння сумішей для морозива ймовірно після їх пастеризації під час перекачування, охолодження, фрезерування, а активація й розвиток мікроорганізмів можливі у процесі визрівання сумішей (до 24 год при 4±2 °С). Тому авторами було зроблено припущення щодо можливості підвищення мікробіологічної чистоти морозива не лише пастеризацією, а й внесенням у харчові системи природних

антимікробних, зокрема фенольних, сполук [7], що входять до складу рослинних екстрактів гібіскусу, троянди, лаванди та котовника.

З метою з'ясування впливу фенольних сполук на життєдіяльність окремих видів мікроорганізмів авторами було визначено антимікробні властивості водних екстрактів лаванди, котовника, троянди та гібіскусу стосовно грампозитивних (*Staphylococcus aureus*) і грамнегативних (*Escherichia coli*) мікроорганізмів та спорової культури (*Bacillus subtilis*). Зазначені мікроорганізми не лише спричинюють псування харчових продуктів, а й зумовлюють виникнення інфекційних захворювань і отруєнь у населення [8].

Матеріали і методи

Для проведення досліджень було використано рослинну сировину: гібіскус (ТУ У 15.8-30307990-002:2005 «Чай каркаде», «Чай із пелюсток суданської троянди»), троянду (ТУ У 00388079.004-2000 «Пелюстки троянди»), лаванду (ТУ У 15.8-30474971.002-2002 «Фіточай Лаванда»), котовник (ГСТУ 01.11-37-512:2006 «Сировина котячої м'яти. Загальні технічні умови») та їхні водні екстракти.

Антимікробну дію екстрактів визначали методом дифузії в щільне живильне середовище (м'ясопептонний агар). Антимікробну активність екстрактів виявляли за утворенням зон пригнічення росту внесених у живильне середовище тест-культур (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) навкруги лунок з досліджуваним матеріалом.

Мікробіологічні показники морозива з рослинними екстрактами визначали після поверхневого висівання розведеного зразка на агаризовані живильні середовища: м'ясопептонний агар (виявлення мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів — МАФАНМ), сусло-агар (дріжджів та грибів), середовище № 10 (*S. aureus*) та ендосередовище (*E. coli*). Чашки з посівами інкубували протягом 2–3 діб за температури 37 °С для встановлення загальної кількості мікроорганізмів (МАФАНМ), патогенних мікроорганізмів та бактерій групи кишкових паличок (БГКП). Посіви на чашки із середовищем сусло-агар для виявлення грибів та дріжджів інкубували за температури 28 °С протягом 5–7 діб [6].

Вміст фенольних сполук в рослинних екстрактах оцінювали фотокалориметричним методом з реактивом Фоліна–Деніса [9]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою стандартної програми статистичного оброблення Microsoft Excel [10].

Результати та обговорення

Результати проведених досліджень наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Антимікробна дія рослинних екстрактів

Водний екстракт	Зона пригнічення росту тест-культур, мм		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Esherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Троянди	60	8	18
Гібіскусу	12	0	2
Котовника	5	2	0
Лаванди	2	0	0

Найбільш виражений антимікробний ефект проілюстровано на прикладі екстракту гібіскусу та троянди (рис. 1).

Результати досліджень свідчать про антимікробну дію різного ступеня стосовно використуваних тест-культур. Усі групи мікроорганізмів виявилися високочутливими до екстракту троянди. Антимікробну дію

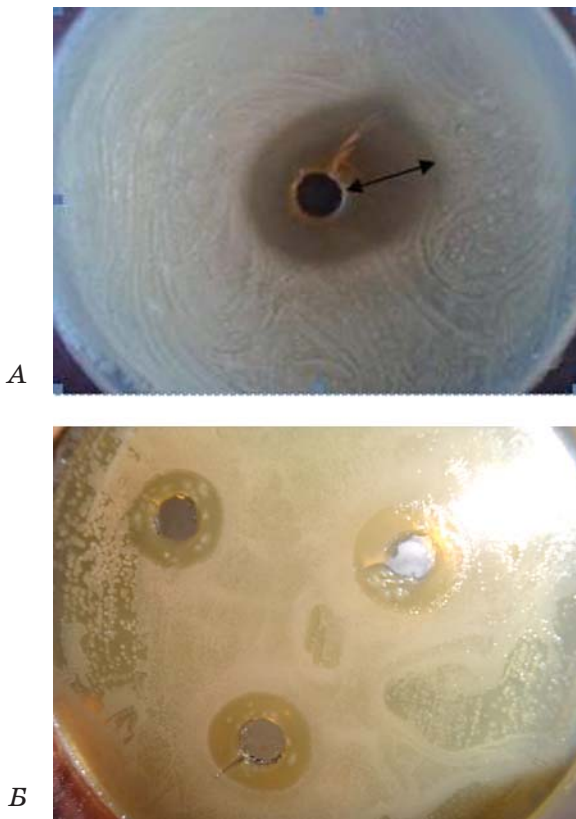


Рис. 1. Антимікробна дія екстракту троянди (А) та гібіскусу (Б) відносно тест-культури *Bacillus subtilis*:

(стрілками позначено зони пригнічення росту тест-культури)

екстракту гібіскусу виявлено щодо тест-культур *Bacillus subtilis*, *S. aureus*. Екстракт котовника пригнічував розвиток *Bacillus subtilis* та *E. coli*, а екстракт лаванди — лише *Bacillus subtilis*.

Цей ефект можна пояснити тим, що в досліджуваних екстрактах троянди та гібіскусу міститься більша кількість фенольних сполук (0,149 та 0,140 мг/см³) порівняно з екстрактами лаванди та котовника (0,085 та 0,132 мг/см³).

Селективність антимікробного впливу досліджуваних екстрактів щодо спороутворювальних мікроорганізмів матиме практичне значення в технології виготовлення морозива для суттєвого поліпшення його мікробіологічних показників, оскільки високий вміст сухих речовин та відносно невисока температура пастеризації є причиною часткового збереження активності мікрофлори.

На наступному етапі було досліджено вплив рослинних екстрактів на мікробіологічні показники сумішей для морозива упродовж часу їх визрівання. Згідно з розробленими рецептурами було отримано суміші для морозива молочного та молочно-овочевого з екстрактами гібіскусу, троянди, лаванди і котовника. Як контроль використовували молочну та молочно-гарбузову суміші для морозива без екстрактів. Пастеризовані, гомогенізовані та охолоджені зразки сумішей визрівали протягом 24 год при температурі 4±2 °С.

Загальну кількість колонієутворювальних одиниць мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (КУО МАФАНМ) у сумішах для морозива з екстрактами та контрольних зразків визначали як для свіжоприготовлених сумішей, так і в процесі їх визрівання на 6-, 12- та 24-ту год [11].

Результати досліджень для молочних сумішей проілюстровано на рис. 2.

Виявлено, що в зразках молочних сумішей з рослинними екстрактами кількість мікроорганізмів зменшується на порядок після 6 год визрівання порівняно з контрольним зразком. Найбільша антимікробна дія характерна для екстрактів троянди та гібіскусу. На 12-ту годину визрівання вплив на залишкову мікрофлору для цих систем був максимальний. Тривалість визрівання більше 12 год для всіх зразків є недоцільною. Таким чином, внесення вищезазначених рослинних екстрактів як рецептурних інгредієнтів у суміші для морозива перед визріванням дасть змогу не лише збагатити готовий продукт біологічно активними речовинами, а й покращити його мікробіологічні показники.

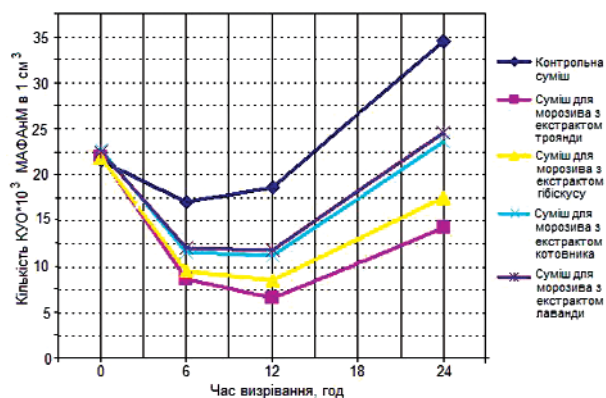


Рис. 2. Зміна загальної кількості мікроорганізмів у молочних сумішах з екстрактами під час їх визрівання

Для розширення спектра застосування виявленого антимікробного ефекту авторами було поєднано найефективніші екстракти гібіскусу та троянди з молочно-гарбузовою сумішшю. Така суміш потребує додаткової ароматизації та підвищення гостроти смаку, тому обрані екстракти можна застосовувати і як смако-ароматичні добавки.

Вплив рослинних екстрактів на мікробіологічні показники молочно-овочевих сумішей проілюстровано на рис. 3.

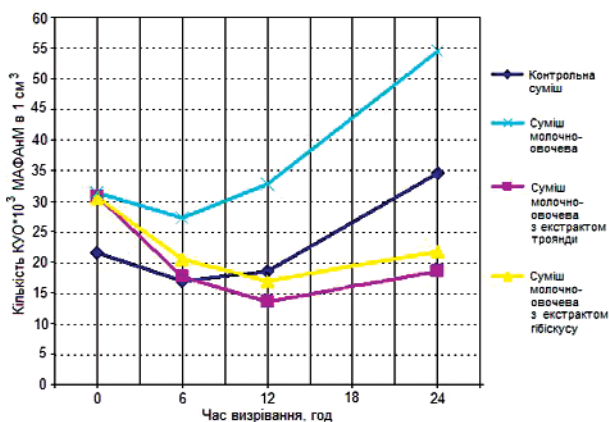


Рис. 3. Зміна загальної кількості мікроорганізмів у молочно-овочевих сумішах з екстрактами під час їх визрівання

Вміст мікроорганізмів у молочно-овочевій суміші без екстрактів більший в середньому на 30 % порівняно з контрольним зразком і майже в 3 рази перевищує інші зразки на 24-ту год визрівання, що підтверджує встановлений раніше ефект на прикладі молочних сумішей. Зразки з овочевим компонентом, порівняно з молочною сумішшю, характеризуються більшим мікробіологічним обсіменінням, що пояснюється застосуван-

ням свіжої овочевої сировини, яка в процесі підготовки безпосередньо контактує з обладнанням, повітрям, руками робітників та ін.

З метою перевірки впливу екстрактів на здатність нових видів морозива до зберігання було досліджено кількість КУО МАФАМ в 1 г морозива молочного та молочно-овочевого протягом 12 міс зберігання за температурою $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (табл. 2, 3).

Загальна тенденція щодо зміни мікробіологічних показників для молочних сумішей підтверджується і для молочно-овочевих.

Вміст БГКП, дріжджів, плісняви у всіх зразках морозива під час зберігання не перевищував нормативні показники за ДСТУ 4733:2007, 4734:2007, 4735:2007.

У всіх зразках протягом часу зберігання виявлено зменшення КУО МАФАМ як під дією антимікробних сполук, так і низьких температур.

Для зразків з екстрактами троянди та гібіскусу на 4-й міс зберігання мікроорганізмів не виявлено, а в контрольному та досліджуваних зразках з екстрактами котовника і лаванди кількість мікроорганізмів була на порядок більшою. Отже, як для морозива молочного, так і для молочно-овочевого максимальну антимікробну дію виявляють екстракти троянди та гібіскусу.

Таким чином, встановлено антимікробну дію рослинних екстрактів стосовно використовуваних тест-культур: усі групи мікроорганізмів виявилися високочутливими до екстракту троянди; антимікробну дію екстракту гібіскусу виявлено щодо тест-культур *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; екстракт котовника пригнічував розвиток *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli*; екстракт лаванди — лише *Bacillus subtilis*.

Антимікробну дію найбільш ефективних екстрактів троянди та гібіскусу можна пояснити більшою кількістю фенольних сполук ($0,149$ та $0,140\text{ мг/см}^3$) порівняно з екстрактами лаванди і котовника ($0,085$ та $0,132\text{ мг/см}^3$).

Селективність антимікробного впливу досліджуваних екстрактів щодо спороутворювальних мікроорганізмів матиме практичне значення в технології виготовлення морозива для суттєвого поліпшення його мікробіологічних показників.

Тривалість визрівання сумішей більше 12 год є недоцільною, тому що сприятиме зниженню витрат холодоносія і скороченню виробничого циклу.

Виявлений антимікробний ефект застосовуваних екстрактів є характерним для всіх досліджуваних сумішей морозива на молочній основі.

Таблиця 2. Мікробіологічні показники морозива молочного на основі екстрактів (КУО МАФАНМ в 1 г)

Вид морозива	Тривалість зберігання									
	Свіжовиготовлене	3 доби	7 діб	1 місяць	2 місяці	4 місяці	6 місяців	8 місяців	10 місяців	12 місяців
Контроль (морозиво молочне)	$2 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^2$	10^2	10	Не виявлено			
Морозиво молочне з екстрактом троянди	$2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	10^2	10	Не виявлено				
Морозиво молочне з екстрактом гібіскусу	$2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	10^2	10	Не виявлено				
Морозиво молочне з екстрактом котовника	$2 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	10	10	Не виявлено			
Морозиво молочне з екстрактом лаванди	$2 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	10	10	Не виявлено			

Таблиця 3. Мікробіологічні показники морозива молочно-овочевого (КУО МАФАНМ в 1 г)

Вид морозива	Тривалість зберігання									
	Свіжовиготовлене	3 доби	7 діб	1 місяць	2 місяці	4 місяці	6 місяців	8 місяців	10 місяців	12 місяців
Контроль (морозиво молочне)	$2 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^2$	10^2	10	Не виявлено			
Морозиво молочно-гарбузове	$3 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	10^2	10	Не виявлено	
Морозиво молочно-гарбузове з екстрактом троянди	$3 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^2$	10	Не виявлено				
Морозиво молочно-гарбузове з екстрактом гібіскусу	$3 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	2-10	Не виявлено			

ЛІТЕРАТУРА

1. Росляков Н. В. Мировые тенденции на рынке ингредиентов: основной приоритет — здоровое питание // Мол. пром. — 2007. — № 10. — С. 24.
2. Гаврилова Н. Б., Пасько О. В., Каня И. П. и др. Научные и практические аспекты технологии производства молочно-растительных продуктов. — Омск: Изд-во Ом-ГАУ, 2006. — 336 с.
3. Корячкина С. Я. Новые виды мучных и кондитерских изделий. Научные основы. Технологии. Рецептуры. — Орел: Изд-во «Труд», 2006. — 480 с.
4. Сімахіна Г. О. Функціональна роль каротиноїдів та особливості їх використання у харчових технологіях // Наук. праці НУХТ. — 2010. — № 33. — С. 45–48.
5. Поліщук Г. С., Гулак О. В., Вовкодав Н. І. та ін. Обґрунтування технологічних режимів одержання рослинних екстрактів для їх застосування у виробництві морозива // Там само. — 2010. — № 33. — С. 20–23.
6. Фостер Э. М., Нельсон Ф. Ю. Микробиология молока. — М.: Пищепромиздат, 1961. — 534 с.
7. Толкунова Н. Н., Чуева Е. Н., Бидюк А. Я. Влияние лекарственных растений на развитие микроорганизмов // Пищ. пром. — 2002. — № 8. — С. 70–71
8. Ністратенко Т. І., Білко Т. М., Благодарова О. В., Ципріян В. І. Гігієна харчування з основами нутриціології. Підручник: — Кн. 1. — К.: Медицина, 2007. — 528 с.
9. Запрометов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. — М.: Высш. школа, 1974. — 213 с.
10. Орвис В. EXCEL для ученых, инженеров и студентов / Орвис В. — К.: Юниор, 1999. — 528 с.
11. Банникова Л. А., Королева Н. С., Семенихина В. Ф. Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Под ред. канд. техн. наук Я. И. Костина. — М.: Агропромиздат, 1987. — 400 с.

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МОРОЖЕНОГО**

*Г. Е. Полищук
Е. В. Гулак
А. В. Згурский
М. Н. Антонюк*

Национальный университет
пищевых технологий, Киев

E-mail: milknuft@bigmir.net

Первоочередным заданием молочной промышленности является производство качественных и безопасных для здоровья населения продуктов. Несмотря на стремительное развитие отечественной пищевой промышленности и расширение ассортимента молочных продуктов с применением пищевых добавок, в инновационных технологиях все более преобладают понятия «обогащение» и «натуральность». Эта тенденция предопределяет рост спроса на молочные продукты, обогащенные растительными добавками.

В статье представлены результаты микробиологических исследований водных экстрактов растений, которые содержат фенольные соединения и могут быть использованы при производстве мороженого. Установлена антимикробная активность экстрактов гибискуса, розы, котовника и лаванды по отношению к патогенным тест-культурам. Антимикробное действие наиболее эффективных экстрактов розы и гибискуса можно объяснить большим количеством фенольных соединений (0,149 и 0,140 мг/см³) по сравнению с экстрактами лаванды и котовника (0,085 и 0,132 мг/см³). Проведена проверка на соответствие микробиологических показателей требованиям ГОСТ на мороженое молочное и молочно-овощное с растительными экстрактами. Доказано, что использование растительных экстрактов улучшает микробиологические показатели смесей и мороженого различных видов. Селективность антимикробного влияния исследуемых экстрактов относительно спорообразующих микроорганизмов будет иметь практическое значение в технологии изготовления мороженого для существенного улучшения его микробиологических показателей.

Ключевые слова: растительные экстракты, антимикробная активность, производство мороженого.

**MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF PLANT EXTRACTS
FOR ICE CREAM PRODUCTION**

*G. E. Polischuk
O. V. Gulak
A. V. Zgurский
M. M. Antonyuk*

National University of Food Technologies, Kiyv

E-mail: milknuft@bigmir.net

A primary task of dairy industry is the production of qualitative and safe-health level products for population. Despite rapid development of the domestic food industry and diversification of dairy products with nutrient additives, the concepts of «enrichment» and «natural» are increasingly dominating in innovative technologies. This tendency predetermines demand growth for dairy products enriched with vegetable additives.

The microbiological studying results of plant aqueous extracts that contain phenol compounds and could be used in the ice cream production are given in the article. Antimicrobial activity of the extracts of hibiscus, roses, nepeta and lavender were found in relation to pathogenic test cultures. The antimicrobial action of the most effective extracts of rose and hibiscus could be attributed to the large amount of phenolic compounds (0.149 and 0.140 mg/cm³) compared to extracts of lavender and nepeta (0.085 and 0.132 mg/cm³). It is proved that herbal extracts improve microbiologic factor of mixtures of different types of ice cream. Selectivity of antimicrobial influence of the investigated extracts on spore-forming micro-organisms would be of practical value for the ice cream production technique to significantly improve its microbiological indicators.

Key words: plant extracts, antimicrobial action, ice cream production.

КОРОТКИ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 577.151.042: 577.152.311

СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

Ю. Г. Жуковский
В. А. Жуковская
Л. П. Кузнецова
Е. Р. Никитина
Е. Е. Социлина

Учреждение Российской Академии наук
«Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И. М. Сеченова РАН», Санкт-Петербург

E-mail: lpkuz@iephb.ru

При промышленном производстве холинэстераз и в лабораторной практике иногда возникает необходимость в идентификации этих энзимов. Это может быть связано с нарушениями маркировки в процессе производства энзимов, а также при контроле и хранении готовой продукции.

Предложен способ идентификации, позволяющий отличить бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови лошади от холинэстераз из других биологических источников: ацетилхолинэстераз — из электрического органа электрического ската и угря, из эритроцитов верблюда, лошади и человека; бутирилхолинэстераз — из сыворотки крови и из мозговой ткани голубя; пропионилхолинэстераз — из сыворотки крови и из мозговой ткани. Способ основан на различной чувствительности холинэстеразного домена (каталитического центра) этих энзимов к двум обратимым фосфониевым ингибиторам: $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_3 \cdot I^-$ (1) и $(C_6H_5)_3 P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$ (2). Для каждого энзима определяют концентрацию ингибитора (C_1 для ингибитора-1 и C_2 для ингибитора-2), которая уменьшает энзиматическую активность в 2 раза, затем вычисляют величину отношения C_1/C_2 . Если эта величина больше, чем 4, можно сделать вывод о том, что идентифицируемым энзимом является бутирилхолинэстераза из сыворотки крови лошади.

Ключевые слова: ацетилхолинэстераза, бутирилхолинэстераза, пропионилхолинэстераза, фосфониевые ингибиторы.

При промышленном производстве холинэстераз и в лабораторной практике иногда возникает необходимость в идентификации этих энзимов. Это может быть связано с нарушениями маркировки в процессе производства энзимов, а также при контроле и хранении готовой продукции.

Широко известна возможность идентификации типов холинэстераз путем сравнительной оценки их способности гидролизовать при оптимальных условиях холиновые эфиры «стандартного набора»: ацетилхолин, пропионилхолин, бутирилхолин и ацетил- β -метилхолин. Так, ацетилхолинэстеразы с наибольшей скоростью гидролизуют субстрат ацетилхолин, пропионилхолинэстеразы — субстрат пропионилхолин, бутирилхолинэстеразы — субстрат бутирилхолин, ацетил- β -метилхолинэстеразы — субстрат ацетил- β -метилхолин [1]. Этот спо-

соб позволяет идентифицировать типы холинэстераз, но не пригоден для надежной идентификации индивидуальной холинэстеразы внутри одного типа. Это прежде всего связано с недостаточно выраженной субстратной внутритиповой специфичностью холинэстераз.

Известен способ определения различий между ацетилхолинэстеразами и бутирилхолинэстеразами путем сравнения чувствительности идентифицируемого энзима к различным ингибиторам [2]. Он дает возможность, например, отличить ацетилхолинэстеразу эритроцитов лошади от бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади: первый энзим намного более чувствителен к параоксону, чем к изопестоксу, а второй, наоборот, имеет большую чувствительность к изопестоксу, чем к параоксону. Существует также способ идентификации индивидуальной

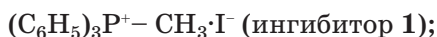
ацетилхолинэстеразы среди энзимов этого же класса [3], позволяющий отличить ацетилхолинэстеразу из электрических рыб от ацетилхолинэстеразы эритроцитов человека, лошади и верблюда. Он основан на различиях в чувствительности этих энзимов к обратимому ингибирующему действию пяти фосфониевых соединений.

Особенности каталитических свойств активного центра холинэстераз по отношению к различным ингибиторам, в том числе и к обратимым фосфониевым, активно изучаются [4, 5]. Накоплен значительный экспериментальный материал, анализ которого дает возможность приблизиться к решению вопроса об идентификации некоторых энзимов.

В настоящей работе описан способ, дающий возможность отличить бутирилхолинэстеразу из сыворотки крови лошади от холинэстераз, выпускаемых промышленным способом из других биологических источников (бутирилхолинэстераза, пропионилхолинэстераза). Способ основан на сравнении чувствительности холинэстераз к обратимому ингибирующему действию двух фосфониевых соединений: $(C_6H_5)_3P^{+}-CH_3 \cdot I^{-}$ и $(C_6H_5)_3P^{+}-CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^{-}$.

В работе в качестве субстратов применяли ацетилхолин, бутирилхолин и ацетилтиохолин йодистые (Chemapol, Чехия).

Как обратимые ингибиторы использовали два фосфониевых соединения, синтез которых описан в работах [6, 7]:



Использовали частично очищенные лиофилизированные препараты ацилхолинэстераз (НФ 3.1.1.8): бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади (БуХЭЛ) и голубя (БуХЭГ) с удельной активностью 9,6 Е/мг и 12 Е/мг соответственно, бутирилхолинэстеразу из мозговой ткани (БуХЭБг) — 18 Е/мг; пропионилхолинэстеразы (НФ 3.1.1.8) из мозговой ткани (ПХЭ № 1) и из сыворотки крови (ПХЭ № 2) — 53 Е/мг и 0,7 Е/мг соответственно; ацетилхолинэстеразы (НФ 3.1.1.7) из электрического органа электрического ската *Torpedo marmorata* (АХЭС) — 1 000 Е/мг и электрического угря *Electrophorus electricus* (АХЭУ) — 1 000 Е/мг (Sigma, США), из эритроцитов верблюда (АХЭВ) — 0,02 Е/мг, лошади (АХЭЛ) — 1,2 Е/мг и человека (АХЭЧ) — 6,1 Е/мг. Препараты холинэстераз изготовлены в Пермском НИИВС.

Удельную активность энзимов определяли методом потенциометрического титрова-

ния с использованием в качестве субстрата 2 мМ ацетилхолина для ацетилхолинэстераз и 2 мМ бутирилхолина для ацилхолинэстераз (25 °С, 0,1 М хлорид калия, рН 7,5).

Скорость холинэстеразного гидролиза ацетилтиохолина в отсутствие и в присутствии ингибитора устанавливали фотометрическим методом Эллмана [8] при температуре 25 °С, рН 7,5. Реакционная смесь состояла из 1 мл 1 мМ раствора 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,5), 1 мл раствора энзима (0,2 Е/мл), 1 мл 0,5 М раствора хлорида калия, 1 мл воды в контрольной пробе или 1 мл раствора ингибитора в опытной пробе и 1 мл 2,5 мМ раствора ацетилтиохолина.

С помощью фотоэлектроколориметра ФЭК-56 (светофильтр № 3) измеряли время в секундах, за которое оптическая плотность реакционной смеси возрастает на величину 0,1 (t_k — в контрольном опыте без ингибитора, $t_{оп}$ — в опыте с ингибитором). Подбирали такую концентрацию ингибитора, при которой энзиматическая активность уменьшится вдвое, т. е. $t_{оп} / t_k = 2$.

С целью идентификации БуХЭЛ была исследована чувствительность холинэстераз, полученных промышленным способом, к фосфониевым соединениям, из которых выбраны два — ингибитор 1 и ингибитор 2. В таблице приведены их концентрации, уменьшающие холинэстеразную активность в два раза (C_1 — для ингибитора 1 и C_2 — для ингибитора 2). Из данных таблицы следует, что наименьшую чувствительность к обоим ингибиторам проявляет только БуХЭБг ($C_1 = C_2 = 1 \text{ 200 мкМ}$), а наибольшую — АХЭЧ (52 и 120 мкМ). Значения C_1 и C_2 для БуХЭЛ не выделяются среди таковых для других холинэстераз. БуХЭЛ проявляет примерно одинаковую чувствительность к ингибитору 1 наряду с БуХЭГ, ПХЭ №1, ПХЭ №2, АХЭЛ и АХЭС (300–430 мкМ), и все они уступают в чувствительности АХЭВ, АХЭЧ и АХЭУ (120–200 мкМ). Что касается ингибитора 2, то БуХЭЛ, наряду с АХЭЧ и АХЭВ, наиболее чувствительны к нему (40–82 мкМ) и существенно отличаются по этому показателю от остальных холинэстераз (150–600 мкМ). Из вышесказанного следует, что концентрации C_1 и C_2 не позволяют надежно отличить БуХЭЛ от других холинэстераз. Однако, если сравнить действие ингибиторов 1 и 2 на каждый энзим, отчетливо видно, что только у БуХЭЛ наблюдается особенно большая разница в их действии: величина C_1 превышает C_2 в 9,5

раза ($C_1/C_2 = 9,5$). Для остальных холинэстераз величины C_1/C_2 колеблются от 0,7 до 2,5. Выявленная особенность в чувствительности БуХЭЛ к ингибиторам 1 и 2 позволяет надежно отличить этот энзим от холинэстераз, производимых из других биологических источников.

Принимая во внимание вышеизложенное, идентификацию БуХЭЛ предлагается

осуществлять таким образом. Подбирают такую концентрацию ингибитора [C_1 — для $(C_6H_5)_3P^+-CH_3 \cdot I^-$ и C_2 — для ингибитора $(C_6H_5)_3P^+-CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$], которая уменьшает холинэстеразную активность в два раза, затем вычисляют величину отношения C_1/C_2 и в том случае, если эта величина больше, чем 4, делают вывод, что идентифицируемым энзимом является БуХЭЛ.

**Концентрации ингибиторов 1 (C_1) и 2 (C_2),
при которых холинэстеразная активность уменьшается в 2 раза,
и величины их отношения (C_1/C_2)
(Погрешность 10%; $n = 5$; $P = 0,95$)**

Энзим	C_1 , мкМ	C_2 , мкМ	C_1/C_2
БуХЭЛ	380	40	9,5
БуХЭГ	430	280	1,5
БуХЭБг	1200	1200	1,0
ПХЭ №1	430	600	0,7
ПХЭ №2	380	280	1,4
АХЭВ	200	80	2,5
АХЭЛ	380	150	2,5
АХЭЧ	120	52	2,3
АХЭС	300	360	0,8
АХЭУ	180	210	0,9

ЛИТЕРАТУРА

1. *Usdin E.* Anticholinesterase agents. Intern. Encyclopedia Pharmac. Ther. — Pergamon Press, 1970. — V. 1. — P. 133.
2. *Aldridge W. N.* The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organophosphorus compounds // *Biochem. J.* — 1953. — V. 53, N 1. — P. 62–67.
3. *Жуковский Ю. Г., Кузнецова Л. П., Социлина Е. Е., Никитина Е. Р.* Способ идентификации ацетилхолинэстераз из различных биологических источников // *Биотехнологія.* — 2010. — Т. 3, № 1. — С. 58–61.
4. *Бресткин А. П., Кузнецова Л. П., Моралёв С. Н., Розенгарт Е. В., Эпштейн Л. М.* Холинэстеразы наземных животных и гидробионтов. — Владивосток: ТИНРО-центр, 1997. — 466 с.
5. *Басова Н. Е., Розенгарт Е. В., Суворов А. А.* Фосфониевые обратимые ингибиторы холинэстераз разных животных // Докл. акад. наук. — 2010. — Т. 434, № 3. — С. 407–411.
6. *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie.* — 1958. — Bd. XII/I. — P. 75–82.
7. *Органикум.* Практикум по органической химии / Пер. с нем. Потапова В. М., Пономарёва С. В. — М.: Мир, 1979. — Т. 1. — С. 277–278.
8. *Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone R. M.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem. Pharmacol.* — 1961. — V. 7, N 1. — P. 88–95.

**СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ
БУТИРИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ
ІЗ СИРОВАТКИ КРОВІ КОНЯ**

*Ю. Г. Жуковський
В. А. Жуковська
Л. П. Кузнєцова
О. Р. Нікітіна
О. О. Сочиліна*

Установа Російської Академії наук
«Інститут еволюційної фізіології і біохімії
ім. І. М. Сеченова РАН»,
Санкт-Петербург

E-mail: lpkuz@iephb.ru

Під час промислового виробництва холінестераз в лабораторній практиці іноді виникає необхідність в ідентифікації цих ензимів. Це може бути пов'язано з порушеннями маркування в процесі виробництва ензимів, а також контролю та зберігання готової продукції.

Запропоновано спосіб ідентифікації, що дозволяє відрізнити бутирилхолінестеразу із сироватки крові коня від холінестераз з інших біологічних джерел: ацетилхолінестераз — із електричного органа електричного ската і вугра, з еритроцитів верблюда, коня і людини; бутирилхолінестераз — із сироватки крові та мозкової тканини голуба; пропіонілхолінестераз — із сироватки крові та мозкової тканини. Спосіб ґрунтується на різній чутливості холінестеразного домена (каталітичного центру) цих ензимів до двох оборотних фосфонієвих інгібіторів: $(C_6H_5)_3P^+ - CH_3 \cdot I^-$ (**1**) і $(C_6H_5)_3P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$ (**2**). Для кожного ензиму визначають концентрацію інгібітора (C_1 для інгібітора-1 і C_2 для інгібітора-2), яка зменшує ензиматичну активність у 2 рази, потім обчислюють величину відношення C_1/C_2 . Якщо ця величина більша за 4, можна зробити висновок про те, що ідентифікованим ензимом є бутирилхолінестераза із сироватки крові коня.

Ключові слова: ацетилхолінестераза, бутирилхолінестераза, пропіонілхолінестераза, фосфонієві інгібітори.

**THE METHOD FOR IDENTIFICATION
OF HORSE SERUM
BUTYRYLCHOLINESTERASE**

*Yu. G. Zhukovskii
V. A. Zhukovskaya
L. P. Kuznetsova
O. R. Nikitina
O. O. Sochilina*

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology
and Biochemistry of the Russian Academy
of Sciences, St. Petersburg

E-mail: lpkuz@iephb.ru

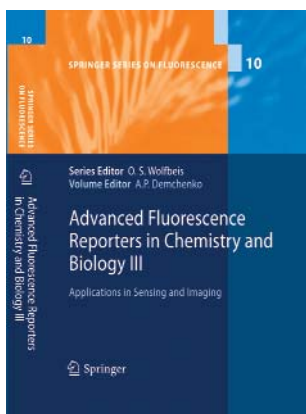
In the industrial production of cholinesterase and in laboratory practice, sometimes it needs to identify these enzymes. It might be due to violations of labeling in enzyme production and control and storage of the ready-made products as well.

A method for identification of horse serum butyrylcholinesterase out of cholinesterases from other biological sources such as acetylcholinesterases of the electric eel and numbfish electric tissues, out of the human, horse and camel erythrocytes; butyrylcholinesterases — of the pigeon blood serum and pigeon brain tissue; propionylcholinesterases — out of the serum and the brain tissue was suggested. The method is based on different sensitivity of cholinesterase domain (catalytic centre) of these enzymes to the two reversible phosphonium inhibitors: $(C_6H_5)_3P^+ - CH_3 \cdot I^-$ (**1**) and $(C_6H_5)_3P^+ - CH_2CH_2CH_3 \cdot Br^-$ (**2**). For this purpose inhibitor concentration (C_1 for inhibitor **1** and C_2 for inhibitor **2**) decreasing enzymatic cleavage of each cholinesterase twofold was determined and then the value of relation C_1/C_2 was calculated. The identified cholinesterase was horse serum butyrylcholinesterase if the value C_1/C_2 was higher than 4.

Key words: acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, propionylcholinesterase, phosphonium inhibitors.

РЕЦЕНЗІЇ

РЕЦЕНЗІЯ
на книгу «Advanced Fluorescence
Reporters in Chemistry and Biology III»
за редакцією О. П. Демченка
(Springer Series of Fluorescence, т. 10,
видавництво Springer, 2011)



Збірка «Springer Series of Fluorescence» є досить популярною серед науковців, оскільки там друкуються найкращі розробки в галузі флуоресцентної спектроскопії, які було відзначено увагою дослідників на конференціях та в часописах. Не є винятком і останній, 10-й том збірки, де упорядником є український фахівець, д. б. н. проф. О. П. Демченко. Збірку присвячено флуоресцентним репортерам — молекулярним пристроям, які з однаковим успіхом можна віднести і до популярної зараз галузі нанотехнології, і до завжди скромної у саморекламі «пікотехнології», інакше кажучи — до одного із сучасних напрямів фізичної органічної хімії.

Флуоресцентні репортери та їх різновиди — флуоресцентні зонди і мітки — дедалі ширше застосовують у різних галузях науки і практики. Переважна більшість завдань, пов'язаних з міжмолекулярними взаємодіями в складних системах, вирішується з їх допомогою. Це — найбільш ефективні молекулярні інструменти сучасної біології, медицини та супрамолекулярної хімії і, очевидно, їхня ефективність у перспективі лише зростатиме.

Як і до будь-якого інформаційного пристрою, до флуоресцентного репортера висувається декілька ключових вимог, пов'язаних із кількістю, адекватністю та стабільністю передачі інформації від об'єкта досліджен-

ня. У світлі цих вимог, залежно від об'єкта дослідження та поставленого завдання, різночасно змінюється дизайн флуоресцентного репортера. Розглянемо докладно, що ж пропонується читачеві у 10-му томі збірки.

Передусім слід відзначити значний внесок українських учених у рецензоване видання. Йдеться не лише про перший розділ та частину другого, які написано власне О. П. Демченком у співавторстві з молодим фізиком-теоретиком — к. ф.-м. н. Семеном Ясилевським, але й доробок дослідницької групи відомого теоретика і практика — д. х. н. Сергія Ярмолюка. А найбільш важливим у зазначеному аспекті є те, що цей внесок — не результат протекціонізму, а реальне свідчення передових позицій українських учених у цій важливій галузі світової науки.

У першому розділі розглядаються сучасні підходи до моделювання міжмолекулярних взаємодій у багатокомпонентних (у тому числі гетерогенних) рідинах та структурної динаміки таких рідин методами квантової та молекулярної механіки. Важливо, що цей розділ написано у чіткому й доступному стилі підручника. Тому він буде корисним не лише спеціалістам у галузі молекулярної динаміки, а й науковцям, що хочуть поглибити свої уявлення про молекулярну структуру біосистем та про спектральні ефекти, які є характерним виявом окремих типів міжмолекулярних взаємодій у рідинах. Висвітлюється природа таких фізичних властивостей рідин, як полярильність, в'язкість, водневе зв'язування, переважна сольватація тощо. На прикладах молекул флуоресцентних барвників описується статична і динамічна взаємодія окремої молекули з оточенням.

Другий розділ присвячено застосуванню флуоресцентних репортерів у вивченні окремих властивостей рідин та їхніх важливих складових. Окрім найбільш актуальних прикладів біооб'єктів у воді тут представлені також органічні полімери і досить унікальний тип середовища — іонні рідини. Саме з них і розпочинається розгляд впливу структури оточення на флуоресценцію зондів сольватохромної природи (A. Samantha). Далі йдеться про використання флуоресцентних зондів для вивчення полімерів і процесу полімеризації (A. Brouwer), а також

рідкокристалічних структур, міцел і ліпідних бішарів (А. Demchenko). Читач має змогу познайомитися з принципами дії, будовою та властивостями численних характерних представників флуоресцентних зондів у вищезгаданій множині середовищ. Загалом, другий розділ є наочною демонстрацією можливостей флуоресцентних репортерів у вирішенні важливих завдань окремих напрямів сучасної науки та практики.

Принципи мічення біооб'єктів розглянуто у третьому розділі. Перші дві частини стосуються флуоресцентного мічення нуклеїнових кислот (S. Yarmoluk) і подальшого вивчення їхньої взаємодії з іншими біомолекулами методами флуоресцентної спектроскопії (Y. Li). Далі обговорюються численні варіанти ковалентної іммобілізації флуорофора на пептиді, протеїні чи нуклеїновій кислоті (C. Schultz) з використанням різних типів функціональних груп — як у природній молекулі, так і в барвникові, що слугує міткою. Розглядаються можливості прямого ковалентного мічення протеїнів безпосередньо в клітині, тканинах чи в організмі.

В наступній частині розділу (C. Spagnuolo) йдеться про новий ефективний метод селективного ковалентного мічення протеїнів *in vitro* й *in vivo* за допомогою біарсенітних похідних органічних флуорофорів та генетично введених у протеїн тетрацистеїнових послідовностей. Висока міцність зв'язку мітки з протеїном, що забезпечується чотирма ковалентними зв'язками, та висока селективність використаного принципу іммобілізації робить його дедалі популярнішим у дослідженнях клітинних процесів.

Більш універсальний у застосуванні метод мічення *in vitro* й *in vivo* розроблено для олігогістидинових протеїнів (J. Piehler). У ньому висока афінність флуоресцентної мітки до протеїну створюється за рахунок

насищення координаційної сфери металу в комплексі його з міткою (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) з подальшим приєднанням кількох гістидинових залишків протеїну. У даному разі мітка має специфічну будову. Вона може містити кілька центрів координації металу, з'єднаних довгим лінкером з флуорофором. Зв'язування з протеїном завжди спричинює спалах флуоресценції.

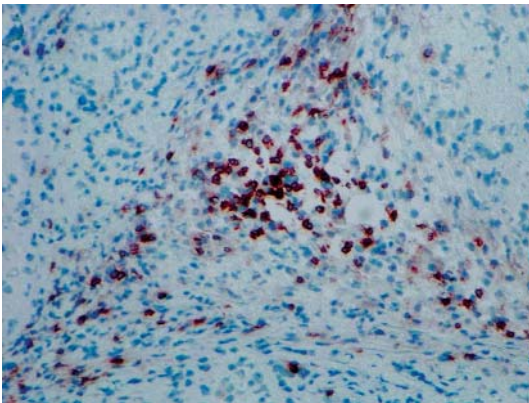
Дві частини останнього, п'ятого розділу безпосередньо стосуються мічення біооб'єктів *in vivo*. Тут обговорюються принципи застосування нових зондів з флуоресценцією на межі ІЧ-області для досліджень судинних процесів, зокрема тромбоутворення, карциногенезу тощо (J. Klohs). Фінальним акордом збірки можна вважати частину, присвячену неінвазивним методам спостереження за функціями окремих органів тварини за допомогою зондів із флуоресценцією на межі ІЧ-області (A. Harmelin). Розглядається повний цикл спостереження починаючи від підбору флуоресцентного репортера, методів його уведення в організм та отримання тривимірного зображення і закінчуючи застосуванням методу в поєднанні з магніторезонансною та рентгеномографією, біolumінесценцією тощо.

Отже, збірка «Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II» є змістовною і актуальною, корисною для широкого кола науковців. А стиль та виклад матеріалу, зокрема велика кількість кольорових ілюстрацій та наведені в кожній частині базові принципи методу, робить її доступною навіть для аспірантів та студентів.

Д-р хім. наук, проф. В. Г. Пивоваренко,
хімічний факультет
Київського національного
університету імені Тараса Шевченка

Перепрограмовані стовбурові клітини ініціюють імунну реакцію у мишей

Ставиться під сумнів практичне застосування препаратів індукованих плюрипотентних стовбурових клітин. У нещодавньому опублікованому журналом Nature дослідженні повідомляється, що перепрограмовані стовбурові клітини, призначені для проростання в різні типи тканин, можуть відторгатися, навіть якщо вони пересажені індивідуумові, від якого їх отримано.



Інфільтрація Т-клітин (показано темно-коричневим кольором) виявляється в тканинах, які утворились від індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (Yang Xu, UC San Diego)

Дослідження проводили в Університеті Сан-Дієго, шт. Каліфорнія, США, під керівництвом Ян Х'ю (Yang Xu). Результати їх стали шокуючими для регенеративної медицини, адже досі більшість учених вважали, що перепрограмовані клітини з власних тканин людини можна було безпечно пересаджувати цій самій людині.

Пауль Фейрчїлд (Paul Fairchild), імунолог і біолог, який досліджує стовбурові клітини в Оксфордському університеті Великобританії, вважає, що такий «сюрприз» ставить під сумнів перспективи використання індукованих стовбурових клітин у медицині. Нещодавно було проведено дослідження ембріональних стовбурових та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин миші (iPS). Обидва типи клітин виявилися плюрипотентними. А це означає, що вони можуть перетворюватися на багато інших видів клітин.

Потенціал зміни

Дослідники групи під керівництвом Х'ю пересаджували стовбурові клітини миші ге-

нетично ідентичним тваринам. Це імітувало трансплантацію клітин одній і тій самій людині. При трансплантації ембріональні стовбурові клітини спричинювали тератоми — пухлини, що містять хаотичне нагромадження типів клітин, використовуваних як плюрипотентні. Більшість iPS-клітин, навпаки, не могли сформувати або створити тератоми і були зруйновані або відторгнені імунною системою реципієнта.

Учені Єрусалимського університету Ізраїлю під керівництвом Ніссима Бенвеністі (Nissim Benvenisty) припустили, що iPS-клітини пацієнтів можна було б знову їм і пересадити. Вони виявили, що певні гени були експресовані на значно вищому рівні в тератомах, утворених iPS-клітинами, порівняно з ембріональними стовбуровими клітинами. Два з таких генів — Zg16 і Normad1 — було спеціально запрограмовано до імунної атаки. Х'ю висловив припущення, що з часом ці гени нівелюватимуться. Ембріон розпочне процес вироблення імунної резистентності до власних тканин. Тому вони не визнаються як власні тілом хазяїна. Процедура iPS-перепрограмування може змінити нормальну експресію цих генів.

Проблема відторгнення

Проте дослідження Х'ю не варто розглядати як погану новину для iPS, як це може здатися на перший погляд. Дослідникам, які працювали зі зрілими iPS-клітинами, наприклад нейронами або клітинами серця, вдалося пересадити їх мишам без відторгнення, однак експерименти в основному проводили на мишах без урахування функціональних імунних систем. Ці дослідження передбачали проведення трансплантації тільки одного виду диференційованих клітин відразу від власних клітин шкіри пацієнта в його ж власні тканини, а не змішування диференційованих клітин у тератомі.

Х'ю та інші дослідники й досі не впевнені, чи не почнуть відторгатися отримані очищені диференційовані iPS-клітини, чи ця проблема є специфічною для недиференційованих клітин.

Фейрчїлд вважає, що дослідження Х'ю насправді не охоплює всієї повноти клінічної ситуації. Він зазначає, що iPS-клітини в цих дослідженнях були отримані з ембріональних клітин шкіри, а не зі шкіри дорослої людини, як це мало б бути в реальному

випадку. Найімовірніше, ці незрілі клітини шкіри викликають імунну реакцію частіше, ніж дорослі клітини. І невідомо, чи спричинюють імунне відторгнення клітини в тератомах, чи так поведуться клітини людини. Доки на ці питання не буде отримано відповіді, заява Х'ю необґрунтовано кидає тінь на всю сферу регенеративної медицини.

Джозеф Ву (Joseph Wu), трансплантолог зі Стенфордського університету в Пало-Альто, шт. Каліфорнія, погоджується, що така заява пов'язана з додатковими проблемами як технічного, так і морально-етичного характеру за індивідуальної трансплантації отриманих іPS-клітин пацієнта.

Пошук вирішення цього питання описаний у першій частині публікації, де висувається припущення, що іPS-клітини можуть містити більше генетичних аномалій порівняно з ембріональними стовбуровими клітинами. Адміністрація Управління з контролю якості харчових продуктів і лікарських засобів США висловила в березні цього року на нараді у Віфезді, шт. Меріленд, стурбованість з приводу генетичної мутації іPS-клітин.

Точно регульована терапія

Очевидно, компанії будуть зацікавлені в розвитку терапії, пов'язаної з отриманням іPS-клітин для конкретного пацієнта. Вони готові якнайшвидше зосередитися на терапії цих клітин і застосовувати її для багатьох людей, для чого так чи інакше буде необхідним пригнічення імунної системи.

Підсумовуючи, можна зробити висновок, що для подальших досліджень потрібно вивчити питання, чи мають іPS-клітини імунні переваги, чи ні.

З цими висновками Х'ю згоден. Його група збирається з'ясувати, які конкретні клітини тератоми і за яких умов викликають імунне відторгнення. При цьому для отримання іPS-клітин використовуватимуться два різних методи, які дадуть відповідь на питання про схильність до імунного відторгнення. І тоді, щоб уникнути цієї проблеми, з'явиться можливість доопрацювати методи перепрограмування. Дослідники вважають, що технологія створення іPS-клітин потребує вдосконалення з метою звести до мінімуму різницю між іPS- і ембріональними стовбуровими клітинами з тим, щоб іPS- клітини стали кориснішими для терапії людини.

Джерело:

<http://www.nature.com/news/2011/110513/full/news.2011.286.html>

Досягнення в галузі біотехнології ензимів

Ензимами — це протеїни, що прискорюють хімічні реакції, наприклад, під дією прального порошку виводяться протеїнові плями, які за інших обставин у край важко видалити. Група дослідників під керівництвом професора Кам-Бо Вонга (Kam-Bo Wong) з Центру наукових досліджень протеїну і кристалографії Школи природничих наук в Китайському університеті Гонконга продемонстрували основний принцип зміни активності ензимів за допомогою протеїнової інженерії.

Їм вдалося розкрити таємницю будови біотехнологічно важливих ензимів, повідомлення про що з'явиться найближчим часом в Інтернет-виданні журналу PLoS Biology.

Протеїни з термофілів, теплолюбних організмів, що живуть в умовах високих температур, стійкіші до теплової денатурації порівняно з мезофільними організмами, які живуть при помірних температурах. У природі ензими з мікробів, що віддають перевагу життю за надзвичайно високих температур, наприклад у гідротермальних джерелах, можуть залишатися стабільними навіть при 100 °С. Ці термофільні ензими є корисними для біотехнологічної промисловості завдяки їхній високій стабільності.

Залишається загадкою, чому термофільні ензими менш активні, ніж їхні мезофільні гомологи, незважаючи на подібність структури. Професор Вонг (Wong) проводить порівняння їх з двома машинами аналогічної системи, з яких одна працює в 10 разів швидше за іншу. Якби термофільні ензими могли б бути активнішими без втрати стабільності, то вони б становили собою велику комерційну цінність для біотехнологічної промисловості.

Дослідницька група Вонга використовувала методи протеїнової інженерії для з'ясування, чому термофільні ензими менш активні. Було виявлено, що термофільний ензим ацилфосфатаза має унікальну властивість, яка полягає в тому, що її активний центр стає стабільнішим під впливом сольового містка. Термофільні ензими, як правило, виявляють схильність до стійкіших взаємодій аналогічно сольовим місткам. У разі видалення цього містка термофільні властивості ацилфосфатази перетворюються на властивості, притаманні мезофільним ензімам. Крім того, мезофільна ацилфосфатаза людини моделювалася в термофільно-подібну зі введенням сольового містка.

Дослідники дійшли висновку, що стабільність сольового містка підсилювала активність ензимів за високих температур і водночас знижувала її за низьких. Можна сподіватися, що закономірності, виявлені дослідженнями групи професора Вонга, буде покладено в основу досліджень з оптимізації активності ензимів і впровадження в біотехнологічній промисловості.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2011/03/110315192813.htm>

Зуби зі стовбурових клітин

Морфогенез і диференціювання зубних зачатків регулюють складні взаємодії між мезенхімальними стовбуровими клітинами краніального нейрального хреста та епітелію ротової порожнини. Італійські вчені з University of Udine в своєму дослідженні показали, що отримана з єдиної клітини популяція мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) *in vitro* може бути диференційована в структуру, що нагадує зубний зачаток. Учені інкубували первинну культуру одержаних з людської жирової тканини мезенхімальних стовбурових клітин в середовищі, що індукуює диференціювання СК в клітини, які створюють зачаток зуба. Тривимірні скупчення клітин, що сформувалися, культивували ще 4 тижні. Утворена структура була схожа на зачаток зуба. За допомогою різних методів аналізу було встановлено експресію маркерів, характерних для тканин зуба. У середовищі клітини, що індукуює диференціювання, були експресовані маркери амелобластів і одонтобластів, а також характерні для них матричні РНК і протеїни. Окрім того, відповідно до розташування клітин виявлялась експресія маркерів основної мембрани, а також епітеліальних і мезенхімальних, схожа з експресією маркерів за нормального фізіологічного морфогенезу зуба. Фізико-хімічний аналіз виявив 200-нм і 50-нм правильно орієнтовані кристали гідроксіапатиту, відповідно, емалі й дентину *in vivo*.

Таким чином, результати цього дослідження свідчать про те, що виділені з жирової тканини стовбурові клітини *in vitro* навіть за відсутності специфічного структурного матриксу або підкладки здатні до диференціювання в спеціалізовані клітини, що організуються в тривимірну структуру, схожу за фенотипом на зачаток зуба.

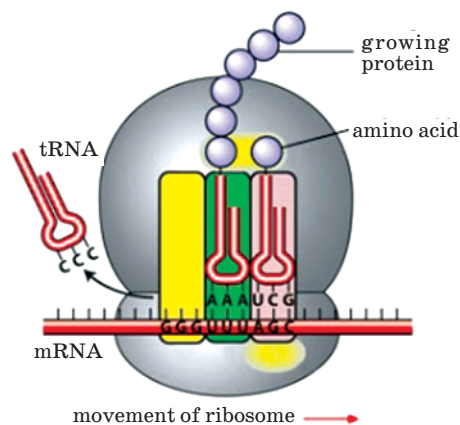
Матеріали дослідження подано в статті: Ferro F, et al. Adipose tissue-derived stem cell *in vitro* differentiation in a three-dimensional dental bud structure. *Am. J. Pathol.*, 2011 May;178(5): 2299-2310.

Джерело:

<http://www.stemcells.ru/news-286>

Від гена до протеїну: трансляція регулює рівень вмісту протеїнових молекул у клітині

Як гени контролюють процеси, що відбуваються в нашому організмі? Це питання фундаментальної біології, незважаючи на довгі роки проведення різних експериментів, ще до кінця не з'ясовано. Гени — це одиниці геному, що містять в собі інформацію про різні протеїнові молекули, які виконують життєво важливі функції. Відомо, що деякі захворювання, такі, наприклад, як рак, характеризуються не тільки змінами на рівні генів, але й виникненням дефектів синтезу протеїнових молекул. Як же контролюється сам протеїновий синтез? Результати досліджень, проведених співробітниками Центру молекулярної медицини ім. Макса Дельбрюка (Max Delbrück Center for Molecular Medicine -MDC, Berlin-Buch of the Helmholtz Association), показали, що контроль цього процесу здійснюється головним чином в цитоплазмі клітини.



Модель процесу трансляції
(www.frontiers-in-genetics.org)

Протеїнові молекули — основа органічного життя. «Вони контролюють фактично всі біологічні процеси: від серцебиття і транспортування кисню до мислення», — зазначив Маттіас Сельбак (Matthias Selbach), один з провідних авторів цього

дослідження. Інформація про будову протеїнових молекул записана в геномі клітини, який, у свою чергу, міститься в ядрі. Інформаційні РНК (іРНК) клітини, що утворюються в процесі транскрипції в ядрі, несуть в собі відображення інформації про необхідні протеїни і спрямовуються з ядра в цитоплазму клітини — на рибосоми, де ця органела певним чином транслює іРНК в амінокислотні послідовності. Питання, яке довго не давало спокою фахівцям, полягає в тому, який з двох процесів (транскрипція або трансляція) більшою мірою бере участь у регулюванні рівня вмісту протеїнових молекул в клітині. За допомогою кількісної мас-спектрометрії і новітніх методик секвенування автори досліджень встановили кількість протеїнових молекул та іРНК, інформація про які зберігається більш ніж в 5 000 генах. Математичне моделювання, проведене на підставі отриманих даних, допомогло вченим зробити певні висновки про контроль рівня вмісту протеїнових молекул усередині клітини. На думку авторів, рівень вмісту протеїнових молекул в основному залежить від процесу трансляції, що відбувається в цитоплазмі. «Врешті-решт, рибосоми визначають кількість протеїнів. Деякі іРНК транслюються за 1 год в одну протеїнову молекулу, інші іРНК за цей час встигають транслюватися 200 разів», — наголосив Сельбак.

Клітина працює як енергоощадна система

Окрім того, автори досліджень виявили, що клітини використовують свої ресурси найбільш ефективним шляхом. Для великої кількості іРНК і протеїнів, які є продуктами конститутивних генів, характерна висока стабільність. Ця стабільність необхідна клітині для збереження енергії (відомо, що процес синтезу протеїнів потребує чималого кількості енергії). На відміну від зазначених вище іРНК та протеїнових молекул, низка ензимів, що забезпечують швидке формування і передачу сигналів, навпаки, як правило, мають низьку стабільність. Завдяки існуванню протеїнів, яким притаманна низька й висока стабільність, клітина може швидко пристосовуватися до змін навколишнього середовища. Саме цим можна пояснити те, чому контроль протеїнового синтезу здійснюється переважно в цитоплазмі, а не в ядрі. Річ у тому, що в цитоплазмі відбувається останній етап формування протеїнів — трансляція. Регулювання трансляції дозволяє клітинам швидко пристосо-

уватись до «вимог» навколишнього середовища.

Автори досліджень сподіваються, що отримані ними результати будуть корисні під час пошуку методів боротьби з різними захворюваннями, пов'язаними з порушенням синтезу протеїнових молекул.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1144.html>

Створено штучні астроцити

Учені створили штучні астроцити — найпоширеніші клітини мозку, які не тільки забезпечують базові функції нервових клітин — нейронів, але й мають ключ до вивчення багатьох хвороб — від головного болю до недоумства. Астроцити вдалось отримати з ембріональних та індукованих плюрипотентних стовбурових клітин.

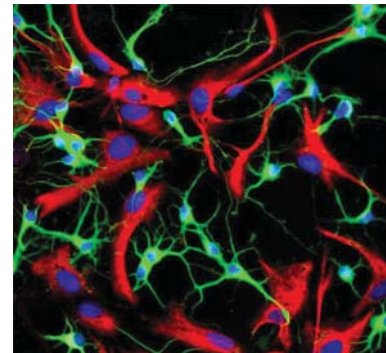


ФОТО: drgominak.com

Астроцити — клітини у формі зірки, що становлять велику частину об'єму мозку. Традиційно їх вважали буфером — «цементом» або «клеєм» речовини мозку, проте нещодавно проведене дослідження показало, що вони є носіями найважливіших функцій. Серед них — формування гематоенцефалічного бар'єру — напівпроникного кордону між кровоносною системою і нервовими клітинами, що захищає мозок від проникнення шкідливих речовин з крові, і забезпечення гомеостазу. Відповідно, астроцити причетні до розвитку багатьох розладів центральної нервової системи.

Ученим з Університету Вісконсин — Медісон вдалося виростити астроцити в пробірці зі стовбурових клітин людини. Повідомлення про їхню роботу опубліковано в Nature Biotechnology.

Біотехнологи отримали астроцити в чашці Петрі спочатку з ембріональних, а потім і зі штучно одержаних стовбурових клітин

з індукованою плюрипотентністю (клітини другого типу вважають перспективнішими як з практичних, так і з етичних міркувань, оскільки їх отримують без використання тканин людських ембріонів).

Можливість виготовляти великі однорідні проби астроцитів відкриває перспективу для кращого вивчення їхніх функцій, а також для розроблення нових ефективних ліків від нервових захворювань, вважає професор Сун Чхон Чжан, в лабораторії якого проведено роботу.

«Частково недостатня вивченість астроцитів пояснюється складністю їх отримання. Тепер ми можемо виростити мільярди або трильйони таких клітин з однієї стовбурової клітини», — заявив Чжан.

Хоча традиційно наука про мозок займається нейронами — великими клітинами, що обробляють і передають інформацію, останнім часом дослідники приділяють дедалі більше уваги вивченню ролі інших клітин. Існує декілька типів астроцитів, їхні функції багатогранні й потребують докладного вивчення. Деякі вчені припускають, що астроцити визначають інтелект людини: об'єм, який ці клітини займають в мозку ното sapiens, значно перевищує їх об'єм в мозку будь-якої іншої тварини. «Без астроцитів нейрони не можуть працювати. Астроцити оточують нервову тканину, захищаючи її й підтримуючи здоровий режим. Вони беруть участь у виконанні практично кожної функції мозку, а також у будь-якому його розладі», — зазначив Чжан.

Окрім функції «пілотної установки» для тестування ліків, астроцити (у далекому майбутньому) зможуть стати об'єктом трансплантації для пацієнтів з травмами головного мозку, хворобою Паркінсона і ушкодженнями спинного мозку. Технологія, розроблена групою Чжана, дозволяє одержувати астроцити будь-якого необхідного типу. Крім того, генетично модифікуючи їх, можна отримати модель ураженою хворобою тканини. Таким чином з'явиться можливість вивчати в лабораторіях складні неврологічні захворювання, об'єкти для яких були раніше недоступні.

Джерело:

http://www.eternalmind.ru/index.php?option=com_content&task=view&id=3362&Itemid=2

Дослідники знайшли спосіб перепрограмування клітин шкіри людини у функціонуючі нейрони

Перетворюючи клітини шкіри людини на робочі нервові клітини, дослідники впритул підійшли до створення моделі захворювання нервової системи і, можливо, навіть регенеративної терапії, заснованої на клітинних трансплантатах.



Функціонуючі нейрони, створені з клітин шкіри людини

В он-лайнній версії журналу Nature повідомляється про досягнення в галузі «трансдиференціювання», що стрімко розвивається, коли клітини швидко набувають нових форм. Минулого року дослідники перетворили клітини сполучної тканини шкіри на клітини серця, крові та печінки.

Трансдиференціювання є альтернативою клітинного перепрограмування, яке включає перетворення зрілих клітин на плюрипотентні стовбурові клітини, здатні стати багатьма типами клітин, згодом перетворюючи плюрипотентні клітини на певний тип клітин, наприклад на нейрони. Маріус Уернінг (Marius Wernig), керівник дослідження стовбурових клітин при Стенфордському університеті шт. Каліфорнія, США, повідомив, що їм вдалося перетворити фібробласти шкіри людини на нейрони, минувши стадію індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (iPSCs), що дозволило уникнути низки проблем, подолання яких могло б зайняти декілька місяців.

Група Уернінга минулого року зацікавила клітинних репрограмістів — дослідники перетворювали клітини, отримані з кінчика хвоста миші, на функціонуючі нервові клітини. Для цього було потрібно всього три чужорідні гени, одержані з хвостових клітин з вірусом, і менш ніж два тижні дослідів. На думку вчених, якщо такий прекрасний результат було отримано для миші, то очевидно не буде жодних проблем у разі застосування цієї ідеї на людині. Однак виявилось, що це не так.

Не зовсім вірно

Ці три гени також індукували одержання клітин людини, які виглядали як нервові, але такі нейрони не могли проводити електричний сигнал. Щоб навчити їх цьому, дослідникам знадобився четвертий ген, знайдений методом проб і помилок у сполучній тканині, що бере участь в загоєнні ран, яку було отримано з абортів плодів і крайньої плоті новонароджених. Приблизно через два тижні ці нейрони почали реагувати на електричний імпульс включенням своїх трансмембранних іонних насосів, як і належить робити звичайним нервовим клітинам. Ще через декілька тижнів нейрони почали утворювати з'єднання, або синапси, з мишачими нейронами, з якими їх було вивчено.

Уернінг зізнається, що не все йшло так чітко. Тільки 2–4% фібробластів становили нейрони проти приблизно 8% у клітин миші. Крім того, більшість отриманих нейронів використовували як хімічну речовину нейромедіатор глутамат, що обмежує їх використання в лікуванні таких захворювань, як хвороба Паркінсона, пов'язана з проблемами в нейронах, що виявляється в деградації саме глутаматзалежних нервових клітин під дією хімічних речовин. Проте вчені не втрачають надії на підвищення ефективності своїх досліджень і намагаються створити нейрони, які б взаємодіяли між собою за допомогою інших хімічних речовин.

Швидкий успіх

Еван Снайдер (Evan Snyder), дослідник в галузі клітинної біології при Стенфордському медичному дослідницькому інституті Бернема, вважає, що нейрони, отримані шляхом трансдиференціювання, мають переваги порівняно з клітинами мозку, отриманими з iPSCs: окрім того, що їх можна швидше й простіше створити, вони з меншою вірогідністю призводять до онкологічних ускладнень за імплантації в тканину.

Проте, з другого боку, клітинні ознаки захворювання можуть з'являтися тільки в тому разі, коли клітина розвивається природним шляхом з плюрипотентних стовбурових клітин у диференційовані нейрони. Намагання перетворити клітини на нейрони може призвести до того, що вони почнуть перетворюватися на ракові пухлини. Крім того, фібробласти, які є початковим матеріалом для трансдиференціювання, не здатні ділитися з такою інтенсивністю, як індуковані стовбурові клітини, що обмежує використання їх у тих випадках, коли потрібна

велика кількість таких клітин, зокрема під час скринінгу ліків.

Уернінг підсумував, що обидва підходи слід активно розвивати, адже невідомо, в яких випадках і за яких конкретних умов виявиться більш відповідним той чи інший метод.

Джерело:

Оригінальна стаття Ewen Callaway, How to make a human neuron,

он-лайн версія журналу Nature —

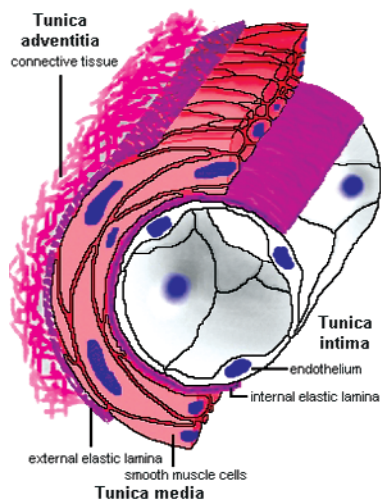
doi:10.1038/nature10202

http://www.nature.com/news/2011/110526/full/news.2011.328.html?WT.mc_id=FB

K_NPG

Протеїн Rasip1 може стати ключем до інгібування формування кровоносних судин, що живлять пухлини

Дослідники з Південно-західного центру медичних досліджень при Техаському університеті виявили протеїн, який керує розвитком кровоносних судин і має всі шанси на те, щоб його було покладено в основу створення методики боротьби з розповсюдженням ракових клітин в організмі. У ході проведення досліджень на лабораторних мишах учені показали, що протеїн Rasip1 (Ras interacting protein) є вельми специфічним і відіграє ключову роль у низці клітинних процесів. За словами д-ра Ундіни Клівер (Ondine Cleaver), доцента кафедри молекулярної біології Техаського університету, основного автора досліджень, без активності Rasip1 кровоносні судини не здатні формуватися. «Те, що ми виявили, є фактором першої необхідності для формування внутрішніх каналів і перебігу тубулогенезу, іншими словами найголовнішим фактором для перетворення чогось схожого на нитку на щось схоже на поливальний шланг», — зазначила д-р Клівер. Розвиток пухлинної тканини залежить від формування кровоносних каналів, які мають забезпечити клітини пухлинної тканини поживними речовинами, необхідними для швидкого росту пухлини. Ракові пухлини так само використовують систему кровоносних судин як засіб розповсюдження малігнізованих клітин в організмі. Хімічні сполуки, що пригнічують активність Rasip1, імовірно, можуть протистояти розвиткові ракових захворювань двома напрямками: через порушення живлення клітин пухлинної тканини і порушення системи транспортування клітин, що перероджуються.



Загальна модель будови кровоносних судин

У процесі внутрішньоутробного розвитку в організмі плоду виникають органи у формі трубок (йдеться про кишечник і судини серцево-судинної системи). За словами авторів досліджень, механізми, в межах яких здійснюється перетворення клітин-прабатьків кровоносних судин на трубочки, які здатні переносити кров, тільки розпочинають досліджувати. Утім, автори досліджень виявили значну кількість регуляторних молекул, що мають велике значення для різних тканин, процесів формування і роботи кровоносних судин. Ці регуляторні молекули перебувають в активному стані в середовищі тканин організму. Rasip1 є специфічним регулятором активності молекул-перемикачів, названих ГТФ-азами. Він з'являється в активному стані тільки в клітинах ендотелію, який створює внутрішні покриття кровоносних судин. При цьому активність Rasip1 не спостерігається в клітинах гладкої м'язової тканини, що входить до складу стінки кровоносних судин. Крім того, автори досліджень виявили, що для нормального формування каналів, якими в організмі здійснюється транспортування крові, потрібен ще один протеїн, з яким зв'язується Rasip1. На думку Ундіни Клівер, основні підходи, спрямовані на пригнічення утворення кровоносних судин, базуються на дії на фактори росту, що містяться поза потрібною клітиною, тимчасом як Rasip1 є фактором росту усередині клітин-мішеней. «Незважаючи на те, що проведено дослідження на лабораторних мишах, ми вважаємо, що майбутні дослідження Rasip1 і процесів, які перебувають під його контролем, дадуть широкі можливості для створення засобів і моделей для

поліпшення методів клінічної терапії, спрямованої на пригнічення формування системи кровоносних судин, що живлять пухлинну тканину», — наголосила Ундіна Клівер.

Докладніший опис результатів проведених досліджень можна віднайти в журналі *Developmental Cell*.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1139.html>

Аналіз крові за хвороби Альцгеймера: диференційна діагностика на ранній стадії захворювання

Завдяки інноваційному дослідженню, здійсненому науково-дослідним інститутом Центру охорони здоров'я Університету Мак-Гіл (McGill University Health Centre, МУНС) невдовзі може з'явитися новий аналіз крові для діагностики хвороби Альцгеймера. Розроблення унікального біохімічного аналізу, що виявляє пацієнтів із цим нейродегенеративним захворюванням, стало можливим завдяки вивченню утворення гормону мозку дегідроепіандростерону (ДГЕА) під час окиснення сироватки крові.

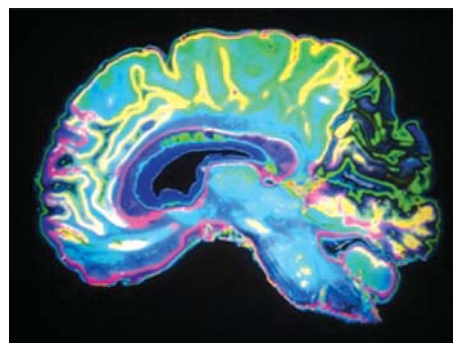


Рис. із сайту www.muhc.ca

Результати роботи, що має значення для мільйонів людей із цієї хворобою, опубліковано в *Journal of Alzheimer Disease*. «Діагностичного інструмента для хвороби Альцгеймера, що забезпечує отримання однозначних даних, окрім посмертного аналізу мозкової тканини, до сьогодні не існує», — зазначив головний автор статті д-р Віссіліос Пападопулос (Vassilios Papadopoulos), директор науково-дослідного інституту МУНС. — Наші клінічні дослідження показали, що для діагностики хвороби Альцгеймера на її ранній стадії можна успішно застосовувати неінвазивний аналіз крові, що ґрунтується на біохімічному процесі, який, окрім того, дає можливість

відрізнити її від інших видів недоумства». Розроблений д-ром Пападопулосом і його колегами тест заснований на утворенні гормону мозку дегідроепіандростерону. Високі рівні цього гормону виявлено в мозку, де він має широкий спектр біологічних ефектів. Раніше вчені ідентифікували мозко- і клітинно-специфічний опосередкований оксидативним стресом механізм біосинтезу цього гормону в мозку щурів, биків і людини. Цей альтернативний шлях індукується прооксидантними речовинами, такими як Fe^{2+} і бета-амілоїдний пептид. Використовуючи зразки тканини мозку, одержані з контролю і від пацієнтів з хворобою Альцгеймера, вони отримали докази, що гормон утворюється в мозку пацієнтів з хворобою Альцгеймера як продукт, опосередкований оксидативним стресом через метаболізм попередника, що знижує рівні цього попередника в крові. Дослідники перевірили присутність попередника ДГЕА в сироватці крові людини, застосовуючи просту, засновану на Fe^{2+} реакцію, і визначили кількість утвореного ДГЕА. Із 86 осіб, залучених у дослідження, 19 чоловіків і 20 жінок мали хворобу Альцгеймера; 18 чоловіків і 22 жінки відповідного віку становили групу контролю; у 4 чоловіків і 3 жінок спостерігалися помірні когнітивні порушення. Окиснення сироватки призвело до різкого підвищення рівнів ДГЕА в контрольній групі, тоді як у сироватці пацієнтів з хворобою Альцгеймера підвищення рівня або не спостерігалось, або було незначним.

Зміни в рівні ДГЕА після окиснення сироватки корелювали з когнітивним і психічним станом пацієнтів. Результати дослідження показали, що порівняння рівнів ДГЕА в сироватці крові пацієнтів до і після окиснення може стати корисним інструментом для діагностики хвороби Альцгеймера. «Існує чітка кореляція між відсутністю можливості отримати ДГЕА шляхом окиснення крові і ступенем когнітивних порушень, що супроводжують хворобу Альцгеймера, — зазначив Пападопулос. — Ми показали, що можна точно і неодноразово діагностувати хворобу Альцгеймера на основі невеликих зразків крові. Аналіз дозволяє проводити й диференціальну діагностику ранніх стадій хвороби Альцгеймера, а це означає, що його можна використовувати як тест на це захворювання на самому початку». «Проте реалізація потенціалу будь-якого методу терапії залежить від достовірності діагнозу», — додав Пападопулос.

На цей час, встановлюючи діагноз хвороби Альцгеймера, досліджують сімейну історію, оцінюють психічний стан і проводять фізичні тести, в яких особливу увагу приділяють неврологічним симптомам. Тому точний, ранній і специфічний неінвазивний біохімічний тест, що корелює з клінічними даними, є життєво важливим. Дослідники вважають, що тест на ДГЕА методом окиснення крові може бути використано для діагностики хвороби Альцгеймера на найранішій її стадії, а також для моніторингу ефективності терапії і прогресування захворювання.

Джерело:

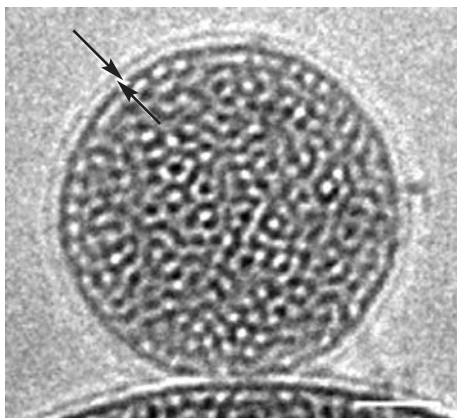
<http://lifesciencetoday.ru/index.php/vesti-iz-laboratoriy/410-blood-test-for-alzheimers-differential-diagnosis-at-an-early-stage>

«Протоклітини» доставляють терапевтичні та діагностичні засоби в ядро ракової клітини

Об'єднавши нанотехнологічні методи з результатами медичних досліджень, учені Національних лабораторій Сандіа (Sandia National Laboratories), Університету Нью-Мехіко (University of New Mexico, UNM) та Дослідницького і лікувального онкологічного центру (Cancer Research and Treatment Center, CRTC) при UNM розробили ефективну стратегію використання наночастинок для знищення ракових клітин.

У статті, що анонсується на обкладинці травневого номера журналу *Nature Materials*, доступного в он-лайн, учені описують кремнієві наночастинки розміром близько 150 нм у діаметрі, що нагадують бджолині соти, порожнини яких можуть бути заповнені великою кількістю різних лікарських препаратів.

Наночастинки й утворені з ліпосом мембрани, що їх оточують і практично є аналогічними клітинним, разом складають комбінацію, яку можна розглядати як «протоклітину»: мембрана «запечатує» смертоносний вантаж і модифікується молекулами (пептидами), що специфічно зв'язуються з рецепторами, які суперекспресуються на поверхні ракових клітин. (Дуже велика кількість рецепторів — один із сигналів того, що клітина є раковою). Наночастинки забезпечують стабільність мембрани і містять терапевтичний (або діагностичний, наприклад квантові крапки) вантаж, вивільняючи його усередині клітини.



Зображення протоклітини (криогенна TEM) з нанопористим ядром і ліпідним бішаром завтовшки близько 4 нм (фото: nature.com)

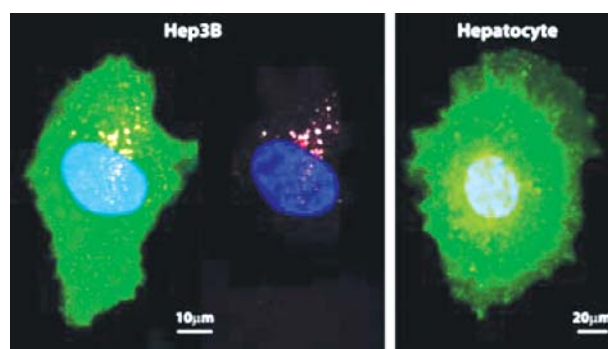
Сьогодні схваленою Управлінням з контролю над якістю харчових продуктів і лікарських засобів США (U.S. Food and Drug Administration) стратегією доставлення терапевтичних препаратів за допомогою наночастинок є використання ліпосом. Порівняння цільових ліпосом і протоклітин з ідентичними мембранами і пептидними композиціями показало, що здатність доставляти більшу кількість препаратів, стабільність і ефективність таргетингу протоклітин зумовлюють багатократно посилення цитотоксичності, специфічно спрямованої на клітини раку печінки людини.

Інша перевага протоклітин над ліпосомами, на думку провідного автора дослідження Карлі Ешлі (Carlee Ashley), полягає в тому, що використання ліпосом як носіїв вимагає спеціалізованих стратегій завантаження, що ускладнює процес їх виробництва. На відміну від звичайних ліпосом, нанопористі кремнієві частинки практично просто вбирають лікарські препарати, завантажуючись унікальними комбінаціями, необхідними для персоналізованої медицини. Крім препаратів хіміотерапії, вони ефективно інкапсулюють токсини і малі інтерферуючі РНК (siRNA), що пригнічують експресію генів. РНК, біологічні месенджери, що «сигналізують» клітинам, які протеїни вони повинні синтезувати, у цьому разі використовуються для інгібування синтезу — один зі способів спричинювати запрограмовану клітинну смерть, або апоптоз.

Складові мембрани — ліпіди слугують щитом, що обмежує просочування токсичних препаратів хіміотерапії з наночастинок доти, доки вони не проникнуть у ракову клітину. Це означає, що в організм пацієнта

потрапить менша кількість отрути, якщо протоклітини не віднайдуть ракових клітин. Таке покриття пом'якшує токсичні побічні ефекти, практично неминучі під час проведення традиційної онкохіміотерапії. Замість цього досить маленькі, щоб залишатися непоміченими «радаром» печінки та інших органів, частинки можуть циркулювати в крові протягом багатьох днів або навіть тижнів, залежно від їхнього розміру, шукаючи свою жертву і не зашкоджуючи організмові.

Застосовуючи дані створеної в CRTC бібліотеки фагів — вірусів, що вражають бактерії, учені виявили пептиди, що специфічно зв'язуються лише з раковими клітинами.



На знімку зліва (Hep3B) показано клітину раку печінки, що флуоресцює зеленим, з протоклітинами, що містяться в ній.

Маленькі червоні крапки — ліпідні бішарові «упаковки». Їхній «вантаж» — заповнені лікарськими препаратами наночастинок — проникає в ракову клітину. Тут їхні пори заповнені білим флуоресцентним барвником з метою візуалізації.

На знімку справа: протоклітини не проникають в здорову клітину печінки (гепатоцит) (фото Carlee Ashley)

Учені продовжують оптимізувати розмір наночастинок з пористого кремнію, що їх отримують аерозолізацією розчину попередників. Розроблений лабораторією Брінкера процес виробництва пористих наночастинок — індуковане випаровування самозбиранням, дозволяє отримувати частинки від 50 нм до декількох мікрон у діаметрі. Частинки розміром від 50 до 150 нм ідеально підходять для максимально тривалої циркуляції в крові і поглинання раковими клітинами, тому до перетворення в протоклітини вони заздалегідь відбираються за розміром.

Зараз метод тестується на людських ракових клітинах *in vivo*, і найближчим часом

учені приступлять до його перевірки на пухлинах мишей. За їхніми оцінками, комерційно доступним він може стати протягом п'яти років.

Джерело:

<https://share.sandia.gov/...o-treatment/>
<http://www.nanonewsnet.ru/news/2011/meditsina-nanotekhnologii-protiv-raka-protokletki-dostavlyayut-terapevticheskie-diagnostic>

За регенерацію органів у хребетних відповідає набір напівспеціалізованих стовбурових клітин

Відростання відірваного плавника, ноги або хвоста у риб і амфібій відбувається не за рахунок єдиних і універсальних стовбурових клітин, як вважалося, а за допомогою набору різних клітин, кожна з яких відновлює певний тип тканини.



Danio rerio (фото Elma_Ben)

Регенерація органів у хребетних вимагає цілого набору стовбурових клітин, як показують у своїй статті дослідники медичного факультету Вашингтонського університету (США). Здатність до відновлення втрачених органів є у багатьох хребетних: пригадаємо хоча б ящірок або саламандр з тритонами. Тривалий час вважали, що відновлення кінцівок відбувається за рахунок єдиних стовбурових клітин (СК). За цією теорією, клітини в місці ампутації втрачали свою спеціалізацію і ставали стовбуровими. Оскільки всі вони виглядали однаково, було вирішено, що відростання ноги або хвоста відбувається за рахунок СК, подібних до ембріональних, які можуть перетворитися на клітину будь-якої тканини. Стівен Джонсон і Шу Ту досліджували регенерацію плавників у *Danio rerio* — акваріумної рибки і популярного модельного об'єкта. Подібно до саламандр, *Danio* здатні швидко відновлювати втрачене за рахунок групи клітин, які з'являються на місці ампутації відразу

після операції; і на вигляд ці клітини не відрізняються одна від одної. Дослідники вводили в ДНК клітин на місці ампутації фрагмент, що кодує флуоресцентний протеїн. Усе потомство цієї клітини несло копію такої ДНК і світилося зеленим. І якби загоєвальні клітини дійсно відновлювали всі тканини в новому плавникові, то зеленим світилися б і клітини шкіри, і нервові клітини, і клітини кровоносних судин. Але такого не відбувалось. Якщо ДНК зеленого протеїну вводили в клітину шкіри, то в новоутвореному плавникові зеленим світилася тільки шкіра. Те ж саме спостерігали і в разі нервових, імунних, кісткових та інших типів клітин. Тобто клітини на місці розриву тканини не перетворювалися на всемогутні ембріоноподібні, а давали тільки свій власний тип тканини, інакше кажучи, ставали тканиноспецифічними СК. Таких клітин дослідники налічили 9 типів. За словами учених, таким же чином це відбувається й у інших тварин: амфібій, ящірок і т. д., аж до людини. Зроблене відкриття має полегшити завдання медикам, які займаються загоєнням ран, і за допомогою регенеративної медицини вирішити проблему, адже при цьому не потрібно отримувати складні й нестабільні ембріоноподібні клітини загальної спеціалізації, цілком достатньо буде обмежитися частково стовбуровими.

Джерело:

<http://science.computenta.ru/610939/>

Нова програма для нейрональних стовбурових клітин

Нейральні стовбурові клітини можуть робити багато що, але не все. Наприклад, клітини головного або спинного мозку, як правило, з'являються не з нейрональних стовбурових клітин периферичної нервової системи, а клітини останньої неможливо отримати зі стовбурових клітин головного мозку. Проте ученим з Інституту вивчення головного мозку Макса Планка (Max Planck Institute for Brain Research) у Франкфурті та Інституту імунології й епігенетики Макса Планка (Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics) у Фрайбурзі вдалося отримати клітини центральної нервової системи з нейрональних стовбурових клітин периферичної нервової системи.

Дослідники встановили, що за певних умов стовбурові клітини периферичної нервової системи трансформуються в олігодендроцити — клітини, які створюють мієлінові оболонки нервів як головного, так і спинного мозку.

Нервова система ссавців складається з центрального (головний і спинний мозок) і периферичного (наприклад, нерви і сенсорні ганглії) відділів. Хоча ці відділи дуже тісно взаємозв'язані, вони відрізняються анатомічно і представлені різними типами клітин. Клітинні типи периферичної нервової системи походять від клітин-попередників ембріона — нервового гребеня. Дотепер вважали, що стовбурові клітини нервового гребеня можуть диференціюватися в нейрони і гліальні клітини периферичної нервової системи (ПНС), але не в клітини центральної нервової системи (ЦНС).

Вид клітин, в який диференціюються стовбурові клітини нервового гребеня, чітко визначається умовами навколишнього мікросередовища. Піддавши стовбурові клітини периферичної нервової системи ембріонів і новонароджених мишей впливу різних умов, німецькі вчені разом зі своїми французькими колегами показали, що зі зміною умов ці стовбурові клітини можуть диференціюватися і в клітини центральної нервової системи. Окрім нейронів, стовбурові клітини нервового гребеня розвивалися в різні типи гліальних клітин ЦНС, включаючи олігодендроцити й астроцити.

«Культуральне середовище перепрограмує стовбурові клітини нервового гребеня таким чином, що вони змінюють свою ідентичність. Це працює без генетичної модифікації клітин», — пояснив Герман Рорер (Hermann Rohrer) з Інституту вивчення головного мозку Макса Планка.

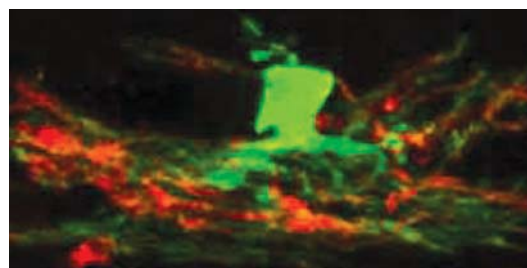
Фактори культурального середовища чітко активували різні генетичні програми, і зі стовбурових клітин розвивалися клітини, які зазвичай з них не розвиваються. Учені поки що не розуміють, які саме фактори відіграють тут свою роль. Проте є деякі підстави вважати, що в цю трансформацію залучений фактор росту фібробластів — FGF.

У мозку мишей на різних стадіях його розвитку перепрограмовані стовбурові клітини в більшості випадків розвивалися в олігодендроцити, створюючи мієлінову оболонку навколо нейронів ЦНС і, отже, вони є необхідними для передачі електричних сигналів. Експерименти з трансплантації, проведені дослідниками на генетично модифікованих мишах, які не здатні синтезувати мієлін і мають серйозні неврологічні дефекти, довели, що це завдання можуть узяти на себе нові олігодендроцити.

«Перепрограмовані стовбурові клітини можуть диференціюватися в клітини центральної нервової системи, і нові клітини

здатні постійно інтегруватися в цю систему», — зазначив Вердон Тейлор (Verdon Taylor) з Інституту імунології та епігенетики Макса Планка.

Поки що незрозуміло, якою мірою нові фундаментальні відкриття сприятимуть розвиткові клітинної терапії. Це вимагає того, щоб, по-перше, такі стовбурові клітини були присутні й доступні в ЦНС людини і, по-друге, щоб їх можна було розмножити і перепрограмувати в культурі. «На сьогодні ми знаємо тільки те, що в мишей ці стовбурові клітини мають потенціал диференціюватися в олігодендроцити», — зауважив Герман Рорер.



Трансплантація перепрограмованих нейрональних стовбурових клітин в головний мозок генетично модифікованих мишей, не здатних синтезувати мієлін. Стовбурові клітини диференціювалися в олігодендроцити (зелені), які синтезували мієлін (червоний)
(фото: © MPI fur Hirnforschung)

Учені планують детальніше вивчити, які молекулярні механізми відповідальні за перепрограмування цих стовбурових клітин, чи присутні стовбурові клітини нервового гребеня в периферичній нервовій системі дорослих мишей, і які умови необхідні для їх перепрограмування.

Оригінальну статтю: «Peripheral Nervous System Progenitors Can Be Reprogrammed to Produce Myelinating Oligodendrocytes and Repair Brain Lesions» було опубліковано в The Journal of Neuroscience.

Джерело:
<http://www.sciencedaily.com/releases/2011/05/110512103948.htm>;
<http://www.nanonewsnet.ru/news/2011/novaya-programma-dlya-neiralnykh-stvolovykh-kletok>

Стовбурові клітини з жиру для тканинно-інженерних кісток

Швейцарські вчені з Університетського госпіталю в Базелі (University Hospital Basel) досліджували, чи можливе формування *in vitro* судинних структур з культивованих

ендотеліальних і мезенхімальних клітин-попередників, отриманих зі стромальної васкулярної фракції (SVF) людської жирової тканини. Вирощені судинні структури дадуть змогу поліпшити ефективність і рівномірність формування кісткової тканини *in vivo* на підкладки, що закривають дефекти критичної величини. Свіжовиділені людські клітини SVF висівали на гідроксіапатитові підкладки (діаметр і товщина — 1 см) і культивували на перфузійному біореакторі, що дозволяло підтримувати зростання ендотеліальних клітин-попередників. Як контроль використовували очищені від васкулогенних клітин стовбурові клітини двох типів: вирощувані моношаром адипозні стромальні клітини (ASC) і відповідного віку стромальні клітини кісткового мозку (BMSC).

Через 5 діб культивування одержані з SVF ендотеліальні й мезенхімальні клітини-попередники сформували капілярну сітку, яка дала анастомози із судинами реципієнта вже через 1 тиждень після ектопічної імплантації позбавленим імунітету щурам. Порівняно з BMSC і ASC SVF-клітини забезпечували швидшу (через 8 тижнів) інтеграцію в тканину, більш рівномірне й об'ємне формування кісткової тканини з осифікатами, що проростають на глибину до 3,5 мм від поверхні підкладки.

Результати дослідження показали, що SVF-клітини мезенхімальної/ендотеліальної фракції відіграють ключову роль у створенні остеогенної конструкції з підвищеною здатністю до приживлення. Єдине досяжне джерело цих клітин і відпрацьований стандартний процес їх культивування в проточному біореакторі роблять запропонований підхід вельми привабливим для вирощування *in vitro* і клінічного застосування для заміщення дефектів кісткової тканини трансплантатів потрібної форми і величини.

Матеріали дослідження наведено в статті: Geven S. et al. Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials*.

Джерело:

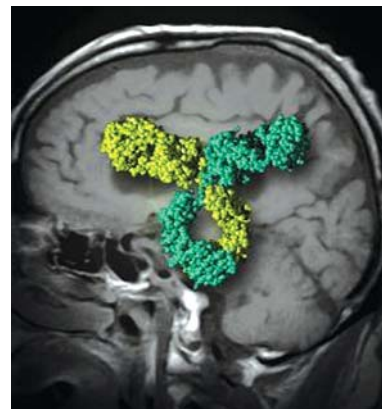
<http://www.stemcells.ru/news-444>

Створено антитіла, здатні долати гематоенцефалічний бар'єр

Ученим вдалося створити антитіла, що без зусиль долають гематоенцефалічний бар'єр, що розділяє системний кровотік організму і кровоносну систему головного мозку.

Нові дані становлять великий потенціал для створення терапії на основі антитіл, яка може бути використана для лікування хвороби Альцгеймера та інших захворювань нервової системи

Антитіла — розчинні протеїни, присутні в сироватці крові і тканинній рідині, що беруть участь в імунній відповіді проти чужорідних агентів. Вони високоспецифічні, тому вчені дедалі частіше прагнуть створити антитіла, здатні зв'язувати більш ніж одну молекулярну мішень.



Антитіла, що зв'язують більш ніж одну молекулярну мішень, здатні подолати гематоенцефалічний бар'єр (фото: Genentech)

«Ми наблизилися до створення біспецифічних антитіл», — повідомив Райан Воттс (Ryan Watts), нейробіолог з біотехнологічної фірми Genentech (США), що є піонером у створенні терапевтичних антитіл. «Перевага нашої розробки в тому, що багато з цих антитіл будуть здатні подолати гематоенцефалічний бар'єр, який захищає головний мозок від патогенів, перешкоджаючи проникненню всередину великих молекул лікарських засобів», — зазначив Воттс.

У двох статтях, опублікованих в журналі *Science Translational Medicine*, вчені представили дизайн нових антитіл. Антитіла здатні розпізнавати і зв'язуватися з двома протеїнами-мішенями. Перший протеїн, названий бета-секретазою 1, є поширеною мішенню для багатьох препаратів, використовуваних у терапії хвороби Альцгеймера, оскільки відіграє важливу роль у продукуванні мономерів бета-амілоїду в головному мозку. Згідно з «амілоїдною гіпотезою», основною причиною захворювання є відкладення конкрементів протеїну — бета-амілоїду в головному мозку, що призводять до його ушкодження.

Другим протеїном, що зв'язується антитілами, є рецептор трансферину, що активує

молекулярні іонні канали, які здійснюють транспортування іонів заліза в головний мозок. Зв'язуючись із цим рецептором, антитіла транспортуються в головний мозок, де інгібують функції бета-секретази 1. Функція антитіл була перевірена на моделі хвороби Альцгеймера у мишей: через день після ін'єкції антитіл концентрація бета-амілоїду в головному мозку тварин знизилася на 47%.

Для досягнення цих результатів групи фахівців компанії Genentech необхідно було кинути виклик ще одному правилу створення антитіл. Сила взаємодії між антитілом і мішенню називається афінністю: чим вища афінність антитіла, тим сильніша взаємодія. Більшість біологів прагнуть отримати антитіла з максимально високою афінністю. Райан Уоттс і Марк Денніс, біоінженери з компанії Genentech, теж почали роботу з отримання високоафінних антитіл до рецептора трансферину, однак виявили, що такі антитіла не здатні долати гематоенцефалічний бар'єр. Проте після зниження афінності антитіл проблему проникнення через кровоносні судини було вирішено [2].

За словами біоінженера-розробника Девіда Гілберта (David Hilbert) з біотехнологічної компанії Zyngenia (США), низькоафінні мультиспецифічні антитіла можуть застосовуватись у багатьох галузях. Наприклад, ракові клітини часто ідентифікують на основі комбінації декількох маркерних протеїнів на їхній поверхні. Однак ці самі маркери, але в інших поєднаннях можуть бути присутні й на поверхні здорових клітин. Традиційні високоафінні моноклональні антитіла здатні вбити здорові клітини разом з раковими, але низькоафінні антитіла будуть більш вибірково зв'язуватися з раковими клітинами.

Проте не всім ученим подобається ідея використання низькоафінних антитіл. «З технічного погляду робота хороша, але, за великим рахунком, я думаю, що вони зайшли в безвихідь», — зазначив Вільям Падрідж (William Pardridge), ендокринолог з Каліфорнійського Університету в Лос-Анджелесі (США) і засновник біотехнологічної компанії ArmaGen, який тривалий час займався вивченням гематоенцефалічного бар'єра. За словами Падріджа, його компанії вдалося отримати антитіла, що долають гематоенцефалічний бар'єр за допомогою тих самих рецепторів, однак зниження афінності антитіл не було потрібно. Падрідж додає, що для досягнення бажаного ефекту будуть потрібні необґрунтовано високі дози низькоафінних антитіл.

Уоттс запевняє, що дози антитіл, використовувани в експериментах з мишами, не були надмірно високими. «Для людини ці дози будуть ще менші, оскільки в нашому організмі антитіла довше залишаються активними перед руйнуванням. Ми маємо намір рухатися вперед. Проведена робота була лише перевіркою концепції. Далі ми плануємо застосувати її до інших мішеней в центральній нервовій системі», — наголосив Уоттс.

Джерело:

<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=3792>

Автономне репрограмування соматичних клітин у стовбурові без внесення чужорідної ДНК

Найважливіше відкриття останніх років, що змінило можливості регенеративної медицини, — перетворення соматичних клітин на плюрипотентні, по суті стовбурові, клітини, для чого в геном клітин вбудовують декілька певних генів, факторів транскрипції, що повертають клітині здатність до диференціювання за декількома напрямками. Цей підхід значно розширив можливості автологічної клітинної терапії і дозволив краще зрозуміти механізм багатьох захворювань, виділяючи пацієнтспецифічні лінії плюрипотентних клітин. Було запропоновано декілька різних стратегій отримання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (ІПСК), зокрема без епігенетичної модифікації і внесення до клітини чужорідних генів. Мета розроблення нових підходів до отримання ІПСК — не тільки краще зрозуміти механізми диференціювання клітин і розвитку захворювань, але й створити придатні для клінічного застосування лінії стовбурових клітин, що не несуть генетичних змін і онкологічно безпечні для пацієнта.

Група американських учених з Медичного центру університету шт. Небраска, США (University of Nebraska Medical Center) у своєму огляді обговорює різні стратегії отримання ІПСК, особливу увагу приділяючи сучасним неклітинним підходам до репрограмування соматичних клітин-попередників у стан стовбурових за допомогою стимуляції ендогенних факторів транскрипції. В огляді головним чином розглядається отримання плюрипотентних клітин для усунення пошкоджень роگیвки.

Матеріали дослідження подано в статті Parameswaran S. Balasubramanian S. Rao M. S. Ahmad I. Non-Cell Autonomous Reprogramming: A Nucleic Acid Free Approach to Induction of Pluripotency. Stem Cells. 2011 May 4. doi: 10.1002/stem.655.

Джерело:
<http://www.stemcells.ru/news-274>

Генетичні війни: гена інженерія



Проблему запобігання біотероризмові слід розглядати не тільки відносно безпосередньо самої загрози застосування біологічної зброї. Останні документи ООН потребують ширшого аналізу і рішучіших дій світової спільноти. Йдеться про розроблення системи міжнародно-правового і, зокрема, міжнародного поліцейського контролю за можливими негативними (кримінальними) наслідками біотехнологічної революції.

У прийнятій 9 вересня 2006 р. консенсусом на Генеральній Асамблеї ООН Глобальній протитерористичній стратегії Організації Об'єднаних Націй запропоновано створити спільно з державами-членами ООН єдину всеосяжну базу даних про біологічні інциденти, здійснивши заходи щодо того, аби вона доповнювала базу даних про біологічні злочини, яку має намір створити Міжнародна організація кримінальної поліції. Водночас Генеральному секретареві ООН рекомендовано відновити список експертів і лабораторій, що є в його розпорядженні, а також технічні керівні принципи і процедури для своєчасного й ефективного розслідування випадків використання таких засобів. Відзначено також важливе значення пропозиції Генерального секретаря ООН про об'єднання за сприяння Організації Об'єднаних Націй зусиль основних заінтересованих сторін у сфері біотехнології, включаючи промислові й наукові кола, громадянське суспільство і уряди, в рамках єдиної програми, спрямованої на забезпечення використання досягнень в галузі біотехнології тільки для загального блага, а не в терористичних або інших злочинних цілях, за належного додержання основопо-

ложних міжнародних норм захисту прав інтелектуальної власності.

Чому так гостро поставлено в Глобальній контртерористичній стратегії ООН питання контролю над біотехнологією? Можна багато й красиво говорити і писати про перспективи гуманістичного використання біотехнології, про «світле майбутнє» людства, ліберальну еugenіку, лікування спадкових захворювань, подовження людського життя практично до безкінечності. Однак все це стосується лише легальної частини біотехнологічної революції. А існує, і вже тривалий час, нелегальна (і практично завжди кримінальна) її складова. Навіть коли цю нелегальну частину реалізує держава, і хай навіть сама є суперліберально-демократичною, вона завжди це робить таємно від своїх громадян, демократичних інститутів. І завжди така діяльність фактично протиправна і злочинна. Злочинна тому, що імітує діяльність, заборонену міжнародно-правовими документами і національним кримінальним законодавством.

Наука розвивається таким чином, що новітні технології, і біотехнологія зокрема, по суті своїй, мають «подвійне призначення». Ті самі генно-інженерні методи, які дають змогу створювати ліки, можуть водночас бути застосовані для створення зброї. Передусім це стосується розроблення біологічної зброї. Як відомо, Конвенцію ООН про заборону розробки, виробництва і накопичення запасів бактеріологічної (біологічної) токсичної зброї і про їх знищення було прийнято ще в 1971 р. Проте є численні свідчення того, що цей тіньовий напрям використання біотехнології розвивався і розвивається далі в країнах з абсолютно різними видами політичних режимів. Причому зброю, створену на основі генної інженерії в різних модифікаціях (генетичну, навіть етнічну), розробляли ще з 60-х років минулого століття, насамперед в СРСР і США. Відомо, що крім смертельно небезпечних генетично змінених вірусів розробляється біологічна зброя, яка може бути етнічно націленою і знищувати навіть окремі групи серед популяцій (наприклад, залежно від статі, віку, різних антропологічних ознак, які можна виявити шляхом аналізу структури ДНК, що зберігає генетичний код, за кольором шкіри, розрізом очей). За повідомленнями ЗМІ на початку 2004 р. на семінарі ЦРУ в США, що проводиться в рамках «Проекту нового американського століття» (PNAC), американські вчені стверджували, що до 2014 р. таку зброю вже буде створено.

З конфіденційної доповіді Пентагону, датованої 1998 роком, що стала відомою

журналістам у 2002 р., впливало, що біологічний агент може бути генетично трансформований, з тим щоб створити нову смертельну зброю. Уільям Коен, колишній міністр оборони США, повідомив, що він отримував відповіді з країн (ПАР, Ізраїль), що працюють над створенням «певних типів патогенів, які могли б бути етнічно специфічні». Так, в ПАР велися роботи з розведення бактерій, здатних робити людей з чорною шкірою безплідними.

Американський біолог Блек Дж. Л. (Black J. L.) наводить у своєму дослідженні декілька загальних категорій генів, які можуть використовуватись у генетичній зброї: гени, суттєві для життя клітин; мутантні гени, відповідальні за спадкові хвороби; токсичні гени екзогенних видів; ген, що кодує вироблення ензиму, який забезпечує перетворення попередника токсину; вектори структури, що вражають окремі людські популяції (наприклад, конкретні етнічні групи).

Академік РАН О. Ф. Спірін пише, що існує декілька класів генів, які стають смертоносними, після того як вбудовуються в клітину хазяїна. Такі гени запускають у клітинах синтез речовин протейнової природи, що руйнують захисну і регуляторну системи, або просто укривають токсичних. Інфікований організм сам синтезує отруту, яка його і вбиває. Для генетичної зброї, на думку академіка О. Ф. Спіріна, є характерними тривалий латентний період і спільність симптомів за величезної різноманітності можливих причин патології. Все це вкрай ускладнює діагностику, лікування і профілактику. Використовуючи генетичні конструкції, ідентичні фрагментам людського геному, які в певних умовах спричиняють захворювання, довести зовнішню дію взагалі неможливо.

Зараз можливе створення односпрямованої біологічної зброї, безпечної для агресора, наприклад на основі «повільних» і «сплячих» вірусів з великими латентними періодами. Патогени поширювати легко, зробити це можна так, щоб джерело інфекції залишилося невідомим. Відкривається можливість «тихої біологічної війни», в якій супротивник навіть не дізнається, звідки виходить небезпека. Зникає останній стримувальний чинник.

На зміну «Геному» приходять нова програма «Протеом» з розшифрування й вивчення призначення і взаємодії протеїнів, не менш складна, ніж «Геном», що відкриває шлях до абсолютної зброї, яка дозволяє за будь-який вибраний термін — від декількох годин до десятків років — планомірно знищити будь-які людські популяції за ключовими генетичними ознаками, не побоюючись при цьому можливого удару у відповідь.

Біотехнологи пішли ще далі: створено мікроби-мутанти, які знищують вибірково неживу матерію — нафту, пластик, метали, композитні матеріали тощо.

У країнах, які створювали біологічну зброю, ці роботи проходили під контролем військових і спецслужб. Але ніхто не може дати гарантій, що такі роботи не ведуться під контролем інших суб'єктів, зокрема терористичних, фашистських і расистських організацій, мафіозних структур та вчених-маніяків.

Як вважає академік РАН О. Ф. Спірін, тим, хто захоче виготовити біологічну зброю, чи то екстремістськи настроєний уряд, опозиційна партія, чи просто група громадян, не знадобиться будувати інститут з полігоном. Одна добре оснащена лабораторія, в якій працюватиме десятеро людей, цілком у змозі зробити генетичну зброю. Тим паче, що, за оцінками експертів, лабораторія з виробництва біологічної зброї в сучасних умовах, разом зі всім устаткуванням, може коштувати в межах від декількох десятків до декількох сотень тис. доларів США, а як біологічна зброя можуть бути використані й ті патогени, які конвенціонально не заборонені до застосування в дослідницьких цілях для отримання діагностичних систем, вакцин та інших медичних препаратів.

Американський вчений Роб Карлсон (Rod Carlson), фізик і біолог, що працював певний час із Brentom в MSI, прогнозує, що приблизно протягом десятиліття створення біологічної зброї з нуля стане таким же простим і дешевим, як побудова сайту.

Увагу журналістів привернув сайт компанії VN Bio Ltd, що займається постачанням устаткування і витратних матеріалів для біологічних лабораторій. В одному з каталогів біосировини було знайдено вельми дивні «товари»: на продаж виставили фрагменти ДНК смертельно небезпечних для людини вірусів віспи й іспанського грипу. Для оформлення замовлення на ДНК віспи знадобилося лише назвати адресу, номер мобільного телефону й адресу електронної пошти, і вже через три години в редакцію The Guardian подзвонив кур'єр і повідомив, що замовлення доставлено. Жодних перевірок того, кому відправляється потенційно небезпечний вантаж, проведено не було. Одержувачем міг би бути як законотворчий орган, так і можливий терорист.

У цих умовах контроль за біотехнологічним ринком у мережі має стати важливим новим завданням поліцейських підрозділів, які контролюють тіньові кримінальні ринки в Інтернеті.

Не меншу небезпеку становить розроблення нейрофармакологічних засобів контролю за поведінкою. Про те, що й ці роботи вже проводили, на вагомому фактичному матеріалі написано достатньо багато книг. По суті, йдеться про розроблені види психотропної зброї на основі біотехнології.

Ще наприкінці 50-х років А. Берл, на той час помічник державного секретаря США, який брав участь у програмах ЦРУ з контролю поведінки за допомогою нейрофармакології, записав у своєму щоденнику: «Я побоююсь одного. Якщо вчені зроблять те, що запланували, то люди перетворяться на муршок, якими маніпулюють».

Ніколи з тіні не виходитимуть і евгенічні роботи з наділення людини надвластивостями (гіперагресією, гіпервирливалістю, гіперреакцією, нечутливістю до болю, спеки, холоду, баченням у темряві і т. д.). Результати такої наукової діяльності цікавлять передусім військових і спецслужби. Але й інші зазначені вище суб'єкти не обійдуть це стороною. Наприклад, мафіозні структури, що «обслуговують» спорт (а вірніше гроші, що їх заробляють на спорті), вже зараз активно співпрацюють з тіншовими ученими в розробленні нових засобів, які підвищують витривалість спортсменів. При цьому головне завдання тут — розроблення препаратів, які неможливо виявити за допомогою тестування.

У березні 2006 р. в США проходила перша міжнародна зустріч експертів, присвячена питанням генетичного допінгу. На ній наголошувалося, що олімпіади XXI століття багато в чому будуть змаганнями фармакології і генетиків. На сьогодні відомо три гени, які, ймовірно, використовуватимуться спортсменами і які неможливо буде визначити існуючими методами, причому їх можна вводити безпосередньо в м'язову тканину як звичайну вакцину: модифікований вірус, який менш уразливий до бунту імунної системи (adeno-associated viruses AAVs); другий ген зростання клітин внутрішньої поверхні судин (vascular endothelial growth factor VEGF); третій ген, що сприяє нарощуванню м'язів, і він замінить заборонені зараз стероїди (insulin-like growth factor 1 IGF-1). Дон Кетлін (Don Catlin), біохімік, який працює в Каліфорнійському університеті, вважає, що визначити наявність цих генів в організмі спортсменів буде практично неможливо.

З великою часткою ймовірності можна припустити, що, незважаючи на будь-які можливі обмеження і заборони, проводитимуться роботи з нелегального клонування людини і навіть створення людиноподібних

химер. Тим паче, що технології для цього вже створено.

Група вчених з 2-го Шанхайського медуніверситету під керівництвом Хуейчжень Шен створила понад 100 гібридних ембріонів, з'єднавши клітини людської шкіри з яйцеклітинами кроликів. Гібридам протягом декількох днів дозволили розвиватися в лабораторних блюдцях, а потім знищили, щоб отримати з них ембріональні стовбурові клітини. Законодавство Китаю не дозволяє вирощувати ембріонів для дослідів більше 14 днів. Стовбурові клітини, отримані з гібридних ембріонів, здатні до росту протягом тривалих періодів часу в лабораторних умовах і можуть перетворюватися на будь-який вид клітин.

Біолог з Гарварду Дуглас Мелтон відзначив, що створення китайцями «фантастичного» ембріона може комуся нагадати химеру з грецької міфології з головою лева, головою козла і хвостом змії, але це — не перший випадок, коли вчені змішують в лабораторії клітини людини і тварин. Були, наприклад, експерименти з мишами, яких для досліджень «забезпечували» клітинами людського мозку або частинами імунної системи.

Британська біотехнологічна компанія Imutran з початку 90-х років минулого століття розводить свиней для використання в трансплантації людині. Багато діабетиків було підключено до свинячих печінки і нирки в апаратах тимчасового діалізу. Проект компанії PPL (США) включає створення стада корів, що виробляють людські протеїни, і кроликів з людським кальцитоніном, який допомагає заміщати кістку.

Компанія Pharmino (Нідерланди) займається виробництвом в організмі корів людського лактоферину, який активізує імунну систему.

Корпорації Genzyme Transgenics і Advanced Cell Technology співпрацюють, щоб створити стада худоби, яка буде носієм людських протеїнів у крові і м'ясі, наприклад, таких як альбумінова сироватка, використовувана для підтримки рідиною балансу крові у жертв опіків. Учені генетично модифікують свиней з людськими протеїнами, що слугують як ідентифікаційний сигнал для імунної системи людини. Це приймається системою захисту людського організму таким чином, що орган не відторгається.

Незважаючи на мораторій Ради Європи на клінічне тестування трансплантатів з органів тварин на людях, уведений ще в січні 1999 р., роботи в цьому напрямі тривають.

Клонування тварин для використання їх як фабрик гормонів для людей розвивається посиленими темпами. Ця технологія ціка-

вить учених і компанії через кількість органів, гормони і фармацевтичні препарати, які можна отримати таким чином.

Королівський жіночий госпіталь в Мельбурні (Австралія) створює мишу, яка синтезує людську сперму, трансплантуючи їй клітини людських яєчок. В Японії університет у м. Тотторі досяг таких самих результатів, і тепер учені з цього закладу хочуть спробувати запліднити людську яйцеклітину спермою, синтезованою мишею. Жіноче молоко вироблятимуть корови і кози.

Оскільки біотехнологічна революція відкриває можливості для реалізації будь-яких людських фантазій, завжди знайдуться суб'єкти, готові їх використовувати в суто утилітарних цілях (військових, оперативних, комерційних). Де, наприклад, гарантії того, що мафіозні структури в майбутньому не організують нелегальні постачання людських клонів для садомазохістських утіх різного роду збоченців або людиноподібних химер для приватних зоопарків?

Клонування людини — процес на цей час ще проблематичний (багато вчених-генетиків й досі сумніваються в можливості клонування людини, незважаючи на появу клонів тварин) і вельми витратний.

Криза клонування, що посилилась із початком цілої епопеї передчасних смертей перших клонів великих ссавців, спонукала до перегляду теорій і методів, які застосовували під час клонування. Учені відзначають, що складність будови людських хромосом зробить цей процес стосовно клонування людей ще важчим.

На сьогодні шість різновидів ссавців: вівця, миша, кролик, свиня, корова і кішка змогли пройти успішно процедуру клонування, але численні спроби досягти подібних результатів з приматами були невдалими.

Можна висунути достатньо обґрунтовану гіпотезу про те, що можлива поява псевдоклонування людини, людських органів і тканин. Мається на увазі заява про клонування людських органів, легітимізація цього процесу в гуманних цілях (наприклад, для заміни хворих органів), а насправді, здійснення кримінального обороту реальних людських органів і тканин під виглядом продуктів клонування. Зараз ставити на конвеєр вбивство людей з метою вилучення органів для кримінальних структур є все-таки морочливим і небезпечним. Немає легального прикриття. Легалізація клонування відкриває для цього широкі можливості. Причому попит на тіншовому ринку трансплантології цей процес прискорюватиме. Набуває дедалі більшого поширення так зва-

ний «трансплантаційний туризм» до Індії і Південно-Східної Азії (по суті небезпечний різновид мафіозного ринку трансплантації).

Іншим напрямом діяльності мафіозних структур стало використання генної інженерії для виведення стійких сортів нарковмісних рослин з метою підвищення їхньої врожайності, захисту від шкідників і т. д.

Тіншовий розвиток біотехнології відбувається не тільки в «законспірованих приватних володіннях», а, як було вже зазначено, в державних лабораторіях, під контролем військових і спецслужб. І саме це робить міжнародно-правовий контроль за тіншовим (кримінальним) використанням біотехнології найскладнішим зі всіх інших видів контролю.

Крім того, вчені обґрунтовано наголошують на абсолютно різних підходах у регулюванні біотехнології в європейських і азійських країнах. Наприклад, іудео-християнське уявлення Заходу про святість унікальної особи не є універсальним. В інших частинах світу, наприклад в Азії, погляд на проблему біотехнології людини значно менш сентиментальний. Отже будь-які дослідження там можуть здійснюватись практично безперешкодно.

Азійські традиції на кшталт буддизму і синтоїзму не проводять різких етичних відмінностей між людством і рештою творіння, як це властиво християнству. Саме тому в Азії раніше була поширена така практика, як інфантицид (вбивство дітей), а зараз китайське керівництво вирішило впровадити дії, на Заході неприпустимі, зокрема, взяття органів в ув'язнених, які підлягають смертній карі. При цьому азійські країни на цей час володіють науковою інфраструктурою, необхідною для конкуренції в біомедицині. Виходячи з відмінностей в етичному сприйнятті світу біотехнологія в майбутньому може стати важливою ланкою розділу в міжнародній політиці.

За всіх складностей міжнародно-правового регулювання біотехнології і біомедицини таке регулювання — основоположний початок контролю за кримінальними наслідками біотехнологічної революції. Основні принципи такого контролю містяться в Конвенції ООН про заборону розробки, виробництва і накопичення запасів бактеріологічної (біологічної) і токсичної зброї і про їх знищення (1971 р.), у Загальній декларації ООН про геном людини і права людини (розробленою Міжнародним комітетом ЮНЕСКО з біоетики і прийнятою Генеральною конференцією ЮНЕСКО в 1997 р.), а також в Декларації ООН про клонування людини (прийнята резолюцією 53/280 Генеральної Асамблеї від 8 березня 2005 р.).

Однак Конвенція з бактеріологічної зброї, на думку багатьох фахівців, за більш ніж 35-річний період потребує істотних доповнень. Наприклад, вона дозволяє здійснювати контроль тільки під час проведення робіт на оборонних або державних підприємствах, які фінансуються з державного бюджету, але не в комерційних структурах. Адже саме в приватних структурах здійснюється найбільш активне розроблення біотехнології. Крім того, Конвенція не передбачає заборони на застосування біологічної зброї нового покоління, зокрема генетичної.

Що стосується Загальної декларації про геном людини і Декларації про клонування людини, то вони є саме деклараціями, що не мають конвенціонального механізму міжнародної співпраці. Крім того, Загальна декларація про геном людини містить об'єктивно закладені в неї суперечності. З одного боку, ст. 11 проголошує заборону на практику клонування з метою відтворення людської особини, а державам і міжнародним організаціям пропонується співпрацювати з метою виявлення такої практики й ухвалення на національному і міжнародному рівнях необхідних заходів. А з другого боку, ст. 12 містить вимоги про загальний доступ до досягнень біології, генетики і медицини, що стосується геному людини, і свободу проведення наукових досліджень. При цьому ст. 11 припускає негативне використання біотехнології, а ст. 12 — позитивне, для зменшення страждань людей і поліпшення стану здоров'я кожної людини і всього людства.

Постійна суперечність між негативними і позитивними наслідками розвитку біотехнології, що об'єктивно не знімається, може регулюватися тільки додатковими міжнародними конвенціональними документами.

Тим часом багато провідних експертів ООН займають тверду позицію, відповідно до якої репродуктивне клонування людини та інші подібні види генетичної інженерії мають бути кваліфіковані як одна з категорій злочинів проти людства. У зв'язку з цим було сформульовано пропозицію про те, щоб Міжнародний кримінальний суд розслідував і переслідував випадки клонування людини.

Серед країн ЄС в авангарді «хрестового походу» проти клонування людини опинилися Німеччина і Франція. Вони запропонували розробити в рамках ООН Міжнародну конвенцію проти клонування людини з метою її відтворення. Підтримавши цю ініціативу, Генеральна Асамблея ООН у грудні 2001 р. ухвалила рішення про розроблення такої конвенції.

Окрім Міжнародної конвенції проти клонування людини з метою її відтворення, доцільно

також ставити питання про розроблення додаткового протоколу про незаконне використання і розповсюдження біотехнології в рамках транснаціональної організованої злочинності (як відомо, три протоколи вже прийнято: про запобігання і припинення торгівлі людьми, особливо жінками і дітьми, та покаранні за неї; про незаконне ввезення мігрантів сушею, морем і повітрям; про незаконне виготовлення і оборот вогнепальної зброї, її складових частин, компонентів і боєприпасів).

Не менш актуальним є розроблення й ухвалення Конвенції про боротьбу з біотероризмом, про що неодноразово піднімалося питання на багатьох міжурядових і міжнародних наукових зустрічах.

Враховуючи ту обставину, що, на думку фахівців-генетиків, генетичну зброю можна використовувати не тільки проти людей, але й проти сільського господарства, перед системою Інтерпол стоїть також завдання застосувати з метою поліцейського контролю міжнародних документів, що визначають правила безпеки під час роботи з генетично-зміненими організмами.

Це — Картагенський протокол (регулює переміщення ГМО), Декларація Ріо (визначає, що тягар доведення нешкідливості лежить на виробникові продукції), документи Кодексу Аліментаріус і комісії ООН з харчових стандартів (містять стандарти для ГМО-продуктів), а також дві директиви Євросоюзу (визначають методи оцінки загрози, правила моніторингу, а також умови, за яких видають дозволи на випуск ГМО).

Міжнародно-правовий контроль за біотехнологією має стати гранично жорстким, міжнародно-правові норми — максимально обмежувальними, враховуючи, що будь-який відступ від заборон може стати необоротним злочином проти людства. Відсутність такого жорсткого контролю і єдиної міжнародної позиції з цих питань створює підґрунтя для можливості виникнення «генетичних Чорнобилів» у різних куточках земної кулі.

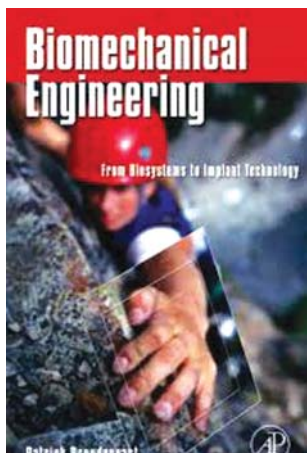
Багато років тому Уїнстон Черчилль сказав: «Кам'яне століття може повернутися на сяючих крилах науки». Не можна допустити, щоб це попередження видатного політика стало пророчим.

Джерело:

<http://uneworld.com/novosti-naukinovejshie-texnologii/geneticheskie-vojnuygennaya-inzheneriya.html>

*Матеріал підготувала
О. С. Виноградова*

НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН



BIOMECHANICAL ENGINEERING: FROM BIOSYSTEMS TO IMPLANT TECHNOLOGY

Біомеханічна інженерія: від біосистем до технології імплантації

За редакцією P. Prendergast

Найбільш авторитетне видання з біомеханіки від провідних фахівців світу. Якщо йдеться про сухожилля, кістки або серце, кожна частина людської біологічної системи виконує свою механічну функцію, яку вивчають на різних рівнях. Таким чином, біомеханіка викликає інтерес з погляду вивчення анатомії, фізіології, техніки, ортопедії, відновлювальної і спортивної медицини, ергономіки, електрофізіологічної кінезіології та інших дисциплін.

Пропонована книга є першим всеосяжним текстовим матеріалом, призначеним для біомеханічних інженерів. Складається з окремих розділів, які охоплюють широкий діапазон питань і висвітлюють всі аспекти біомеханіки /біомеханічної інженерії.

Для урізноманітнення процесу навчання вміщено допоміжний матеріал з Інтернету.

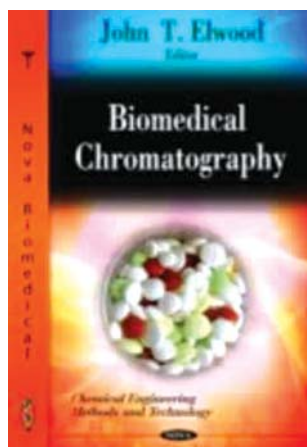
Логічний розгляд питань побудовано на основі загальноприйнятої прогресивної практики викладання в провідних університетах світу.

Обсяг: 500 стор.

Видавництво: «Academic Press» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY

Біомедична хроматографія

За редакцією J. T. Elwood

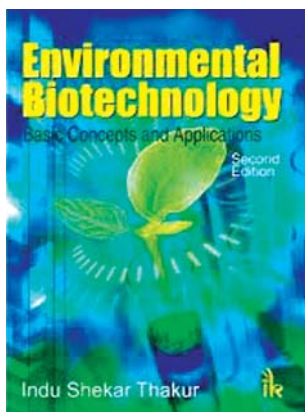
Біомедична хроматографія — наука, присвячена застосуванню хроматографії і суміжних методів у біологічних та медичних дослідженнях. В основу цих досліджень покладено методи і технології, що стосуються розділення, ідентифікації та визначення речовин у галузі біохімії, біотехнології, молекулярної біології, клітинної біології, клінічної хімії, фармакології та суміжних дисциплін, а також аналізу біологічних рідин, клітин і тканин, очищенню біологічно важливих сполук і т. д. У пропонованій монографії обговорюються і розглядаються ці та пов'язані з ними теми.

Обсяг: 178 стор.

Видавництво: «Nova Science Pub Inc» (США).

Дата публікації: 2010 р.

Мова: англ.



ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY: BASIC CONCEPTS AND APPLICATIONS

Екологічна біотехнологія: Основні концепції та використання

I. S. Thakur

Біотехнологія так чи інакше торкається життя кожної людини. Це одна з основних технологій XXI століття з багатогранною сферою використання, починаючи від малих об'єктів до застосування у виробництві товарів. Екологічна біотехнологія є дуже широкою галуззю, що швидко розвивається. Актуальність її постійно зростає, сприяючи стійкому розвитку і захисту довкілля під час виробництва біоматеріалів. Ця галузь революціонізувала розуміння процесів життєзабезпечення навколишнього середовища, уможливила застосування чистої технології для вирішення екологічних проблем. Книга є оглядом основних екосистемних процесів, перетворень і порушень довкілля в результаті природних явищ і діяльності людини з використанням біотехнологічних принципів реабілітації для його розвитку і захисту.

Зміст:

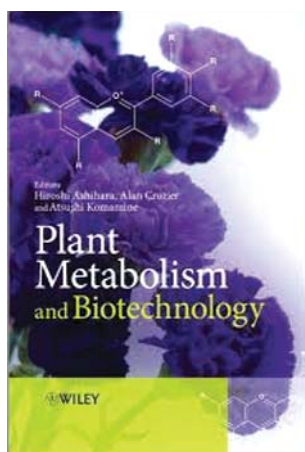
1. Вступ.
2. Навколишнє середовище та екосистемні процеси.
3. Екологічні ресурси повітря, води і ґрунту.
4. Екологічні порушення повітря, забруднення води і ґрунту.
5. Глобальні екологічні проблеми.
6. Структурно-функціональна динаміка життя мікроорганізмів.
7. Забруднення повітря і контроль.
8. Забруднення води і контроль цього процесу.
9. Тверді відходи і контроль забруднення ґрунту.
10. Деградація природних сполук.
11. Деградація ксенобіотиків.
12. Біоабсорбція металів.
13. Біотехнологічні процеси в галузі управління природокористуванням.
 - 13.1. Поглинання вуглецю.
 - 13.2. Біодобрива і біопестициди.
 - 13.3. Біоремедіація.
 - 13.4. Компостування.
 - 13.5. Біополімери та біопластика.
 - 13.6. Біовилуговування.
 - 13.7. Отримання біогазу.
 - 13.8. Біоенергетика біоетанолу й біодизеля.
 - 13.9. Наноматеріали: парадигми, процеси і перспективи.
14. Біотехнологічні процеси у виробництві і засобах захисту.
 - 14.1. Целюлозно-паперова промисловість.
 - 14.2. Шкіряна промисловість.
 - 14.3. Лікєро-горілчана промисловість.
 - 14.4. Лакофарбова промисловість.
 - 14.5. Виробництво антибіотиків.
 - 14.6. Нафтодобувна промисловість.
 - 14.7. Молочна промисловість.

Обсяг: 534 стор.

Видавництво: «IK International Publishing House Pvt. Ltd» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



PLANT METABOLISM AND BIOTECHNOLOGY

Метаболізм рослин і біотехнологія

H. Ashihara, A. Crozier, A. Komamine

Різноманітні рослинні метаболіти є корисними для життя людини і тому виробництво їх з використанням сучасних біотехнологічних прийомів має величезне потенційне значення, особливо в галузях сільського господарства і охорони здоров'я. У пропонованій книзі описуються біосинтетичні шляхи метаболітів рослин, їхні функції в рослинах і застосування для біотехнології. Тематика книги охоплює такі наукові напрями:

- біосинтез і метаболізм цукрів і крохмалю;
- біосинтез ліпідів;
- симбіотична фіксація азоту;
- метаболізм нуклеотидів;
- пуринові алкалоїди в метаболізмі;
- біосинтез нікотину;
- біосинтез терпеноїдів;
- біосинтез алкалоїду бензилізохіноліну;
- біосинтез монотерпеноїдних індольних алкалоїдів;
- біосинтез флавоноїдів;
- біосинтез пігментів: антоціанів, бетаціанів і каротиноїдів;
- метаболоміки в галузі біотехнології;
- крохмалі та цукри.

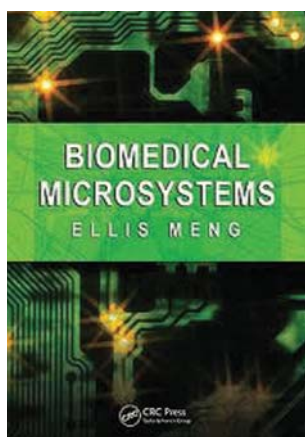
Пропонована книга є важливим посібником і призначена для дослідників та студентів, які спеціалізуються в галузі біохімії, біології рослин, метаболічної інженерії, біотехнології, харчової промисловості, сільського господарства і медицини.

Обсяг: 420 стор.

Видавництво: «Wiley-Blackwell» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIOMEDICAL MICROSYSTEMS

Біомедичні мікросистеми

E. Meng

Істотно впливаючи на здоров'я людини, технології біомедичних мікросистем (bioMEMS) охоплюють різні аспекти: від матеріалознавства до біології, хімії, фізики, медицини і техніки. Віддзеркалюючи міждисциплінарний характер цієї галузі, книга охоплює основи мініатюризації з описом біоматеріалів, мікро- і нанотехнологій, а також їх відповідне застосування.

Автор книги — активний дослідник, якого нещодавно було названо одним з новаторів технологічних оглядів серед молодих учених у віці до 35 років. У вступній частині йдеться про переваги мініатюризації. Далі розглянуто матеріали, технологію їх виготовлення та необхідні компоненти для всіх bioMEMS. Висвітлено також основоположні принципи і складові елементи, зокрема мікрофлюїдні концепції, системи лабораторії-на-чипі, зондування і методи виявлення. У завершальних розділах подано декілька важливих додатків bioMEMS (мікродіаліз, катетер-сенсори, MEMS-імпланти, нейронні зонди і тканинна інженерія).

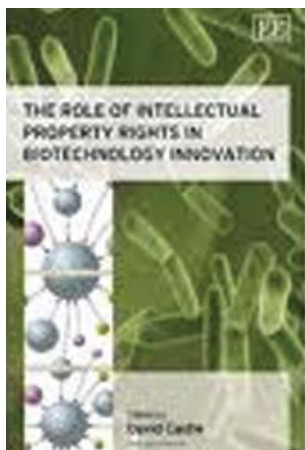
Для читачів, які мають лише обмежені уявлення про MEMS і bioMEMS, пропонована книга є практичним вступом у технологію застосування цих пристроїв і принципів їх експлуатації з наведенням прикладів для кращого розуміння цієї складної теми.

Обсяг: 412 стор.

Видавництво: «CRC Press» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



THE ROLE OF INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS IN BIOTECHNOLOGY INNOVATION

**Роль прав на інтелектуальну власність
в інноваційному потенціалі біотехнології**

Під редакцією D. Castle

Права на інтелектуальну власність (ПІВ), зокрема патенти, посідають важливе місце в інноваційній системі, але дотепер ведуться дискусії щодо того, якою мірою вони сприяють або перешкоджають інноваціям. Крізь призму біотехнології ця книга глибоко розкриває основні питання, що стосуються інновацій та інтелектуальної власності для оцінки вимог позитивної і негативної дії прав інтелектуальної власності на інновації. Міжнародна група вчених з різних дисциплін — економічної географії, медичного права, бізнесу, філософії, історії, суспільної охорони здоров'я, управління вивчають, як ПІВ фактично працює в інноваційних системах, не тільки з погляду теорії, але й ґрунтуючись на глобальних, регіональних, національних, поточних та історичних контекстах. При цьому автори прагнуть розкрити тематику і вийти за межі усталеного припущення про роль прав інтелектуальної власності в інноваційних системах.

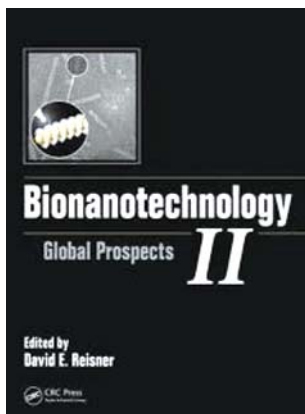
Учені й студенти, зацікавлені в інноваціях, науково-технічній політиці, праві інтелектуальної власності й передачі технологій, знайдуть у цій книзі багато цікавого, а її висновки будуть корисні для осіб, які беруть участь у прийнятті рішень у політиці науки і техніки, для менеджерів інтелектуальної власності в галузі біотехнології, а також для фірм венчурного капіталу.

Обсяг: 459 стор.

Видавництво: «Northampton, MA: Edward Elgar, Publishing» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIONANOTECHNOLOGY II: GLOBAL PROSPECTS

Біонанотехнологія II: глобальні перспективи

За редакцією D. Reisner

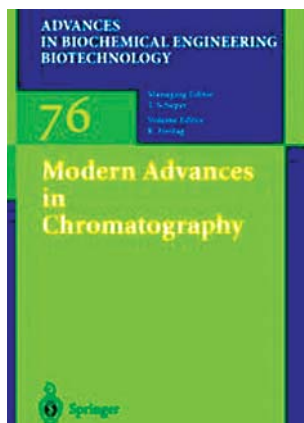
Ґрунтуючись на інформації, наведеній у Довіднику з біомедичної інженерії (*Biomedical Engineering Handbook*) і отриманого нового матеріалу, ця книга спирається на досвід фахівців з таких країн, як Іран, Куба, Південна Африка, Велика Британія, Канада, Китай, Індія та Росія. Вона відображає дедалі зростаюче значення наномедицини і біотехнології, включаючи такі питання, як біомімікрія, стовбурові клітини, оптичні тканини, нанопокриття для медичних пристроїв, що імплантуються, біобатареї, будівельні блоки ДНК, протеїнові пристрої, квантові крапки, застосування в харчовій промисловості, косметиці, кардіодіагностиці, доставленні лікарських засобів, фотоніці, біоаналізі, оптиці, наномедицині, персоніфікованій медицині й бізнесі біотехнологічних компаній.

Обсяг: 350 стор.

Видавництво: «CRC Press» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



MODERN ADVANCES IN CHROMATOGRAPHY (ADVANCES IN BIOCHEMICAL ENGINEERING BIOTECHNOLOGY)

Сучасні досягнення хроматографії
(Досягнення біохімічної інженерної біотехнології)

R. W. Allington, M. Barut, O. Bruggemann, J. M. J. Frechet

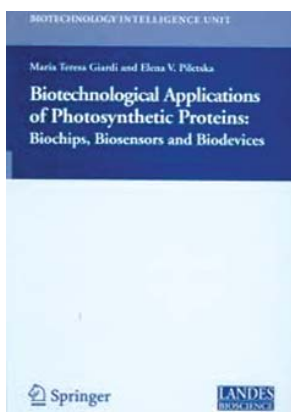
Огляд присвячено новому хроматографічному методу — капілярній електрохроматографії (КЕХ), якій останнім часом приділяється велика увага. Принципи цього методу ґрунтуються на поєднанні електроосмотичного потоку і стаціонарної фазової взаємодії з аналізом. Описано прилади КЕХ, технології капілярних колонок, умови розділення, а також детально розглянуто приклади їх застосування.

Обсяг: 283 стор.

Видавництво: «Springer» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF PHOTOSYNTHETIC PROTEINS: BIOCHIPS, BIOSENSORS AND BIODEVICES (BIOTECHNOLOGY INTELLIGENCE UNIT)

Біотехнологія фотосинтетичних протеїнів: біочипи, біосенсори і біопристрої (біотехнологічні інтелектуальні елементи)

M. T. Giardi, E. Piletska

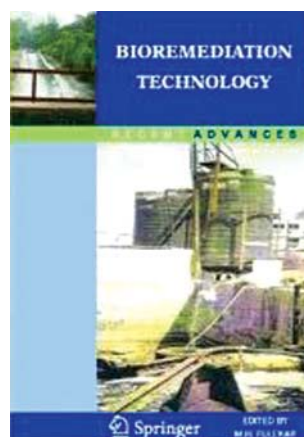
У пропонованому виданні подано огляд останніх досліджень фотосистем II та систем, доступних для біотестування забруднювачів за допомогою біосенсорів, що ґрунтуються на фотохімічній активності. Дані, наведені в цій книзі, слугуватимуть основою для розроблення комерційних біосенсорів, призначених для використання в оперативному аналізі попереднього відбору забруднювальних речовин фотосистеми II, зводячи до мінімуму дорогі й трудомісткі лабораторні аналізи.

Обсяг: 232 стор.

Видавництво: «Springer» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIOREMEDIATION TECHNOLOGY: RECENT ADVANCES

Технологія біодеградації: останні досягнення

M. H. Fulekar

Забруднення довкілля стало однією з основних глобальних проблем сьогодення. Сучасне зростання індустріалізації, урбанізація, інтенсивний розвиток сільського господарства і виробництво електроенергії спричинили неврегульовану експлуатацію природних ресурсів для задоволення дедалі більших людських потреб і бажань, порушуючи при цьому екологічний баланс, від якого залежить якість навколишнього середовища. Сучасні технологічні досягнення в галузі хімічних процесів/операцій сприяють одержанню нових продуктів, а також появі у великій кількості нових забруднювальних речовин, які перевищують

здатність навколишнього середовища проводити самоочищення. У зв'язку з прогресивним погіршенням довкілля, що стало загрозою для життя людини, ця проблема постала як одна з найбільш важливих.

У книзі обговорюється процес біодеградації, що ґрунтується на технології реабілітації, для очищення і відновлення забруднених ділянок і захисту навколишнього середовища. Розглядається можливість ефективніших біологічних процесів у галузі молекулярної біології та екології. Книга містить спеціальні документи, підготовлені відомими фахівцями, в яких наведено економічно обґрунтовані ефективні стратегії біодеградації за допомогою іммобілізації забруднювальних речовин з метою очищення довкілля. Призначена для аспірантів з фахів: біотехнологія/науки про життя/екологія, дослідників з університетів і науково-дослідних інститутів, а також промисловості.

Обсяг: 290 стор.

Видавництво: «Springer» (США).

Дата публікації: 2010 р.

Мова: англ.

BIOSENSORS: FROM ELECTRIC CIRCUITS TO IMMUNOSENSORS

Біосенсори: від електричних ланцюгів до імуносенсорів

J.-Y. Yoon, L. J. Lucas

Книга призначена для біомедичних інженерів та інженерів-електриків і покликана забезпечити міждисциплінарний підхід до дослідження біосенсорів. У ній розглядаються основні схеми датчиків для біомедицини, зокрема біомедичного зондування. Поданий матеріал стосується використання структурних елементів, починаючи з основ дизайну датчиків температури і закінчуючи складнішими біосенсорами.

Обсяг: 330 стор.

Видавництво: «Springer» (США).

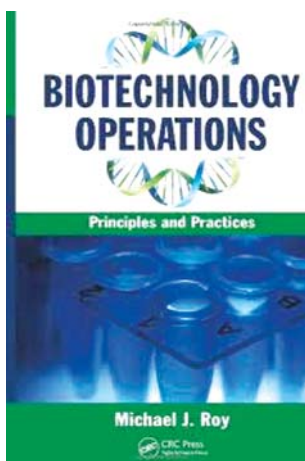
Дата публікації: 2010 р.

Мова: англ.

BIOTECHNOLOGY OPERATIONS: PRINCIPLES AND PRACTICES

Біотехнологічні операції: принципи і практика

M. J. Roy



Через швидкий розвиток біотехнологічної галузі й цілого спектра дисциплін, які сприяють її поширенню, виникла підвищена потреба в ретельніше спланованій і повнішій інтеграції розвитку біотехнологічних проектів. Незважаючи на великий практичний досвід і наявність доступної літератури, жодна книга ще не стала всеосяжним практичним посібником з основних принципів біотехнології.

Заповнюючи цю прогалину, запропонована монографія відображає інтеграційну філософію, виступаючи як практичний посібник для студентів, фахівців, усіх зацікавлених в розвитку біотехнологічної промисловості. Хоча в багатьох виданнях розглядаються конкретні технічні аспекти біотехнології, у цій книзі, мабуть, уперше інтегруються найважливіші концепції її розвитку, наукових і управлінських принципів та навиків, таких функціональних аспектів біотехнології, як:

- Біообробка.
- Клінічні випробування.
- Доклінічні дослідження.

- Управління проектами.
- Забезпечення якості.
- Контроль якості.
- Питання регулювання.

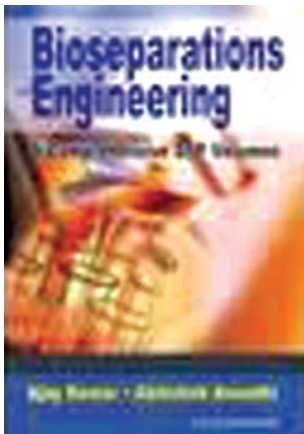
У детальному практичному поясненні оптимізації процесів біотехнології йдеться про те, як використовувати конкретне планування випуску продукції, проектування і процеси управління проектами для безперешкодного поєднання планів і зусиль у ключових функціональних питаннях. Застосовуючи уроки всієї історії біотехнології, Майкл Рой висвітлює процес розроблення принципів, які можуть сприяти безпечному і більш ефективному просуванню продуктів на ринок. Спираючись на досвід своєї роботи в промисловості і викладання в аспірантурі в Університеті штату Вісконсин, автор роз'яснює основні методологічні і практичні принципи, щоб допомогти зменшити ризики і вирішити проблеми реалізації майбутніх технологічних відкриттів у матеріальних продуктах.

Обсяг: 416 стор.

Видавництво: «CRC Press» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIOSEPARATION TECHNOLOGY

Технологія біосепарації

N. Mishra, A. Dubey

У пропонованій книзі, призначеній для фахівців у галузі інженерії або біології, розглянуто основи технології біосепарації, що зараз бурхливо розвивається. Монографія починається зі вступу з подальшим висвітленням процесів руйнування клітин, фільтрації, центрифугування, адсорбції і екстракції. Розглядаються також мембранні процеси розділення, осідання, хроматографія, електродинамічні методи розділення і остаточна обробка та формулювання висновків.

Обсяг: 416 стор.

Видавництво: «CRC Press» (США).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIOTECHNOLOGY

Біотехнологія

D. Roy

У монографії подано опис структури, організації і функції генетичного матеріалу з детальним обговоренням генетичного, структурного коду, кодексу регулювальних норм і положень, РНК-МІР, «редагування» РНК та імпринтингу ДНК. Також розглядаються ген, його структура і експресія, клонування генів, мутагенез *in vitro*, транспозонований мутагенез, сайлесинг генів, синтез ДНК, технологія секвенування, а також секвенування і збирання геному. Докладно описано молекулярну технологію маркера та її застосування, технології структурної геноміки, зокрема методи аналізу нуклеотидів і галотипів, функціональну геноміку, технологію вивчення функцій генів і взаємодію на рівні окремих генів та в повногеномному масштабі, а також технологію протеоміки.

Обсяг: 800 стор.

Видавництво: «Alpha Science International» (США).

Дата публікації: 2010 р.

Мова: англ.



BIOMECHATRONICS IN MEDICINE AND HEALTH CARE

Біомехатроніка в медицині та охороні здоров'я

За редакцією R. K. Y. Tong

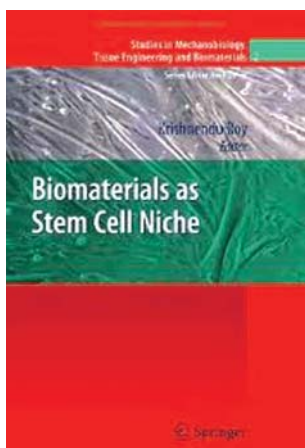
На сьогодні виникла потреба в біомехатронних пристроях у медичній галузі і дедалі більша кількість дослідницьких груп займається розробленням різних систем у цій сфері. Мета книги полягає в сприянні розумінню фахівцями нових технологій, що застосовуються або застосовуватимуться в медицині для вирішення різних клінічних проблем, а також в розкритті можливостей біомехатроніки під час лікування й обслуговування пацієнтів. Розглянуто також нові й захоплюючі міждисциплінарні напрями досліджень, що стосуються, зокрема, роботизованої терапевтичної системи для реабілітації після інсульту, екзоскелетів для повсякденної діяльності людей, які мають інвалідність, функціональної електричної стимуляції і безпровідної активної капсульної ендоскопії. Кожен розділ містить важливі довідкові матеріали з конкретної теми. Книга призначена для дослідників, фахівців інженерного і медичного профілю, студентів і тих, хто захоплюється мехатронікою.

Обсяг: 416 стор.

Видавництво: «Pan Stanford Publishing» (Велика Британія).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



BIOMATERIALS AS STEM CELL NICHE

Біоматеріали як ніша для стовбурових клітин

За редакцією K. Roy

Останні досягнення біології стовбурових клітин відкрили новий напрям у клітинній терапії. У пропонованій книзі подано сучасний погляд на використання біоматеріалів як штучних ніш для інженерних стовбурових клітин з метою кращого розуміння їх біології в 3D біомімітичних умовах та розроблення нових стратегій для ефективного довгострокового обслуговування і спрямованої диференціації стовбурових клітин в різних терапевтичних лініях. Стовбурові клітини тварин і людини як ембріонального походження, так і дорослих, обговорюються з погляду практичного застосування для регенерації нервових волокон, використання в ортопедії, серцево-судинній терапії, формування клітин крові і протипухлинної терапії. Як синтетичні, так і природні біоматеріали розглядаються з акцентом на характер індукування матеріально-стовбуровими клітинами (material-stem cells) прямих конкретних сигналів.

Книга призначена для фахівців у галузі біоматеріалів і створення тканин, лікарів, а також біологів, провідних спеціалістів з фундаментальних досліджень і застосування ембріональних і дорослих стовбурових клітин.

Обсяг: 350 стор.

Видавництво: «Springer» (США).

Дата публікації: 2010 р.

Мова: англ.

КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ, ВИСТАВКИ

IN-TECH 2011: INTERNATIONAL CONFERENCE ON INNOVATIVE TECHNOLOGIES **Міжнародна конференція з інноваційних технологій (IN-TECH 2011)**



Дата проведення: 01–03.09.2011 р.

Місце проведення: Братислава (Республіка Словаччина).

Веб-сайт: <http://www.in-tech.info>

Теми конференції:

- медичні інноваційні технології;
- біотехнологія та біоінженерія;
- інноваційні технології для сільського господарства;
- нанотехнологія;
- інтелектуальні виробничі системи;
- моделювання і симуляція;
- неемпіричний, генетичний алгоритм, нейронні мережі;
- виробництво біологічних систем;
- відновлювані і нетрадиційні джерела енергії, енергетичні системи.

AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY INTERNATIONAL CONFERENCE 2011 (ABIC 2011) **Міжнародна конференція 2011 року із сільськогосподарської біотехнології (ABIC 2011)**



Дата проведення: 06–09.09.2011 р.

Місце проведення: Йоганнесбург (Південно-Африканська Республіка).

Веб-сайт: <http://www.abic2011.co.za/>

ABIC — щорічне зібрання вчених, що є унікальним форумом, на якому обговорюються останні наукові досягнення в галузі сільськогосподарської біотехнології, намічаються майбутні напрями технологій, розглядаються різноманітні чинники, які можуть вплинути на розвиток науки і бізнесу в глобальному масштабі.

На сьогодні визнано, що сільськогосподарська біотехнологія може відігравати значну роль в економічному розвитку на місцевому, регіональному, національному і міжнародному рівнях.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY AND ENVIRONMENT MANAGEMENT — ICBEM 2011
Міжнародна конференція з біотехнології та управління навколишнім середовищем — ICBEM 2011



Дата проведення: 06–18.09.2011 р.
Місце проведення: Сінгапур (Республіка Сінгапур).
Веб-сайт: <http://www.icbem.org/>

Метою конференції є об'єднання зусиль дослідників, учених з метою обміну досвідом, новими ідеями і результатами досліджень з усіх аспектів біотехнології та раціонального природокористування, обговорення практичних проблем управління навколишнім середовищем і суміжних дисциплін.

6TH BIONANOTOX AND APPLICATIONS INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE
6-та міжнародна науково-практична конференція з біонанотоксикології та її застосування



Дата проведення: 10–13.09.2011 р.
Місце проведення: Алабама (США).
Веб-сайт: <http://www.goingtomeet.com/228150>

ВіоNanoТох (біологія, нанотехнологія і токсикологія) є новою галуззю досліджень, яка вивчає біологічні системи (рослини, тварини і людину) та навколишнє середовище у поєднанні з наноматеріалами.

Теми конференції:

- біотехнологія;
- нанотехнологія;
- токсикологія;
- хімія;
- біологія/мікробіологія;
- фармацевтика/діагностика;
- охорона здоров'я;
- сільське господарство;
- обчислювальна наука/інформатика;
- біоінформатика;
- нейроінформатика.

1-ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SECONDARY METABOLITES: CHEMICAL, BIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES (ISSET 2011)

1-й Міжнародний симпозиум зі вторинних метаболітів: їхні хімічні, біологічні та біотехнологічні властивості (ISSET 2011)



Дата проведення: 12–15.09.2011 р.

Місце проведення: Денізлі (Туреччина).

Веб-сайт: <http://issmet2011.pau.edu.tr/>

Теми конференції:

- Хімія вторинних метаболітів (синтез, властивості, біологічна активність і т. д.).
- Роль вторинних метаболітів у клітинах рослин в середовищах *in vitro* й *in vivo*.
- Вторинні метаболіти рослин і тварин та їх біотехнологія.
- Вторинні метаболіти лікарських рослин і їхня роль у фармакології.
- Використання вторинних метаболітів у промисловості (виноробстві, виробництві чаю, харчовій промисловості та ін.)

2ND ANNUAL BIO INDIA INTERNATIONAL CONFERENCE 2-га щорічна Міжнародна конференція BIO India International partnering



Дата проведення: 21–22.09.2011 р.

Місце проведення: Хайдерабад (Індія).

Веб-сайт: <http://www.bio.org/bioindia/content.aspx?id=358>

Цей ексклюзивний форум буде місцем зустрічі для біотехнологічних і фармацевтичних компаній з Північної Америки, Європи і Азії. Присвячений вивченню й обговоренню можливостей для бізнесу в новому біотехнологічному секторі Індії.

ВІО для Індії — це більш ніж 10-річний досвід біотехнологічного і фармацевтичного партнерства. Конференція відома своїми успішними проектами в США, Японії і Німеччині, зокрема вона є найбільшою подією з партнерства у сфері біотехнології, бізнес-форумах і Міжнародній конвенції в галузі біотехнології.

3RD INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMICAL, BIOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING (ICBEE 2011) 3-тя Міжнародна конференція з хімічної, біологічної та екологічної інженерії (ICBEE 2011)



Дата проведення: 23–25.09.2011 р.

Місце проведення: Ченду (Китай)

Веб-сайт: <http://www.icbee.org/>

Міжнародна конференція з хімічної, біологічної та екологічної інженерії є однією з важливих міжнародних подій, де обговорюються нові основні досягнення і результати досліджень у цій галузі.

ІСВБЕ 2011 також сприятиме полегшенню взаємодії між дослідниками і практиками, які працюють в найрізноманітніших науково-виробничих напрямках і зацікавлені в ширшому розвитку хімічної, біологічної і екологічної інженерії та пов'язаних з нею методів.

У конференції візьмуть участь провідні вчені, інженери і фахівці зі всього світу, що виявляють інтерес до цієї галузі.

8TH EUROPEAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING / 1ST EUROPEAN CONGRESS OF APPLIED BIOTECHNOLOGY 8-й Європейський конгрес із хімічної інженерії / 1-й Європейський конгрес із прикладної біотехнології



Дата проведення: 25–29.09.2011 р.

Місце проведення: Берлін (Німеччина).

Веб-сайт: <http://ecce2011.de/ECCE.html>

Обговорювані питання:

- Біовиробництво.
- Процес біотермодинаміки.
- Відновлювані джерела енергії, біопаливо і біоенергетика.

WORLD CONFERENCE ON MARINE BIODIVERSITY Всесвітня конференція з морського біорізноманіття



Дата проведення: 26–30.09.2011 р.

Місце проведення: Абердін (Велика Британія).

Веб-сайт: <http://www.marine-biodiversity.org/about/>

Загальною метою Всесвітньої конференції з морського біорізноманіття є привернення уваги вчених, практиків і громадськості до обговорення та вирішення питань, що стосуються цієї важливої проблеми.

Мета конференції:

- огляд знань про біорізноманіття і його роль у функціонуванні морських екосистем;
- оцінка найважливіших загроз для морських систем і розроблення стратегії управління;
- обговорення стійкого розвитку і соціально-економічних наслідків для морської галузі;
- визначення майбутніх пріоритетних досліджень.

Теми конференції:

- таксономія;
- біорізноманіття;
- зміна біорізноманітності з часом;
- морські технології: платформи і датчики для 21-го століття;
- морська біотехнологія;
- використання екосистем;
- зміна клімату;
- екстремальні морські ситуації;
- біоінформатика та надання даних;
- досягнення в галузі статистики у зв'язку з морським біорізноманіттям;
- морська політика і право;
- морське біорізноманіття та здоров'я людини;

- інтеграційна структура фізичної динаміки і зв'язок з біорізноманіттям;
- біорізноманіття — функція екосистеми;
- зв'язок біорізноманіття — функції екосистем та їх використання;
- біорізноманіття, освіта і роз'яснювальна робота;
- екологічна фізіологія;
- вплив діяльності людини на біорізноманіття.

VII МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ «ЧИННИКИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ»



Дата проведення: 26–30.09.2011 р.

Місце проведення: Алушта, Україна.

Веб-сайт: http://www.kon-ferenc.ru/konferenc04_09_11.html

VII Міжнародна наукова конференція «Чинники експериментальної еволюції організмів» присвячена 110-річчю з дня народження Л. М. Делоне.

Наукові напрями конференції:

1. Еволюція геномів у природі та експерименті.
2. Структура і функція хромосом.
3. Молекулярна структура та організація геномів.
4. Проблеми екогенетики (до 25-річчя аварії на Чорнобильській АЕС).
5. Аналіз і оцінка генетичних ресурсів.
6. Прикладна генетика і селекція.
7. Біотехнологія в сільському господарстві і медицині (до 90-річчя з дня народження Р. Г. Бутенко).
8. Генетика людини і медична генетика.
9. Питання викладання генетики, еволюції і біотехнології.

I КОНФЕРЕНЦІЯ МОЛОДИХ УЧЕНИХ «БІОЛОГІЯ РОСЛИН ТА БІОТЕХНОЛОГІЯ»



Дата проведення: 05–07.10.2011 р.

Місце проведення: Біла Церква (Україна).

Секції конференції:

1. Молекулярна та клітинна біологія.
2. Регуляція росту і розвитку рослин.
3. Структурна та функціональна геноміка.
4. Біотехнологія.
5. Рослинні ресурси для біопалива.
6. Функціональні харчові продукти рослинного походження.

2-ГА МІЖНАРОДНА КОНФЕРЕНЦІЯ «РЕГУЛЯЦІЯ РОСТУ І РОЗВИТКУ РОСЛИН: ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ТА ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ»

Дата проведення: 11–13.10.2011 р.
Місце проведення: Харків (Україна).
Веб-сайт: www-biology.univer.kharkov.ua

Тематичні напрями роботи конференції:

1. Фізіолого-біохімічна, фітогормональна та фітохромна регуляція росту і розвитку.
2. Генетична регуляція розвитку.
3. Фотоперіодичний та яровизаційний контроль розвитку.
4. Молекулярно-біологічні та біотехнологічні аспекти регуляції цвітіння.
5. Прикладні аспекти регуляції росту, розвитку і продуктивності рослин.

БІОТЕХНІКА 2011 Міжнародна виставка «БІОТЕХНІКА-2011»



Дата проведення: 11–13.10.2011 р.
Місце проведення: Ганновер (Німеччина).
Веб-сайт: http://www.biotechnica.de/homepage_d

«БІОТЕХНІКА» — провідна Європейська виставка передової біотехнології. Основна мета заходу — організація діалогу між фахівцями, що працюють в різних напрямках біотехнології. Цей форум є унікальною платформою для обміну ідеями і пошуку партнерів для проведення сумісних досліджень і вирішення актуальних завдань.

Тематика

Біоінженерія:

- аналітичні методи;
- технології біопроцесу;
- біотехнологічні продукти;
- хімія;
- біоінформатика/послуги;
- медичне і фармацевтичне застосування;
- біотехнологія для захисту навколишнього середовища;
- застосування в сільському господарстві;
- с/х продукція/заводська біотехнологія;
- вирощування тварин;
- біологічний контроль над шкідниками сільського господарства;
- застосування в харчовій промисловості;
- біотехнологія у виробництві продуктів харчування.

BIO CHINA INTERNATIONAL CONFERENCE Міжнародна конференція BIO CHINA



Дата проведення: 12–13.10.2011 р.
Місце проведення: Шанхай (Китай).
Веб-сайт: <http://www.bio.org/biochina/>

У цій конференції візьмуть участь керівники біотехнологічних виробництв, фармацевтичних та інвестиційних компаній з Північної Америки, Європи і Азії з метою вивчення можливостей для бізнесу в новому біотехнологічному секторі Китаю.

Організації біотехнологічної промисловості в Китаї мають більш ніж 15-річний досвід в проведенні міжнародних конференцій для біотехнологічної промисловості, зокрема Міжнародної конференції «БІО», найбільшої в світі щорічної конференції з біотехнології. «БІО» представляє 1200 біотехнологічних компаній, академічних інститутів, державних центрів біотехнології і пов'язаних з нею організацій на території Сполучених Штатів та понад 30 інших країн.

ANALYTICA ANACON INDIA 2011 — 6-ТА МІЖНАРОДНА ВИСТАВКА АНАЛІТИЧНОГО І ЛАБОРАТОРНОГО УСТАТКУВАННЯ, ІНСТРУМЕНТУ, БІОТЕХНОЛОГІЇ



Дата проведення: 12–14.10.2011 р.

Місце проведення: Бомбей (Індія).

Веб-сайт: <http://www.profiexpo.ru/exhibition.asp?ID=1774>

Періодичність проведення виставки — один раз на два роки.

Основні тематичні розділи:

- аналіз / контроль якості;
- вимірювальне і тестувальне устаткування;
- лабораторні технології;
- біотехнологія;
- медицина і діагностика.

Галузі застосування:

- хімія, нафтохімія;
- фармацевтична промисловість, косметологія;
- медицина, діагностика;
- електротехніка, електроніка;
- харчова промисловість, натуральні продукти харчування;
- екологія, захист навколишнього середовища та ін.

IV CONGRESS OF POLISH BIOTECHNOLOGY AND IV EUROBIOTECH 2011 IV конгрес біотехнології Польщі та IV «Євробіотех» 2011



IV Congress of Polish Biotechnology and
IV EUROBIOTECH 2011
„Four Colours of Biotechnology”
Central European Congress of Life Sciences
October, 12th-15th, 2011, Krakow, Poland

Дата проведення: 12–15.10.2011 р.

Місце проведення: Краків (Польща).

Веб-сайт: <http://eurobiotech.krakow.pl/gb//about-congress.html>

Тематика

«Червона» біотехнологія:

- функціональна перевірка геному раку;
- опромінення для ядерної медицини;
- молекулярна діагностика і персоналізована медицина;
- перенесення генів та генна терапія;
- стовбурові клітини в біотехнології;
- стовбурові клітини, генна терапія і біоетика.

«Зелена» біотехнологія:

- біотехнологічні підходи до виявлення стресостійкості генів для підвищення врожайності;
- агробіотехнологія — сільськогосподарська технологія, біологічна безпека і економіка;
- агробіотехнологія — біотехнологія геному рослин;
- агробіотехнологія — біотехнологія у тваринництві, сільському господарстві та біомедицині;
- біотехнологія в харчовій промисловості й виробництві кормів;
- екологічна біотехнологія.

«Біла» біотехнологія:

- нутрігеноміка, нутрігенетика і сучасна діагностика;
- промислові біомаси та промислова біотехнологія;
- промислові біопроцеси і біокаталіз;
- синтетична біологія, біоінформатика і нанотехнології;
- фармацевтична біотехнологія;
- відновлювані джерела енергії.

«Фіолетова» біотехнологія:

- передача технологій — основні питання укладення договорів у галузі біотехнології;
- правові питання, що стосуються інтелектуальної власності та соціальних аспектів біотехнології;
- права інтелектуальної власності в біотехнології.

NATIONAL CONFERENCE ON RECENT ADVANCES IN PLANT SCIENCES

Національна конференція з останніх досягнень у рослинництві



Дата проведення: 15–16.10.2011 р.

Місце проведення: Алігарх (Індія).

Веб-сайт: https://docs.google.com/document/pub?id=1FJjEInqt_gMcRtoXZnKcSyR4AWfwaYJQ7lInfcC4lQ

До участі в конференції запрошуються всі бажаючі для вільного обміну думками і встановлення наукових контактів.

Теми конференції:

- біотехнологія рослин;
- молекулярна біологія і цитогенетика;
- екологія рослин і навколишнього середовища;
- насінневі рослини;
- біохімія і фізіологія рослин;
- рослини для репродуктивної біології;
- морфологія та анатомія рослин;
- мікробіологія і патологія рослин.

V МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ «ВІДНОВЛЕННЯ ПОРУШЕНИХ ПРИРОДНИХ ЕКОСИСТЕМ»

Дата проведення: 18–21.10.2011 р.

Місце проведення: Донецьк (Україна).

Веб-сайт: http://www.kon-ferenc.ru/konferenc12_10_11.html

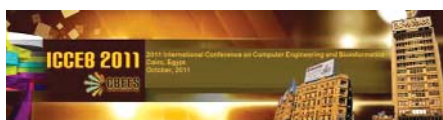
Під час роботи конференції планується розглянути такі питання:

- вивчення біорізноманіття природних екосистем, їх відновлення і охорона;
- комплексне збереження і стійке використання біорізноманіття;
- генетичні для популяції і фізіолого-біохімічні аспекти стійкості рослин в умовах техногенного забруднення;
- фітоіндикація техногенних забруднень;

- фіторекультивування і фітомеліорація порушених земель;
- інтродукція рослин у ботанічних садах і дендропарках, їхня роль у збереженні й відновленні біорізноманіття.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTER ENGINEERING AND BIOINFORMATICS ICCEB 2011

Міжнародна конференція з комп'ютерної інженерії та біоінформатики ICCEB 2011



Дата проведення: 21–23.10.2011 р.

Місце проведення: Каїр (Єгипет).

Веб-сайт: www.icceb.org

Загальна інформація

Метою серії конференцій ICCEB є забезпечення форуму для створення основ нового принципового підходу до комп'ютерної інженерії та біоінформатики. Із цією метою передбачається залучення учасників з різним рівнем підготовки з метою сприяння встановленню контактів між різними галузями досліджень, а також виявлення і обговорення новітніх теорій, методик, інструментів і доповнень.

МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ «ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ СЕЛЕКЦІЇ, ОБРОБКИ ТА ВИКОРИСТАННЯ ПЛОДОВИХ КУЛЬТУР»

Дата проведення: 24–27.10.2011 р.

Місце проведення: Ялта (Україна).

Веб-сайт: www.nbgns.com

Програма конференції:

- Генетичні ресурси, селекція, генетика кісточкових, субтропічних плодових, горіхоплідних, ягідних і нетрадиційних культур насінневих.
- Сортовивчення плодових культур.
- Технологічні прийоми обробки і розмноження.
- Зберігання і переробка плодової продукції.

17TH ANNUAL BIO EUROPE 2011

17-та щорічна конференція BIO EUROPE 2011



Дата проведення: 31.10–02.11.2011 р.

Місце проведення: Дюссельдорф (Німеччина).

Веб-сайт: <http://www.ebdgroup.com/bioeurope/index.php>

BIO-EUROPE є найбільшою партнерською конференцією у Європі в галузі індустрії біотехнології. Конференція щорічно залучає до участі провідних фахівців у цій галузі, а також фармацевтики і фінансів, представників найвідоміших нових компаній. Цю подію, що проводиться за підтримки ВІО, розцінюють як видатну для розвитку біотехнологічної промисловості.

11TH ASIAN TEXTILE CONFERENCE

11-та Азійська конференція з текстильної промисловості



The 11th
Asian Textile Conference

Дата проведення: 01–04.11.2011 р.

Місце проведення: Дегу (Республіка Корея).

Веб-сайт: <http://www.atc11.org/program/topics.php>

Головною темою конференції є загальний погляд на текстиль з точки зору людини і природи. З урахуванням постійного процесу розвитку і розширення текстильної промисловості, що пов'язаний з проникненням в інші науково-дослідні й технологічні галузі, тематика включає міждисциплінарні питання, пов'язані з текстильною промисловістю, а також з волоконною, текстильною і полімерною галузями науки та інженерії.

Головні питання:

- волоконні та полімерні матеріали;
- оброблення текстилю, механіка і машини;
- фарбування, обробка, нанесення покриттів і ламінування;
- тестування текстилю, оцінка та продуктивність;
- текстильний дизайн, мода і виробництво одягу;
- інтерактивний текстиль і нанотехнології;
- екологічно чистий текстиль і біотехнологія;
- текстиль, що застосовується в екстремальних ситуаціях/текстиль, що виконує захисну функцію;
- нетканий і технічний текстиль;
- новий композитний текстиль і його застосування.

INTERNATIONAL SEMINAR ON THE APPLICATION OF SCIENCE & MATHEMATICS

Міжнародний семінар із застосування науки і математики



Дата проведення: 01–03.11.2011 р.

Місце проведення: Куала-Лумпур (Малайзія).

Веб-сайт: <http://uhsb.uthm.edu.my/isasm2011/index.html>

Тематика конференції:

Фізика: фізика високих енергій, радіаційна безпека, ядерна фізика, геофізика, лазери, фотоніка, контрольовано-вимірювальні прилади, нанотехнології.

Хімія: органічна і неорганічна хімія, прикладна хімія, біохімія, хімічний синтез, аналітична хімія, судово-медична хімія, «зелена хімія».

Біологія: біотехнологія, біохімія, біоіндустрія, біополімери, біоінформація, біорізноманіття.

Математика: математичне моделювання, біоматематика, обчислювальна математика, моделювання, обчислювальна гідродинаміка, нечіткість і її застосування, чисельний аналіз, інженерна математика, дослідження операцій і оптимізація.

Статистика: статистичне моделювання, випадкові процеси, оперативні дослідження, функціональна статистика, нейронна мережа, прогнозування, евристичний підхід.

Інженерні науки: нанотехнології, полімери, матеріалознавство, напівпровідники, нові матеріали, електротехнічна і електронна техніка, цивільне будівництво, машинобудування.

4TH ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY AND MANAGEMENT CONFERENCE (ETMC)

4-та конференція з екологічної технології і управління (ETMC)



Дата проведення: 03–04.11.2011 р.
Місце проведення: Бандунг (Індонезія).
Веб-сайт: <http://www.etmc-2011.org/index.php>

Ця конференція, яка раніше називалася «Семінар з екологічної технології і управління (ETMS)», проводиться один раз на 4 роки. У ній візьмуть участь політики, вчені, інженери та експерти в галузі екологічних технологій і управління. Наголос буде зроблено на поточні й майбутні місцеві, регіональні та глобальні екологічні проблеми.

Мета конференції:

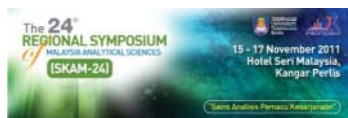
- Забезпечення платформи для обміну ідеями, інформацією і досвідом між зацікавленими сторонами.
- Розвиток співпраці та взаємодії між заінтересованими сторонами.
- Обговорення і оцінка останніх підходів, інноваційних технологій, стратегій і нових напрямів у вирішенні екологічних питань.

Обговорюватимуться такі теми:

- **зміна клімату:** пом'якшення наслідків зміни клімату, управління ризиками і адаптація;
- **досягнення в галузі екологічних технологій:** екологічна біотехнологія, газифікація, піроліз, вдосконалений процес окиснення, передові методи контролю якості повітря, мембранна технологія;
- **зелені міста:** зелені інфраструктури, утилізація твердих відходів, водопостачання, очищення стічних вод і гігієна навколишнього середовища;
- **раціональне використання природних ресурсів:** сільське господарство, гірничодобувна промисловість, водні ресурси, якість повітря, екологічний аналіз і управління ризиками;
- **екогалузі:** чистіше виробництво і запобігання забрудненню, безпека, охорона здоров'я і довкілля.

THE 24TH REGIONAL SYMPOSIUM OF MALAYSIA ANALYTICAL SCIENCES

24-й регіональний симпозиум Малайзії з аналітичних наук



Дата проведення: 15–17.11.2011 р.
Місце проведення: Кангар (Малайзія).
Веб-сайт: <http://perlis.uitm.edu.my/skam24>

24-й регіональний симпозиум Малайзії з аналітичних наук (SKAM) є підсумком річної діяльності малайзійського товариства з аналітичних наук (ANALIS). Ця подія об'єднує місцевих учених і дослідників з метою обговорення останніх розробок і результатів аналітичної науки загалом і аналітичної хімії зокрема.

Наукова програма включає пленарні засідання, паралельні і стендові сесії.

Головні теми:

- екологічний аналіз;
- одержання та екстракція речовин;
- техніка спектроскопії;
- органічний і неорганічний синтез;
- аналітична біотехнологія;
- додаткові матеріали;

- каталіз і промислове застосування;
- біомедичний і фармацевтичний аналіз;
- аналіз продуктів та мікродомішок;
- аналіз природних продуктів;
- електроаналітичний аналіз;
- радіохімія;
- продукти переробки масел;
- біосенсиори;
- полімери;
- дослідження скупчення рідини в тканинах.

BIOMALAYSIA 2011 **Біомалайзія 2011**



Дата проведення: 21–23.11.2011 р.

Місце проведення: Куала-Лумпур (Малайзія).

Веб-сайт: <http://www.biomalaysia.com.my/2011/>

Це — найбільша конференція в галузі біотехнології в цьому регіоні, в якій беруть участь представники провідних корпорацій, університетів, дослідницьких інститутів і всесвітньо відомі лідери. Проводиться восьмий рік поспіль. Одночасно з конференцією BioMalaysia 2011 проходить і виставка, що виконує багато нових і цікавих функцій, які дозволять розширити знання в галузі біотехнології та підняти бізнес на новий рівень.

Виставка і конференція BioMalaysia 2011 проходять разом із 6-м самітом Азійсько-Тихоокеанського регіону з промислової біотехнології і біоенергетики за участю провідних учених у галузі екології та промислової біотехнології, увага яких буде спрямована на промислову біотехнологію в Індії, Азії і в регіонах світу, що розвиваються. Конвергенція цих двох глобальних подій дасть усім учасникам і відвідувачам широкі можливості для досліджень, розробок і комерціалізації.

Очікується, що в цій міжнародній події візьмуть участь понад 10 000 фахівців зі всіх регіонів. Будуть представлені винаходи і розробки більш ніж 350 провідних корпорацій, науково-дослідних інститутів, університетів, урядових установ і окремих провідних дослідників. Експонати включатимуть продукти і прилади для охорони здоров'я і фармацевтики, сільського господарства, стосуватимуться продовольства і напоїв, навколишнього середовища, водних ресурсів і стічних вод, виробництва і біообробки в лісовому господарстві, гірничій справі, біохімії та виробництві біопалива.

THE 3RD INTERNATIONAL SEMINAR APTECS (APPLIED TECHNOLOGY, SCIENCE & ARTS) **3-й міжнародний семінар APTECS (прикладна технологія, наука і мистецтво)**



Дата проведення: 06–07.12.2011 р.

Місце проведення: Сурабайя (Індонезія).

Веб-сайт: <http://www.aptecs.its.ac.id/>

На цьому форумі обговорюватимуться глобальні питання, що стосуються відновлюваних джерел енергії, енергоефективності, реструктуризації енергетики, біології морів, морських і прибережних споруд та навколишнього середовища, а також електроніки, мехатроніки, матеріалознавства, промислових процесів, інформаційних і комунікаційних технологій, біотехнології, біомедичної інженерії, нанотехнології. Очікується, що в роботі семінару візьмуть участь учені, діячі в галузі освіти, бізнесу і промисловості, практичної охорони здоров'я, працівники державного апарату, мистецтва і культури.

**4TH POLISH-UKRAINIAN WEIGL CONFERENCE
ON MICROBIOLOGY
«FROM MICROBIOLOGY TO SYNTHETIC BIOLOGY»
(MAY 18–21, 2011, CZESZOW NEAR WROCLAW, POLAND)**

Similar to Parnas conferences on Biochemistry, Weigl conferences on Microbiology have been organized periodically in Ukraine and Poland. The 1st Weigl conference took place in Lviv (Ukraine) in 2003, and since that time there were two more Weigl conferences organized in Warsaw and Odesa. The 4th Weigl conference was organized in May 18–21, 2011, and the scientific sessions took place at the hall of the hotel in a small village Czeszow located near Wroclaw (Poland).

Who was Rudolf Stefan Weigl? Briefly, his main discovery is a vaccine against typhus. This discovery was not only a great discovery, but it also got a broad practical application, especially during the 2nd World War. Weigl has started his scientific carrier in 1907 as an assistant at the Department of Zoology of the Faculty of Natural Sciences of Lviv University. At that time, it was one of the best universities in Poland. In his research, Weigl used modern methods related to parasitology, and this led him to the doctorate habilitation in 1913. Visiting the bacteriological lab of Philip Eisenberg has provided Weigl with modern microbiological methods, and the break of typhus epidemic in the Austrian army during the 1st world war has twisted the scientific fate of Weigl. It should be noted that production of the anti-typhus vaccine involved many outstanding Lviv scientists and artists in feeding the Rickettsia infected lice, since this was the only way how those people could save their lives and earn some money in order to survive during German occupation period in 1941–1944.

Why the logo of the 4th Weigl conference was «From Microbiology to Synthetic Biology»? Among the honorary guests and keynote speakers of the conference, there were: Waclaw Szybalski, professor of the University of Wisconsin-Madison (USA) — an outstanding molecular biologist, creator of synthetic biology which was put in founding gene therapy, and Karl Maramorosch, professor of The Rutgers-State University of New Jersey (USA) — an outstanding virologist. They both spent their young years in the Western Ukraine, and prof. Szybalski was born in Lviv, worked at Weigl's laboratory, and studied at Lviv Technical University.

The opening ceremony of the 4th Weigl conference took place in Aula Leopoldinum — a historical hall of Wroclaw University. The meeting was headed by prof. Andrzej Gamian — Head of the Organizing Committee; prof. M. Niemialowski — President of the Committee on Microbiology, Polish Academy of Sciences; prof. S. Komisarenko — Director of the Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine; prof. A. Sibirny — Director of the Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine; prof. W. Szybalski — the University of Wisconsin-Madison (USA), and prof. Karl Maramorosch, The Rutgers-State University of New Jersey (USA). At the end of the opening ceremony, Halina Szymura (Poland) presented the film devoted to prof. R. S. Weigl. Some vivid documents taken during his active work on the development of anti-typhus vaccine were demonstrated in that film.

The Session 1 was devoted to the «**History of Medicine and Microbiology**», in particular, to the role of prof. Rudolf Weigl and his lab in the development of parasitology, epidemiology, and microbiology. At this session, there were two keynote lectures presented by Waclaw Szybalski «Gene therapy and synthetic biology», and Karl Maramorosch «How Albert Schatz discovered streptomycin and missed



At the Opening Ceremony of the 4th Weigl conference in Wroclaw (Poland) in May 18, 2011.

the Nobel Prize». Besides, Jerzy Chmielowski (Katowice, Poland) who also worked at Weigl's lab during the 2nd world war period, made a presentation about professor Henryk Mosing who was among the best collaborators of R. S. Weigl. Iryna Kurganova (Lviv, Ukraine) delivered a lecture «To the 100-years anniversary of doctor Henrich Mosing birthday», and Rostyslav Stoika (Lviv, Ukraine) had a brief presentation based on some interesting documents from Lviv City Archives that were touching scientific life of prof. Weigl.

The Session 2 was titled «**Medical Microbiology**», and there were four lectures presented by: Serhiy Komisarenko (Kyiv, Ukraine) «Recombinant proteins in prophylaxis, diagnosis, and treatment of tuberculosis and diphtheria», Macej Ugorski (Wroclaw, Poland) «The role of type 1 fimbriae in pathogenesis of Salmonella enteritidis and S. gallinarum», Rostyslav Stoika (Lviv, Ukraine) «Application of novel functionalized nanosized carriers for drug and gene delivery», and Barbara Dlugaszewska (Labo Baza Company) «New approaches of New Brunswick Scientific towards production and purification of biomass and biologically active compounds».

The Session 3 was titled «**Microbial Biotechnology**», and all lectures but one (Nataniel Bialas, Katowice, Poland) «Production of the exopolysaccharides by a wild type strain Yersinia enterocolitica») were presented by the conference participants who work at the Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine (Lviv). The session was opened by the lecture of A. Sibirny (Director of this Institute) «Yeast metabolic engineering for construction of the advanced producers of biofuels». The next speakers at this session were: Natalia Finyuk, Yuriy Boretsky, Yuriy Pynyaha, Valentina Yatsyshyn, Kostantyn Dmytruk, Nataliya Stasyuk, and Oleh Smutok.

The Session 4 was titled «**Microbial Genetics**», and four lectures were presented by: Mykhailo Gonchar (Lviv, Ukraine) «Nanosized biorecognition elements of biosensors», Andriy Zakalskiy (Lviv, Ukraine) «Overexpression of (His)₆-tagged human arginase 1 in Saccharomyces cerevisiae», Anna Grudniak (Warsaw, Poland) «Characterization of E. coli htpG null mutant», and Oleh Stasyk (Lviv, Ukraine) «Construction of yeast producers of recombinant human arginase 1 as anticancer agent».

The Session 5 was titled «**Environmental Microbiology**», and the following lectures were presented by: Anna Pauter (Torun, Poland) «Some physiological properties of microsymbionts stimulating growth of Robinia pseudoacacia», Anna Brzezinska (Torun, Poland) «Influence of Myxobacteria isolated from the forest soils on the fungi pathogenic to roots of scot pine (Pinus sylvestris)», Maria Boretska (Kyiv, Ukraine) «Features of exopolymer composition in thionic bacteria biofilms», Daria Fedorovych (Lviv, Ukraine) «Study of non-enzymatic systems involved in the chromate tolerance of the yeast Pichia guilliermondii», Olena Moshynets (Kyiv, Ukraine) «A new methodological approach for studying the phytoshere as a microbial microcosm: a new insight into plant-microbial interactions».

The Session 6 was titled «**Advances in Virology**», and the following lectures were presented by: Marek Niemialtowski (Warsaw, Poland) «Mousepox conjunctivitis and herpetic stromal keratitis as example of viral ocular infection», Anatoly Potopalsky (Kyiv, Ukraine) «Elicitation and protection effects of preventive treatments with isatizon against Tobacco Mosaic Virus in Nicotiana tabacum», Liudmyla Leibenko (Kyiv, Ukraine) «Phylogenetic analysis of pandemic 2009 influenza A viruses isolated in Ukraine», Zenoviy Trachuk (Kyiv, Ukraine) «Clinical use of the antiviral effect of yeast RNA and features of the mechanism of action».

The Session 7 was titled «**Advances in vaccinology and immunology**», and the following lectures were presented by: Andrzej Myc (Ann Arbor, USA) «Nanoemulsions as mucosal vaccine adjuvants», Marek Drab (Wroclaw, Poland) «Caveolae — structure and functions», Anna Kurek (Warsaw, Poland) «Effect of oleanolic and ursolic acids on bacterial susceptibility to antibiotics and biofilm formation and structure», Marcin Lukaszewicz (Wroclaw, Poland) «Investigation of Candida albicans virulence factors», Heinicke Burhard (SHP Steriltechnik AG/Labo Baza Companies) «Steam sterilization in accordance with relevant norms», Andrzej Szkaradkiewicz (Poznan, Poland) «Application of autovaccine in treatment of patients with chronic Staphylococcus aureus infections», Katarzyna Dzierzba (Wroclaw, Poland) «5-amino-2-pyridyl 1-thioglycosidases application in the glycine epitope glycoconjugate synthesis».

As usual, there was **the Poster Session** during which a competition of the best posters presented by young scientists took place. Selected young scientists also got an opportunity to have short oral presentation. Rostyslav Bilyy (Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine) was nominated as the winner of this competition, and got the 1st prize including the monetary support. Other young scientists working at the research institutions of Ukraine were also awarded.

Those who want to get acquainted with the materials of the 4th Weigl conference in more detail can address **the journal «Sepsis»** (Vol. 4, N 1, 2011) where some lectures, including the keynote lectures, are presented in the form of the articles.

*Prof. Rostyslav Stoika,
Institute of Cell Biology of National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv*

Доповнення до Правил для авторів

Текст резюме має починатися реченням, в якому сформульовано актуальність аналізованої автором (авторами) проблеми. Слід зазначити, що нового є в цій роботі порівняно з іншими, спорідненими за тематикою і цільовим призначенням.

Далі висвітлюються:

- предмет, тема, мета роботи;
- метод або методологія її проведення;
- результати роботи;
- галузь застосування результатів;
- висновки.

Методи в резюме тільки називаються. Результати роботи слід подавати гранично точно й інформативно. Наводяться основні теоретичні та експериментальні результати, фактичні дані, виявлені взаємозв'язки і закономірності. При цьому перевага віддається новим результатам і висновкам, які, на думку автора статті, мають практичне значення. Потрібно вказати межі точності та надійності даних, а також ступінь їх обґрунтування. Висновки можуть супроводжуватися рекомендаціями, оцінками, пропозиціями, описаними в статті. Рекомендований середній обсяг тексту резюме для журналу «Біотехнологія» — 2 000 знаків (30 рядків тексту).

Зважаючи на зростаючу популярність журналу «Біотехнологія» серед зарубіжних науковців, особливу увагу слід приділяти написанню резюме статті англійською мовою. Для цього доцільно користуватися послугами кваліфікованих фахівців-лінгвістів з подальшою науковою редакцією тексту автором(-ами).

Короткі повідомлення

Журнал публікує менші за обсягом статті, які мають безумовну новизну і значущість для біотехнології. Ці статті проходять прискорене рецензування і публікуються в короткі терміни. Загальний обсяг короткого повідомлення обмежений 10 машинописними сторінками, кількість малюнків і/або таблиць — не більше 3, а список використаних літературних джерел не повинен перевищувати 15. Розділи короткого повідомлення аналогічні розділам оригінальної статті, але не виділяються заголовками і підзаголовками; результати можуть бути викладені разом з обговоренням.

Доцільність такої позачергової публікації має бути обґрунтована в листі, що надсилається Головному редакторові автором для кореспонденції. У разі прийняття така робота може бути опублікована протягом 3–4 місяців.

У розділі «Дискусії» можлива публікація дискусійного матеріалу.

Дополнения к Правилам для авторов

Текст резюме должен начинаться фразой, в которой сформулирована актуальность анализируемой автором (авторами) проблемы. Следует указать, что нового содержит эта работа в сравнении с другими, близкими по тематике и целевому назначению.

Далее приводятся:

- предмет, тема, цель работы;
- метод или методология ее проведения;
- результаты работы;
- область применения результатов;
- выводы.

Методы в резюме только называются. Результаты работы следует описывать предельно точно и информативно. Приводятся основные теоретические и экспериментальные результаты, фактические данные, обнаруженные взаимосвязи и закономерности. При этом предпочтение отдается новым результатам и выводам, которые, по мнению автора статьи, имеют практическое значение. Следует указать пределы точности и надежности данных, а также степень их обоснования. Выводы могут сопровождаться рекомендациями, оценками, предложениями, описанными в статье. Рекомендуемый средний объем текста резюме для журнала «Біотехнологія» — 2 000 знаков (30 строк текста).

Учитывая растущую популярность журнала «Біотехнологія» среди зарубежных специалистов, особое внимание следует уделять написанию резюме статьи на английском языке. Для этого следует пользоваться услугами квалифицированных специалистов-лингвистов с дальнейшим научным редактированием текста автором(-ами).

Краткие сообщения

Журнал публикует меньшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость для биотехнологии. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 10 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц — не более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Разделы краткого сообщения аналогичны разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками; результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Целесообразность такой внеочередной публикации должна быть обоснована в письме, направляемом Главному редактору автором для корреспонденции. В случае принятия такая работа может быть опубликована в течение 3–4 месяцев.

В разделе «Дискуссии» возможна публикация дискуссионного материала.

Amendment to the Author rules

Text abstract should begin with a phrase which the author(s) formulated the relevance of the analyzed problem in. Then it is stated what kind of news this document bears in comparison to other related topics.

The following are:

- subject, topic, purpose of work;
- method or methodology of work performance;
- results of work;
- application area of results;
- conclusions.

Methods in the abstract are just called. Results are described extremely accurate and informative. The basic theoretical and experimental results, factual data, manifested associations and common factors are provided. Thereat new findings and conclusions are preferred which are of practical importance in the opinion of the author. It should be indicated the limits of accuracy and reliability of data as well as their degree of justification. Recommendations, estimates, proposals, described in the article could be given in conclusions. Recommended average volume of the abstract for the «Биотехнология» journal is 2 000 characters (30 lines of text).

Given the growing popularity of the «Biotechnology» journal of foreign specialists, special attention should be paid to the articles resume writing in English. To do this, use the services of the qualified linguists and scientific text editing by the author(s).

Short messages

«Biotechnology» journal publishes the smaller volume of the items of implicit originality and relevance to biotechnology. These articles are expedited review and published in a short term. The total volume of short messages is limited to 10 typewritten pages, number of drawings and/or tables should not exceed 3, and a list of used literature sources could not be more than 15. Sections of the brief messages are similar to the sections of the original article, but not highlighted with headings and subheadings, the results could be given together with the discussion. Author for correspondence should justify the expediency of such an extraordinary publication in a letter to the editor. In case of acceptance, such work could be published within 3–4 months.

Publication of a material of polemical character is possible in «Discussions».