

Editor-in-Chief

Komisarenko S. V. (Ukraine)

Deputy Editors:

Stoika R. S. (Ukraine)

Kolybo D. V. (Ukraine)

EDITORIAL BOARD

Levitsky E. L., scientific editor (Ukraine)

Vinogradova A. S., executive secretary (Ukraine)

Honchar M. V. (Ukraine)

Dzyadevych S. V. (Ukraine)

Drobot L. B. (Ukraine)

Filonenko V. V. (Ukraine)

Karpov A. V. (Ukraine)

Kunakh V. A. (Ukraine)

Kuchuk M. V. (Ukraine)

Lukash L. L. (Ukraine)

Matyshevska O. P. (Ukraine)

Melnichuk M. D. (Ukraine)

Minchenko O. G. (Ukraine)

Prylutsky Yu. I. (Ukraine)

Sandomirsky B. P. (Ukraine)

Soldatkin O. P. (Ukraine)

Spivak M. Ya. (Ukraine)

Головний редактор

Комісаренко С. В. (Україна)

Заступники головного редактора:

Стойка Р. С. (Україна)

Колибо Д. В. (Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Левицький Є. Л., науковий редактор (Україна)

Виноградова А. С., відповідальний секретар (Україна)

Гончар М. В. (Україна)

Дзядевич С. В. (Україна)

Дробот Л. Б. (Україна)

Філоненко В. В. (Україна)

Карпов О. В. (Україна)

Кунах В. А. (Україна)

Кучук М. В. (Україна)

Лукаш Л. Л. (Україна)

Матишевська О. П. (Україна)

Мельничук М. Д. (Україна)

Мінченко О. Г. (Україна)

Прилуцький Ю. І. (Україна)

Сандомирський Б. П. (Україна)

Солдаткін О. П. (Україна)

Співак М. Я. (Україна)

EDITORIAL COUNCIL

Komisarenko S. V. (Council Head)

Blum Ya. B. (Ukraine)

Egorov A. M. (Russia)

El'skaya G. V. (Ukraine)

Kordium V. A. (Ukraine)

Kukhar V. P. (Ukraine)

Miroshnikov A. I. (Russia)

Pidgorsky V. S. (Ukraine)

Severin E. S. (Russia)

Sibirny A. A. (Ukraine)

Sidorov V. A. (USA)

Scriabin K. G. (Russia)

Sozinov O. O. (Ukraine)

Shirobokov V. P. (Ukraine)

РЕДАКЦІЙНА РАДА

Комісаренко С. В. (Україна) (голова)

Блюм Я. Б. (Україна)

Егоров О. М. (Росія)

Єльська Г. В. (Україна)

Кордіум В. А. (Україна)

Кухар В. П. (Україна)

Мірошников А. І. (Росія)

Підгорський В. С. (Україна)

Северин Є. С. (Україна)

Сибірний А. А. (Україна)

Сидоров В. А. (США)

Скрябін К. Г. (Росія)

Созінов О. О. (Україна)

Широбоків В. П. (Україна)

Editorial address:

Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine,
Building 9, Leontovich str., Kyiv, Ukraine, 01601

Адреса редакції:

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, Україна, 01601.

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»

Tel.: (380-44) 235-14-72; E-mail: biotech@biochem.kiev.ua; Web-site: www.biotechnology.kiev.ua

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ №19650-9450ПР від 30.01.2013

Літературний редактор Г. М. Шевченко. Комп'ютерна верстка О. В. Мележик.

Підписано до друку 20.04.2013. Формат 210×297. Папір крейд. 115 г/м².

Гарн. SchoolBookC. Друк — цифровий. Обл.-вид. арк. 13,82. Наклад 200 прим. Замовлення 2/6.

Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;

друк — ФОП Москаленко О. М.



BIOTECHNOLOGIA ACTA

Виходить один раз на два місяці

Науковий журнал
БІОТЕХНОЛОГІЯ

Научный журнал
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Scientific journal
BIOTECHNOLOGY

Том 6, №2, 2013

ЗМІСТ

ОГЛЯДИ

Шульга С. М.
Тігунова О. О.
Блюм Я. Б.

Лігноцелюлоза як альтернативна сировина
для одержання біобутанолу 9

Телегєєва П. Г.
Єфременко Д. С.
Телегєєв Г. Д.
Малюта С. С.

Застосування наночастинок у біомедицині 21

Васильченко О. А.
Сологуб В. В.
Васильченко К. К.

Наночастинки срібла як підсилювачі дії пеніциліну 33

Гулевський О. К.
Абакумова О. С.
Щенявський І. Й.

Використання біопрепаратів у терапії ішемічного
ушкодження серця 43

Сидоров Ю. І.

Сучасні процеси і обладнання для виробництва пива 58

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

Кіпріанова О. А.
Варбанець Л. Д.
Шепелевич В. В.
Войчук С. І.

Противірусна активність ліпополісахаридів
Pseudomonas chlororaphis subsp. *Aureofaciens* 68

Матвєєва Н. А.
Кудрявець Ю. Й.
Ліхова О. А.
Кваско О. Ю.
Шаховський А. М.

Створення та вивчення культури трансгенних коренів
Althaea officinalis із геном інтерферону $\alpha 2b$ людини 74

<i>Шестеренко Є. А.</i> <i>Романовська І. І.</i> <i>Севастьянов О. В.</i> <i>Семенішина К. О.</i> <i>Павловський В. І.</i> <i>Андронаті С. А.</i>	Взаємозв'язок між структурою ефірів 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону та ступенем їх гідролізу карбоксилестеразою	80
<i>Степанюк С. В.</i> <i>Вудмаска М. І.</i> <i>Рибалко С. Л.</i> <i>Співак М. Я.</i>	Розроблення тест-системи для виявлення пандемічного штаму вірусу грипу А (H1N1 2009) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі	85
<i>Грек О. В.</i> <i>Красуля О. О.</i> <i>Тігунова О. О.</i>	Бродильна активність лактозозброджувальних дріжджів у сироватко-солодовому суслі	92
<i>Байрактар В. М.</i>	Концентрація органічних кислот у виноматеріалах після ферментації <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97
<i>Древаль К. Г.</i> <i>Бойко М. І.</i>	Целюлази з культуральної рідини базидіоміцетів	107
<i>Поєдинок Н. Л.</i>	Світлове регулювання росту та меланіноутворення в <i>Inonotus obliquus</i> (Pers.) Pilat	115
<i>Горбунов Л. В.</i> <i>Петров І. В.</i>	Взаємозв'язок між видом і сортом ягідних культур та результатами кріоконсервування живців	121
НОВИНИ		128
КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ, ВИСТАВКИ		140
ЮВІЛЕЇ		
До 75- річчя від дня народження Б. П. Сандомирського		148

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

<i>Шульга С. М.</i> <i>Тигунова Е. А.</i> <i>Блюм Я. Б.</i>	Лигноцеллюлоза как альтернативное сырье для получения биобутанола	9	
<i>Телегеева П. Г.</i> <i>Ефременко Д. С.</i> <i>Телегеев Г. Д.</i> <i>Малюта С. С.</i>	Применение наночастиц в биомедицине	21	
<i>Васильченко О. А.</i> <i>Сологуб В. В.</i> <i>Васильченко К. К.</i>	Наночастицы серебра как усилители действия пенициллина	33	
<i>Гулевский А. К.</i> <i>Абакумова Е. С.</i> <i>Щенявский И. И.</i>	Использование биопрепаратов в терапии ишемического повреждения сердца	43	
<table border="1"><tr><td><i>Сидоров Ю. И.</i></td></tr></table>	<i>Сидоров Ю. И.</i>	Современные процессы и оборудование для производства пива	58
<i>Сидоров Ю. И.</i>			

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Киприанова Е. А.</i> <i>Варбанец Л. Д.</i> <i>Шепелевич В. В.</i> <i>Войчук С. И.</i>	Противовирусная активность липополисахаридов <i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>Aureofaciens</i>	68
<i>Матвеева Н. А.</i> <i>Кудрявец Ю. И.</i> <i>Лихова А. А.</i> <i>Кваско Е. Ю.</i> <i>Шаховский А. М.</i>	Создание и изучение культуры трансгенных корней <i>Althaea officinalis</i> с геном интерферона $\alpha 2b$ человека	74
<i>Шестеренко Е. А.</i> <i>Романовская И. И.</i> <i>Севастьянов О. В.</i> <i>Семенишина Е. А.</i> <i>Павловский В. И.</i> <i>Андронати С. А.</i>	Взаимосвязь между структурой сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она и степенью их гидролиза карбоксилэстеразой	80
<i>Степанюк С. В.</i> <i>Вудмаска М. И.</i> <i>Рыбалко С. Л.</i> <i>Спивак Н. Я.</i>	Разработка тест-системы для выявления пандемического штамма вируса гриппа А (H1N1 2009) с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени	85

<i>Грек Е. В. Красуля Е. А. Тизунова Е. А.</i>	Бродильная активность лактосбраживающих дрожжей в сывороточно-солодовом сусле	92
<i>Байрактар В. Н.</i>	Концентрация органических кислот в виноматериалах после ферментации <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97
<i>Древаль К. Г. Бойко М. И.</i>	Целлюлазы из культуральной жидкости базидиомицетов	107
<i>Поединок Н. Л.</i>	Световая регуляция роста и меланинообразования у <i>Inonotus obliquus</i> (Pers.) Pilat	115
<i>Горбунов Л. В. Петров И. В.</i>	Взаимосвязь между видом и сортом ягодных культур и результатами криоконсервирования черенков	121
НОВОСТИ		128
КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ, СИМПОЗИУМЫ, ВЫСТАВКИ		140
ЮБИЛЕИ		
К 75-летию со дня рождения Б. П. Сандомирского		148

CONTENTS

REVIEWS

- Shulga S. M.*
Tigunova O. A.
Blume Y. B. Lignocellulose as an alternative source
for obtaining of biobutanol9
- Telegeeva P. G.*
Iefremenko D. S.
Telegeev G. D.
Maliuta S. S. Application of nanoparticles in biomedicine21
- Vasylchenko O. A.*
Sologub V. V.
Vasylchenko K. K. Silver nanoparticles as penicillin action enhancers33
- Gulevsky A. K.*
Abakumova Ye. S.
Schenyavsky I. I. Biopreparations using in the ischemic heart
injury therapy43
- Sidorov Yu. I.* Modern processes and equipment for beer production58

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Kiprianova E. A.*
Varbanets L. D.
Shepelevich V. V.
Voichuk S. I. Antiviral activity of lipopolysaccharides
of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aureofaciens*68
- Matvieieva N. A.*
Kudriavets Yu. I.
Lichova A. A.
Kvasko O. Yu.
Shachovsky A. M. Construction and study of *Althaea officinalis* transgenic
roots culture with human interferon $\alpha 2b$ gene74
- Shesterenko E. A.*
Romanovska I. I.
Sevastyanov O. V.
Semenishina E. A.
Pavlovsky V. I.
Andronati S. A. Interrelation between 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-one
esters structure on their hydrolysis by carboxyl esterase ...80
- Stepaniuk S. V.*
Vudmaska M. I.
Rybalko S. L.
Spivak M. Y. Development of test kit for detection of pandemic strain
influenza virus A (H1N1 2009) by real time polymerase
chain reaction85

<i>Greek E. V.</i> <i>Krasulya E. A.</i> <i>Tigunova E. A.</i>	Fermentation activity of lactose-fermentation yeast in whey-malt wort	92
<i>Bayraktar V. N.</i>	Organic acids concentration in wine stocks after <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fermentation	97
<i>Dreval K. G.</i> <i>Boyko M. I.</i>	Cellulases from the basidiomycetes cultural liquid	107
<i>Poyedinok N. L.</i>	Light regulation of growth and melanin formation in <i>Inonotus obliquus</i> (Pers.) Pilat	115
<i>Gorbunov L. V.</i> <i>Petrov I. V.</i>	Interrelation between type and cultivar of berry-like crop and cuttings cryopreservation results	121
NEWS		128
CONFERENCES, CONGRESSES, SYMPOSIA, EXHIBITIONS		140
CELEBRATIONS		
On the 75 th anniversary of B. P. Sandomirsky		148

УДК 579.222

ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗА ЯК АЛЬТЕРНАТИВНА СИРОВИНА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БІОБУТАНОЛУ

С. М. ШУЛЬГА, О. О. ТІГУНОВА, Я. Б. БЛЮМ

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Отримано 21.12.2012

Енергетичні та екологічні кризи, що їх переживає світ, спонукають переглянути питання ефективності використання природних відновлюваних ресурсів, особливо органічних відходів із застосуванням екологічно чистих технологій. Мікробіологічна конверсія відновлюваних ресурсів біосфери з метою одержання корисних продуктів, зокрема біопалива, наразі є однією з нагальних проблем біотехнології. Анаеробні бактерії родини *Clostridiaceae* відомі як продуценти одного з видів біопалива — бутанолу, однак мікробіологічний синтез бутанолу під час класичного ацетон-бутанол-етанольного бродіння на сьогодні є економічно недоцільним. Для того, аби зробити ацетонобутилове бродіння рентабельним, потрібні високопродуктивні солвентогенні штами, які б використовували доступну і дешеву сировину — відходи сільського господарства або рослинну біомасу. Одним з прикладів такого субстрату може слугувати рослинна біомаса. Огляд містить опис можливостей та шляхи створення процесів перероблення лігноцелюлозних відходів для одержання біобутанолу.

Ключові слова: біопаливо, лігноцелюлоза, біобутанол, клостридії.

Бутанол (біобутанол) — нормальний бутиловий спирт (*n*-бутанол, метилолпропан), рідина без кольору з характерним сивушним запахом, лінійний чотирикарбонний аліфатичний спирт, молекулярна формула якого C_4H_9OH або $CH_3(CH_2)_3OH$. Бутанол застосовують як розчинник, сировину для хімічного синтезу або компонент біопалива [1]. Як паливо біобутанол використовують у карбюраторному та інжекторному двигунах у чистому вигляді або як компонент у сумішевому паливі [2].

Біобутанол можна отримати з біомаси, як і біоетанол, декількома шляхами: ферментацією цукро- або крохмалевмісної рослинної сировини (біобутанол 1-го покоління) та переробленням лігноцелюлозної сировини (біобутанол 2-го покоління). Біобутанол, вироблений з біомаси за допомогою клостридій у процесі ацетон-бутанол-етанольної (АБЕ) ферментації, має ідентичні характеристики з бутанолом, одержаним у результаті хімічного синтезу [3, 4].

Основним чинником, що впливає на рентабельність АБЕ-бродіння, є висока собівартість крохмальних (кукурудза, пшениця, просо тощо) та цукрових (меляса, сорго тощо) субстратів [5–9]. Саме цей факт і здатність цукролітичних клостридій використо-

вувати різні вуглеводи стимулювали дослідження щодо застосування альтернативних субстратів [10, 11].

У дослідженнях з ферментації різноманітних субстратів у виробництві ацетону та бутанолу було встановлено [12], що глюкоза, фруктоза, маноза, цукроза, лактоза, крохмаль та декстроза утилізувалися повністю. Натомість галактоза, ксилоза, арабіноза, рафіноза, мелецитоза, інулін та маніт були використані лише частково, а трегалоза, рамноза, мелібіоза та гліцерол практично не утилізувалися. Хоча в роботах інших авторів [13] показано, що ксилоза та арабіноза утилізувалися клостридіями.

Деякі штами зброджували вуглеводи, які містилися у відходах молочної та деревообробної промисловості [14, 15]. Основним компонентом практично всієї біомаси (відходи деревообробної промисловості і недеревних рослин, зокрема трави) є лігноцелюлоза.

Лігноцелюлоза — найпоширеніший відновлюваний ресурс і практично необмежений субстрат для ферментації. Велика кількість лігноцелюлозних відходів (табл. 1), утворених у процесі життєдіяльності лісового та сільського господарств, целюлозно-паперової та деревообробної промисловості, створює екологічну проблему — значне забруднення довкілля.

Таблиця 1. Види та використання лігноцелюлозної сировини [16]

Лігноцелюлозна сировина		
Джерела та процеси одержання біопалива	Види відходів	Використання відходів
Процес збирання зернових — пшениці, рису, вівса, ячменю, кукурудзи	Солома, качани, стебла, лушпиння	Корми для тварин, компост, ґрунтове добриво, як вид палива
Процес оброблення зерна кукурудзи, пшениці, рису, сої	Стічні води, висівки	Корми для тварин
Перероблення овочів та фруктів	Насіння, шкуринки, стічні води, лушпиння, мушлі, забраковані фрукти	Корм для тварин та риби, сировина (насіння) для видобутку олії
Перероблення цукрової тростини, сорго та інших цукровмісних культур	Жом	Як вид палива
Перероблення олійних культур — сої, соняшнику, ріпаку, горіхів, бавовнику, оливи тощо	Лушпиння, оболонки, волокна, фібрили, шлам, макуха, стічні води	Корми для тварин, добрива, як вид палива
Відходи тваринництва	Гній та інші відходи	Ґрунтове добриво
Процес заготівлі деревини	Залишки дерев, кори, листя тощо	Ґрунтове добриво, як вид палива
Виробництво пиломатеріалів та фанери	Тирса, стружка, тріски	Виробництво деревостружкових плит (ДВП), деревоволокнистих плит (ДСП) та пілет
Відходи діяльності целюлозно-паперових комбінатів	Фібрилові відходи, сульфатні луги	Як вид палива
Побутові лігноцелюлозні відходи	Старі газети, папір, картон, старі дошки, занедбані меблі	Невеликий відсоток на перероблення, інші спалюють

З табл. 1 випливає, що хоча частина відходів утилізується, проте велика кількість залишкової біомаси потенційно може бути перероблена на різноманітну продукцію, включаючи біопаливо [16]. Біоконверсія лігноцелюлозних відходів — це суттєвий внесок у подолання багатьох екологічних та економічних проблем і підґрунтя для створення нових видів біопалива [17–26].

Лігноцелюлоза складається з лігніну, геміцелюлози та целюлози (рис. 1).

Відсотковий склад компонентів лігноцелюлози може змінюватися залежно від виду сировини (табл. 2).

Кожен з компонентів лігноцелюлози (геміцелюлоза, целюлоза та лігнін) можна, у разі відповідної обробки, використовувати у виробництві біопалива.

Геміцелюлози — гетерополісахариди, що найчастіше трапляються у здерев'янілих частинах рослин, соломі злаків із целюлозою [28,29]. Геміцелюлози не розчинні у воді, але розчинні у лужних розчинах і легше гідролізуються кислотами, ніж целюлоза [30]. Залежно від вмісту у складі геміцелюлози тих чи інших моноцукрів їх називають мананами, галактанами або пентозанами

(ксилани, арабани) [28]. Найбільш важливими і поширеними у природі є пентози — арабіноза та ксилоза і, особливо, гексози — глюкоза, фруктоза, галактоза, маноза.

Бактерії виду *S. acetobutylicum* використовують усі розповсюджені цукри, які присутні в геміцелюлозах деревини та її гідролізатах [31]. У роботах [32–36] було підібрано оптимальні умови ферментації для різних цукрів і отримано підвищений вихід розчинників. Одним з основних компонентів геміцелюлози є ксилоза. Ферментацію ксилози

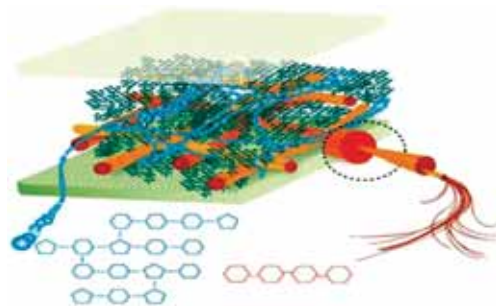


Рис. 1. Будова клітинної стінки: салатом кольором показані клітинні мембрани, блакитним — геміцелюлоза, помаранчевим — целюлоза (макро- та мікрофібрили), синім — лігнін [27]

Таблиця 2. Компонентний склад різних лігноцелюлозних відходів [16]

Джерело лігноцелюлозних відходів			
Компоненти	Целюлоза, %	Геміцелюлоза, %	Лігнін, %
Деревина листяних порід дерев	40–55	24–40	18–25
Деревина хвойних порід дерев	45–50	25–35	25–35
Горіхи	25–30	25–30	30–40
Качани кукурудзи	45	35	15
Папір	85–99	0	0–15
Солома пшениці	30	50	15
Солома рису	32,1	24	18
Відсортовані побутові відходи	60	20	20
Листя дерев	15–20	80–85	0
Газетний папір	40–55	25–40	18–30
Целюлозно-паперові відходи	60–70	10–20	5–10
Жом свіжий	33,4	30	18,9
Відходи свиноферм	6	28	–
Гній великої рогатої худоби	1,6–4,7	1,4–3,3	2,7–5,7
Просо	45	31,4	12,0
Садова трава (середньої зрілості)	32	40	4,7
Трави (середнє значення для різнотрав'я)	25–40	25–50	10–30

C. acetobutylicum було досліджено в роботах [13, 14, 36]. Показано відносно високий (близько 28%) конверсійний вихід порівняно з глюкозою, але з меншою швидкістю ферментації та обмеженим споживанням ксилози. Наступним кроком було дослідження кінетики ферментації суміші глюкози та ксилози порівняно з окремою ферментацією ксилози та глюкози. У роботі [15] було показано, що утилізація ксилози є адаптивною та гальмується за концентрації глюкози вище 15 г/л. Як модуляційну систему альтернативного субстрату використовували відходи целюлозно-паперових комбінатів (сульфітні луги), які містили глюкозу, ксилозу та арабінозу. Видалення діоксиду сірки, лігніну та надлишку кальцію з відходів перед ферментацією сприяло високому виходу розчинників. У рідких сульфитних відходах було отримано до 96% конверсії цукрів.

Подальшим стимулом для пошуку альтернативних субстратів для зброджування була потреба замінити геміцелюлози харчової сировини, яка йшла на технічні потреби, нехарчовою сировиною [37].

Найбільш перспективною і доступною заміною харчової сировини були відходи, що утворювались під час збирання та перероблення кукурудзи. Відходи містили 32–37% пентозанів і легко гідролізувались. Після дослідів з використанням чистої ксилози було також вивчено ацетонобутилове

бродиння на пентозних гідролізатах кукурудзяних качанів. Показана можливість часткової або повної заміни харчової сировини нехарчовою без втрати продуктивності ферментації у процесі виробництва розчинників [38]. У разі повної заміни харчової сировини в середовище додавали протеїн, джерелом якого слугували відходи крохмального виробництва — глютені. В лабораторних умовах було досліджено різні способи використання нехарчової біомаси у виробництві розчинників. Частина лабораторних технологій реалізовано в промислових масштабах [39].

Іншим джерелом геміцелюлоз, що його також вивчали, була суха трава. Досліджували активність нових штамів клостридій на бета-глюкані та ксилані. Показано, що вони мали високу геміцелюлазну активність, яка підвищувалась зі збільшенням частки сухої трави в середовищі для ферментації [40, 41].

Целюлоза — лінійний гомополісахарид β -D-глюкопіранози у вигляді довгих ниток, з'єднаних β -1,4-глікозидними зв'язками, не розчинний у воді. Структурною одиницею його є дисахарид целобіоза із залишків β -глюкози, що може містити від 300 до 10 000 та більше залишків β -глюкози (рис. 2).

Асоціація молекул целюлози в стабільній кристалічній структурі призводила до утворення мікрофібрил з 15–45 ланцюгами. На мікроскопічному рівні саме такі мікрофібрили формували цілісну фібрилу.

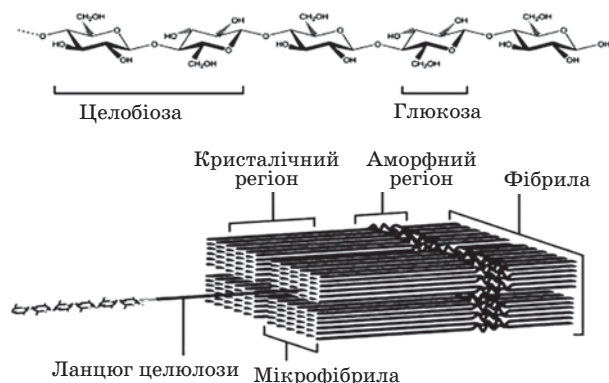


Рис. 2. Схема структури целюлози: первинної (а) та целюлозної (б) фібрили [42]

Целюлоза в паракристалічній структурі містить як аморфні, так і кристалічні регіони [42]. Ступінь полімеризації (СП) целюлози становить від 100 до 7 000 і є одним з основних чинників, що впливає на біоконверсію целюлози. Встановлено, що СП сільськогосподарських відходів, таких як жом та солома пшениці, є нижчим за СП деревини, що робить їх перспективними для подальшої переробки (табл. 3.)

Таблиця 3. Ступінь полімеризації різних видів целюлози [43]

Джерело одержання целюлози	СП
Осіка тремтяча	5 000
Бук	4 050
Червоний клен	4 450
Східний білий кедр	4 250
Східна тсуга	3 900
<i>Pinus banksiana</i>	5 000
Модрина американська	4 350
Ялина біла	4 000
Ялиця бальзамічна	4 400
Береза біла	5 500
<i>Eucalyptus regnans</i>	1 510
<i>Pinus radiata</i>	3 063
Жом	925
Солома пшениці	1 045

Целюлозу складно гідролізувати як хімічним, так і ензиматичним способом. Це пов'язано з тим, що молекулярні ланцюги целюлози, які не зв'язані мітками, майже не містять гідроксильних груп [44]. Під час кипіння у мінеральних кислотах целюлоза гідролізується і перетворюється на глюкозу [30].

У роботі [45] було вивчено використання целюлози для одержання бутанолу за допо-

могою промислових штамів. Встановлено, що виробничий штам *C. acetobutylicum* P270 мав невисоку целюлозну активність, яку можна було підвищити за допомогою мутацій або генетичних маніпуляцій. Альтернативний підхід до біоконверсії целюлозних відходів полягав у пошуку та ізолюванні нових солвентгенетичних штамів *C. acetobutylicum* [46, 47]. Автори [48, 49] провели скринінг целюлолітичної активності 20 штамів *Clostridium* spp., що продукували розчинники. Лише два штами — *C. acetobutylicum* NRRL B527 та *C. acetobutylicum* ATCC 824 показали целюлолітичну активність і здатність продукувати позаклітинні ензими. Можливість продукування розчинників із целюлозної біомаси за допомогою штаму *C. acetobutylicum* P 262 було досліджено в роботі [15]. Натомість інші автори [10] показали, що клостридіальні бактерії не утилізують целюлозу для потреб росту.

Лігнін, ще один із компонентів лігноцелюлозної біомаси, лише в останні роки викликав зацікавленість з боку вчених. Це — природний полімер, що розташований у клітинних стінках та міжклітинному просторі і скріплює целюлозні волокна. Лігнін можна виділити з рослинних тканин багатьма способами. Він розчиняється як у кислотах, так і в лугах. Протолігнін майже не розчинний в органічних розчинниках. Лігнін, виділений різними способами, відрізнявся за складом і властивостями. У хімічному сенсі лігнін — поняття загальне та умовне. У природі не існує двох однакових лігнінів. У літературі можна зустріти безліч формул лігніну [50, 51]. Структурну формулу лігніну, що її рекомендує Міжнародний інститут лігніну, наведено на рис. 3.

Молекула лігніну невизначено велика і містить багато функціональних груп. Загальною структурною одиницею всіх видів лігніну є похідні фенілпропану. Згідно із сучасними уявленнями, лігнін — це

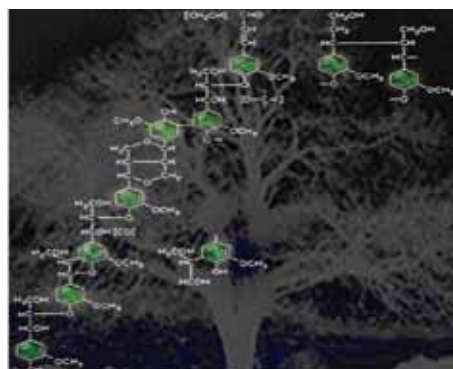


Рис. 3. Модель структури лігніну [52]

складний тривимірний полімер ароматичної природи, що утворився в результаті поліконденсації декількох монолігнолів — коричних спиртів (паракумарового, конеферилового, синапового).

Для полегшення біоконверсії лігноцелюлозної сировини її попередньо обробляють у декілька технологічних стадій. Основною для всіх видів такої сировини є стадія подрібнення [53]. Властивості помелу зумовлюють температурний режим водно-теплової обробки і ступінь втрат зброджувальних вуглеводів. Зі збільшенням ступеня диспергування сировини температура розварювання знижувалась, зменшувалися втрати цукру та підвищувався вихід розчинників. Це пояснювалось частковим розщепленням целюлози та утворенням додаткової кількості зброджуваних цукрів.

Наступною є стадія температурної обробки лігноцелюлозної біомаси для вивільнення цукрів. Вона відбувалась як за відносно низької температури (135–145 °C) протягом однієї або більше годин, так і за підвищеної температури (165–175 °C) від 2 до 5 хв, або постадійно (від вищої температури до нижчої). Стадія попередньої підготовки сировини мала багато варіацій, прикладом яких була органозольна підготовка [54, 55], з використанням лугів [56], гідроксиду натрію, розбавлених кислот [57, 58], іонних рідин [59–61], високочастотного нагрівання [62], оброблення за допомогою гострого пару [63, 64], вапна [65] або аміаку [66]. Найбільш перспективними визнано органозольну підготовку та оброблення за допомогою гострого пару. За таких обробок збільшувався вихід цукрів, зменшувалась кількість нерозчинного лігніну та підвищувався вміст легко розщеплюваної целюлози.

Наступною стадією підготовки сировини для подальшої біоконверсії був гідроліз до пентозних або гексозних цукрів. Гідроліз відбувався із застосуванням або лугів, або кислот, або ензимів.

Для ензиматичного гідролізу використовували як, власне, ензими, так і мікроорганізми, що продукують ензими. Каталітична активність ензимів характеризувалася «числом обертів», тобто кількістю перетворених за одиницю часу молей речовини на один моль ензиму. Активність ензимів залежала від температури, концентрації водних іонів, присутності активатора та інгібітора. Детальний механізм ензиматичного гідролізу лігноцелюлози не з'ясовано дотепер. Значних успіхів було досягнуто у вивченні лігноцелюлолітичних генів мікроорганізмів,

які брали участь в ензиматичному гідролізі. Основний спектр лігноцелюлолітичних мікроорганізмів становили бактерії та гриби. На цей час відомо більше 14 000 грибів, які виявляли целюлолітичну активність, та лише деякі з них використовували в промислових технологіях. Одним з найпоширеніших мікроорганізмів для розщеплення целюлози і геміцелюлози був *Trichoderma reesei*, проте він не мав ензимів для деградації лігніну [67–69]. Головну роль у переробленні лігніну відігравали гриби базидіоміцети, що живуть як на живій, так і на мертвій деревині. Основним продуктом розщеплення лігніну в природі є гумус. Серед лігнінолітичних грибів трапляються їстівні, такі як опеньки, печериці, гливи. Значну частину протолігніну розщеплювали гриби бурі гнилі, які спричинювали гідроліз полісахаридів. Ефективними деструкторами лігніну були гриби білої гнилі, серед яких найповніше вивченим вважають *Phanerochaete chrysosporium* [70, 71]. Саме його використовують у промислових технологіях для виробництва лігніндеградуєчих ензимів, а також для безпосереднього застосування під час біоконверсії лігноцелюлози [72, 73]. Деградація полімерного лігніну відбувалась під дією позаклітинних ензимів — оксидоредуктаз, зокрема лігнінпероксидази, Mn-пероксидази та лакази. Крім того, лігнінолітичний комплекс грибів включав піранозооксидази, глюкозооксидази, гліоксальоксидази та целобіозодегідрогенази. Менш вивченими вважають *Daedalea flavida*, *Phlebia fascicularia*, *P. floridensis* та *P. radiata*, які використовують лише за необхідності відділення лігніну із сировини та селективного розщеплення лігніну [74]. Незначне розщеплення лігніну притаманне *Cellulomonas*, *Pseudomonas*, актиноміцетам *Thermomonospora* та *Microbispora*, а також бактеріям з поверхнево-зв'язаним целюлозним комплексом, зокрема *Clostridium thermocellum* та *Ruminococcus* [75]. Такі організми можна застосовувати в подальшому як генофонд для генно-інженерних прийомів. Перелік мікроорганізмів з високою специфічною лігніназною активністю та необхідні умови активації наведено в табл. 4.

Геміцелюлази вважають мультидоменими протеїнами, як і більшість інших ензимів, що гідролізують полісахариди рослинних клітин (рис. 4).

Такі протеїни, як правило, складаються із структурно-дискретних каталітичних та некаталітичних модулів. Найбільш важливими з них були вуглеводзв'язувальні домени,

Таблиця 4. Перелік грибів зі специфічною активністю лігніназ [16]

Ензим	Організм-продуцент	Субстрат	Активність (мкмоль/хв·мг)	Оптимальні	
				t (°C)	pH
Мп-пероксидаза	<i>Stropharia coronilla</i>	$Mn^{2+} + H^+ + H_2O_2$	692	25	–
Лаказа	<i>Botrytis cinerea</i>	1,2,4-бензентріол + O_2 /1-нафтол + O_2 /2-нафтол + O_2 /3,5-диметроксигідрокси-бензалдазин + O_2 /4,5-диметил-о-фенілендіамін + O_2 /4-аміно-N,N-диметилаланін + O_2 /4-метилкатехол + O_2 /аскорбат + O_2 /кофеїнова кислота + O_2 /катехол + O_2 /фериціанід + O_2 /галова кислота + O_2 /гваякол + O_2	5778	55	4
Діарилпропан-пероксидаза (лігніназа)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1,2-біс(3,4-диметоксифеніл)пропан-1,3-діол + H_2O_2 /1-(3,4-діетоксифеніл)-1,3-дигідрокси-2-(4-метоксифеніл)пропан + O_2 + H_2O_2 /1-(4-етокси-3-метоксифеніл)-1,2-пропен + O_2 + H_2O_2 /1-(4-етокси-3-метоксифеніл)пропан + O_2 + H_2O_2 /2-кето-4-тіометилмасляна кислота + H_2O_2 /3,4-диметилоксибензильний спирт + H_2O_2	28	23–37	3–5

які полегшують розщеплення полісахаридів, міждоменні лінкери та якірна ділянка, що опосередковує зв'язування каталітичного домену [77].

Геміцелюлази можуть мати як специфічну активність (наприклад, ксиланазу), так і бути біфункціональними (розщеплювати декілька субстратів). Результатом дії цих ензимів може бути як повна утилізація сировини, так і модифікація, необхідна для подальшої ферментації. Прикладом такої підготовки слугувала дія геміцелюлазних естераз, спрямована на розщеплення зв'язків між пентозанами та кислотами [78, 79].

Ензиматично целюлозу розщеплювали два ензими: целюлаза, яка спричинювала розщеплення молекул целюлози на молекули целобіози, та целобіаза, що викликає розщеплення молекул целобіози і утворення глюкози. Целюлозні ланцюги високостабільні за рахунок міжланцюгових водневих та ван-дер-ваальсових взаємодій між піранозними кільцями, що формували криста-

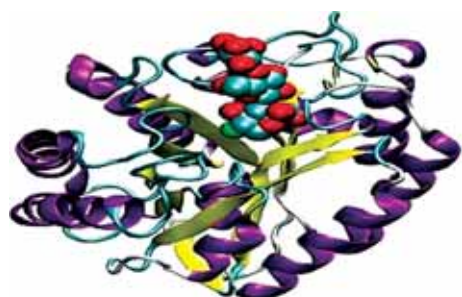


Рис. 4. Взаємодія целюлозного ензиму із субстратом:

ензими показано стрічками, а субстрат — у вигляді сфер [76]

лічні регіони [44]. Кристалічні регіони целюлози перемижувалися з аморфними, які розщеплюються значно легше (рис. 5).

Целюлази, які відповідають за гідроліз целюлози, складаються з комплексу протеїнів, що мають різну специфічну активність для гідролізу глікозидних зв'язків. За активністю целюлази можна поділити на три основні класи: ендоглюканази, целобіогідролази (екзоглюканази) та β -глюкозидази. Ендоглюканази випадково розщеплюють целюлозні ланцюги в незахищених позиціях аморфного регіону і створюють нові кінці, тимчасом як екзоглюканази розщеплюють полімерний ланцюг як з відновлювального, так і з невідновлювального кінця, продукуючи основний продукт — целобіозу.



Рис. 5. Схема гідролізу целюлози за допомогою целюлаз [44]

Ендоглюканази виявляють високу специфічну активність стосовно розчинних похідних целюлози, таких як карбоксиметилцелюлоза, та низьку (або зовсім без активності) — для мікрокристалічної целюлози, порівняно з екзоглюканазами. Для ефективного розщеплення целюлози необхідна синергетична дія обох ензимів.

β -Глюкозидази гідролізують глюкозні димери, а в деяких випадках і олігосахариди до глюкози [80–82]. Мікроорганізми, як правило, мають декілька варіантів ендо- та екзоглюканаз. Різноманітні анаеробні організми, включаючи деякі види грибів та бактерій, розщеплюють целюлозу за допомогою екстрацелюлярного мультипротеїнового комплексу — целюлосоми [83]. Під час дії целюлосоми глюкозидні гідралази зв'язуються з великим неензиматичним протеїном (целюлозов'язувальний або целюлозоінтеграційний протеїн), що з'єднує полімер целюлози з клітиною. Целюлосома позиціонує гідролітичні ензими в оптимальній орієнтації стосовно субстрату або ж мінімізує дифузію. Наявність ензимів з різною активністю і специфічністю до субстратів у целюлосомі дають змогу такому комплексу розщеплювати целюлозу так само, як й інші полімери, що містяться у клітинних стінках рослин. Для *C. cellulovorans* показано, що саме субстрат для вирощування впливає на склад та ензиматичну активність целюлосоми [84–86]. Гени, які кодують целюлази бактерій, можуть бути або випадково розподілені, як у *C. thermocellum*, або зібрані

у кластер на хромосомі, як у *C. cellulovorans*, *C. cellulolyticum*, *C. josui* [87–89]. Деякі солвентгенетичні клостридії також можуть виявляти екстрацелюлярну целюлозолітичну активність [90, 91]. У роботі [92] було показано присутність генів, які кодують передбачувані целюлосомальні компоненти в хромосомі *C. acetobutylicum* ATCC 824. На цей час вартість ензимів — одна з головних перешкод для комерціалізації ензиматичного гідролізу целюлози. Низька активність целюлаз, яка залежить від попередньої підготовки сировини, потребує значної кількості лігноцелюлітичних ензимів [93].

Шляхи створення економічно доцільного гідролізу сировини можна поділити на 4 групи: скринінг організмів з новими ензимами [94–100]; удосконалення існуючих промислових мікроорганізмів та техніки використання їхніх ензимів [101–103]; удосконалення операцій, пов'язаних з вибором субстрату, умов культивування, перероблення ензимів та оптимізацією процесів [104–108]; створення генетично модифікованих культур рослин з високою утилізацією лігноцелюлози [109–114]. Основні комерційні препарати та їхню целюлазну активність наведено в табл. 5.

Активність того чи іншого ензиму можна поліпшити за допомогою використання суміші ензимів за безпосереднього змішування ензимів та їх активації або з використанням генетично модифікованих організмів, які містять клоновані гени, що кодують целюлази, геміцелюлази та лігнінази.

Таблиця 5. Комерційні препарати целюлаз та їхня специфічна активність [16]

Назва препарату	Мікроорганізми-продуценти	ОФП*/мг	β -глюкозидази, О/мг**	Карбоксиметилцелюлоза, О/мг	Целобіаза, О/мг
Biocellulase TRI	<i>T. reesei</i>	0,24	0,72	5,5	0,059
Biocellulase	<i>A. niger</i>	0,01	1,40	3,6	–
Cellulast 1.5L	<i>T. reesei</i>	0,37	0,16	5,1	0,018
Cellulase TAP1	<i>T. viride</i>	0,13	5,20	14,0	–
Cellulase AP30	<i>A. niger</i>	0,03	10,00	21,0	–
Cellulase TRL	<i>T. reesei</i>	0,57	1,00	13,0	0,016
Econase CE	<i>T. reesei</i>	0,42	0,48	8,5	0,038
Multifect CL	<i>T. reesei</i>	0,42	0,20	7,1	0,015
Multifect GC	<i>T. reesei</i>	0,43	0,39	13,0	0,025
Spezyme #1	<i>T. reesei</i>	0,54	0,35	15,0	0,026
Spezyme #2	<i>T. reesei</i>	0,57	0,42	15,0	0,029
Spezyme #3	<i>T. reesei</i>	0,57	0,46	25,0	0,031
Ultra-low Microbial	<i>T. reesei</i>	0,48	0,96	–	–

* ОФП (одиниці фільтрувального паперу), 1 ОФП — вивільнення 1 мкмоль/хв глюкози;

– не визначено;

** О/мг — одиниці на міліграм.

Для зменшення витрат на виробництво можна використовувати неочищені ензимні препарати або вихідні культури бактерій чи грибів для зброджування лігноцелюлозної сировини. Отриманий глибинним культивуванням субстрат містить пентозні чи гексозні цукри (оцукрювання за допомогою грибів) або масляну кислоту (ферментація за допомогою клостридій), які зброджують ацетоно-бутиловими бактеріями.

ЛІТЕРАТУРА

1. Закон України «Про альтернативні види палива» (Стаття 1), м. Київ, 14 січня 2000 року, N 1391-XIV.
2. Online source: <http://www.cobaltbiofuels.com/advancing-biofuels/biobutanol/>.
3. Lee S. Y., Park J. H. et al. Fermentative Butanol Production by Clostridia. [Review] // *Biotechnol. Bioeng.* — 2008. — V. 101 (2). — P. 209–228.
4. Shulga S. M., Blyum Ya. B., Tkachenko A. F. Biotechnology and effective strains-producers of biobutanol // 14th European Congress on Biotechnology «Symbiosis», 13–16 September 2009, Barcelona, Spain. — P. 276.
5. Gibbs D. F. The rise and fall (... and rise?) of acetone/butanol fermentations // *Trends Biotechnol.* — 1983. — V. 1. — P. 12–15.
6. Lenz T. G., Moreira A. R. Economic evaluation of the acetone-butanol fermentation // *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* — 1980. — V. 19. — P. 478–483.
7. Petitdemange H. J., Desborders J. Berthelin, Gay R. Conversion enzymatique du n-butanol chez *Clostridium acetobutylicum* // *C. R. Acad. Sci. Ser. D* — 1968. — V. 266. — P. 1722–1774.
8. Ross D. The acetone-butanol fermentation // *Prog. Ind. Microbiol.* — 1961. — V. 3. — P. 73–85.
9. Volesky B., Mulchandani A., Williams J. Biochemical production of industrial solvents (acetone-butanol-ethanol) from renewable resources // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1981. — V. 369. — P. 205–218.
10. Shulga S. M., Blyum Ya. B., Tkachenko A. F. Biotechnology and effective strains-producers of biobutanol // *New Biotechnol.* — 2009. — V. 25/S. — P. 256–258
11. Mitchell W. L. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia // *Appl. Microbiol. Physiol.* — 1998. — V. 39 — P. 31–130.
12. Robinson G. C. A study of the acetone and butyl alcohol fermentation of various carbohydrates // *J. Biol. Chem.* — 1922. — V. 52. — P. 125–155.
13. Nakhmanovich B. M., Shcheblykina N. A. Fermentation of pentoses of corn cob hydrolyzates by *Clostridium acetobutylicum* // *Microbiologiya.* — 1959. — V. 28. — P. 99–104.
14. Compere A. L., Griffith W. L. Evaluation of substrates for butanol production // *Dev. Ind. Microbiol.* — 1979. — V. 20. — P. 509–517.
15. Jones D. T., Woods D. R. Acetone-Butanol Fermentation Revisited // *Microbiol. Rev.* — 1986. — V. 50, N 4. — P. 484–524.
16. Howard R. L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. L., Howard S. Lignocellulose biotechnology issues of bioconversion and enzyme production // *Afr. J. Biotechnol.* — 2003. — V. 2 (12). — P. 602–619.
17. Malherbe S., Cloete T. E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review // *Environ. Sci. Biotechnol.* — 2003. — V. 1. — P. 105–114.
18. Levine J. S. Biomass burning and global change. In: Levine JS (eds) Remote sensing and inventory development and biomass burning in Africa // The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA. — 1996. — V. 1. — P. 35.
19. Smith J. E., Anderson J. G., Senior E. K. et al. Bioprocessing of lignocelluloses // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A.* — 1987. — V. 321. — P. 507–521.
20. Bhat M. K. Research review paper: Cellulases and related enzymes in biotechnology // *Biotechnol. Adv.* — 2000. — V. 18. — P. 355–383.
21. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review // *Biores. Technol.* — 2002. — V. 83. — P. 1–11.
22. Wong K. K. Y., Saddler J. N. Applications of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries / Coughlan P. P., Hazlewood G. P. (eds). Hemicellulose and Hemicellulases. — Portland Press, London. — 1992. — P. 127–143.
23. Beauchemin K. A., Morgavi D. P., Mcallister T. A. et al. The use of enzymes in ruminant diets / Wiseman J., Garnsworthy P. C. (eds). *Rec. Adv. Animal Nutr.* Nottingham Univ. Press. — 2001. — P. 296–322.
24. Beauchemin K. A., Colombatto D., Morgavi D. P., Yang W. Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve animal feed utilisation by ruminants // *J. Anim. Sci.* — 2003. — V. 81 (E. Suppl. 2). — P. 37–47.
25. Subramaniyan S., Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application // *Crit. Rev. Biotechnol.* — 2002. — V. 22. — P. 33–64.

26. *Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S.* Microbial xylanases and their industrial applications: A review // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2001. — V. 56. — P. 326–338.
27. Online source: <http://www.ceres.net/AboutUs/AboutUs-Biofuels-Carbo.html>.
28. *Мусієнко М. М.* Фізіологія рослин. — К.: Либідь, 2005. — 808 с.
29. *Дудкин М. С., Громов В. С. и др.* Гемицеллюлозы. — Рига: «Зинатне», 1991. — 488 с.
30. *Фертман Г. И., Шойхет М. И., Чепелева А. С.* Технология бродильных производств. — М.: Высшая школа, 1966. — 343 с.
31. *Тігунова О. О., Шульга С. М.* Нові штамподуценти біобутанолу. 1. Виділення та ідентифікація // *Biotechnol. Acta.* — 2013. — Т. 6, №1. — С. 97–105.
32. *Mes-Hartree M., Saddler J. N.* Butanol production of *Clostridium acetobutylicum* grown on sugars found in hemicellulose hydrolysates // *Biotechnol. Lett.* — 1982. — V. 4. — P. 247–252.
33. *Ounine K., Petitdemange H., Raval G., Gay R.* Acetone-butanol production from pentoses by *Clostridium acetobutylicum* // *Ibid.* — 1983. — V. 5. — P. 605–610.
34. *Yu E. K. C., Deschatelets L., Saddler J. N.* The bioconversion of wood hydrolyzates to butanol and butanediol // *Ibid.* — 1984. — V. 6. — P. 327–332.
35. *Yu E. K. C., Saddler J. N.* Enhanced acetone-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* grown on D-xylose in the presence of acetic or butyric acid // *FEMS Microbiol. Lett.* — 1983. — V. 18. — P. 103–107.
36. *Yu E. K. C., Saddler J. N.* Butanol and butanediol production from pretreated biomass. I // *Proc. Biomass Convers. Technol.* — 1984. — P. 1–10.
37. *Тігунова О. О., Ткаченко А. Ф., Бейко Н. Е., Шульга С. М.* Ліпіди мікробного походження, як сировина для біопалива // Тези доповідей V регіональної науково-практичної конференції викладачів, науковців, аспірантів, молодих вчених та студентів. Біотехнологія XXI століття. 26 квітня 2011 р. Київ. — С. 36.
38. *Нахманович Б. М.* Ацетано-бутиловое брожение на гидролизатах кукурузной кочерыжки / Вопросы пищевой и бродильной микробиологии. — К.: Изд. Академии наук Украинской ССР, 1958. — С. 150–155.
39. *Zverlov V. V., Berezina O., Velikodvorskaya G. A., Schwarz W. H.* Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — V. 71(5). — P. 587–597.
40. *Березина О. В.* Целлюлазная и гемицеллюлазная активности сольвентогенных клостридий // Сб. статей «Биотехнология будущего» в рамках Междунар. симпозиума «ЕС — Россия: перспективы сотрудничества в области биотехнологии в 7-й Рамочной Программе» — М.: ОАО «Авиаиздат», 2006 — С. 4–5.
41. *Berezina O. V., Sineoky S. P., Velikodvorskaya G. A. et al.* Extracellular glycosyl hydrolase activity of the *Clostridium* strains producing acetone, butanol, and ethanol // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2008. — V. 44, N 1. — P. 42–47.
42. *M. Desvaux.* *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2005. — V. 29. — P. 741–764.
43. *Hallac B. B., Ragauskas A. J.* Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. Review // *Biofuels Bioprod. Bioref.* — 2011. — V. 5. — P. 215–225.
44. *Ana Maria Lopez Contreras.* Utilization of Lignocellulosic Substrates by Solvent-Producing Clostridia // PhD thesis Wageningen University, Wageningen. The Netherlands. — 2003. — P. 144.
45. *Allcock E. R., Woods D. R.* Carboxymethyl cellulase and cellobiase production by *Clostridium acetobutylicum* in an industrial fermentation medium // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1981. — V. 41. — P. 539–541.
46. *Tigunova O., Shulga S.* Obtaining of new biobutanol producers // Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology «New biotechnology», 23–26 September 2012, Istanbul, Turkey. — V. 29. — Issue S. — P. S43.
47. *Тігунова О. О., Шульга С. М.* Виділення та ідентифікація продуцентів біопалива // Матеріали XII конференції молодих вчених «Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів», 15–16 листопада 2012 р., Київ. — С. 313–314.
48. *Lee S. F., Forsberg C. W., Gibbins L. N.* Cellulolytic activity of *Clostridium acetobutylicum* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1985. — V. 50. — P. 220–228.
49. *Lee S. F., Forsberg C. W., Gibbins L. N.* Xylanolytic activity of *Clostridium acetobutylicum* // *Ibid.* — 1985. — V. 50. — P. 1068–1076.
50. *Лигнины* / Под ред. К. В. Сарканена, К. Х. Людвига. Пер. с англ. — М.: Мир, 1975. — 632 с.
51. *Физическая химия лигнина: Учебник* / Под ред. К. Г. Боголицына, В. В. Лунина. — М.: Академкнига, 2010. — 489 с.
52. Online source: <http://www.ili-lignin.com/>.
53. *Олійничук С. Т., Левандовський Л. В., Шевченко В. І. та ін.* Технологічний регламент виробництва етилового спирту з крохмалевмісної сировини. — К.: ТОВ «Матриця», 2000. — 142 с.
54. *Cateto C., Hu G., Ragauskas A.* Enzymatic hydrolysis of organosolv Kanlow switchgrass and its impact on cellulose crystallinity

- and degree of polymerization // *Energy Environ. Sci.* — 2011. — V. 4. — P. 1516–1521.
55. Sannigrahi P., Miller S. J., Ragauskas A. J. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine // *Carbohydrate Research.* — 2010. — V. 345. — P. 965–970.
 56. Wang Z., Keshwani D. R., Redding A. P., Cheng J. J. Alkaline pretreatment of coastal bermudagrass for bioethanol production // ASABE Annual International Meeting; Rhode Island Convention Center Providence, Rhode Island 2008.
 57. Sun Y., Cheng J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production // *Biores. Technol.* — 2005. — V. 96. — P. 1599–1606.
 58. Laser M., Schulman D., Allen S. G. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol // *Ibid.* — 2002. — V. 81. — P. 33–44.
 59. Li C., Knierim B. et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification // *Ibid.* — 2010. — V. 101. — P. 4900–4906.
 60. Arora R., Manisseri C. et al. Monitoring and Analyzing Process Streams Towards Understanding Ionic Liquid Pretreatment of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // *Bioenerg. Res.* — 2010. — V. 3. — P. 134–145.
 61. Hua Zhao, Baker G. A., Cowins J. V. Fast enzymatic saccharification of switchgrass after pretreatment with ionic liquids // *Biotechnol. Prog.* — 2010. — V. 26, N 1. — P. 127–133.
 62. Hu Z., Wang Y., Wen Z. Alkali (NaOH) pretreatment of switchgrass by radiofrequency-based dielectric heating // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2008. — V. 148. — P. 71–81.
 63. Sassner P., Maartensson C.-G., Galbe M., Zacchi G. Steam pretreatment of H(2)SO(4)-impregnated Salix for the production of bioethanol // *Biores. Technol.* — 2008. — V. 99. — P. 137–145.
 64. Sassner P., Galbe M., Zacchi G. Steam pretreatment of Salix with and without SO₂ impregnation for production of bioethanol // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2005. — V. 124. — P. 1101–1117.
 65. Del Rio L. F., Chandra R. P., Saddler J. N. The ease of Enzymatic hydrolysis of Organosolv-pretreated softwoods // *Biores. Technol.* — 2012. — V. 107. — P. 235–242.
 66. Bals B., Rogers C., Jin M. et al. Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEX) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations // *Biotechnol. Biofuels.* — 2010. — 3, 1.
 67. Esterbauer H., Steiner W. et al. Production of *Trichoderma* cellulose in laboratory and pilot scale // *Biores. Technol.* — 1991. — V. 36. — P. 51–65.
 68. Jorgensen H., Erriksson T. et al. Purification and characterization of five cellulases and xylanases from *Penicillium brasilianum* IBT 20888 // *Enz. Microb. Technol.* — 2003. — V. 32. — P. 851–861.
 69. Nieves R. A., Ehrman C. I. et al. Technical communication: survey and commercial cellulose preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World J. // Microbiol. Biotechnol.* — 1998. — V. 14. — P. 301–304.
 70. Akin D. E., Rigsby L. L. et al. Alterations in the structure, chemistry and biodegradation of grass lignocelluloses treated with white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Cyathus stercoreus* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1995. — V. 61. — P. 1591–1598.
 71. Gold M. H., Alic M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium* // *Microbiol. Rev.* — 1993. — V. 57 (3). — P. 605–622.
 72. Ruggeri B., Sassi G. Experimental sensitivity analysis of a trickle bed bioreactor for lignin peroxidases production by *Phanerochaete chrysosporium* // *Process Biochem.* — 2003. — V. 38, N 12. — P. 1669–1676.
 73. Bosco F., Ruggeri B., Sassi G. Performances of a trickle bed reactor (TBR) for exoenzyme production by *Phanerochaete chrysosporium*: influence of a superficial liquid velocity // *Chem. Eng. Sci.* — 1999. — V. 54. — P. 3163–3169.
 74. Arora D. S., Chander M., Gill P. K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in the degradation and selective ligninolysis of wheat straw // *Int. Biotechnol. Biodegrad.* — 2002. — V. 50. — P. 115–120.
 75. Miller (Jr) R. C., Gilkes N. R. et al. Similarities between bacterial and fungal cellulases systems. // *Proceedings of the 6th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Advances in Applied and Fundamental Research.* — 1996. — P. 531–542.
 76. Online source: <http://www.scidacreview.org/0905/html/biofuel.html>.
 77. Benedita F. Pinheiro, Mark R. Proctor et al. The *Clostridium cellulolyticum* Dockerin Displays a Dual Binding Mode for its Cohesin Partner // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283, N 26. — P. 18422–18430.
 78. Saha B. C. β -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology // *Biotechnol. Adv.* — 2000. — V. 18. — P. 403–423.
 79. Prates J. A. M., Tarbouriech N. et al. The structure of the feruloyl esterase module of xylanases 10B from *Clostridium thermocellum* provides insight into substrate recognition // *Structure.* — 2001. — V. 9. — P. 1183–1190.
 80. Goyal A., Ghosh B., Eveleigh D. Characterization of fungal cellulases // *Biores. Technol.* — 1991. — V. 36. — P. 37–50.
 81. Rabinovich M. L., Melnik M. S., Bolobova A. V. Microbial cellulases: A review. // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2002. — V. 38 (4). — P. 305–321.

82. *Rabinovich M. L., Melnik M. S., Bolobova A. V.* The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes // *Biochemistry (Moscow)*. — 2002. — V. 67 (8). — P. 850–871.
83. *Beguin P., Lemaire M.* The cellulosome: An extracellular, multiprotein complex specialized in cellulose degradation // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* — 1996. — V. 31. — P. 201–236.
84. *Doi R. H., Tamaru Y.* The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: an enzyme complex with plant cell wall degrading activity // *Chem. Rec.* — 2001. — V. 1 — P. 24–32.
85. *Schwarz W. H.* The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2001. — V. 56. — P. 634–649.
86. *Gal L., S. Pages C. et al.* Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) produced by *Clostridium cellulolyticum* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1997. — V. 63. — P. 903–909.
87. *Belaich J. P., Tardif C., Belaich A., Gaudin C.* The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum* // *J. Biotechnol.* — 1997. — V. 57. — P. 3–14.
88. *Kakiuchi M., Isui K. et al.* Cloning and DNA sequencing of the genes encoding *Clostridium josui* scaffolding protein CipA and cellulose CelD and identification of their gene products as major components of the cellulosome // *J. Bacteriol.* — 1998. — V. 180. — P. 4303–4308.
89. *Tamaru Y., Karita S. et al.* A large gene cluster for the *Clostridium cellulovorans* cellulosome // *Ibid.* — 2000. — V. 182. — P. 5906–5910.
90. *Qureshi N., Ezeji T. C.* Butanol (a superior biofuel) production from agricultural residues (renewable biomass) // *Recent progress in technology. Biofuels, Bioproducts and Biorefining.* — 2008. — V. 2. — P. 319–330.
91. *Lopez-Contreras A. M., Martens A. A. et al.* Production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 of CelG, a Cellulosomal Glycoside Hydrolase Belonging to Family 9 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2003. — V. 69, N 2 — P. 869–877.
92. *Nolling J., Breton G. et al.* Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum* // *J. Bacteriol.* — 2001. — V. 183. — P. 4823–4838.
93. *Walker L. P., Wilson D. B.* Enzymatic hydrolysis of cellulose // *An Overview. Biores. Technol.* — 1991. — V. 36. — P. 3–14.
94. *Bruant G., Levesque M.-J. et al.* Genomic Analysis of Carbone Monoxide Utilization and Butanol Production by *Clostridium carboxidivorans* Strain p7^T // *PloS ONE.* — 2010. — V. 5, Iss. 9. — P. 1–12.
95. *Ястремская Л. С., Васильченко О. А.* Селекция анаэробного целлюлолитического термофильного штамма *Clostridium thermocellum* 5СТ // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 2. — С. 80–85.
96. *Hongoh Y., Sharma V. K. et al.* Genome of an endosymbiont Coupling N₂ Fixation to Cellulolysis Within Protist Cells in Termite Gut // *Science.* — 2008. — V. 322. — P. 1108–1109.
97. *Sadanari Jindou, Qi Xu et al.* Novel architecture of family-9 glycoside hydrolases identified in cellulosomal enzymes of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Clostridium thermocellum* // *FEMS Microbiol Lett.* — 2008. — V. 254. — P. 308–316.
98. *Willquist K., Zeidan A. A., Ed W. J. van Niel.* Physiological characteristics of the extreme thermophile *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*: an efficient hydrogen cell factory // *Microbial Cell Factories.* — 2010. — V. 9, N 89. — P. 1–17.
99. *Online source: <http://biomassmagazine.com/articles/7273/researchers-use-bacterium-to-convert-cellulose-into-n-butanol/?ref=brm>.*
100. *Шульга С. М., Тигунова Е. А.* Синтез бутанола штаммом *C. acetobutylicum* на альтернативных субстратах // *Материалы 7-го Международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития».* 19–22 марта 2013 г., Москва. — С. 272.
101. *Bras J. L. A., Cartmell A. et al.* Structural insights into a unique cellulose fold and mechanism of cellulose hydrolysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — V. 108, N 13. — P. 5237–5242.
102. *Jennert K. C. B., Tardif C., Young D. I., Young M.* Gene transfer to *Clostridium cellulolyticum* ATCC 35319 // *Microbiology.* — 2000. — V. 146. — P. 3071–3080.
103. *Online source: <http://himkniga.com/news/290>.*
104. *Shulga S., Tkachenko A., Tigunova O., Beyko N., Khomenko A.* Microbial lipids as an alternative bio fuel // *Abstracts of 15th European Congress on Biotechnology «New biotechnology», 23–26 September 2012, Istanbul, Turkey.* — V. 29. — Issue S. — P. S44.
105. *Yanpin Lu, Yi-Heng Percival Zhang, Lee R. Lynd.* Enzyme-microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — V. 103, N 44. — P. 16165–16169.
106. *Guedon E., Payot S., Desvaux M., Petitdemange H.* Carbone and electron flow in *Clostridium cellulolyticum* grown in chemostat culture on synthetic medium // *J. Bacteriol.* — 1999. — V. 181, N 10. — P. 3262–3269.
107. *Desvaux M., Guedon E., Petitdemange H.* Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — V. 66, N 6. — P. 2461–2470.
108. *Hibino S., Minami Z.* Bacterial preparation for agricultural use. United States Patent. Patent Number 5,733,355.
109. *Fu C., Mielenz J. R. et al.* Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — V. 108, N 9. — P. 3803–3808.

110. *Молекулярные механизмы, действующие в клетках растений, помогут в разработке улучшенного биотоплива // Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология». — 2008. Онлайн-ресурс: <http://www.cbio.ru/article.php?storyid=3131>.*
111. Онлайн-джерело: <http://www.sciencedaily.com/releases/2011/03/110329095444.html>.
112. Новые источники сырья для производства биотоплива // Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология». — 2008. Онлайн-ресурс: <http://www.cbio.ru/article.php?storyid=3183>.
113. Онлайн-джерело: http://insciences.org/article.php?article_id=8011.
114. *Ohmiya K., Sakka K., Kimura T., Morimoto K. Application of microbial genes to recalcitrant biomass utilization and environmental conservation // J. Biosci. Bioeng. — 2003. — V. 95, N 6. — P. 549–561.*
115. *Online source: <http://www.renewableenergyworld.com/rea/news/article/2010/01/cobalt-technologies-opens-biobutanol-plant>.*
116. *Online source: <http://www.greencarcongress.com/2011/07/cathay-20110725.html>.*
117. *Online source: <http://www.clostridia.net/clostridiumXII/programme.html>.*

ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗА КАК АЛЬТЕРНАТИВНОЕ СЫРЬЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОБУТАНОЛА

*С. М. Шулга
Е. А. Тигунова
Я. Б. Блюм*

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Энергетические и экологические кризисы, которые переживает мир, побуждают пересмотреть вопрос эффективности использования природных возобновляемых ресурсов, особенно органических «отходов», с использованием экологически чистых технологий. Микробиологическая конверсия возобновляемых ресурсов биосферы с целью получения полезных продуктов, в том числе биотоплива, в настоящее время является актуальной биотехнологической проблемой. Анаэробные бактерии семейства *Clostridiaceae* известны как продуценты бутанола, но микробиологический синтез бутанола во время классического ацетон-бутанол-этанольного брожения в настоящее время является экономически нецелесообразным. Для того чтобы сделать ацетонобутиловое брожение рентабельным, нужны высокопродуктивные солвентогенетические штаммы, использующие доступное и дешевое сырье — отходы сельского хозяйства или растительную биомассу. Обзор содержит описание возможностей и пути создания экономических и экологических процессов переработки лигноцеллюлозных отходов для создания биобутанола.

Ключевые слова: биотопливо, лигноцеллюлоза, биобутанол, клостридии.

LIGNOCELLULOSE AS AN ALTERNATIVE SOURCE FOR OBTAINING OF BIOBUTANOL

*S. M. Shulga
O. A. Tiginova
Y. B. Blume*

SO «Institute for Food Biotechnology
and Genomics» of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Energy and environmental crisis facing the world force us to reconsider the effectiveness or find an alternative use of renewable natural resources, especially organic «waste» by using environmentally friendly technologies. Microbial conversion of renewable resources of biosphere to produce useful products, including biofuels, currently is an actual biotech problem. Anaerobic bacteria of *Clostridiaceae* family are known as butanol producers, but unfortunately, the microbiological synthesis is currently not economical one. In order to make cost-effective acetone-butanol-ethanol fermentation, solvent-producing strains using available cheap raw materials, such as agricultural waste or plant biomass, are required. Opportunities and ways to obtain economic and ecological processing of lignocellulosic wastes for biobutanol creation are described in the review.

Key words: biofuels, lignocellulose, biobutanol, *Clostridium*.

УДК 577.15 + 546.28 + 615.032

ЗАСТОСУВАННЯ НАНОЧАСТИНОК У БІОМЕДИЦИНІ

П. Г. ТЕЛЕГЄВА^{1,2}, Д. С. ЄФРЕМЕНКО^{1,2}, Г. Д. ТЕЛЕГЄВ¹, С. С. МАЛЮТА¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: g.d.telegeev@imbg.org.ua

Отримано 16.07.2012

В огляді висвітлено досягнення в галузі нанотехнологій, зокрема застосування їх у біомедицині. Наведено характеристику нових систем доставлення ліків, що включають ліпідні, протеїнові та полімерні наночастинки, які забезпечують стабільне транспортування лікарських препаратів, їх цільовий розподіл в організмі та запобігають швидкій деградації. Розглянуто переваги застосування векторів нанометрового масштабу. Через свій невеликий розмір, структуру і велику площу поверхні нанорозмірні матеріали набувають необхідних фізико-хімічних властивостей, які дають змогу наночастинкам, навантаженим специфічними агентами, долати обмеження, що існують для форм більших розмірів. Це значно полегшує внутрішньоклітинне транспортування певних агентів до специфічних внутрішньоклітинних мішеней. Контрольоване доставлення в місце дії та скорочення часу впливу на нецільові тканини підвищує ефективність лікарських препаратів, а також знижує токсичність та інші побічні ефекти, що загалом поліпшує самопочуття пацієнта. Використання різних шляхів уведення наночастинок уможливило доставлення низькомолекулярних препаратів, протеїнів, пептидів або нуклеїнових кислот до певних тканин. Розглянуто різні шляхи доставлення нанопрепаратів у клітину, а також можливості модифікації їхньої поверхні цільовими лігандами. Наведено типи систем доставлення ліків: мікрогубки, віруси, імунокон'югати, везикулярні системи (ліпосоми, трансферосоми, етосоми, ніосоми, віросоми, кохлеати, кубосоми), мікроемульсії та наноемульсії, металеві наночастинки і квантові точки, дендримери, природні та синтетичні полімерні наночастинки тощо. Описано їхні властивості, а також можливості практичного застосування.

Велике різноманіття нановекторів, можливість модифікації та навантаження ліками (розглянуто методи включення та адсорбції), контролювання їх вивільнення в клітині відкривають перспективи широкого застосування наночастинок для візуалізації біологічних процесів, діагностики і терапії низки захворювань.

Ключові слова: наночастинки, наномедицина, поглинання макромолекул, модифікація нанополімерів, цільова терапія.

Доставлення лікарських препаратів у певні клітини і тканини — одне з важливих питань фармакотерапії. Використання ліків у звичайних формах зазвичай пов'язано з великими труднощами як у досягненні місця дії ліків, так і в підтриманні відповідних доз препарату протягом певного періоду часу. Нові вектори для ліків включають ліпідні, протеїнові та полімерні наночастинки, що мають забезпечити нове стабільне доставлення з поліпшеним розподілом в організмі, захистом їх від жорстких умов навколишнього середовища і запобіганням швидкому вимиванню [1]. В останні десятиліття спостерігається значний інтерес до таргетної терапії з використанням векторів, у яких носіями слугують частинки невели-

кого розміру, що здатні переносити великі й малі молекули [2].

Пошук нових підходів до цільової терапії і способів дії — це одна з передових галузей, які охоплюють міждисциплінарний науковий підхід, що має на меті поліпшення біодоступності до конкретного місця дії ліків. Контрольоване доставлення до мішені та скорочення часу впливу на нецільові тканини підвищує ефективність лікування, а також знижує токсичність та інші побічні ефекти, поліпшуючи таким чином самопочуття пацієнта [3].

Однією з основних передумов для використання біологічно активних речовин у фармацевтичних цілях є біосумісність, тому розроблення оптимальної форми, яка

відповідатиме певним фізико-хімічним властивостям препарату, є одним із важливих завдань дизайну нових лікарських форм. Таргетна терапія дає змогу поліпшити фармакокінетичні профілі численних препаратів за допомогою впливу на сайтспецифічні органи у більш високих дозах за допомогою лігандів, забезпечуючи водночас контрольоване вивільнення і розкладання на нетоксичні продукти [4].

Наномедицина використовує матеріали нанометрового розміру для розроблення нових підходів і методів лікування. Через свій невеликий розмір, структуру і велику площу поверхні нанорозмірні матеріали набувають відмінних фізико-хімічних властивостей, які дають змогу системам з наночастинками долати існуючі обмеження звичайних форм, полегшуючи внутрішньоклітинний транспорт до специфічних клітинних мішеней. Саме тому нанотехнології застосовують для доставлення ліків/генів, візуалізації та діагностики [1].

Наноструктурні матеріали мають розміри від 1 до 100 нм, унікальні властивості та функції саме через «ефект розміру» [5, 6]. Оскільки більшість біологічно активних макромолекул і речовин, таких як віруси, мембрани і протеїнові комплекси, є природними наноструктурами [2], припускають, що нанорозмірні структури матимуть здатність до посиленої взаємодії з мембранами клітини і протеїнами [7]. На сьогодні велику увагу приділяють фулеренам C_{60} як можливим ефективним регуляторам оксидантної рівноваги у біологічних системах. Фулерени C_{60} належать до нової алотропної форми вуглецю. Це гідрофобні молекули майже сферичної форми діаметром 1 нм з унікальними фізико-хімічними властивостями: мають значний відновлювальний потенціал; здатні до утворення синглетного кисню (за дії ультрафіолетового та видимого випромінювання) і супероксид-аніонів (за наявності в середовищі донорів електронів). Від рівня утворюваних у клітині активних форм кисню (АФК) залежать такі важливі процеси, як спрямування на шлях росту/диференціації, формування адаптаційної відповіді на дію зовнішніх чинників, запуск програми загибелі для вибіркового видалення ушкоджених клітин. З'ясовано, що істотне підвищення внутрішньоклітинної концентрації АФК спричинює розвиток окисного стресу та ушкодження компонентів клітини, що призводить до їх загибелі [8, 9].

Існують певні обмеження в розмірі для частинок під час проходження крізь бар'єр

слизової оболонки кишечника за перорального застосування препарату. Часто макрочастинки не проходять крізь цей бар'єр через великі розміри, що унеможливує їх поглинання клітинами. Наночастинки, у свою чергу, мають перевагу над мікрочастинками через свої нанорозміри. Окрім того, вони більше підходять для внутрішньовенного введення [10] порівняно з мікрочастинками.

Унікальні властивості наночастинок зумовлені подібністю їхніх розмірів і таких біомолекул, як протеїни та нуклеїнові кислоти. До того ж вони можуть бути виготовлені з широкого спектра металів і напівпровідникових матеріалів, яким притаманні такі корисні характеристики, як здатність до флуоресценції і намагнічення [11]. Поєднання наночастинок з такими біомолекулами, як протеїни і ДНК, може бути досягнуто завдяки двом різним підходам: прямого ковалентного зв'язку та нековалентних взаємодій між частинкою і біомолекулою [12, 13]. Найбільш уживаним підходом є створення кон'югатів біомолекула–наночастинка ковалентним зшиванням [14]. Це досягається або хемосорбцією біомолекул на поверхні частинок, або за допомогою гетеробіфункціональних лінкерів. Хемосорбція протеїнів на поверхні наночастинок (які зазвичай містять ядро з Au, ZnS, CdS та CdSe/ZnS) часто здійснюється через залишки цистеїну, що присутні на поверхні протеїну (наприклад, олігопептиди, сироватковий альбумін) [15], або хімічно з використанням 2-імінотіолану (реагент Траута) [16]. Біфункціональні лінкери слугують універсальним засобом біокон'югації. Біомолекули часто ковалентно зв'язуються з лігандами на поверхні наночастинок за допомогою традиційних стратегій, таких як карбодіімідопосередковане амідування та етерифікація [17]. Зв'язок ДНК–наночастинка може бути здійснено через електростатичні взаємодії, шляхом інтеркаляції та зв'язування комплементарної одноланцюгової нитки ДНК [18]. Комплекси наночастинка–протеїн можуть регулювати безліч біологічних процесів, таких як протеїн-протеїнові взаємодії, протеїново-нуклеїнові взаємодії, а також регулювати рівень ензиматичної активності. Специфічні взаємодії між біомакромолекулами, зокрема комплементарність стрептавідин/біотину [19], можуть бути використані для зшивання протеїнів з наночастинками. Zheng і Huang створили біотин- і глутатіон-функціоналізовані золоті наночастинки, функціонально активні завдяки триетиленгліколевим тіольним залишкам [20].

Наночастинки можуть застосовуватися для безпечного і надійного доставлення гідрофільних та гідрофобних препаратів, протеїнів, вакцин та інших біологічних макромолекул в організм. Їх можна спеціально розробити для цільового доставлення ліків до мозку, стінок артерій, легень, пухлинних клітин, печінки і селезінки. Вони також можуть бути розраховані на довгострокове циркулювання в організмі. Крім того, наночастинки, мічені спеціальними агентами, можна використовувати для МРТ-діагностики раку та при терапії за допомогою гіпертермії [21].

Перелік деяких сфер застосування наноматеріалів у біології та медицині: люмінесцентні біологічні мітки [22–24]; доставлення ліків та генів [25, 26]; біодетекція патогенів [27]; виявлення протеїнів [28]; зондування структури ДНК [29]; тканинна інженерія [30, 31]; знищення пухлин шляхом нагріву (гіпертермії) [32]; виділення та очищення біологічних молекул і клітин [33]; МРТ-контрастне підсилення [34]; фагокінетичні дослідження [35].

Загальна характеристика механізмів дії наночастинок

Було досліджено низку методів цільового доставлення ліків до конкретного сайту за допомогою пасивного або активного транспорту.

Модифікація поверхні векторів для перенесення препаратів біологічно активними молекулами полягає в адсорбуванні, покритті та кон'югуванні з ними. Ці молекули взаємодіють із клітинними рецепторами, забезпечуючи вибірккову спорідненість до певного осередку або типу тканини і підвищуючи поглинання терапевтичних засобів (рис. 1).

Модифікація поверхні наночастинок, наприклад поєднанням альбуміну і хітозану, може бути використана для запобігання ензиматичному розщепленню в шлунково-кишковому тракті та в крові. Наночастинки можуть нести на собі моноклональні антитіла (або їхні фрагменти) і такі ліганди, як вуглеводи (зокрема лектини), що є специфічними для клітинної поверхні [36]. Окрім того, перспективними є малі молекули або пептиди, агоністи/субстрати або антагоністи/інгібітори рецепторів, які надмірно експресовані на поверхні клітин конкретних тканин (наприклад, фолієва кислота, трансферин, галактозамін), що уможливить ефективне доставлення наночастинок до цілі. Однак важливим залишається питання про неспецифічне поглинання наночастинок здоровими тканинами.

Для запобігання поглинанню векторів клітинами імунної системи і поліпшення доставлення можна також змінювати ліпофільність/гідрофільність профілю. Так, наночастинки виводяться з плазми протягом декількох хвилин унаслідок опсонізації і подальшого фагоцитозу клітинами ретикулоендотеліальної системи. Опсонізацію можна зменшити, застосовуючи деякі поверхневі ліганди, наприклад поліетиленгліколь, що є гідрофільним полімером, який сприяє стійкості до зв'язування протеїнів плазми і перешкоджає агрегації, спричиненій солями та протеїнами сироватки крові. Таким чином можна запобігти опсонізації та впізнаванню фагоцитами і тим самим уникнути імунних реакцій (рис. 2).

Поліетиленгліколь може також зменшити доступ ензимів до скафолду дендримерів, а отже, запобігти їх деградації. Час циркуляції в умовах *in vivo* для наночастинок, укритих поліетиленгліколем, збільшується від декількох хвилин до годин. З другого боку, ефективність поліетиленгліколю залежить



Рис. 1. Різні шляхи доставлення наночастинок.

Зліва — наночастинки, модифіковані: *A* — захисним полімером із цільовим лігандом/зондом; *B* — антитілом; *C* — ензимом; *D* — утворення комплексу разом з ДНК; *E* — захисним полімером; *F* — лігандом. Справа — наночастинки, які вивільняють свій вміст після поглинання клітиною, а також такі, що були доставлені специфічним рецептором і вивільняють свій вміст поблизу клітини [1]

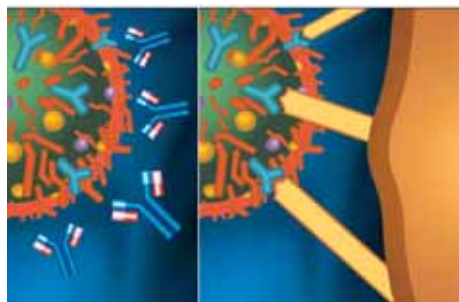


Рис. 2. Гіпотетичний механізм, що показує, яким чином укриті поліетиленгліколем наночастинки уникають упізнання з боку імунної системи.

Зліва — покриття поліетиленгліколем запобігає взаємодії і зв'язуванню антитіл з протеїнами на поверхні наночастинок; справа — те саме покриття з поліетиленгліколю не заважає впізнанню з боку клітинних рецепторів [38]

від поверхневої густини, довжини ланцюга [37] і здатності уникати поглинання печінкою.

Коли вектор потрапляє безпосередньо до клітини, ліки можуть бути вивільнені двома шляхами: звільненням від вектора з подальшим поглинанням клітиною або поглинанням усього вектора клітиною з повільним вивільненням ліків внутрішньоклітинно [36]. Поглинання наночастинок відбувається за різними механізмами, однак найбільше значення має ендоцитоз [39]. Транспортування макромолекул у клітини здійснюється переважно за допомогою різних видів ендоцитозу в складі замкнених мембранних утворень, і подальша доля ендоцитованої молекули значною мірою залежить від системи везикулярного транспорту клітини та наявності відповідних сигнальних послідовностей на структурі, що здійснює доставлення, або ж на тих молекулах клітини, з якими вона взаємодіє. Звідси випливає, що впізнання клітини-мішені та транспортування терапевтичного препарату всередину клітини в загальному випадку недостатньо для потрапляння в ті компартменти клітини, де може ефективно здійснюватися його дія, тобто необхідні якісь додаткові компоненти, що несуть сигнали внутрішньоклітинного транспорту [40]. В одних випадках за сигналів, що впливають на везикулярний транспорт між ендосомами і такими органелами, як ендоплазматичний ретикулум (ЕР), або ж у разі транспортування з ендосом в гіалоплазму може бути цілком достатньо одного такого компонента, тоді як в інших випадках, наприклад під час транспортування в ядро клітини або ж у мітохондрії, одного додаткового компонента недостатньо (рис. 3).

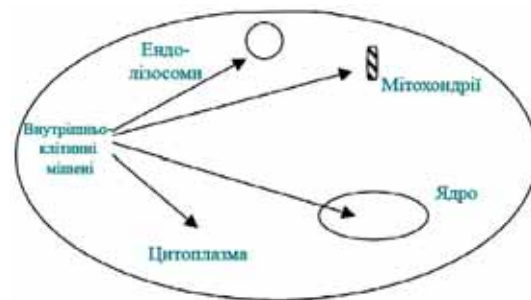


Рис. 3. Різні шляхи внутрішньоклітинного доставлення [41]

Таким чином, система транспортування в цільові компартменти клітин-мішеней має містити декілька компонентів з різними транспортними сигналами. Макромолекули можуть надходити в клітину різними шляхами [36]: рецепторопосередкованим ендоцитозом, через укриті клатрином везикули; транспортуванням через кавеолі [36]; утворенням везикул, до складу яких не входить ні клатрин, ні кавеолін (наприклад, транспортування, пов'язане з ліпідними рафтами — доменами); різні типи фагоцитозу [37] (рис. 4).

У багатьох типах клітин неклатриновий шлях може забезпечувати поглинання майже половини рідини мембранною поверхнею. Певні ділянки плазматичної мембрани, збагачені холестерином і глікоspfінголіпідами (кавеолі й ліпідні рафти), також беруть участь у специфічному транспортуванні макромолекул всередину клітини. Замикання складок плазматичної мембрани веде до утворення великих замкнених ендоцитозних компартментів різного розміру — макропіносом.



Рис. 4. Шляхи поглинання макромолекул клітинами ссавців і максимальні розміри поглинальних структур:

1 — рецепторопосередкований ендоцитоз через укриті клатрином везикули; 2 — транспортування через кавеолі; 3 — транспортування через утворені везикули, до складу яких не входить ані клатрин, ані кавеолін; 4-5 — різні типи фагоцитозу; 6 — замикання складок мембран, що сприяє утворенню замкнених везикул розміром до 2 мкм [40]

Специфічну роль цей процес відіграє, наприклад, в антигенпрезентуючих дендритних клітинах. Макропіноцитоз регулюється через полімеризацію актину і за своїми властивостями близький до фагоцитозу, який найбільш поширений у макрофагів, однак здатність до такого типу поглинання певною мірою зберігають майже всі типи клітин [40].

Однією з основних проблем, пов'язаних з новими типами векторів для доставлення ліків, є їхня здатність до вибухоподібного вивільнення. Хоча вибухоподібне вивільнення має корисний ефект при підшкірному та системному доставленні, воно може призвести до значної і непередбачуваної токсичності, особливо для сильнодійних препаратів і засобів лікування хронічних захворювань.

Навантаження ліками

В ідеалі, ефективна система наночастинок повинна мати високу здатність до навантаження ліками, тим самим зменшуючи кількість речовини, що має бути доставлена. Навантаження препаратами може бути досягнуто двома способами:

- включення препарату під час синтезу наночастинок (метод включення);
- поглинання препарату після синтезу наночастинок шляхом інкубації носія з концентрованим розчином препарату (техніка адсорбції/поглинання) [42].

Навантаження препаратами й ефективність захоплення багато в чому залежатиме від розчинності твердих ліків у матриці матеріалу або полімеру (тверде розчинення чи диспергування), що, у свою чергу, залежить від складу полімеру, молекулярної маси, взаємодії препарату з полімером та наявності ендofункціональних груп (ефірних або карбоксильних) [43–45]. Підсилення ефективності захоплення препарату може досягатися шляхом впливу рН водної фази, додаванням до складу частинок речовин-модифікаторів, жирних кислот тощо [43]. Наприклад, поліаспарагінова кислота як допоміжна речовина може підвищити ефективність захоплення водорозчинного препарату диміназону ацетурату [44]. На ефективність захоплення і вивільнення гідрофобних препаратів (таких, як дексаметазон та флутамід) у полімери може впливати їх розчинність [45].

Вивільнення ліків. Розчинність, дифузія та біодеградація матричних матеріалів регулюють процес вивільнення. Якщо дифузія ліків відбувається швидше, ніж ерозія мат-

риці, то механізм вивільнення значною мірою контролюється процесом дифузії. Швидке початкове вивільнення або «вибух» передусім зумовлено слабким зв'язуванням або адсорбуванням препарату на великій поверхні наночастинок.

Якщо препарат завантажується методом включення, то система має відносно невеликий ефект вибуху і більш повільне вивільнення препарату. Крім того, швидкість вивільнення може також залежати від іонних взаємодій між ліками і допоміжними складовими.

Типи систем доставлення ліків

Мікрогубки належать до біологічно інертних пористих частинок, які виготовляють із синтетичних полімерів, здатних зберігати обсяг активної речовини, і масою, співмірною з їхньою власною [46]. Вони можуть захистити препарат від навколишнього середовища і забезпечити контрольоване вивільнення.

Наночастинки. Завдяки своєму невеликому розміру, структурі та великій площі поверхні нанорозмірні матеріали набувають відмінних фізико-хімічних властивостей [47]. Це дає змогу системам з наночастинками долати існуючі обмеження звичайних форм, полегшуючи внутрішньоклітинний транспорт до специфічних клітинних мішеней [1].

Імунокон'югати є рекомбінантними антитілами, ковалентно зв'язаними з ліками [48]. Ідея цієї технології полягає в доставленні препаратів до місця дії за допомогою специфічних моноклональних антитіл, що дозволяє уникати токсичного ефекту на нецільові органи. Перші дослідження показали деякі обмеження в їх використанні, такі як короткий період напіврозпаду, імуногенність або навіть відсутність ефективної взаємодії [49, 50]. У результаті було розроблено нову стратегію для використання антитіл, що були прикріплені до наночастинок і ліпосом (так звані імунонаночастинки та імуноліпосоми, відповідно) [51–53]. Такі системи можуть бути транспортовані у важкодоступні тканини-мішені, мають здатність долати гематоенцефалічний бар'єр завдяки трансфериновим, інсуліновим або глутатіоновим рецепторам.

Віруси є потенційними транспортерами ліків та засобом генної терапії через їхню природню здатність до проникнення в конкретні клітини і транспортування генетичної інформації до ядра [54–56]. До найужи-

ваніших вірусів належать лентивіруси, ретровіруси та аденовіруси [56, 57]. Проте використання вірусів викликає побоювання у зв'язку з ризиком помилок інсерції та активації протоонкогенів мутагенної дії, реплікації вірусу і сильної імунної відповіді. Такі системи найчастіше застосовують у цитотоксичній генній терапії [58].

Везикулярні системи: ліпосоми, трансферосоми, етосоми, ніосоми, віросоми, кохлеати, кубосоми. Ці вектори мають фосфоліпідну природу. Складаються з двошарової мембрани, яка може бути розділена на маленькі одношарові (від 20 до 100 нм), великі одношарові (від 100 до 500 нм) і багатшарові (понад 500 нм) везикули [59].

Ліпосомам, які найчастіше складаються з фосфатидилхоліну, притаманні висока біосумісність, простота підготовки, підвищена сумісність з ліками, регульована фармакокінетика та поліпшена пероральна абсорбція. Як правило, виникають певні труднощі за перорального застосування через погану стійкість везикул у фізіологічних умовах, які є в шлунково-кишковому тракті [60, 61]. Ліпосоми можуть також слугувати препаратом, який уводять підшкірно.

Етосоми і трансферосоми є ліпосомами з підвищеною гнучкістю, що зумовлена додаванням етилового спирту і поверхнево-активних речовин, відповідно [59, 62, 63].

Ніосоми — це неіоногенні поверхнево-активні везикули, що складаються з алкільованих ефірів поліоксидетилену або діефірів сахарози (рис. 5). Такі системи розроблені спеціально для шкірного застосування (етанол підсилює проникність). Інший тип ліпосом класифікують як віросоми, що містять на своїй поверхні вірусні протеїни. Цю стратегію було запропоновано для вакцинації [64] (через слизову оболонку — носовий, вагінальний та інші шляхи, внутрішньошкірно і внутрішньом'язово).

Кохлеати — стабільні частинки, що їх отримують із ліпосом. Ці структури утворю-

ються з негативно заряджених фосфоліпідів, таких як фосфатидилсерин, і являють собою біліпідний шар, без внутрішнього простору. В останні декілька років було встановлено здатність кохлеатів функціонувати як системи доставлення ліків, вакцин, протеїнів, пептидів і ДНК [65].

Кубосоми є аналогічними до кохлеатів завдяки своїй багатшаровій структурі безперервного ліпідного бішару. Їх розглядають як нові системи доставлення ліпідів. Вони мають кубічну форму, діаметром від 86 до 106 нм, є біосумісними і мають біоадгезивні властивості. Ліки, що їх захоплюють кубосоми, перебувають в аморфному чи молекулярному стані. Ці фізико-хімічні характеристики впливають на термін функціонування, ефективність та безпеку наночастинки, що робить їх ідеальними для внутрішнього застосування [66, 67].

Тверді ліпідні наночастинки. Тверді ліпідні наночастинки (ТЛН) складаються з ліпідів, які залишаються твердими як за кімнатної температури, так і за температури тіла. До них належать гліцеролу бегенат, гліцеролу пальмітостеарат, лецитин, тригліцериди і тристеарингліцерид [60, 61]. На відміну від ліпосом, ТЛН залишаються стабільними протягом тривалого часу, захищаючи лабільні сполуки від хімічної деградації. З огляду на це їх можна використовувати для масового виробництва. Однак існують деякі проблеми, пов'язані з ефективністю їх навантаження через формування твердого ліпідного матриксу і можливою зміною фізичного стану ліпідів [59, 68, 69].

Мікроемульсії і наноемульсії — це ізотропні суміші, що складаються з олії або води, стабілізованої поверхнево-активними речовинами, часто в поєднанні з допоміжними поверхнево-активними речовинами [59, 60, 63]. Дія мікроемульсій може виявлятися у посиленні руйнування ліпідної структури або підвищенні стабільності препарату.

Циклодекстрини — це циклічні олігосахариди, що складаються принаймні з шести D-(+)-глюкопіраноз, що об'єднані α -1,4-зв'язком. У природі відомо три типи циклодекстринів: α - (6 субодиниць), β - (7 субодиниць) і γ -циклодекстринів (8 субодиниць). β -Циклодекстрин ідеально підходить для доставлення лікарських засобів завдяки розміру порожнини, ефективності навантаження ліками, доступності та порівняно низькій вартості. Циклодекстрини можуть запобігати деградації препарату, поліпшувати його стабільність і розчинність, що підвищує біодоступність [60, 70].

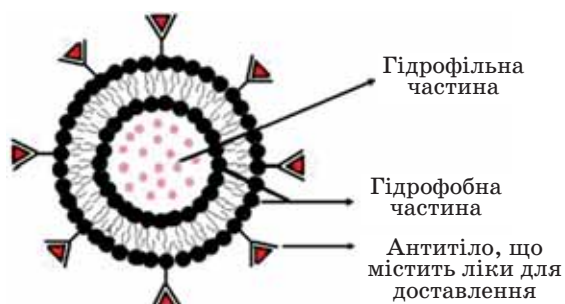


Рис. 5. Структура ніосом

Металеві наночастинки і квантові точки. Неорганічні наночастинки, що з'явилися нещодавно, застосовують як системи доставлення ліків і генів, засоби візуалізації та діагностичні біосенсиори [51, 71, 72]. Доставлення ліків за допомогою магніту (як і в разі використання заліза) у тканини-мішені відбувається під дією зовнішнього магнітного поля [60, 73, 74]. Однак магнітні частинки самі по собі не підходять для транспортування ліків через обмеження в контрольованому вивільненні. Змішані частинки з магнітного ядра та полімерної оболонки можуть дати сумарний позитивний ефект двох компонентів [74].

Квантові точки являють собою колоїдні ядра, оточені однією (чи більше) поверхнею, що знижує ступінь вилугування металів з ядра. Було показано можливість використання наночастинок титану діоксиду і цинку оксиду як засобу захисту від сонця [75]. Зменшення розміру частинок до нанометрового масштабу знижує прозорість, що підвищує захист від ультрафіолетового випромінювання [75, 76].

Наночастинки із золота виступають дієвим інструментом у галузі наномедицини. Зокрема, їх застосовують як біосенсиори, для діагностичної візуалізації, бінарної терапії раку. Вони здатні до вибіркового транспортування ліків до ядра клітин злоякісних пухлин, особливо при зв'язуванні з аргінін-глїцинаспарагіновою кислотою, пептидом та поліетиленгліколем [77]. Безпосередньо в пухлинних клітинах вони можуть спричиняти гіпертермію з неінвазивною радіочастотою.

Полімери. Дендримери. Дендримери є синтетичними високомолекулярними полімерними наночастинками, деревоподібно розгалуженої форми, зібрані в дендритоподібні структури, що можуть бути створені з метою транспортування в конкретні компартменти клітини [78]. Крім того, вони мають більшу функціональність поверхні, що уможливило їх широке застосування, зокрема для доставлення ліків [79] і генів [80], як біологічний клей [81], у роботах, пов'язаних з візуалізацією агентів (наприклад, МРТ) [82].

Ці частинки можна використовувати для перорального, внутрішньоочного, внутрішньовенного та черезшкірного доставлення. Дендримери можуть бути структурно модифіковані і в подальшому зв'язані з антитілами. Створення таких частинок може йти різними шляхами, такими як синтез самозбиранням, леґо- і клік-хімії (або швидкої

хімії — методу, що дає змогу за допомогою простих і гарантованих реакцій отримувати сполуки з новими функціональними властивостями) [78, 79]. Окрім того, дендримери не є імуногенними і достатньо малі, аби проникнути крізь судини і потрапити до клітини-мішені пухлини. Їхні розміри можуть бути зменшені нижче порогу ниркової фільтрації [83].

Природні та синтетичні полімерні наночастинки. Інкапсуляція ліків/генів можлива шляхом однорідного чи неоднорідно диспергованого вбудовування в матрицю або сорбції на поверхні наночастинок. Термін «наночастинки» є збірною назвою для наносфер і нанокапсул [84]. Наночастинки являють собою тверді носії, з натуральних або синтетичних полімерів, і мають різну здатність до біорозкладання. До наночастинок виявляють більшу увагу, ніж до ліпосом, через їхній терапевтичний потенціал і високу стабільність у біологічних рідинах, а також тривалий час зберігання [85]. Вони мають вищу ефективність інкапсуляції і здатність до захисту нестабільних ліків від деградації під впливом зовнішнього середовища порівняно з ліпосомами [59, 86].

Було описано деякі методи отримання наночастинок полімеризацією мономерів або з попередньо сформованих полімерів [84], однак сучасні методи спрямовані на використання безпечних розчинників з можливістю промислового застосування.

Властивості наночастинок можуть бути змінені за допомогою різних полімерів і кополімерів або протеїнів. Нові стратегії передбачають використання нових, здатних до біорозкладання синтетичних полімерів і модифікованих полімерів натурального походження, таких як хітозан і альбумін. Для хітозану було показано відносну безпечність, і його використовують як харчову добавку. Більш того, хітозан має широке застосування завдяки його біосумісності, адгезійним властивостям та підвищеній проникності [61, 87, 88]. Природним носієм гідрофобних молекул, зокрема жирних кислот, гормонів і жиророзчинних вітамінів, є альбумін. Його широко використовують як нетоксичну та неімуногенну речовину. Однак природні полімери важко очищувати і вони є нестабільними, тому часто замість них використовують синтетичні полімери. Синтетичні полімери з групи ефірів, такі як полімолочна кислота, поліціаноакрилати, поліакриловова кислота, поліангідриди, поліаміди, поліортоєфіри, поліетиленгліколь, полівінілалкоголь та інші, наприклад полі-

ізобутилціаноакрилат, поліетиленоксид, полі-ε-капролактон, є зручними засобами для доставлення ліків через їхню здатність до біологічного розкладання. Вони можуть зв'язуватися один з одним, утворюючи структури з різними властивостями, такими як контрольоване вивільнення та висока біосумісність.

Нещодавно привернув увагу полі-β-аміно-ефір (РβАЕ), оскільки йому притаманне швидке вивільнення в кислому середовищі [42, 89, 90]. Цей полімер виявився менш токсичним, ніж інші катіонні полімери, зокрема поліетиленамін та полі-L-лізин [42]. РβАЕ нерозчинний за фізіологічних значень рН, але стає миттєво розчинним у водному середовищі за рН нижче 6,5. Ці

речовини ефективні для терапії в безпосередній близькості від пухлини [42, 90].

Отже, наночастинки є перспективним засобом доставлення ліків, здатним спрямовувати безліч препаратів і біомолекул до специфічних мішеней в організмі. Для оптимізації доставлення за участю наночастинок необхідне більш глибоке і всебічне дослідження механізмів їх дії. Утім, вже сьогодні показано значні переваги використання наночастинок як засобу доставлення ліків завдяки їх малому розміру, біосумісності з різними клітинами і тканинами в організмі, можливості модифікації поверхні цільовими лігандами і високому ступеню навантаження.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Martinho N., Damge C., Reis C. P.* Recent Advances in Drug Delivery Systems // *J. Biomater. Nanobiotechnol.* — 2011. — V. 2, N 5. — P. 510–526.
2. *Mohanraj V. J., Chen Y.* Nanoparticles — A review // *Tropical J. Pharm. Res.* — 2006. — V. 5, N 1. — P. 561–573.
3. *Lattin J. R., Belnap D. M., Pitt W. G.* Formation of Eliposomes as a Drug Delivery Vehicle // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* — 2011. — V. 89. — P. 93–100.
4. *Vlerken L. E., Duan Z., Little S. R. et al.* Biodistribution and Pharmacokinetic Analysis of Paclitaxel and Ceramide Administered in Multifunctional Polymer-Blend Nanoparticles in Drug Resistant Breast Cancer Model // *Mol. Pharm.* — 2008. — V. 5, N 4. — P. 516–526.
5. *Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Бурлака А. П., Прилуцький Ю. І.* Перспективи використання вуглецевих нанотрубок у протираковій терапії // *Онкологія.* — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 5–9.
6. *Прилуцька С. В., Кічмаренко Ю. М., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І.* Фулерени C₆₀ та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи // *Біотехнологія.* — 2012. — Т. 5, № 3. — С. 9–17.
7. *Prylutska S. V., Matyshevska O. P., Grynyuk I. I. et al.* Biological effects of C₆₀ fullerenes in vitro and in a model system // *Mol. Cryst. Liquid Cryst.* — 2007. — V. 468. — P. 265–274.
8. *Prylutska S. V., Burlaka A. P., Klymenko P. P. et al.* Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy // *Cancer Nanotech.* — 2011. — V. 2, N 1. — P. 105–110.
9. *Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutsky Yu. I. et al.* Comparative study of antitumor effect of pristine C₆₀ fullerenes and doxorubicin // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 6. — С. 82–87.
10. *Soppimath K. S., Aminabhavi T. M., Kulkarni A. R., Rudzinski W. E.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices // *J. Contr. Release.* — 2001. — V. 70, N 1–2. — P. 1–20.
11. *Ferrari M.* Cancer nanotechnology: opportunities and challenges // *Nat. Rev. Cancer.* — 2005. — V. 5. — P. 161–171.
12. *Buzaneva E., Karlash A., Yakovkin K. et al.* DNA nanotechnology of carbon nanotube cells: physico-chemical models of self-organization and properties // *Mater. Sci. Engin.: C.* — 2002. — V. 19, N 1–2. — P. 41–45.
13. *Katz E., Willner I.* Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties and applications // *Angewandte Chem. Intern. Edit.* — 2004. — V. 43. — P. 6042–6108.
14. *Caruso F.* Nanoengineering of Particle Surfaces // *Adv. Mater.* — 2001. — V. 13. — P. 11–22.
15. *Naka K., Itoh H., Tampo Y., Chujo Y.* Effect of gold nanoparticles as a support for the oligomerization of L-cysteine in an aqueous solution // *Langmuir.* — 2003. — V. 19, N 13. — P. 5546–5549.
16. *Ghosh S. S., Kao P. M., McCue A. W., Chappelle H. L.* Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes // *Biocon. Chem.* — 1990. — V. 1. — P. 71.
17. *Wang J.* Nanoparticle-based electrochemical DNA detection // *Anal. Chim. Acta.* — 2003. — V. 500. — P. 247–257.
18. *Wang G. L., Zhang J., Murray R. W.* DNA binding of an ethidium intercalator attached to a monolayer-protected gold cluster // *Anal. Chem.* — 2002. — V. 74. — P. 4320.
19. *Holmberg A., Blomstergren A., Nord O. et al.* The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures // *Electrophoresis.* — 2005. — V. 26. — P. 501.

20. Zheng M., Huang X. Y. Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2004. — V. 126 — P. 12047–12054.
21. Park K., Lee S., Kang E. et al. New Generation of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy // *Adv. Funct. Mater.* — 2009. — V. 19, N 10. — P. 1553–1566.
22. Bruchez M., Moronne M., Gin P. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels // *Science.* — 1998. — V. 281. — P. 2013–2016.
23. Chan W. C. W., Nie S. M. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection // *Ibid.* — 1998. — V. 281. — P. 2016–2018.
24. Wang S., Mamedova N., Kotov N. A. et al. Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates // *Nano Letters.* — 2002. — V. 2. — P. 817–822.
25. Mah C., Zolotukhin I., Fraites T. J. et al. Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo // *Mol. Ther.* — 2000. — V. 1. — P. S239.
26. Panatarotto D., Prtidos C. D., Hoebeke J. et al. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses // *Chem. Biol.* — 2003. — V. 10. — P. 961–966.
27. Edelstein R. L., Tamanaha C. R., Sheehan P. E. et al. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents // *Biosens. Bioelectr.* — 2000. — V. 14. — P. 805–813.
28. Nam J. M., Thaxton C. C., Mirkin C. A. Nanoparticles-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins // *Science.* — 2003. — V. 301. — P. 1884–1886.
29. Mahtab R., Rogers J. P., Murphy C. J. Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between «straight», «bent», and «kinked» oligonucleotides // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1995. — V. 117. — P. 9099–9100.
30. Ma J., Wong H., Kong L. B., Peng K. W. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium // *Nanotechnology.* — 2003. — V. 14. — P. 619–623.
31. De la Isla A., Brostow W., Bujard B. et al. Nanohybrid scratch resistant coating for teeth and bone viscoelasticity manifested in tribology // *Mater. Res. Innov.* — 2003. — V. 7. — P. 110–114.
32. Burlaka A., Lukin S., Prylutska S. et al. Hyperthermic effect of multi-walled carbon nanotubes stimulated with near infrared irradiation for anticancer therapy: in vitro studies // *Exp. Oncol.* — 2010. — V. 32, N 1. — P. 48–50.
33. Molday R. S., MacKenzie D. Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells // *J. Immun. Meth.* — 1982. — V. 52. — P. 353–367.
34. Weissleder R., Elizondo G., Wittenburg J. et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging // *Radiology.* — 1990. — V. 175. — P. 489–493.
35. Parak W. J., Boudreau R., Gros M. L. et al. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks // *Adv. Mater.* — 2002. — V. 14 — P. 882–885.
36. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts // *J. Cell Sci.* — 2003. — V. 116. — P. 4707–4714.
37. May R. C., Machesky L. M. Phagocytosis and the actin cytoskeleton // *Ibid.* — 2001. — V. 114. — P. 1061–1077.
38. McNeil S. E. Nanoparticle therapeutics: a personal perspective // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* — 2009. — V. 1. — P. 264–271.
39. Myers J. N., Tabas I., Jones N. L., Maxfield F. R. Beta-very low density lipoprotein is sequestered in surface-connected tubules in mouse peritoneal macrophages // *J. Cell Biol.* — 1993. — V. 123. — P. 1389–1402.
40. Соболев А. С., Розенкранц А. А. Внутриклеточный транспорт и его использование для направленной внутриклеточной доставки локально действующих лекарств. Проблемы регуляции в биологических системах // *Регулярная и хаотическая динамика.* — 2006. — 480 с.
41. Panyam J., Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2003. — V. 55 — P. 329–347.
42. Shenoy D., Little S., Langer R., Amiji M. Poly(ethylene oxide)-Modified Poly(beta-amino ester) Nanoparticles as a pH-Sensitive System for Tumor-Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs. 1. In Vitro Evaluations // *Mol. Pharm.* — 2005. — V. 2, N 5. — P. 357–366.
43. Govender T., Stolnik S., Garnett M. C. et al. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug // *J. Control. Release.* — 1999. — V. 57. — P. 171–185.
44. Govender T., Riley T., Ehtezazi T. et al. Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles // *Int. J. Pharm.* — 2000. — V. 199. — P. 95–110.
45. Panyam J., Williams D., Dash A. et al. Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles // *J. Pharm. Sci.* — 2004. — V. 93. — P. 1804–1814.
46. Taglietti M., Hawkins C. N., Rao J. Novel Topical Drug Delivery Systems and Their Potential Use in Acne Vulgaris // *Skin Ther. Let.* — 2008 — V. 13, N 5. — P. 6–8.
47. Semete B., Booyesen L., Lemmer Y. et al. In Vivo Evaluation of the Biodistribution and

- Safety of PLGA Nanoparticles as Drug Delivery Systems // *Nanomedicine*. — 2010. — V. 6, N 5. — P. 662–671.
48. Beck A., Haeuw J. F., Wurch T. et al. The Next Generation of Antibody-Drug Conjugates Comes of Age // *Discov. Med.* — 2010. — V. 10, N 53. — P. 329–339.
49. Wu A. M., Senter P. D. Arming Antibodies: Prospects and Challenges for Immunocombinates // *Nat. Biotechnol.* — 2005. — V. 23, N 9. — P. 1137–1146.
50. Nelson A. L. Antibody Fragments: Hope and Hype // *Monoclon. Antibod.* — 2010. — V. 2, N 1. — P. 77–83.
51. Mody V. V., Siwale R., Singh A., Mody H. R. Introduction to Metallic Nanoparticles // *J. Pharm. Bioall. Sci.* — 2010. — V. 2, N 4. — P. 282–289.
52. Olivier J. C., Huertas R., Lee H. J. et al. Synthesis of Pegylated Immunonanoparticles // *Pharm. Res.* — 2002. — V. 19, N 8. — P. 1137–1143.
53. Olivier J. C. Drug Transport to Brain with Targeted Nanoparticles // *Neurotherapeutics*. — 2005. — V. 2, N 1. — P. 108–119.
54. Blau H. M., Springer M. L. Gene Therapy — A Novel Form of Drug Delivery // *New Engl. J. Med.* — 1995. — V. 333, N 18. — P. 1204–1207.
55. Chen Y. Z., Yao X. L., Tabata Y. et al. Gene Carriers and Transfection Systems Used in the Recombination of Dendritic Cells for Effective Cancer Immunotherapy // *Clin. Dev. Immunol.* — 2010. — P. 565–643.
56. Eliyahu H., Barenholz Y., Domb A. J. Polymers for DNA Delivery // *Molecules*. — 2005. — V. 10, N 1. — P. 34–64.
57. Taratula O., Garbuzenko O. B., Kirkpatrick P. et al. Surface-Engineered Targeted PPI Dendrimer for Efficient Intracellular and Intratumoral siRNA Delivery // *J. Control. Release*. — 2009. — V. 140, N 3. — P. 284–293.
58. Blau H. M., Springer M. L. Gene Therapy — A Novel Form of Drug Delivery // *New Engl. J. Med.* — 1995. — V. 333, N 18. — P. 1204–1207.
59. Korting H. C., Schafer-Korting M. Carriers in the Topical Treatment of Skin Disease // *Handbook Experim. Pharm.* — 2010. — V. N197 — P. 435–468.
60. Wang S., Tan M., Zhong Z. et al. Nanotechnologies for Curcumin: An Ancient Puzzler Meets Modern Solutions // *J. Nanomater.* — 2011. — V. 2011, N 2011. — P. 8.
61. Fricker G., Kromp T., Wendel A. et al. Phospholipids and Lipid-Based Formulations in Oral Drug Delivery // *Pharm. Research*. — 2010. — V. 27, N 8. — P. 1469–1486.
62. Esposito E., Menegatti E., Cortesi R. Ethosomes and Liposomes as Topical Vehicles for Azelaic Acid: A Preformulation Study // *J. Cosmetic Science*. — 2004. — V. 55, N 3. — P. 253–264.
63. Karande P., Mitrugotri S. Enhancement of Transdermal Drug Delivery via Synergistic Action of Chemicals // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2009. — V. 1788, N 11. — P. 2362–2373.
64. Cusi M. G. Applications of Influenza Virosomes as a Delivery System // *Hum. Vaccine*. — 2006. — V. 2, N 1. — P. 1–7.
65. Sesana A. M., Monti-Rocha R., Vinhas S. A. et al. In Vitro Activity of Amphotericin B Conjugates against *Leishmania Chagasi* // *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. — 2011. — V. 106, N 2. — P. 251–253.
66. Yang Z., Peng X., Tan Y. et al. Optimization of the Preparation Process for an Oral Phytantriol-Based Amphotericin B Cubosomes // *J. Nanomater.* — 2011, N 2011. — P. 10.
67. Bei D., Zhang T., Murowchick J. B., Youan B. B. Formulation of Dacarbazine-Loaded Cubosomes. Part III. Physicochemical Characterization // *AAPS PharmSciTech*. — 2010. — V. 11, N 3. — P. 1243–1249.
68. Arayne M. S., Sultana N., Qureshi F. Review: Nanoparticles in Delivery of Cardiovascular Drugs // *Pakistan J. Pharm. Sciences*. — 2007. — V. 20, N 4. — P. 340–348.
69. Castro G. A., Orefice R. L., Vilela J. M. et al. Development of a New Solid Lipid Nanoparticle Formulation Containing Retinoic Acid for Topical Treatment of Acne // *J. Microencapsul.* — 2007. — V. 24, N 5. — P. 395–407.
70. Manosroi J., Apriyani M. G., Foe K., Manosroi A. Enhancement of the Release of Azelaic Acid through the Synthetic Membranes by Inclusion Complex Formation with Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin // *Intern. J. Pharm.* — 2005 — V. 293, N 1–2. — P. 235–240.
71. Sharrna P., Brown S., Walter G. et al. Nanoparticles for bioimaging // *Adv. Coll. Interface Sci.* — 2006. — V. 123. — P. 471–485.
72. Arvizo R. R., Miranda O. R., Moyano D. F. et al. Modulating Pharmacokinetics, Tumor Uptake and Biodistribution by Engineered Nanoparticles // *PLoS One*. — 2011. — V. 6, N 9. — P. e24374.
73. Brambilla D., Le Droumaguet B., Nicolas J. et al. Nanotechnologies for Alzheimer's Disease: Diagnosis, Therapy, and Safety Issues // *Nanomedicine*. — 2011. — V. 7, N 5. — P. 521–540.
74. Arias J. L. Novel Strategies to Improve the Anticancer Action of 5-Fluorouracil by Using Drug Delivery Systems // *Molecules*. — 2008. — V. 13, N 10. — P. 2340–2369.
75. Jain S. K., Jain N. K. Multiparticulate Carriers for Sun-Screening Agents // *Intern. J. Cosmetic Sci.* — 2010. — V. 32, N 2. — P. 89–98.
76. Fauce T. Exploring the Safety of Nanoparticles in Australian Sunscreens // *Intern. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* — 2010. — V. 1, N 1. — P. 87–94.

77. *Chen P. C., Mwakwari S. C., Oyelere A. K.* Gold Nanoparticles: From Nanomedicine to Nanosensing // *Nanotechnol. Sci. Appl.* — 2008. — V. 1, N 2008. — P. 45–66.
78. *Kaminskas L. M., Boyd B. J., Porter C. J.* Dendrimer Pharmacokinetics: The Effect of Size, Structure and Surface Characteristics on ADME Properties // *Nanomedicine.* — 2011. — V. 6, N 6. — P. 1063–1084.
79. *Medina S. H., Tekumalla V., Chevliakov M. V. et al.* N-Acetylgalactosamine- Functionalized Dendrimers as Hepatic Cancer Cell Targeted Carriers // *Biomaterials.* — 2011. — V. 32, N 17. — P. 4118–4129.
80. *Lim Y. B., Kim T., Lee J. W. et al.* Self-Assembled Ternary Complex of Cationic Dendrimer, Cucurbituril, and DNA: Noncovalent Strategy in Developing a Gene Delivery Carrier // *Bioconjugate Chem.* — 2002. — V. 13, N 6. — P. 1181–1185.
81. *Velazquez A. J., Carnahan M. A., Kristinsson J. et al.* New Dendritic Adhesives for Sutureless Ophthalmic Surgical Procedures: In Vitro Studies of Corneal Laceration Repair // *Arch. Ophthalmol.* — 2004. — V. 122, N 6. — P. 867–870.
82. *Menjoge A. R., Kannan R. M., Tomalia D. A.* Dendrimer-Based Drug and Imaging Conjugates: Design Considerations for Nanomedical Applications // *Drug Discovery Today.* — 2010. — V. 15, N 5–6. — P. 171–185.
83. *Kukowska-Latallo J. F., Candido K. A., Cao Z. et al.* Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer // *Cancer Res.* — 2005. — V. 65, N 12. — P. 5317–5324.
84. *Pinto C., Reis C., Neufeld R. J. et al.* Nanoencapsulation. I. Methods for Preparation of Drug- Loaded Polymeric Nanoparticles // *Nanomed.: Nanotech., Biol., Med.* — 2006. — V. 2, N 1. — P. 8–21.
85. *Pinto Reis C., Neufeld R. J., Ribeiro A. N. J., Veiga F.* Nanoencapsulation II. Biomedical Applications and Current Status of Peptide and Protein Nanoparticulate Delivery Systems // *Ibid.* — 2006. — V. 2, N 2. — P. 53–65.
86. *Alvarez-Roman R., Naik A., Kalia Y. N. et al.* Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles // *Pharm. Res.* — 2004. — V. 21, N 10. — P. 1818–1825.
87. *Nafee N., Schneider M., Schaefer U. F., Lehr C. M.* Relevance of the Colloidal Stability of Chitosan/PLGA Nanoparticles on Their Cytotoxicity Profile // *Int. J. Pharm.* — 2009. — V. 381, N 2. — P. 130–139.
88. *Reis A. C.* Encapsulacao de Farmacos Peptidicos Pelo Metodo de Emulsificacao/Gelificacao Interna // Ph.D. Thesis, Faculdade Farmacia Universidade de Coimbra, 2007.
89. *Van Vlerken L. E., Duan Z., Little S. R. et al.* Biodistribution and Pharmacokinetic Analysis of Paclitaxel and Ceramide Administered in Multifunctional Polymer-Blend Nanoparticles in Drug Resistant Breast Cancer Model // *Mol. Pharm.* — 2008. — V. 5, N 4. — P. 516–526.
90. *Little S. R., Lynn D. M., Ge Q. et al.* Poly-Beta Amino Ester-Containing Microparticles Enhance the Activity of Nonviral Genetic Vaccines // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2004. — V. 101, N 26. — P. 9534–9539.

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ В БИМЕДИЦИНЕ

*П. Г. Телегеева^{1,2}, Д. С. Ефременко^{1,2},
Г. Д. Телегеев¹, С. С. Малиута¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

E-mail: g.d.telegeev @ imbg.org.ua

В обзоре освещены достижения в области нанотехнологий, в частности их применение в биомедицине. Дана характеристика новых систем доставки лекарств, включающих липидные, протеиновые и полимерные наночастицы, которые обеспечивают стабильный транспорт лекарственных препаратов, их

APPLICATION OF NANOPARTICLES IN BIOMEDICINE

*P. G. Telegeeva^{1,2}, D. S. Iefremenko^{1,2},
G. D. Telegeev¹, S. S. Maliuta¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Kyiv National Taras Shevchenko University

E-mail: g.d.telegeev @ imbg.org.ua

The advances in nanotechnology, particularly, application in biomedicine are described in the review. The characteristic of the new drug delivery systems is given including lipid, protein and polymer nanoparticles which provide stable delivery of drugs to the target of distribution in the body and prevent their rapid degradation.

целевое распределение в организме и предотвращают быструю деградацию. Рассматриваются преимущества применения векторов нанометрового масштаба. Из-за своего небольшого размера, структуры и большой площади поверхности наноразмерные материалы приобретают необходимые физико-химические свойства, которые позволяют наночастицам, нагруженным специфическими агентами, преодолевать ограничения, существующие для форм больших размеров. Это значительно облегчает внутриклеточный транспорт к специфическим клеточным мишеням. Контролируемая доставка к месту действия и сокращение времени воздействия на нецелевые ткани повышает эффективность лекарственных препаратов, а также снижает токсичность и другие побочные эффекты, что улучшает общее самочувствие пациента. Использование различных путей введения наночастиц позволяет доставлять низкомолекулярные препараты, протеины, пептиды или нуклеиновые кислоты в определенные ткани. Рассмотрены различные пути доставки нанолекарств в клетку, а также возможности модификации их поверхности целевыми лигандами. Представлены типы систем доставки лекарств: микрогубки, вирусы, иммуноконъюгаты, везикулярные системы (липосомы, трансферосомы, этосомы, ниосомы, вирусомы, кохлеаты, кубосомы), микроэмульсии и наноэмульсии, металлические наночастицы и квантовые точки, дендромеры, природные и синтетические полимерные наночастицы и т. д. Описаны их свойства и возможности практического применения.

Большое разнообразие нановекторов, возможность их модификации, а также загрузки различными лекарствами (рассмотрены методы включения и адсорбции), контроля их высвобождения в клетке открывают перспективы широкого применения наночастиц для визуализации биологических процессов, диагностики и терапии ряда заболеваний.

Ключевые слова: наночастицы, наномедицина, поглощение макромолекул, модификация нанополимеров, целевая терапия.

The advantages of nanometer scale vectors were analyzed. Due to their small size, structure and large surface area, nanoscale materials acquire necessary physico-chemical properties. These properties allow the nanoparticles, containing specific agents, to overcome the limitations existing for the forms of large sizes. This significantly facilitates the intracellular transport to specific cellular targets. Controlled delivery to the place of action and reduction of exposure time on non-target tissues increases efficacy and reduces toxicity and other side effects, which improves the patient's overall health.

Use of different ways to deliver nanoparticles allows to deliver low-molecular drugs, proteins, peptides or nucleic acids to specific tissues. Various ways of nanodrugs delivery to a cell and the possibility of modifying their surface by target ligands are discussed in the review. Types of drug delivery systems: microsponges, viruses, immunoconjugates, liposomes, metal nanoparticles and quantum dots, dendrimers, natural and synthetic polymeric nanoparticles, etc are discussed.

A large variety of nanovectors, as well as their modification, and loading of various drugs (the methods of inclusion and adsorption are examined), control of their release into the cell, opens prospects for their wide application for visualization of biological processes, diagnosis and therapy of wide range of diseases.

Key words: nanoparticles, nanomedicine, absorption of macromolecules, modification of nanopolymers, targeted therapy.

SILVER NANOPARTICLES AS PENICILLIN ACTION ENHANCERS

O. A. VASYLCHENKO¹, V. V. SOLOGUB¹, K. K. VASYLCHENKO²

¹National Aviation University, Institute of Ecological Safety, Kyiv

²Bogomolets National Medical University, Kyiv

E-mail: vasilchenko@nau.edu.ua

Received 25.10.2012

Nowadays, the value of bactericidal nanomaterials research increases at the increasing number of bacteria strains resistant to the most highly potent antibiotics. In the review the characteristic of nanoparticles and methods for their production are done. The scope of nanoparticles application is observed, special attention is focused on silver nanoparticles usage in medicine, in particular, as bactericidal products. It is indicated that nanoparticles may have toxic effects.

Much attention is paid to nanoparticles application in the treatment of various diseases, for example, for targeted drug delivery, wound healing, bone regeneration, local heating of tumors in cancer pathology, immune system stimulation, for antibodies, viruses, bacteria detection, for liquids filtration.

Penicillins and their producers — *Penicillium* sp. characteristic is done. The mechanism of penicillin antimicrobial action is estimated.

It is revealed that silver nanoparticles usage in combination with antibiotics, particularly penicillin, leads to antibiotics antibacterial activity increasing against gram-positive and gram-negative microorganisms.

Key words: nanotechnology, silver nanoparticles, antibiotics, penicillin, *Penicillium* sp.

The field of nanotechnology is an intensively developing field as a result of its wide-ranging applications in different areas of science and technology. The term nanotechnology is defined as the creation, exploitation and synthesis of materials at a scale of 1–100 nm (1 nm = 10⁻⁹ m). The word «nano» is derived from a Greek word meaning «dwarf» or «extremely small». Nanobiotechnology is a multidisciplinary field and involves research and development of technology in different fields of science like biotechnology, nanotechnology, physics, chemistry, and material science [1, 2].

Nanoparticles (NPs) exhibit different shapes like spherical, triangular, rod, etc. (Fig. 1). Research on nanoparticles' synthesis is the current area of interest due to the unique visible properties (chemical, physical, optical, etc.) of nanoparticles compared with the bulk material [3, 4].

Nanoparticles have broad application prospects in biology and medicine [6–10]. Since many microorganisms seem to be less sensitive to most of the antibiotics, researchers started finding a new potential antimicrobial agent. With this respect, silver and sil-

ver-based compounds are having strong bacteriocidal and fungicidal activity [11].

Nanoparticles having larger surface area to volume ratio tend to pose higher antimicrobial activity [12]. Also, silver has a lower propensity to stimulate microbial resistance than many other antimicrobial agents [11]. Based on these properties, silver nanoparticles (Ag-NPs) have been used in wide range of applications such as to prevent infection, in (burn and traumatic) wound dressings, diabetic ulcers, coating of catheters, dental works, scaffold, and medical devices [13, 14].

Nanotechnology is an integration of different fields of science which holds promise in

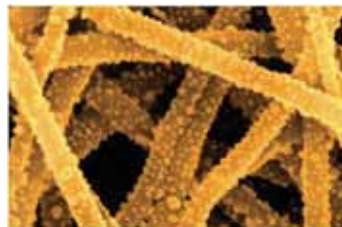


Fig. 1. Silver nanoparticles with a diameter of 10–15 nanometers coat nylon nanofibers with a diameter of approximately 80 nanometers.

Photo: Cornell University Textiles [5]

the pharmaceutical industry, medicine, biotechnology and agriculture [2]. The unique properties of nanoparticles different from the bulk material have attracted the attention of several workers to use the multiple functionalities of nanoparticles. For example, the information about silver nanoparticles for water treatment and microbiological control was given at VII International Scientific conference of students and PhD Students «Youth and Progress of Biology» [15].

Silver NPs may exhibit antibacterial activity [16]. Furthermore, silver NPs were shown to enhance the antibacterial activity of such biotechnological products as penicillin G, amoxicillin, erythromycin, clindamycin, and vancomycin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* [17].

Silver as a biocide

Nanotechnology offers opportunities to re-explore the biological properties of already known antimicrobial compounds by manipulating their size to alter the effect. Silver has long been known for its antimicrobial properties, but its medical applications declined with the development of antibiotics. Silver (Ag) is a transition metal element having atomic number 47 and atomic mass 107.87. The medicinal uses of silver have been documented since 1000 B.C. Silver is a wellness additive in traditional Chinese and Indian Ayurvedic medicine [18]. Its action as an antibiotic comes from the fact that it is a non-selective toxic «biocide». Silver based antimicrobial biocides are used as wood preservatives. In water usage, silver and copper based disinfectants are used in hospital and hotel distribution systems to control infectious agents (for example, *Legionella*).

Nanomaterials can be toxic at the cellular, organ, and organism levels [19]. Cytotoxic effects of carbon nanotubes may be due to their ability to generate reactive oxygen species. The cytotoxic effect is due to oxidative damage of proteins, lipids and DNA, which in turn increases oxidative stress in cells and leads to their death by apoptosis or necrosis [8].

In medicine the most widely used are silver nanoparticles. Colloidal silver containing medicines collargol and protargol are produced since 1902 till nowadays. Except for nanosilver, nanogold, nanocopper, nanooxides of silicium, titanium, iron and zinc, calcium phosphate and hydroxyapatite ceramic nanoparticles, nanoparticles of polymers (polystyrene, latex, chitosane, cyclodextrin) are used [20].

Currently, silver sulfadiazine is listed by the World Health Organization as an essential anti-infective topical medicine [21]. Since silver works as a bulk material, the use of nano-size silver may also be appealing.

Methods of nanoparticle synthesis

Owing to the wide range of nanoparticles applications in different fields of science and technology, different protocols have been designed for their synthesis [13]. The nanoparticles can be synthesized using the top-down (physical) approach which deals with methods such as thermal decomposition, diffusion, irradiation, arc discharge, etc., and bottom-up (chemical and biological) approach which involves seeded growth method, polyol synthesis method, electrochemical synthesis, chemical reduction, and biological entities for fabrication of nanoparticles by means of biotechnological methods. Different synthesis methods involve the use of different types of chemical, physical, and biological agents to yield nanoparticles of different sizes and shapes [3].

Physical methods used for the synthesis of nanoparticles include thermal decomposition, laser irradiation, electrolysis, condensation, diffusion, etc. The thermal decomposition method is used for the synthesis of monodisperse nanoparticles. Fatty acids are dissolved in hot NaOH solution and mixed with metal salt solution which leads to formation of metal precipitate [22]. In diffusion method, crystals and short wires of copper are enclosed in glass ampoules and sealed at low pressure; further, the ampoules are annealed at 500 °C for 24 h. The crystals are removed from the ampoules and cooled on a metallic plate at room temperature. In the UV irradiation technique, polycarbonate films are cut and placed on glass microscope slide and exposed to UV radiation which results in the formation of hydroxyl groups on polycarbonate films. Further, these polycarbonate films are silanized with 3-(aminopropyl) triethoxysilane (APS) in denatured ethanol for 2 h and rinsed with deionised water which leads to the formation of silver film on the polycarbonate film [23]. The arc-discharge method involves use of two graphite electrodes which act as cathode and anode and are immersed in metal salt solution. The electrodes are brought in contact to strike an arc and separated immediately to sustain arc inside salt solution. The synthesis of nanoparticles is carried out at an open circuit and an optimized direct current [24].

The most often used method for the chemical synthesis of nanoparticles is the chemical reduction method, which deals with the reduction of metal particles to nanoparticles using chemical reducing agents like sodium borohydride or sodium citrate [25]. Other chemical agents utilized for the synthesis are N,N-dimethyl formamide (DMF), poly(N-vinyl pyrrolidone) (PVP), ethyl alcohol, tetra-n-tetrafluoroborate (TFATFB), etc. [26, 27]. Seeded growth method is a colloid chemical method for the synthesis of nanoparticles which involve preparation of seeds by reducing metal ions with the suitable reducing agent. The fine particles so formed are called seed particles which are then added to growth solutions containing metal ions and additives like L-ascorbic acid and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) [27]. Polyol is also used in the synthesis of nanoparticles. In the polyol method a metal precursor is dissolved in a liquid polyol in the presence of capping agent. The metal sol is prepared using methanol or ethyl alcohol as a solvent and reducing agent while PVP is used as a protective and capping agent [26]. Electrochemical synthesis method induces chemical reactions in an electrolyte solution with the use of an applied voltage. A wide variety of nanomaterials could be synthesized using this method.

Biological agents used for the synthesis of nanoparticles include mainly bacteria, fungi [28, 29] and plants [30–33]. The biotechnological methods used for the synthesis of nanoparticles include both extracellular and intracellular methods [2, 34, 35]. The synthesis of nanoparticles using bacteria and actinomycetes usually involves the intracellular synthesis method, in which the bacterial cell filtrate is treated with metal salt solution and kept in a shaker in dark at ambient temperature and pressure conditions [36]. For the extracellular synthesis of nanoparticles using bacteria, the bacterial culture is centrifuged at 8,000g and the supernatant is challenged with metal salt solution [37]. In case of fungi also nanoparticles are intracellularly synthesized by treating the fungal mycelium with metal salt solution and further incubation for 24 h [38]. Dried mycelium of fungi is also used for synthesis of nanoparticles. In this method the fungal mycelium is harvested by centrifugation and subsequently freeze dried, and this freeze-dried mycelium is immersed in metal salt solution and kept on a shaker [39]. However, in the extracellular method the filtrate of the mycelium is treated with metal salt solution and incubated for 24 h [40, 41].

In algal synthesis of nanoparticles washed culture of algae without the presence of any medium is treated with metal salt solution and kept in dark with controlled pH and temperature conditions [42, 43]. The biotechnological synthesis of nanoparticles using yeast involves two steps which include firstly the synthesis of nanoparticles and next recovery of the synthesized nanoparticles [43]. For the synthesis process, yeast culture is challenged with metal salt solution and incubated in dark for 24 h. Further, the cells are separated from the medium by centrifugation and the cell-free extract is used for recovery of nanoparticles. For recovery of nanoparticles, specifically designed apparatus (polycarbonate bottle with sampling cup) is used, which separates nanoparticles from the extract by differences in thawing temperature. The cell-free medium containing nanoparticles is filled in the bottle up to the brim and kept at 20 °C in upright position. During freezing, the nanoparticles get denser than medium and settle down. The bottle is then kept at 0 °C and allowed to thaw. The concentrated colloidal solution obtained in the sampling cup is centrifuged at 23,000 g for 24 h, the particles are suspended in distilled water, and further the particles are dried in vacuum [42].

Fields of application

Nanotechnology is an integration of different fields of science which holds promise in the pharmaceutical industry, medicine, biotechnology and agriculture [44]. The unique properties of nanoparticles different from the bulk material have attracted the attention of several workers to harness the multiple functionalities of nanoparticles.

Silver nanoparticles are utilized in the area of electronics, e.g. silica-coated Ag nanowires for electric circuits [45].

Colloidal silver nanoparticles can be used in the treatment of cancer and arthritis.

In cancer therapy it is proposed to use carbon nanotubes for the transport of drugs to the cancer cells [7], for DNA oligonucleotides transport to the nuclei of cancer cells for their selective destruction without damaging of normal cells [8]. In addition, carbon nanotubes by irradiation in the infrared are heated, due to this hyperthermic therapy of tumors is possible [46].

Fullerenes are biologically active and non-toxic, they are able to penetrate biological membranes, exhibit strong antioxidant and antiviral properties, increase the protective

functions of the immune system, and prevent the growth of malignant tumors. Metallofullerenes penetrate the plasma membrane of the tumor cells and effectively inhibit their proliferation, inhibit the vascularization of tumors and therefore prevent their malignancy, reduce metastasis. Their effect may be explained by their high antioxidant activity and blocking of specific cell receptors [9, 10, 47–49].

Detection of viruses is generally performed by either antigens (immunoassays) or genome sequences (polymerase chain reaction-based methods). However, sensitivity of such detection techniques is a problematic issue. There is novel sandwich-enzyme immunosorbent method for direct detection of adenoviruses with the help of covalently coated monoclonal anti-hexon antibodies onto highly fluorescent europium (III)-chelate doped nanoparticles ($\sim 10^7$ nm).

Carbon nanotubes are offered to use for antibodies detection, including the cases of autoimmune diseases, for the detection of nucleotide sequences, as ion channel blockers, as biosensors for detection of DNA, glucose, cholesterol, and nitric oxide [7].

The technique of nanofiltration is a novel method to remove both enveloped and non-enveloped viruses [50]. There are reports of removal of IgG-coated non-enveloped viruses including bovine parvovirus and bovine enterovirus with the help of 20- and 50-nm-sized nanofilters [51].

Nanoparticles due to its biocompatibility and strong interaction with bases like thiols play a major role in the treatment of cancer [52]. Epithelial ovarian cancer a common malignancy of female genital tract could be cured with the use of gold nanoparticles. Vascular endothelial growth factor (VEGF) performs a vital role in the progression of ovarian cancer and also tumor growth and gold nanoparticles possess the capability to inhibit the progression of ovarian tumor growth and metastasis. Also, in case of multiple myeloma (MM), a cancer of plasma cells, nanoparticles are observed to inhibit the function of VEGF which induces cell proliferation. This inhibition of VEGF further leads to upregulation of cell cycle inhibitor proteins like p21 and p27 which inhibit proliferation [52].

Chronic lymphocytic leukemia (CLL), a cancer caused due to the overproduction of lymphocytes. Chronic leukemia starts in the bone marrow but could spread to other organs also. Nanoparticles possess the ability to inhibit the function of growth factor secreted by CLL cells, and induce apoptosis [52].

Rheumatoid arthritis which is considered as an incurable disease, bare nanoparticles are found to serve as a possible cure.

Nanoparticles can be used in the construction of miniaturized devices, which can be helpful in drug delivery [6, 7, 53].

Thiol-stabilized nanoparticles are used as «bio-catalyst». Nanoparticles can be used as fluorescence labeling system in microbial detection. Nanoparticles can be widely used as signal reporters to detect biomolecules in DNA assay, immunoassay and cell bioimaging [54].

It is prospectively to use carbon nanotubes as mechanically strong micro catheters that do not affect coagulation parameters [7].

Catheters coated with nanocrystalline silver serve as a tool to prevent infections. Silver nanoparticles are found to be active against most of the nosocomial infections related to catheters and also predominantly accumulate at the site of insertion. Thus, silver nanoparticles function as a protective agent against infection has no risk of systemic toxicity [55].

Nanosilver dressings are found to induce major improvements in the healing of wounds with respect to antimicrobial efficiency, ease in using and faster re-epithelialization. It was reported that re-epithelialization in a patient with a third-degree burn was observed as a result of the treatment of nanosilver dressing as it provided a protection against infections and also promoted early formation of neoderms and uncomplicated wound closure [3, 56].

Titanium nanoparticles are particularly useful for the production of pigments, paints and cosmetics [57].

The bone cells interact with nanostructured materials as the collagen fibrils, hydroxyapatite and proteoglycans found in bone tissues in the nanometer scale. Hence, nanomaterials are efficiently used for the regeneration and repair of bone tissues. It is observed that the bone cells could elicit desired cellular functions like adhesion, migration and proliferation. Nanomaterials can mimic the constituent components of bone, may be used for bones and neurons growing [7, 58]. Examples of bone implants include nanoceramics, nanopolymers, nanometals and composites [59].

Characteristics of penicillin and *Penicillium* spp.

Penicillin (sometimes abbreviated PCN or pen) is a group of antibiotics derived from *Penicillium* fungi (Fig. 2). They include penicillin G, procaine penicillin, benzathine peni-

cillin, and penicillin V. Penicillin antibiotics are historically significant because they are the first drugs that were effective against many previously serious diseases such as syphilis and infections caused by staphylococci and streptococci. Penicillins are still widely used today, though many types of bacteria are now resistant. All penicillins are beta-lactam antibiotics and are used in the treatment of bacterial infections caused by susceptible, usually Gram-positive, organisms [60].

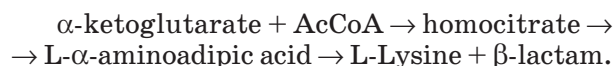


Fig. 2. Laboratory Petri-dish culture of the fungus *Penicillium chrysogenum* growing on agar with the produced antibiotic penicillin.
Geoff Tompkinson/Science Photo Library [5]

Bacteria constantly remodel their peptidoglycan cell walls, simultaneously building and breaking down portions of the cell wall as they grow and divide. β -Lactam antibiotics inhibit the formation of peptidoglycan cross-links in the bacterial cell wall, but have no direct effect on cell wall degradation. The β -lactam moiety (functional group) of penicillin binds to the enzyme (DD-transpeptidase) that links the peptidoglycan molecules in bacteria. The enzymes that hydrolyze the peptidoglycan cross-links continue to function, which weakens the cell wall of the bacterium (in other words, the antibiotic causes cytolysis or death due to osmotic pressure). In addition, the build-up of peptidoglycan precursors triggers the activation of bacterial cell wall hydrolases and autolysins, which further digest the bacteria's existing peptidoglycan. This imbalance between cell wall production and degradation is responsible for the rapid cell-killing action of this class of drugs, even in the absence of cell division. In addition, the relatively small size of the penicillin molecule allows it to penetrate deeply into the cell wall, affecting its entire depth. This is in contrast to the other major class of cell wall synthesis inhibiting antibiotics, the glycopeptide antibiotics (which includes vancomycin and teicoplanin) [61].

Penicillin shows a synergistic effect with aminoglycosides, since the inhibition of peptidoglycan synthesis allows aminoglycosides to penetrate the bacterial cell wall more easily, allowing its disruption of bacterial protein synthesis within the cell.

Penicillin is a secondary metabolite of fungus *Penicillium* that is produced when growth of the fungus is inhibited by stress. It is not produced during active growth. Production is also limited by feedback in the synthesis pathway of penicillin [61]:



The by-product L-Lysine inhibits the production of homocitrate, so the presence of exogenous lysine should be avoided in penicillin production [62].

The *Penicillium* cells are growing using a technique called fed-batch culture, in which the cells are constantly subject to stress, which is required for induction of penicillin production. The carbon sources that are available are also important: glucose inhibits penicillin production, whereas lactose does not. The pH and the levels of nitrogen, lysine, phosphate, and oxygen of the batches must also be carefully controlled [61].

The biotechnological method of directed evolution has been applied to produce by mutation a large number of *Penicillium* strains. Appropriate techniques include PCR, DNA shuffling etc. [62].

Penicillium is a genus of ascomycetous fungi of major importance in the natural environment as well as food and drug production (Fig. 3). It produces penicillin, a molecule that

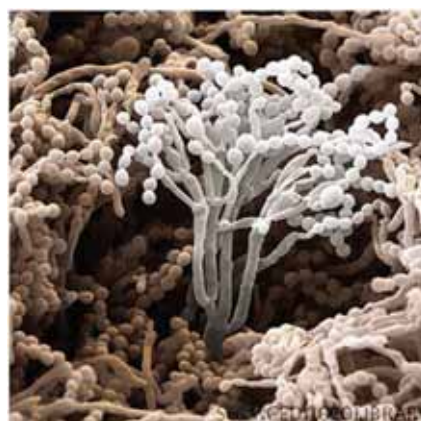


Fig. 3. *Penicillium chrysogenum*, coloured scanning electron micrograph (SEM) at magnification $\times 1250$.
The round structures are conidia, the asexual reproductive spores of the fungus. Eye of Science/Science Photo Library [5].

is used as an antibiotic, which kills or stops the growth of certain kinds of bacteria inside the body. The widespread genus contains over 300 species [63].

Penicillium is classified as a genus of anamorphic fungi in the division *Ascomycota* (order *Eurotiales*, class *Eurotiomycetes*, family *Trichocomaceae*) [64]. The genus name is derived from the Latin root «penicillium», meaning «painter's brush», and refers to the chains of conidia that resemble a broom [65].

The thallus (mycelium) typically consists of a highly branched network of multinucleate, septate, usually colorless hyphae. Many-branched conidiophores sprout on the mycelia, bearing individually constricted conidiospores. The conidiospores are the main dispersal route of the fungi, and often green.

Sexual reproduction involves the production of ascospores, commencing with the fusion of an archegonium and an antheridium, with sharing of nuclei. The irregularly distributed asci contain eight unicellular ascospores each [66].

Combined action of penicillin and nanoparticles

With the emergence and increase of microbial organisms resistant to multiple antibiotics, and the continuing emphasis on healthcare, many researchers have tried to develop new, effective antimicrobial reagents free of resistance. Such problems and needs have led to the resurgence in the use of Ag-based antiseptics that may be linked to broad-spectrum activity and far lower propensity to induce microbial resistance than antibiotics [67]. Research in antibacterial material containing various natural and inorganic substances has been intensive [68]. Among metal nanoparticles (Me-NPs), silver nanoparticles (Ag-NPs) have been known to have inhibitory and bactericidal effects. It can be expected that the high specific surface area and high fraction of surface atoms of Ag-NPs will lead to high antimicrobial activity as compared with bulk silver metal [68]. The biomedical application of silver nanoparticles also attracted increasing interest, such as antimicrobial activity of silver nanoparticles for wound healing, and silver nano-coated medical devices, etc. [69]. There were investigated that silver ion or metallic silver as well as silver nanoparticles can be exploited in medicine for burn treatment, dental materials, coating stainless steel materials, textile fabrics, water treatment, sunscreen lotions, etc. and possess low toxicity

to human cells, high thermal stability and low volatility [70].

In 2007, three papers have been published reporting the use of blue aggregated mixtures of drugs and NPs, rather than of stable red conjugates [71–73]. Such a color change and transmission electron microscopy (TEM) images unambiguously indicated NP aggregation. The drugs used were aminoglycoside antibiotics (streptomycin, gentamicin, kanamycin, and neomycin), quinolones (ciprofloxacin, gatifloxacin, and norfloxacin), ampicillin (a penicillin antibiotic), and 5-fluorouracil (an antimetabolite of nucleic acid metabolism). The preparations were tested for antibacterial activity toward gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) and gram-negative (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) microorganisms and they also were examined for antifungal activity toward *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger* (Fig. 4, 5). The basic experimental tests for the determination of antibacterial activity were the disk diffusion method and the agar diffusion method. Depending on the antibiotic used, increase in the activity of the antibiotic-colloidal-silver mixture ranged from 12 to 40%, as compared with the activities of the native drugs. So, the antibacterial activities of the antibiotics were enhanced through the use of silver NPs.

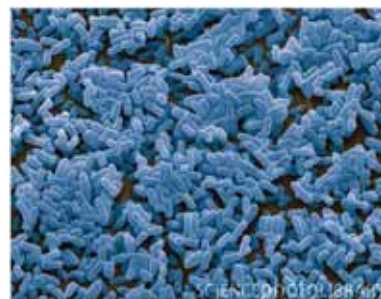


Fig. 4. Coloured scanning electron micrograph (SEM) of *Bacillus subtilis* bacteria at magnification $\times 12000$.

Steve Gschmeissner/Science Photo Library [5]



Fig. 5. Coloured scanning electron micrograph (SEM) of *Staphylococcus aureus* bacteria at magnification $\times 16000$.

Eye of Science/Science Photo Library [5]

Nowadays one of the nanobiotechnology tasks is metal nanoparticles construction and usage. Nanoparticles are known for a long time, and they are used in different areas of human activity. Silver nanoparticles have a wide range of applications in pharmacy, medicine, biotechnology and agriculture. From the literature data analyzing there was given information about nanotechnology development in face of silver nanoparticles in the combination with antibiotics. Silver nanoparticles are in active usage as «naked» as in the combination with antibiotics, in particular with penicillin, for enhancing of their action. The silver nanoparticles can be synthesized by the means of physical, chemical and biological methods. Penicillin produced by filamentous

fungi *Penicillium* sp. is the first discovered antibiotic; it is still applied in medicine. But many bacteria for the long time have developed the resistance to it. Researches show that penicillin in the combination with the silver nanoparticles give the highly effective bactericidal action against different bacteria, especially *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*.

Nanobiotechnology is prospective for medicine. Nanocomposites creation and application are especially important. Nanoparticles usage offers great opportunities for diagnostics and treatment patients with bone and joint pathology, bacterial and virus infections, injuries, autoimmune diseases, cancer, etc.

REFERENCES

- Huang J., Chen C., He N. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamotum camphora* leaf // Nanotechnology. — 2007. — V. 18. — P. 105–106.
- Rai M., Yadav A., Gade A. Current trends in phytosynthesis of metal nanoparticles // Crit. Rev. Biotechnol. — 2008. — V. 28, N 4. — P. 277–284.
- Rai M., Yadav A., Gade A. Silver nanoparticles: as a new generation of antimicrobials // Biotechnol. Adv. — 2009. — V. 27. — P. 76–83.
- Sau T.K., Rogach A.L. Nonspherical noble metal nanoparticles: colloid-chemical synthesis and morphology control // Adv. Mater. — 2010. — V.22, N16. — P. 1781–1804.
- <http://www.sciencephoto.com/>
- Демченко О. П., Назаренко В. І. Нанобіотехнологія: шлях у новий мікросвіт, створений синтезом хімії та біології // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, №2. — С. 9–30.
- Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Гончаренко Ю. В., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новий клас матеріалів для біонанотехнології // Там само. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 55–66.
- Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Бурлака А. П., Прилуцький Ю. І. Перспективи використання вуглецевих нанотрубок у протираковій терапії // Онкологія. — 2010. — Т. 12, №1. — С. 5–9.
- Ротко Д. М., Прилуцька С. В., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новітні матеріали для нейроінженерії // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, №5. — С. 9–24.
- Прилуцька С. В., Кічмаренко Ю. М., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Фулерен C₆₀ та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи // Там само. — 2012. — Т. 5, №3. — С. 9–17.
- J. S. Kim, E. Kuk, K. N. Yu, J. H. Kim et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles // Nanomedicine: NBM. — 2007. — V. 3. — P. 95–101.
- Lok C. N., Ho C. M., Chen R. et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities // J. Biol. Inorg. Chem. — 2007. — V. 12. — P. 527–534.
- Rai M., Yadav A., Gade A. Preparation of silver nanoparticles by bio-reduction using *Nigrospora oryzae* culture filtrate and its antimicrobial activity // Biotechnol. Adv. — 2006. — V. 27, N 76. — P. 76–83.
- Thomas V., Yallapu M. M., Sreedhar B. et al. A versatile strategy to fabricate hydrogel-silver nanocomposites and investigation of their antimicrobial activity // J. Coll. Interf. Sci. — 2007. — V. 315. — P. 389–395.
- Menzhun V., Aliieva O. Silver nanoparticles for water disinfection and microbial control // Youth and Progress in Biology: abstracts book of VII International Scientific conference of students and PhD Students (April 5–8, 2011 Lviv). — Lviv, 2011. — P. 163–164.
- Shrivastava S., Bera T., Roy A., et al. Applying nanoparticles in human health // Nanotechnology. — 2007. — V. 18. — P. 225–233.
- Shahverdi A. R., Fakhimi A., Shahverdi H. R., Minaian S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // Nanomedicine. — 2007. — V. 3. — P. 168–170.
- <http://www.reach4life.com/colloidalsilver.htm>
- Прилуцька С. В., Ротко Д. М., Прилуцький Ю. І., Рибальченко В. К. Токсичність

- вуглецевих наноструктур у системах *in vitro* та *in vivo* // Совр. пробл. токсикол. — 2012. — № 3, 4. — С. 1–17.
20. *Герациенко І. І., Васильченко О. А.* Нанотехнології в медицині та фармації // Пробл. екол. біотехнол. — 2012. — № 1. — Режим доступу: <http://jrn1.nau.edu.ua/index.php/ecobiotech/issue/current/showToc>
 21. http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/a95078_eng.pdf
 22. *Yang N., Aoki K.* Voltammetry of the silver alkylcarboxylate nanoparticles in suspension // *Electrochimica Acta*. — 2005. — V. 50. — P. 4868–4872.
 23. *Aslan K., Holley P., Geddes C. D.* Metal-enhanced fluorescence from silver nanoparticle-deposited polycarbonate substrates // *J. Mater. Chem.* — 2006. — V. 16. — P. 2846–2852.
 24. *Ashkarran A. A., Zad A. I., Mahdavi S. M. et al.* Rapid and efficient synthesis of colloidal gold nanoparticles by arc discharge method // *Appl. Physics A: Mater. Sci. Processings*. — 2009. — V. 96, N 2. — P. 423–428.
 25. *Cao J., Hu X.* Synthesis of gold nanoparticles using halloysites // *J. Surf. Sci. Nanotechnol.* — 2009. — V. 7. — P. 813–815.
 26. *Kim J. S.* Antibacterial activity of Ag⁺ ion-containing silver nanoparticles prepared using the alcohol reduction method // *Industr. Engin. Chemi.* — 2007. — V. 13, N 4. — P. 718–722.
 27. *Hanauer M., Lotz A., Pierrat S. et al.* Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size and shape // *Nano Lett.* — 2007. — V. 7, N 9. — P. 2881–2885.
 28. *Birla S. S., Tiwari V. V., Gade A. K. et al.* Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2009. — V. 48. — P. 173–179.
 29. *Gajbhiye M., Kesharwani J., Ingle A. et al.* Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole // *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.* — 2009. — V. 5. — P. 382–386.
 30. *Song J. Y., Kim B. S.* Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts // *Bioproc. Biosyst. Engin.* — 2009. — V. 44. — P. 1133–1138.
 31. *Bar H., Bhui D. K., Sahoo G. P. et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas* // *Coll. Surf. A: Physicochem. Engin. Asp.* — 2009. — V. 339. — P. 134–139.
 32. *Bar H., Bhui D. K., Sahoo G. P. et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas* // *Ibid.* — 2009. — V. 348. — P. 212–216.
 33. *Jha A. K., Prasad K., Prasad K., Kulkarni A. R.* Plant system: nature's nanofactory // *Coll. Surf.: B: Biointerfaces*. — 2009. — V. 73. — P. 219–223.
 34. *Ahmad A., Mukherjee P., Senapati S. et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum* // *Ibid.* — 2003. — V. 28. — P. 313–318.
 35. *Shaligram N. S., Bule M., Bhambure R. M. et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain // *Proc. Biochem.* — 2009. — V. 44. — P. 939–948.
 36. *Mouxing F., Qingbiao L., Daohua S. et al.* Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations // *Chin. J. Chem. Engin.* — 2006. — V. 14, N 1. — P. 114–117.
 37. *Kalishwaralal K., Deepak V., Ramkumarpan-dian S. et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis* // *Mater. Lett.* — 2008. — V. 62. — P. 4411–4413.
 38. *Mukherjee P., Roy M., Mandal B. P. et al.* Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum* // *Nanotechnology*. — 2008. — V. 19. — P. 103–110.
 39. *Chen J. C., Lin Z. H., Ma X. X.* Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of *Phoma* sp 32883 with silver nitrate // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2003. — V. 37. — P. 105–108
 40. *Basavaraja S., Balaji S.D., Lagashetty A. et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum* // *Mater. Res. Bulle.* — 2007. — V. 43, N 5. — P. 1164–1170.
 41. *Fayaz A. M., Balaji K., Girilal M. et al.* Mycobased synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation // *J. Agricult. Food Chem.* — 2009. — V. 57. — P. 6246–6252.
 42. *Singaravelu G., Arockiamary J. S., Ganesh K. V., Govindraju K.* A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville // *Coll. Surf. B: Biointerfaces*. — 2007. — V. 57. — P. 97–101.
 43. *Thakkar K. N., Mhatre S. S., Parikh R. Y.* Biological synthesis of metallic nanoparticles // *Nanomedicine*. — 2010. — V. 6, N 2. — P. 257–262.
 44. *Mohanpuria P., Rana N. K., Yadav S. K.* Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications // *J. Nanopart. Res.* — 2008. — V. 7. — P. 9275–9280.
 45. *Kvistek L., Pucek R.* The preparation and application of silver nanoparticles // *J.*

- Mater. Sci. — 2005. — V. 22. — P. 2461–2473.
46. *Burlaka A., Lukin S., Prylutska S. et al.* Hyperthermic effect of multi-walled carbon nanotubes stimulated with near infrared irradiation for anticancer therapy: *in vitro* studies // *Exp. Oncol.* — 2010. — V. 32, N 1. — P. 48–50.
47. *Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutsky Yu. I. et al.* Pristine C₆₀ fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis // *Ibid.* — 2011. — V. 33, N 3. — P. 162–164.
48. *Prylutska S.V., Burlaka A.P., Klymenko P. P. et al.* Using water-soluble C₆₀ fullerenes in anticancer therapy // *Canc. Nanotechnol.* — 2011. — V. 2, N 1. — P. 105–110.
49. *Prylutska S.V., Burlaka A.P., Prylutsky Yu. I. et al.* Comparative study of antitumor effect of pristine C₆₀ fullerenes and doxorubicin // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 6. — С. 82–87.
50. *Hennebel T., Gusseme B.T., Boon N., Verstraete W.* Biogenic metals in water treatment // *Trends Biotechnology.* — 2009. — V. 27, N 2. — P. 90–98.
51. *Bamberger E. S., Perrett C. W.* Angiogenesis in epithelial ovarian cancer // *Diagn. Mol. Pathol.* — 2002. — V. 55. — P. 348–359.
52. *Bhattacharya R., Mukherjee P.* Biological properties of «naked» metal nanoparticles // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2008. — V. 60. — P. 1289–1306.
53. *Nair L. S., Laurencin C. T.* Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications // *J. Biomed. Nanotechnol.* — 2007. — V. 3. — P. 301–316.
54. *Liu W. T.* Nanoparticles and their biological and environmental applications // *J. Biosci. Bioengin.* — 2006. — V. 102, N 1. — P. 1–7.
55. *Roe D., Karandikar B., Bonn-Savage N. et al.* Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles // *J. Antimicrob. Chemother.* — 2008. — V. 61, N 4. — P. 869–876.
56. *Marazzi M., Angelis A. D., Ravizza A. et al.* Successful management of deep facial burns in a patient with extensive third degree burns: the role of a nanocrystalline dressing in facilitating resurfacing // *Int. Wound J.* — 2007. — V. 4. — P. 8–14.
57. *Prasad K., Jha A. K., Kulkarni A. R.* *Lactobacillus* assisted synthesis of titanium nanoparticles. // *Nano Res. Lett.* — 2007. — V. 2. — P. 248–250.
58. *Balasundaram G., Webster T. J.* Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications // *Nanomedicine.* — 2006. — V. 1, N 2. — P. 169–176.
59. *Laurencin C. T., Kumbar S. G., Nukavarapu S. P.* Nanotechnology and orthopedics: a personal perspective // *Nanotechnol. Nanomed.* — 2008. — V. 1, N 1. — P. 6–10.
60. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/>
61. *Rossi S.* Australian Medicines Handbook. — Adelaide, 2006: Australian Medicines Handbook.
62. *Brakhage A. A.* Molecular Regulation of β -Lactam Biosynthesis in Filamentous Fungi // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2008. — V. 62, N 3. — P. 547–585.
63. *Kirk P.M., Cannon P. F., Minter D. W., Stalpers J. A.* Dictionary of the Fungi (10th ed.). — Wallingford, UK. — 2008. : CABI. P. 505.
64. <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=9257>
65. *Haubrich W. S.* Medical Meanings: A Glossary of Word Origins (2nd ed.). — Philadelphia, Pennsylvania: American College of Physicians, 2003. — P. 175.
66. *Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday G. W.* The Fungi, 2nd edition. — Academic Press, London, 2001. — P. 156.
67. *Kim J. S., Eunye K., Yu K. N.* Antibacterial effects of silver nanoparticles // *Nanotechnology.* — 2007. — V. 3, P. 95–101.
68. *Cho K., Park J., Osaka T., Park S.* The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient // *Electrochim. Acta.* — 2005. — V. 51. — P. 956–960.
69. *Sun R. W., Chen R., Chung N. P. et al.* Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells // *Chem. Commun.* — 2005. — V. 21. — P. 5059–5061.
70. *Duran N., Marcarto P. D., de Souza G. I. et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment // *J. Biomed. Nanotechnol.* — 2005. — V. 3. — P. 203–208.
71. *Grace A. N., Pandian K.* Antibacterial efficacy of aminoglycosidic antibiotics protected gold nanoparticles // *Coll. Surf. A: Physicochem. Engin. Asp.* — 2007. — V. 297. — P. 63.
72. *Saha B., Bhattacharya J., Mukherjee A. et al.* In vitro structural and functional evaluation of gold nanoparticles conjugated antibiotics // *Nanosc. Res. Lett.* — 2007. — V. 2. — P. 614–622.
73. *Selvaraj V., Alagar M.* Analytical detection and biological assay of gold nanoparticles as probe // *Int. J. Pharmaceut.* — 2007. — V. 337. — P. 275–281.

НАНОЧАСТИНКИ СРІБЛА ЯК ПІДСИЛЮВАЧІ ДІЇ ПЕНІЦИЛІНУ

О. А. Васильченко¹
В. В. Сологуб¹
К. К. Васильченко²

¹Національний авіаційний університет,
Інститут екологічної безпеки,
Київ

²Національний медичний університет
ім. О. О. Богомольця, Київ

E-mail: vasilchenko@nau.edu.ua

На цей час зростає значення досліджень бактерицидних наноматеріалів у зв'язку зі збільшенням кількості штамів бактерій, резистентних до більшості сильнодіючих антибіотиків. В огляді подано характеристику наночастинок і способів їх одержання. Розглянуто галузі застосування наночастинок, особливу увагу приділено використанню наночастинок срібла в медицині, зокрема як бактерицидних препаратів. Зазначено, що наночастинок можуть справляти токсичну дію.

Велику увагу приділено застосуванню наночастинок в терапії різних захворювань, наприклад, для спрямованого доставлення ліків, загоєння ран, відновлення кісткової тканини, локального нагрівання пухлин при онкологічних захворюваннях, стимуляції функцій імунної системи, для визначення антитіл, вірусів, бактерій, для фільтрації рідин.

Наведено характеристику пеніцилінів та їхніх продуцентів — *Penicillium* sp. Розглянуто механізм антимікробної дії пеніциліну.

Виявлено, що застосування наночастинок срібла в комбінації з антибіотиками, зокрема з пеніциліном, сприяє посиленню антибактеріальної активності антибіотиків стосовно грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів.

Ключові слова: нанотехнологія, наночастинок срібла, антибіотики, пеніцилін, *Penicillium* sp.

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА КАК УСИЛИТЕЛИ ДЕЙСТВИЯ ПЕНИЦИЛЛИНА

О. А. Васильченко¹
В. В. Сологуб¹
К. К. Васильченко²

¹Национальный авиационный университет,
Институт экологической безопасности,
Киев

²Национальный медицинский университет
им. А. А. Богомольца, Киев

E-mail: vasilchenko@nau.edu.ua

В настоящее время возрастает значение исследованной бактерицидных наноматериалов в связи с увеличением количества штаммов бактерий, резистентных к большинству сильнодействующих антибиотиков. В обзоре дана характеристика наночастиц и способов их получения. Рассмотрены области применения наночастиц, особое внимание уделено использованию наночастиц серебра в медицине, в частности в качестве бактерицидных препаратов. Указано, что наночастицы могут обладать токсическим действием.

Большое внимание уделено применению наночастиц в терапии различных заболеваний, например, для направленной доставки лекарств, заживления ран, восстановления костной ткани, локального нагрева опухолей при онкологических заболеваниях, стимуляции функций иммунной системы, для определения антител, вирусов, бактерий, для фильтрации жидкостей.

Дана характеристика пенициллинов и их продуцентов — *Penicillium* sp. Рассмотрен механизм антимикробного действия пенициллина.

Установлено, что применение наночастиц серебра в комбинации с антибиотиками, в частности с пенициллином, приводит к усилению антибактериальной активности антибиотиков по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам.

Ключевые слова: нанотехнология, наночастицы серебра, антибиотики, пенициллин, *Penicillium* sp.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТОВ В ТЕРАПИИ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРДЦА

А. К. ГУЛЕВСКИЙ, Е. С. АБАКУМОВА, И. И. ЩЕНЯВСКИЙ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: danalado@rambler.ru

Получено 18.04.2012

Рассмотрены перспективы применения в эксперименте и в клинике ишемического повреждения миокарда биологически активных веществ: факторов роста, цитомединов, природных антиоксидантов, веществ, содержащихся в экстрактах из ювенильных и фетальных органов и тканей животных. Наряду с хорошо изученными и широко используемыми в клинической практике биопрепаратами животного происхождения, такими как кордиалин, актовегин, эрбисол, несиритид, энергостим, в качестве перспективных средств для терапии сердечно-сосудистых заболеваний рассматриваются экстракты из сердца и низкомолекулярная фракция кордовой крови.

Показано, что использование тканей эмбриофетоплацентарного комплекса повышает репаративную способность миокарда. Основное отличие таких биопрепаратов как биогенных стимуляторов состоит в том, что в их составе есть сбалансированный комплекс биологически активных веществ, в частности различных активаторов регенерации и дифференциации (факторы роста фибробластов, нервов, фактор, стимулирующий рост макрофагальных и эритроидных колоний), а также антипролиферативных цитокинов, предотвращающих клеточную и системную гиперстимуляцию. Кроме того, фетальные клетки и их ассоциаты практически не иммуногены.

Таким образом, если будут определены факторы роста и дифференциации, способные регулировать митотическую активность кардиомиоцитов, станет возможным направленно инициировать процесс дифференцировки стволовых клеток и воздействовать на регенерацию миокарда человека, а следовательно, оптимизировать лечение инфаркта миокарда.

Ключевые слова: инфаркт миокарда, биологически активные вещества, факторы роста, цитомедины, антиоксиданты, экстракты ткани сердца, кордовой крови, фетальных тканей.

По мнению многих исследователей, клеточная трансплантология является наиболее перспективным методом лечения инфаркта миокарда (ИМ). Несмотря на то, что истинный регенеративный потенциал стволовых клеток (СК) костного мозга (КМ) по-прежнему противоречив, во многих доклинических и клинических исследованиях было показано, что введение СК КМ способно привести к небольшому, но воспроизводимому увеличению сердечной функции [1]. Следовательно, в сердце содержатся клетки, которые могут образовывать новые кардиомиоциты (КМЦ) после ИМ, но в недостаточном количестве, либо они недостаточно активированы, чтобы вызвать достаточную регенерацию.

Альтернативным подходом к пересадке клеток-предшественников в сердце может явиться использование биопрепаратов, содержащих биологически активные веще-

ства (пептидов, ростовых факторов, веществ, содержащихся в экстрактах из фетальных и ювенильных тканей животных, природных антиоксидантов), которые улучшают функции сердца после ИМ.

Использование биологически активных протеинов для лечения инфаркта миокарда

С появлением биотехнологии были открыты протеины, обладающие терапевтическим потенциалом для восстановления функции сердца после ИМ. Показано, что эти протеины улучшают функции сердца при применении их в экспериментальных моделях ИМ. Выделяют четыре класса таких протеинов (рис. 1) [2]:

А) *Протеины, индуцирующие ангиогенез.* Лечение ИМ с помощью факторов роста кровеносных сосудов (рис. 1, А) — фактора

роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов (FGF), как показали доклинические исследования, может индуцировать ангиогенез, т. е. увеличивать кровоснабжение сердца и сохранять его функцию после ИМ [3]. Однако при использовании в эксперименте и клинической практике оба фактора роста вызывали опосредованную оксидом азота гипотензию при введении в коронарные артерии как у свиней [4], так и у человека [4, 5], ограничивая максимально вводимую дозу до 50 нг/кг/мин [5]. Кроме того, недостатками факторов роста кровеносных сосудов, ограничивающими их применение в клинике, являются следующие: 1) формирование aberrантных и вытекающих сосудов [5–7] (образование стабильных, не вытекающих сосудов требует согласованных действий различных ростовых и антиангиогенных факторов, например ангиопоэтинов [8], достижение чего является сложной задачей в процессе разработки лекарственного средства); 2) наличие многих изоформ VEGF, связывающихся с различными рецепторами [6, 9, 10], вызывает вопрос, имеет ли определенная изоформа лучший по сравнению с другими профиль фармакокинетики/фармадинамики для лечения ИМ; 3) стимуляция FGF и VEGF митоза различных типов клеток может обусловить рост опухоли [4, 6]; 4) необходи-

мость разработки методов адресной доставки FGF и VEGF в ишемизированный миокард с целью ограничения их побочных эффектов [11].

Плацентарный фактор роста (PlGF) также стимулирует ангиогенез и рост коллатералей в ишемизированных тканях [12–14]. Экспрессия PlGF повышается при ИМ [12]. Внутрисердечная доставка PlGF после обширного экспериментального ИМ у крыс приводила к расширению границ зоны ангиогенеза, увеличению фракции выброса, улучшению функции сердца [15]. Кроме того, PlGF может быть маркером сосудистого воспаления. Было показано, что уровень PlGF в плазме повышается в зависимости от тяжести сердечной недостаточности (CH) [13].

Терапевтический потенциал PlGF и участие его рецептора Flt1 в ангиогенезе изучены недостаточно. Показано, что антитела против Flt1 подавляли неоваскуляризацию в опухолях и ишемизированной сетчатке, уменьшали рост атеросклеротических бляшек [14]. Подавление рецептора VEGF-Flk1 не влияло на атеросклероз, что свидетельствует о недостаточной степени ингибирования Flk1-управляемого ангиогенеза для остановки прогрессирования заболевания. Противовоспалительное действие антител против Flt1 обусловлено снижением мобилизации костномозговых клеток-предшественников миелоидного ряда в периферическую кровь и инфильтрацией лейкоцитов, экспрессированных Flt1, в воспаленные ткани, а также нарушением активации миелоидных клеток. Следовательно, PlGF и Flt1 можно использовать для модуляции ангиогенеза и ингибирования воспаления [14].

Для терапевтической коррекции ангиогенеза необходимо введение факторов, которые дополняют друг друга. Известно, что PlGF может модулировать активность VEGF — самого мощного из всех ангиогенных индукторов [12, 16], регулируя меж- и внутримолекулярные взаимодействия между VEGF-тирозин-киназными рецепторами Flt1 и Flk1. Активация Flt1 с помощью PlGF приводит к межмолекулярному трансфосфорилированию Flk1, усиливая тем самым VEGF-управляемый ангиогенез через Flk1. Хотя как VEGF, так и PlGF связывают Flt1, PlGF однозначно стимулирует фосфорилирование специфических тирозиновых остатков Flt1 и экспрессию различных генов-мишеней. Кроме того, гетеродимер VEGF/PlGF активирует внутримолекулярный VEGF-рецептор перекрестно через формирование гетеродимеров Flk1/Flt1. Следует отметить,

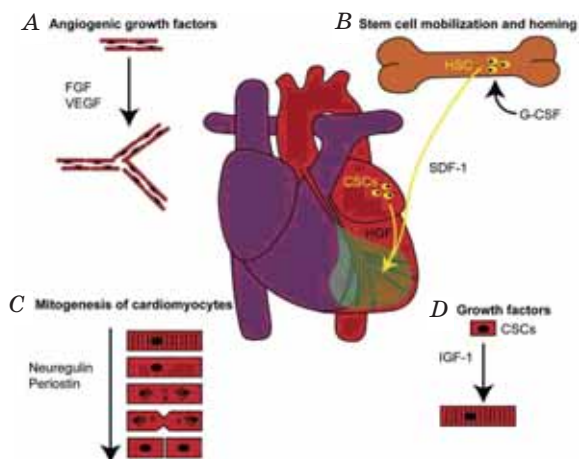


Рис. 1. Регенерация ткани сердца четырьмя различными классами протеинов:

- A** — FGF и VEGF индуцируют ангиогенез;
B — G-CSF мобилизует гемопоэтические СК КМ; SDF-1 индуцирует эндотелиальные прогениторные клетки, HGF — СК сердца;
C — нейрегулин и периостин могут индуцировать деление взрослых кардиомицитов;
D — IGF-1 способствует созреванию и дифференцировке СК сердца

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2967710/figure/F1/>]

что лечение гетеродимером VEGF/PlGF или комбинацией VEGF и PlGF увеличивало ангиогенез при экспериментальном ИМ у мышей, чего не наблюдалось при использовании только VEGF [16].

Снижение повреждения миокарда после экспериментального ИМ было показано после использования эритропоэтина, основного регулятора эритропоэза. Как известно, рецепторы эритропоэтина экспрессируются также в некроветворных тканях, в том числе во взрослом миокарде человека и эндотелиальных сосудистых клетках [17, 18].

Введение одной дозы экзогенного эритропоэтина на моделях ИМ у грызунов, кроликов, собак приводило к уменьшению размера ИМ, снижению посттравматического ремоделирования желудочка и сохранению его насосной функции [19, 20]. Эти эффекты объясняются эритропоэтинопосредованным снижением апоптотической гибели клеток, повышенной мобилизацией циркулирующих костномозговых эндотелиальных клеток-предшественников, увеличением ангиогенеза в преинфарктной ишемической зоне [19–21].

Было проведено проспективное плацебо-контролируемое, рандомизированное, двойное слепое клиническое испытание безопасности, эффективности и механизма действия рекомбинантного человеческого эритропоэтина (rHuEpo) у 44 пациентов с острым ИМ [19]. rHuEpo вводили внутривенно (200 ЕД/кг ежедневно в течение 3 дней), пациенты получали также аспирин и клопидогрель после успешного чрескожного коронарного вмешательства. Было показано увеличение синтеза сигнальных протеинов ангиогенеза в мононуклеарных клетках периферической крови по сравнению с плацебо: rHuEpo значительно повышал экспрессию рецепторов эритропоэтина, эндотелиального сосудистого фактора роста Flt-1 и фосфорилировал фосфатидилинозитол 3-киназу в мононуклеарных клетках периферической крови.

Б) Протеины, увеличивающие набор клеток-предшественников в сердце. Привлечение клеток-предшественников в место повреждения при помощи колониестимулирующих ростовых факторов — гранулоцитарного и гранулоцитмакрофагального [1, 22, 23] рассматривается в качестве возможной альтернативы трансплантации клеток (рис. 1, В).

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) стимулирует пролиферацию гемопоэтических СК. Впервые Orlic

и соавт. [24] применили мобилизацию аутологичных СК посредством подкожного введения мышам G-CSF и фактора стимуляции КМ непосредственно перед созданием очага ишемии миокарда и в течение нескольких дней после экспериментального ИМ. Удалось продемонстрировать превращение этих клеток в миоциты, артериолы и капилляры, что сочеталось с резким ограничением очага ИМ, уменьшением степени дилатации левого желудочка и увеличением фракции выброса (рис. 2, 3). При этом концентрация СК в периферической крови мышей под влиянием ростовых факторов возрастала в 240 раз.

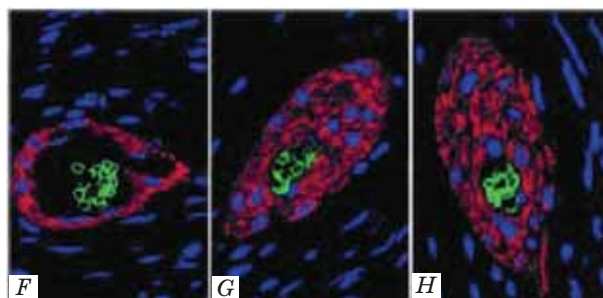


Рис. 2. Регенерация миокарда: артериолы с эритроцитами, мембраны которых мечены TER-119 (зеленая флуоресценция); ядра окрашены йодидом пропидия (синяя флуоресценция); α -актин клеток гладких мышц (красная флуоресценция).
Ув.: F $\times 800$; G и H $\times 1200$
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC56963/?tool=pubmed>]

Было выполнено много исследований возможной миграции циркулирующих в крови СК КМ в миокард и их дифференцировки в КМЦ [25–28]. Для увеличения количества циркулирующих в крови СК КМ после экспериментального ИМ у мышей использовали курс инъекций рекомбинантного G-CSF и фактора стволовых клеток. Через 27 сут после ИМ у животных регистрировали снижение на 68% летальности, уменьшение на 48% очага некроза, а также на 26% дилатации полости левого желудочка [29]. Одновременно было отмечено увеличение количества новых КМЦ, артериол и капилляров. Эти данные подтвердили возможность миграции после ИМ аутологичных СК из КМ в зону инфаркта и включение их в постинфарктную регенерацию миокарда.

Проведенные клинические испытания (385 пациентов) показали, что терапия с G-CSF является безопасной и оказывает незначительное влияние на функцию сердца [30]. Было установлено увеличение на

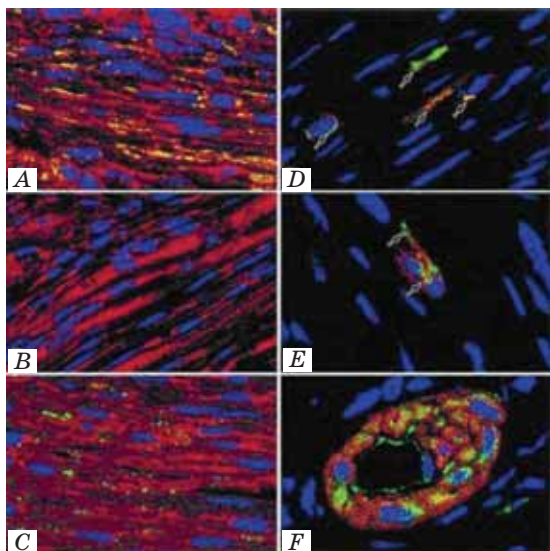


Рис. 3. Маркеры дифференциации сердечных клеток (A–F):

маркировка миоцитов нестиномом (A, желтый), десмином (B, красный) и коннексином 43 (C, зеленый). Красная флуоресценция (A, C) соответствует сердечному миозину; желто-зеленое свечение (D) отражает маркировку фетальной печеночной киназой (FLK-1) эндотелиальных клеток и VE-кадгерина (E); красная флуоресценция (D, E) соответствует фактору VIII в эндотелиальных клетках. Зеленое свечение (F) отражает маркировку цитоплазмы гладкомышечных клеток и эндотелиальной выстилки по FLK-1; красная флуоресценция соответствует α -актину гладких мышц, синяя — мечение ядер пропидия йодидом.

Ув.: A, E $\times 1200$; B, F $\times 800$; C $\times 1400$; D $\times 1800$.
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC56963/?tool=pubmed>]

4,75% фракции выброса, если терапия с G-CSF была начата в течение 37 ч после ИМ [30]. Однако потенциал миогенной дифференциации гемопоэтических СК, мобилизованных G-CSF, спорный и, как принято считать, низкий [23]. Кроме того, G-CSF оказывает антиапоптотическое действие на КМЦ после ИМ [31], что подтверждается улучшением фракции выброса при лечении G-CSF в ранние сроки после ИМ, в то время как в конце лечения это не происходит [30].

Влияние G-CSF на гемодинамический и нейрогуморальный статус пациентов, а также безопасность его применения в дополнение к стандартной терапии ИМ изучали в работе [1]. Использовали рекомбинантный человеческий G-CSF (препарат нейпоген, Hoffmann La Roche), который при введении подкожно или внутривенно стимулирует пролиферацию и дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников. Было показано, что G-CSF индуцирует неангиогенез, что создает благоприятные

условия для улучшения метаболизма ткани, повышения общей сократимости и улучшения гемодинамики в целом. Маркером выхода в кровоток СК был лейкоцитоз, с интенсификацией которого повышались концентрация СК в области повреждения и шансы на успешный неомиоцитогенез и/или неангиогенез.

Помимо возможного неангиогенеза нельзя исключить наличия иных механизмов действия G-CSF: он является цитокином с целым комплексом малоизученных гормональных эффектов на уровне металлопротеаз, молекул адгезии и т. д. Следует отметить, что до сих пор непонятен непосредственный механизм стимуляции выхода СК из КМ под влиянием G-CSF, поскольку СК не имеют рецепторного аппарата, чувствительного к G-CSF [24]. Авторы отмечают, что проведенное исследование не может служить доказательством связи терапии G-CSF с положительными гемодинамическими и клиническими изменениями, однако позволяет надеяться, что такая связь существует.

Фактор роста гепатоцитов (HGF) — митогенный ростовой фактор для гепатоцитов [32], проявляющий также хемотаксическое и антиапоптотическое действие на нескольких типах клеток [33]. Внутривенное введение HGF после ишемии/реперфузии у крыс уменьшало апоптоз КМЦ и размер ИМ, улучшало сердечную функцию [34] с помощью различных механизмов: привлечения клеток-предшественников [35], ангиогенеза [36] и антиапоптоза [34]. Остается неясным, какой из них наиболее важен для оказания кардиопротекторного эффекта HGF.

HGF может также влиять на функции сердца после ИМ с помощью хемотаксического воздействия на сердечные клетки-предшественники. Тирозинкиназный рецептор HGF — c-Met — представлен в различных популяциях сердечных СК, включая c-Kit+ [37] и Sca-1+ [38]. Было показано что HGF является хемотаксическим для c-Kit+ сердечных СК [35] и увеличивает образование новых КМЦ при введении в инфарктированный миокард вместе с инсулиноподобным фактором роста-1 [35]. Но для клинического применения протеина необходимо четко определить основной механизм его действия и фармакокинетические свойства.

Фактор роста стромальных клеток-1 (SDF-1) — небольшой протеин (68 аминокислот) из семейства хемокинов, обладающий способностью привлекать эндотелиальные клетки-предшественники [39]. Экспрессия SDF-1 увеличивается после ИМ. Ранние

исследования с использованием методов генной терапии [40] показали, что устойчивая локальная концентрация SDF-1 после острого ИМ увеличивает плотность сосуда и улучшает сердечную функцию, но этого недостаточно, чтобы вызвать значительное увеличение регенерации сосудов. Однако SDF-1 быстро инактивируется матриксными металлопротеиназами (ММП), включая ММП-2, активность которой повышается после ИМ, а также DPPIV/CD26. Поэтому был разработан вариант SDF-1, называемый SSDF-1(S4V), с валином для замещения серина в положении 4, который защищает от расщепления ММП-2, и с дополнительным серином на N-конце, защищающим против DPPIV (protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell) [41].

Способность SDF-1 действовать как хемотаксический фактор для эндотелиальных клеток-предшественников [39] не только делает его мощным индуктором ангиогенеза, но и может ограничить побочные эффекты при использовании в качестве терапевтического средства. Например, VEGF также индуцирует ангиогенез, но его высокая локальная концентрация может вызвать неконтролируемую пролиферацию эндотелиальных клеток с образованием извилистых и структурно ненормальных сосудов [7, 26].

В) Протеины, индуцирующие митоз КМЦ. Известно, что обновление КМЦ происходит во взрослом сердце [42], но с гораздо меньшей скоростью, чем в неонатальном или во взрослом некоторых позвоночных [43, 44]. Недавние исследования показали, что некоторые протеины, в частности периостин [44] и нейрегулин [45], могут индуцировать повторное включение взрослых КМЦ в клеточный цикл (рис. 1, С).

Периостин — протеин внеклеточного матрикса с молекулярной массой 90 кДа. Он синтезируется фибробластами и играет важную роль в процессе развития сердца [46]. Синтез периостина во взрослом сердце минимален, но повышается после травм, в том числе после ИМ [46], где протеин участвует в ремоделировании внеклеточного матрикса. Дефицит периостина у мышей показал дефектное формирование рубца, что приводило к повышенной частоте желудочковых разрывов в первые дни после ИМ [47]. Kuhn et al. показали, что доставленный в инфарктированный миокард крыс периостин улучшал функцию сердца после ИМ, уменьшал формирование рубца и ремоделирование неинфарктированного миокарда [44]. При этом протеин индуцировал возвращение

в клеточный цикл от 0,6 до 1% КМЦ в пограничной зоне ИМ.

Другим протеином, представляющим интерес в качестве возможного митогена для КМЦ, является нейрегулин. Нейрегулины связаны с эпидермальным фактором роста. Воздействуя на семейство трансмембранных рецепторов ErbB, они стимулируют рост, пролиферацию и дифференцировку разных типов клеток, в том числе и КМЦ. Во взрослом сердце нейрегулин в основном синтезируется в эндотелиальных клетках, стимулирует выживание и гипертрофию КМЦ [48]. Bersell et al. показали, что нейрегулин может вызвать повторное включение КМЦ взрослых мышей в клеточный цикл [45]. Ежедневное внутривенное введение нейрегулина в дозе ~0,1 мг/кг повышало функцию сердца после ИМ с уменьшением размера инфаркта [45]. Авторы показали, что это было связано с распространением существующих КМЦ, а не с уменьшением их апоптоза или увеличением дифференцировки клеток-предшественников.

Теоретически такие протеины, как периостин и нейрегулин, стимулирующие митоз КМЦ, которые сохранились в пограничной зоне, могут частично восстановить повреждение, нанесенное при ИМ. Однако для клинического применения этих протеинов необходимо прежде всего обеспечить их специфичность для КМЦ, что предотвращает образование и рост опухолей в других тканях. Промитотические протеины должны быть специфичны не только для КМЦ в целом, но также для КМЦ в пограничной зоне ИМ, поскольку маловероятно, что бесконтрольная пролиферация КМЦ в удаленной зоне, ведущая к гиперплазии миокарда и, следовательно, к неблагоприятному ремоделированию, принесет пользу функции миокарда в течение ИМ. Кроме того, формирование новых КМЦ путем либо митоза, либо дифференциации СК несет повышенный риск возникновения желудочковых аритмий. Присущая же КМЦ специфичность даст возможность доставлять протеин системно, без привлечения более сложных местных механизмов доставки.

Г) Протеины, индуцирующие рост и дифференциацию стволовых клеток и кардиомиоцитов. Кроме привлечения мультипотентных клеток-предшественников в поврежденный миокард, важной целью терапевтической регенерации сердца являются выживание, рост и дифференциация СК [23] (рис. 1, D). Инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), будучи одним из

ключевых протеинов при развитии сердечной мышцы, индуцирует пролиферацию и выживание сердечных стволовых и прогениторных клеток и улучшает сердечную функцию [49, 50]. Было показано, что добавление IGF-1 к трансплантированным клеткам способствует созреванию СК в увеличенные миоциты по сравнению с трансплантацией только СК [49].

Для устранения трудностей, возникающих при клеточной терапии ИМ (плохая приживляемость, выживаемость и дифференцировка клеток), было разработано биотинилированное самособирающееся пептидное нановолокно для длительной доставки IGF-1 в миокард [50]. Оно представляет собой олигопептиды, состоящие из чередующихся гидрофильных и гидрофобных аминокислот. При воздействии физиологических осмолярности и pH пептиды быстро собираются в маленькие нановолокна (≈ 10 нм), которые могут быть введены в миокард в форме 3D-клеточного микроокружения. Биотинилированный IGF-1 соединяется в комплекс с четырехвалентным стрептавидином и затем связывается с биотинилированными самособирающимися пептидами, что делает возможным связывание IGF-1, но не препятствует самосборке пептидов в нановолокна в миокарде.

Связанный с пептидным нановолокном IGF-1 снижал активацию расщепления каспазой-3 и повышал экспрессию сердечного тропонина I в КМЦ. После введения в миокард крыс нановолокна обеспечивали устойчивую доставку IGF-1 в течение 28 дней. В сочетании с пересаженными КМЦ доставка IGF-1 нановолокнами снижала расщепление каспазой-3 на 28% и повышала площадь поперечного сечения КМЦ на 25% по сравнению с клетками, введенными без нановолокон [50]. Подобная клеточная терапия улучшала систолическую функцию после экспериментального ИМ, подтверждая, что создание локального микроокружения может улучшить эффективность клеточной терапии.

Важную роль в дифференциации эмбриональных СК (ЭСК) в КМЦ играют трансформирующий фактор роста β и фактор фибробластов [51]. Однако для качественной дифференциации ЭСК в КМЦ необходимо достижение устойчивого баланса, т. е. хорошо организованного пространственного и временного распределения различных протеинов, что является основным препятствием для использования их в качестве терапевтического средства для регенерации сердца

[51]. Кроме того, действие этих протеинов на резидентные сердечные СК практически неизвестно, и маловероятно, что местное или системное управление одним из них вызовет значительную дифференциацию СК сердца.

Использование цитомединов в терапии инфаркта миокарда

Описаны исследования выделенных из различных органов пептидных биорегуляторов — цитомединов или «клеточных медиаторов», осуществляющих перенос информации, необходимой для нормального функционирования, развития и взаимодействия клеток. В норме эти соединения регулируют физиологические процессы, связанные с защитными функциями и развитием организма, — репаративные процессы, клеточные иммунные реакции, гемопоэз, гемокоагуляцию и др. [52, 53]. Цитомедины не только обладают специфической активностью, но и оказывают неспецифическое действие. Показано, что в условиях патологии препараты цитомединов избирательно восстанавливают нарушенные функции клеток и органов, из которых они выделены. Это сопровождается усилением экспрессии мембранных рецепторов, изменением внутриклеточного содержания циклических нуклеотидов, повышением интенсивности процессов биосинтеза.

Основное действие цитомединов, выделенных из сердца, заключается в стимуляции репаративных процессов в миокарде, поврежденном введением больших доз изопротеренола или наложением лигатуры на коронарные артерии. При этом отмечено их влияние на течение метаболических процессов в миокарде [52, 54].

В работе [55] изучали возможность коррекции биоэнергетики КМЦ в условиях гипоксии и ишемии препаратом кордиалин, выделенным из сердца крупного рогатого скота. Кордиалин представляет собой комплекс регуляторных пептидов с молекулярной массой 1–10 кДа, полученных методом кислотной экстракции и последующей гель-фильтрации на сефадексе G-25 [53]. Препарат, как было показано, не проявляет своего действия в норме, но способен восстанавливать функцию поврежденного миокарда [54, 56].

На суспензии КМЦ крыс, криостатных срезах и в гомогенатах миокарда, находящихся в гипоксических условиях, было показано, что пептиды кордиалина ингибируют патологически активированную в условиях недостатка кислорода сукцинат-

дегидрогеназу и интенсифицируют окислительные энергетически более выгодного субстрата НАДН₂, тем самым оказывая благоприятное действие на энергетический метаболизм, о чем свидетельствует увеличение содержания АТФ в миокарде. Коррекция кордиалином биоэнергетики КМЦ, находящихся в условиях гипоксии и ишемии, предотвращает аккумуляцию липидных капель в клетках околоинфарктной зоны, свидетельствующих о высокой интенсивности протекания процессов β-окисления жирных кислот. В результате отпадает необходимость в активации гликолиза (что подтверждается высоким содержанием гликогена в миокарде и низкими концентрациями глюкозы и лактата в крови), а следовательно, предотвращаются последствия, вызываемые ацидозом [55, 56].

Таким образом, кардиопротекторное действие пептидного препарата выражается в замедлении формирования зоны некроза после коронароокклюзии, прежде всего за счет оптимизации процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях [55]. Кроме того, терапия кордиалином, начатая в ранние сроки после экспериментального ИМ, значительно ослабляет ишемическое повреждение околоинфарктной зоны, стимулирует репаративные процессы в ней, что приводит к сохранению жизнеспособности КМЦ и нормализации их ультраструктуры, препятствуя расширению границ инфаркта [57].

Следует отметить отсутствие токсичности у этого препарата, поскольку терапевтическая и токсическая дозы отличаются более чем в 800 раз (при определении острой токсичности на мышах). Поскольку кордиалин способствует внутриклеточной регенерации поврежденных КМЦ, предполагается его непосредственное или опосредованное действие на процессы биосинтеза протеинов и нуклеиновых кислот [56].

Изучение ангиопротекторных свойств цитомедина, выделенного из аорты крупного рогатого скота — полипептидной фракции с молекулярной массой до 10 кДа, проводили в условиях моделирования различных видов атероартериосклероза и аутоиммунного васкулита [58].

Введение полипептидной фракции аорты как при пероксидном, так и холестероловом экспериментальном атероартериосклерозе способствовало нормализации липидного спектра крови (что проявлялось в снижении содержания холестерина и атерогенных липопротеидов), пероксидных процессов, коагуляционного гемостаза, восстановле-

нию эластического каркаса и состояния клеточных элементов стенки аорты. В стенке аорты также наблюдалось уменьшение накопления холестерина [58].

При экспериментальном аутоиммунном васкулите фракция аорты вызывала нормализацию вышеуказанных показателей крови и морфофункционального состояния стенки аорты. Восстанавливались функциональная активность и количественное соотношение лейкоцитов крови и снижалась гематогенная клеточная инфильтрация стенки аорты [58].

Было показано, что фракция полипептидов 1–10 кДа, выделенная из ткани мозга холодоадаптированного животного — якутской лошади, оказывает выраженное кардиотропное действие. Введение этой фракции животным за 1 ч до извлечения сердца приводило к улучшению параметров перфузии, что выражалось в снижении сопротивляемости сосудов сердца и стабилизации внешней мембраны КМЦ, а также сохранении способности миокарда к сокращению после 36-часовой гипотермической перфузии [59]. Кроме того, эта фракция, выделенная в зимний период, в диапазоне концентраций от 10 мг/мл до 0,3 мг/мл вызывала снижение скорости пассивного транспорта ионов Ca²⁺ и увеличение скорости активного транспорта в инвертированных везикулах сарколеммы КМЦ при физиологической концентрации кальция в среде инкубации [58–60].

Проводится работа по изучению структуры и биологического действия пептидов, синтезируемых КМЦ предсердий — кардиолатина и натрийуретического пептида (НУП) [61], которые играют важную роль в становлении кардиоваскулярного гомеостаза. Исследования экстрактов предсердий показали, что биологической активностью этих пептидов обладают соединения различной молекулярной массы — от 3 до 44 кДа. Биологическая активность пептидов предсердий проявляется через рецепторный аппарат базолатеральных мембран почек, эндотелия и клеток гладкой мускулатуры артерий, коры надпочечников, гипофиза. Действие НУП направлено главным образом на усиление диуреза и экскреции электролитов почками, а кардиолатина — на расслабление гладкой мускулатуры артерий.

Было установлено, что СН сопровождается значительным (в 10 раз) увеличением синтеза НУП как в периферической крови, так и в крови правого предсердия, что блокирует активность циркулирующего звена

ренинангиотензинальдостероновой системы и улучшает состояние больных. При лечении концентрация этого пептида снижается параллельно с уменьшением отечности и достигает нормального уровня при исчезновении отеков и улучшении сердечной деятельности [62]. В настоящее время проходит клиническое исследование препарат несиририд, представляющий собой НУП, структурно идентичный эндогенному мозговому НУП человека. Действие препарата направлено на потенцирование эффектов данного пептида. Применение несиририда при СН вызывало быстрое дозозависимое вазодилатирующее действие; при внутривенном введении быстро и значительно снижалось давление в концевых легочных капиллярах по сравнению с внутривенным введением нитроглицерина [63].

Использование в терапии инфаркта миокарда экстрактов фетальных и ювенильных органов и тканей животных

Известно, что продукты лизиса различных клеток и тканей, экстракты и гомогенаты из нативных и обработанных разными способами тканей стимулируют рост и интенсифицируют функции клеточных систем [64, 65]. Было показано, что продукты деструкции содержат вещества, являющиеся биостимуляторами и обладающие в основном не тканеспецифическим действием. Функциональный эффект продуктов лизиса клеток связывают с массивным выходом энзимов и других активных факторов, которые секретируются живыми клетками, в том числе и медиаторов, а также образованием большого количества физиологически активных продуктов из разрушенных клеточных компонентов — цитоплазматических и ядерных протеинов, полипептидов и аминокислот, нуклеотидов, фосфолипидов и т. д. Лизосомальные кислые гидролазы и нейтральные протеиназы, выходящие в большом количестве в ткани при массивном разрушении лейкоцитов и макрофагов, а также протеазы тучных клеток существенно и многогранно влияют на клеточные системы, в частности способны усиливать регенерацию.

Экстракты, полученные из здоровых фетальных и ювенильных органов и тканей животных, обладают еще одним положительным свойством. Их действие основано на принципе гомологичности или органо-тканевого подобия: например, фетальный экстракт, выделенный из органа животного,

кумуляруется в гомологичном органе человека и оказывает на него прямое влияние независимо от способа введения [66]. За раскрытие механизма этого эффекта, называемого органным тропизмом, американский исследователь Г. Блобель в 1999 г. был удостоен Нобелевской премии по медицине.

Органопрепараты — своего рода биомолекулярный эталон для гомологичных тканей и органов человека, несущий специфику биомолекул, характерную для каждой ткани. Этот эталон отражает естественный баланс биомолекул, их соотношение между собой, а также различные химические составляющие (в виде лигандов, солей, ионов и т. п.), характеризующие ткань или орган, что невозможно создать искусственным путем. Все это обеспечивает максимальную эффективную усвояемость (быстрое и качественное включение в метаболизм) компонентов препарата и быстрое воздействие на физиологические процессы поврежденной или патологически измененной клетки [66].

В связи с этим перспективным направлением стала разработка кардиопротекторных и биостимулирующих препаратов, действие которых направлено на поддержание оптимального режима биоэнергетических процессов в условиях гипоксии и ишемии, что является принципиальным моментом выживания КМЦ при ИМ [67–69].

Известным природным источником био-препаратов, способных улучшать метаболизм в сердечной мышце, является кровь молочных телят. В настоящее время одним из наиболее изученных биопрепаратов является актовегин (Nycomed, Австрия) — высокоочищенный беспротеиновый гемодериват, получаемый из крови молочных телят методом ультрафильтрации. Он содержит физиологически активные вещества с молекулярной массой до 5 кДа: аминокислоты, олигопептиды, нуклеозиды, продукты углеводного и жирового обмена (олигосахариды, гликолипиды), электролиты (Mg, Na, Ca, P, K) и микроэлементы (Si, Cu).

Фармакологическое действие Актовегина основано на улучшении транспортировки и утилизации глюкозы в сочетании со стимуляцией поглощения клетками кислорода, в результате чего повышается обмен высокоэнергетических фосфатов (АТФ), активируются энзимы окислительного фосфорилирования (пируват- и сукцинатдегидрогеназы, цитохром с-оксидаза), повышается активность щелочной фосфатазы, ускоряется синтез углеводов и протеинов, возрастает приток

в клетку ионов K^+ , что приводит к активации калийзависимых энзимов — каталаза, сахараз, глюкозидаз, ускоряется распад продуктов анаэробного гликолиза — лактата, β -гидроксibuтирата [67, 70].

Клинические исследования влияния актовегина на течение острого ИМ показали необходимость включения его в комплексную терапию этого заболевания в качестве активного метаболита [67]. Антигипоксический эффект актовегина при лечении ИМ выражался в снижении потребления миокардом кислорода в результате уменьшения периферического сопротивления и улучшения утилизации глюкозы и кислорода. Применение актовегина в комплексной терапии ИМ [67] способствовало снижению частоты осложнений острого периода, ранней летальности, а также более быстрой нормализации сократительной способности миокарда левого желудочка, благоприятно влияло на метаболизм липидов. Вследствие действия актовегина наблюдалось улучшение микроциркуляции, связанное с оптимизацией аэробного обмена сосудистого эндотелия, способствующего высвобождению вазодилататоров — простаглицлина и оксида азота. Антиоксидантное действие биопрепарата обусловлено его высокой супероксиддисмутазной активностью, наличием магния и микроэлементов, входящих в простетическую группу супероксиддисмутазы (СОД) [67].

В работе [71] показано, что экстракт из миокарда молодых животных и ионы Ca^{2+} осуществляют позитивный контроль размножения культивируемых мышечных клеток сердца, в то время как вытяжка из миокарда зрелых особей, напротив, подавляет синтетическую способность КМЦ.

Ткани эмбриофетоплацентарного комплекса содержат большое количество различных активаторов регенерации и дифференциации: факторы роста фибробластов и нервов, фактор, стимулирующий рост макрофагальных и эритроидных колоний, а также антипролиферативные цитокины, предотвращающие клеточную и системную гиперстимуляцию. Фетальные клетки и их ассоциаты практически не иммуногенны, поскольку в 1-м и 2-м триместрах гестации на них не экспрессированы протеины гистосовместимости 1-го и 2-го класса. В связи с этим изучается возможность использования в терапии ишемического повреждения миокарда продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса, в частности экстрактов и ткани плаценты. Плацента является естественным депо и продуцентом практически всего спек-

тра биологически активных веществ, обеспечивающих рост и развитие организма плода: гормонов, витаминов, иммуностимуляторов, цитокинов, интерлейкинов, ростовых факторов, природных антиоксидантов [72, 73]. Установлено, что при использовании экстракта плаценты повышается репаративная способность миокарда, улучшается трофика сердечно-сосудистой системы [73, 74]. Эффективность такой терапии связывают с наличием в экстракте плаценты (препарат «Криоцелл-криоэкстракт плаценты») α -фетопротейна (229 ± 75 МЕ/мл), хорионического гонадотропина ($26,8 \pm 8$ мМЕ/мл), эстрадиола (755 ± 48 МЕ/л), прогестерона (226 ± 1 нМ/мл), пролактина (705 ± 129 мМЕ/л), тестостерона (160 ± 25 нМ/л) [47]. Клинический эффект после введения экстракта плаценты сохраняется на протяжении трех месяцев [73, 75].

Наблюдался дозозависимый эффект влияния водно-солевого экстракта плаценты на скорость поглощения кислорода и энергетическое состояние митохондрий миокарда [76, 77]. Замедление синтеза АТФ при повышении дозы препарата плаценты может быть вызвано высоким содержанием макроэргических соединений, в частности АТФ, что при отрицательной обратной связи оказывает регулирующий эффект, выражающийся в снижении потребления кислорода митохондриями.

Показана эффективность использования при лечении ишемических повреждений и атеросклероза фрагментов ткани плаценты (биопрепарат «Криоплацента»). В комплексной терапии ишемической болезни сердца (ИБС) применение фрагментов ткани плаценты способствовало снижению холестерина в сыворотке крови на 19,2%, что, в свою очередь, на 38% снижало уровень риска дальнейшего развития заболевания [73].

Было показано антиатерогенное действие аллогенной криоконсервированной плаценты (АКП) при экспериментальном атеросклерозе [78]. Введение АКП на фоне регресса экспериментального атеросклероза ускоряло процесс нормализации показателей липидного обмена, приводило к восстановлению структурно-функциональной целостности эндотелия, вызывало стимуляцию системы мононуклеарных фагоцитов и активацию механизма лейкоцитарного клиренса липидов из сосудистой стенки. Благодаря введению АКП неангиогенез происходил не только в миокарде, но и в стенке аорты, что способствовало ускоренному обратному развитию атеросклероза. По

мнению автора, антиатерогенные эффекты АКП достигаются за счет действия эстрадиола и тироксина, которые стимулируют рецепторзависимый катаболизм липопротеидов низкой плотности и блокируют синтез липопротеидов очень низкой плотности.

Путем трансплантации криоконсервированной плацентарной ткани показана также возможность влияния на процессы гемокоагуляции при ишемии сердечной мышцы [63, 79]. Трансплантация плаценты на фоне базисной терапии ИБС способствовала снижению частоты приступов стенокардии, уменьшению дозы приема нитроглицерина, оказывала выраженное стимулирующее влияние на систему гемостаза, а также эндотелий коронарных сосудов [75]. Были выявлены изменения липидного обмена: через 3 месяца лечения снижался уровень β -липопротеидов, повышался уровень холестерина и β -липопротеидов высокой плотности. Наблюдалось снижение ПОЛ, а также активация каталазы и СОД. Возможно, повышение активности каталазы является адаптивно-компенсаторным процессом, связанным с увеличением продукции пероксида водорода, который разрушает мембраны эритроцитов и способствует гемолизу. Кроме того, эстрогены, уровень которых в плацентарной ткани составляет 755 ± 48 МЕ/л, способны активировать каталазу.

В клинике внутренних болезней используют биопрепарат эрбисол, представляющий собой раствор продуктов гидролиза клеточных мембран эмбриональной ткани куриных зародышей [80]. Он содержит комплекс непротеиновых низкомолекулярных органических соединений негормонального происхождения: аминокислоты, пептиды, гликопептиды, нуклеотиды. Фармакологические свойства и активность эрбисола определяются содержащимися в нем специфическими гликопептидами, направленно активизирующими иммунную систему на поиск и устранение патологических изменений в органах и тканях. Обладая антиоксидантными свойствами, эрбисол оказывает опосредованное нормализующее влияние на углеводный и липидный обмен, благодаря чему положительно действует на сердечно-сосудистую систему при ишемии. Уменьшение содержания конечных продуктов ПОЛ способствует восстановлению эндотелийзависимой регуляции кровообращения, энзиматической активности мембран митохондрий и микросом КМЦ, предупреждает развитие периваскулярного фиброза, изменений в нервных волокнах и сократитель-

ной системе миокарда. Препарат также оказывает кардиотоническое действие.

В настоящее время проводятся исследования по изучению биологической активности низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) из кордовой крови крупного рогатого скота [81, 82, 83]. Конечный продукт получают ультрафильтрацией раствора, содержащего компоненты плазмы крови и вещества, высвободившиеся из форменных элементов в процессе замораживания-оттаивания крови (без использования какой-либо жесткой обработки с целью гидролиза макромолекул). Благодаря применению такой методики в состав фракции входят только естественные низкомолекулярные соединения, характерные для кордовой крови. Проведенные доклинические исследования биологической активности низкомолекулярной фракции показали ее рано- [81–83] и язвозаживляющее [82, 84, 85] действие. В связи с этим перспективным является изучение возможности применения биопрепарата на ее основе для репаративной регенерации миокарда.

Использование в терапии инфаркта миокарда природных антиоксидантов

Естественными антиоксидантами в клетках являются никотинамидадениндинуклеотид (НАД), цитохром *c*, коэнзим Q10 (убихинон), инозит и др. В условиях гипоксии при остром ИМ КМЦ теряют НАД — коэнзим дегидрогеназы гликолиза и цикла Кребса и цитохром *c* — энзим цепи переноса электронов, с которым в митохондриях через окислительное фосфорилирование сопряжен синтез АТФ. Выход из митохондрий цитохрома *c* ведет не только к развитию энергодифицита, но и способствует образованию свободных радикалов и прогрессированию оксидативного стресса, заканчивающихся апоптической гибелью клеток.

Биопрепаратом, в составе которого содержатся все три субстанции — НАД, цитохром *c* и инозин, является энергостим, оказывающий антиоксидантное и антигипоксическое действие на клеточный метаболизм. За счет комбинированного состава эффективность этого препарата при лечении ИМ в составе традиционной терапии во много раз превосходит действие других антигипоксантов [68]. Внутривенное введение энергостима усиливает коронарный кровоток, способствуя доставке и утилизации кислорода.

При ишемии миокарда широко используется коэнзим Q10 или убихинон — витаминоподобное вещество, участвующее как

в электронном транспорте в митохондриях, так и в сопряжении процессов электронного транспорта и окислительного фосфорилирования [69]. Коэнзим Q10 эффективно защищает от процессов пероксидного окисления липиды биологических мембран и липопротеиды крови, предохраняет ДНК и протеины от воздействия активных форм кислорода. Установлена эффективность его применения при реперфузионном синдроме для сохранения субклеточных структур КМЦ, подвергнутых ишемическому стрессу, и восстановления функции окислительного фосфорилирования митохондрий [86].

Убихинон и цитохром *c* в промышленности выделяют из ткани сердца крупного рогатого скота. В отличие от других антиоксидантов, которые, выполняя свою функцию, необратимо окисляются сами, убихинон обладает регенеративной способностью под действием энзиматических систем организма и не требует дополнительного введения.

Таким образом, в терапии ишемического повреждения сердца активно используют подходы, альтернативные клеточной трансплантации. Перспективными в этом отношении являются следующие направления.

Во-первых, использование протеинов, обладающих терапевтическим потенциалом для регенерации миокарда. Проведенные исследования показали, что только 1 протеин (Г-КСФ) может быть применен для мобилизации гемопоэтических СК и всего 2 протеина с хемотаксическими свойствами на СК: SDF-1 — на эндотелиальные клетки-предшественники и HGF — на СК сердца. Аттрактантом мезенхимных СК является моноцитхемотаксический протеин-3 [87], однако пока неизвестно, улучшает ли его локальная доставка сердечную функцию.

Во-вторых, перспективным направлением является разработка кардиопротекторных и биостимулирующих препаратов, способных оптимизировать внутриклеточный энергообмен КМЦ и противостоять окислительному стрессу. Применение таких биопрепаратов, как кордиалин, актовегин, эрбисол, энергостим, способствует замедлению формирования зоны некроза после коронароокклюзии, прежде всего за счет оптимизации процессов окислительного фосфорилирования в митохондриях, значительно ослабляет ишемическое повреждение околоинфарктной зоны, стимулирует репаративные процессы в ней, что приводит к сохранению жизнеспособности КМЦ и нормализации их ультраструктуры.

Использование тканей эмбриофетоплацентарного комплекса также повышает репаративную способность миокарда. Основное свойство таких биопрепаратов как биогенных стимуляторов состоит в том, что в их составе есть сбалансированный комплекс биологически активных веществ, в частности различных активаторов регенерации и дифференциации (факторы роста фибробластов, нервов, фактор, стимулирующий рост макрофагальных и эритроидных колоний), а также антипролиферативных цитокинов, предотвращающих клеточную и системную гиперстимуляцию. Кроме того, фетальные клетки и их ассоциаты практически не иммуногенны.

Таким образом, если будут синтезированы факторы роста и дифференциации, способные регулировать митотическую активность КМЦ, станет возможным направленно инициировать процесс дифференцировки СК и воздействовать на регенерацию миокарда человека, а следовательно, оптимизировать лечение такого тяжелого заболевания, как ИМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленков Ю. Н., Агеев Ф. Т., Мареев В. Ю., Савченко В. Г. Мобилизация стволовых клеток костного мозга в лечении больных с сердечной недостаточностью // Кардиология. — 2003. — № 3. — С. 7–12.
2. Segers V. F., Lee R. T. Protein Therapeutics for cardiac regeneration after myocardial infarction // J. Cardiovasc. Transl. Res. — 2010. — V. 3, N 5. — P. 469–477.
3. Padin-Iruegas M. E., Misao Y., Davis M. E. et al. Cardiac progenitor cells and biotinylated insulin-like growth factor-1 nanofibers improve endogenous and exogenous myocardial regeneration after infarction // Circulation. — 2009. — V. 120, N 10. — P. 876–887.
4. Epstein S. E., Kornowski R., Fuchs S., Dvorak H. F. Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects // Ibid. — 2001. — V. 104, N 1. — P. 115–119.
5. Henry T. D., Rocha-Singh K., Isner J. M. et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease // Am. Heart J. — 2001. — V. 142, N 5. — P. 872–880.
6. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer // Oncology. — 2005. — V. 69, Suppl. 3. — P. 4–10.
7. Lee R. J., Springer M. L., Blanco-Bose W. E. et al. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression // Circulation. — 2000. — V. 102, N 8. — P. 898–901.
8. London N., Whitehead K., Li D. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain

- vascular stability // *Angiogenesis*. — 2009. — V. 12, N 2. — P. 149–158.
9. *Byrne A. M., Bouchier-Hayes D. J., Harmey J. H.* Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) // *J. Cell. Mol. Med.* — 2005. — V. 9, N 4. — P. 777–794.
 10. *Carmeliet P.* Angiogenesis in life, disease and medicine // *Nature*. — 2005. — V. 438, N 7070. — P. 932–936.
 11. *Scott R. C., Rosano J. M., Ivanov Z. et al.* Targeting VEGF-encapsulated immunoliposomes to MI heart improves vascularity and cardiac function // *FASEB J.* — 2009. — V. 23, N 10. — P. 3361–3367.
 12. *Iyer S., Acharya K. R.* Role of placenta growth factor in cardiovascular health // *Trends Cardiovasc. Med.* — 2002. — V. 12, N 3. — P. 128–134.
 13. *Nakamura T., Funayama H., Kubo N. et al.* Elevation of plasma placental growth factor in the patients with ischemic cardiomyopathy // *Int. J. Cardiol.* — 2009. — V. 131, N 2. — P. 186–191.
 14. *Luttun A., Tjwa M., Moons L. et al.* Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1 // *Nat. Med.* — 2002. — V. 8, N 8. — P. 831–840.
 15. *Kolakowski S. Jr., Berry M. F., Atluri P. et al.* Placental growth factor provides a novel local angiogenic therapy for ischemic cardiomyopathy // *J. Card. Surg.* — 2006. — V. 21, N 6. — P. 559–564.
 16. *Autiero M., Waltenberger J., Communi D. et al.* Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1 // *Nat. Med.* — 2003. — V. 9, N 7. — P. 936–943.
 17. *Depping R., Kawakami K., Ocker H. et al.* Expression of the erythropoietin receptor in human heart // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* — 2005. — V. 130, N 3. — P. 877–878.
 18. *Anagnostou A., Liu Z., Steiner M. et al.* Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1994. — V. 91, N 9. — P. 3974–3978.
 19. *Yi-Da Tang, Faisal Hasan, Frank J. Giordano et al.* Effects of recombinant human erythropoietin on platelet activation in acute myocardial infarction: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial // *Am. Heart J.* — 2009. — V. 158, N 6. — P. 941–947.
 20. *Hirata A., Minamino T., Asanuma H. et al.* Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2006. — V. 48, N 1. — P. 176–184.
 21. *Arcasoy M. O.* The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin // *Br. J. Haematol.* — 2008. — V. 141, N 1. — P. 14–31.
 22. *Лакомкин В. Л., Алоев Р. С., Черпаченко Н. М. и др.* Влияние цитокина лейкомаза на функцию и регенерацию миокарда у крыс с экспериментальным инфарктом // *Эксперимент. кардиол.* — 2005. — № 3. — С. 64–70.
 23. *Segers V. F., Lee R. T.* Stem-cell therapy for cardiac disease // *Nature*. — 2008. — V. 451, N 7181. — P. 937–942.
 24. *Orlic D., Kajstura J., Chimenti S. et al.* Mobilized bone marrow cells repair the myocardial heart, improving function and survival // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — V. 98, N 18. — P. 10344–10349.
 25. *Quaini F., Cigola E., Lagrasta C. et al.* End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear mitotic diversion in ventricular myocytes // *Circ. Res.* — 1994. — V. 75, N 6. — P. 1050–1063.
 26. *Quaini F., Urbanek K., Beltrami A. P. et al.* Chimerism of the transplanted heart // *N. Engl. J. Med.* — 2002. — V. 346, N 1. — P. 5–15.
 27. *Orlic D.* Stem cell repair in ischemic heart disease: an experiment models // *Int. J. Hematol.* — 2002. — V. 76, Suppl. 1. — P. 144–145.
 28. *Taylor D. A., Hruban R., Rodriguer E. R. et al.* Cardiac chimerism as a mechanism for self repair: does it happen and if so to what degree? // *Circulation*. — 2002. — V. 106, N 1. — P. 2–4.
 29. *Orlic D., Kaistura J.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2001. — V. 98, N 8. — P. 10344–10349.
 30. *Abdel-Latif A., Bolli R., Zuba-Surma E. K. et al.* Granulocyte colony-stimulating factor therapy for cardiac repair after acute myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials // *Am. Heart J.* — 2008. — V. 156, N 2. — P. 216–226.
 31. *Harada M., Qin Y., Takano H. et al.* G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes // *Nat. Med.* — 2005. — V. 11, N 3. — P. 305–311.
 32. *Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M. et al.* Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor // *Nature*. — 1989. — V. 342, N 6248. — P. 440–443.
 33. *Boros P., Miller C. M.* Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine // *Lancet*. — 1995. — V. 345, N 8945. — P. 293–295.
 34. *Nakamura T., Mizuno S., Matsumoto K. et al.* Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF // *J. Clin. Invest.* — 2000. — V. 106, N 12. — P. 1511–1519.
 35. *Urbanek K., Rota M., Cascapera S. et al.* Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival // *Circ. Res.* — 2005. — V. 97, N 7. — P. 663–673.

36. Wang Y., Ahmad N., Wani M. A., Ashraf M. Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodeling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2004. — V. 37, N 5. — P. 1041–1052.
37. Beltrami A. P., Barlucchi L., Torella D. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration // *Cell.* — 2003. — V. 114, N 6. — P. 763–776.
38. Oh H., Bradfute S. B., Gallardo T. D. et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — V. 100, N 21. — P. 12313–12318.
39. Yamaguchi J., Kusano K. F., Masuo O. et al. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization // *Circulation.* — 2003. — V. 107, N 9. — P. 1322–1328.
40. Askari A. T., Unzek S., Popovic Z. B. et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy // *Lancet.* — 2003. — V. 362, N 9385. — P. 697–703.
41. Segers V. F., Tokunou T., Higgins L. J. et al. Local delivery of protease-resistant stromal cell derived factor-1 for stem cell recruitment after myocardial infarction // *Circulation.* — 2007. — V. 116, N 15. — P. 1683–1692.
42. Bergmann O., Bhardwaj R. D., Bernard S. et al. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans // *Science.* — 2009. — V. 324, N 5923. — P. 98–102.
43. Borchardt T., Braun T. Cardiovascular regeneration in non-mammalian model systems: what are the differences between newts and man? // *Thromb. Haemost.* — 2007. — V. 98, N 2. — P. 311–318.
44. Kuhn B., del Monte F., Hajjar R. J. et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair // *Nat. Med.* — 2007. — V. 13, N 8. — P. 962–969.
45. Bersell K., Arab S., Haring B., Kohn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury // *Cell.* — 2009. — V. 138, N 2. — P. 257–270.
46. Conway S. J., Molkenkin J. D. Periostin as a heterofunctional regulator of cardiac development and disease // *Curr. Genomics.* — 2008. — V. 9, N 8. — P. 548–555.
47. Oka T., Xu J., Kaiser R. A. et al. Genetic manipulation of periostin expression reveals a role in cardiac hypertrophy and ventricular remodeling // *Circ. Res.* — 2007. — V. 101, N 3. — P. 313–321.
48. Lemmens K., Segers V. F., Demolder M., de Keulenaer G. W. Role of neuregulin-1/ErbB2 signaling in endothelium-cardiomyocyte cross-talk // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, N 28. — P. 19469–19477.
49. Padin-Iruegas M. E., Misao Y., Davis M. E. et al. Cardiac progenitor cells and biotinylated insulin-like growth factor-1 nanofibers improve endogenous and exogenous myocardial regeneration after infarction // *Circulation.* — 2009. — V. 120, N 10. — P. 876–887.
50. Rota M., Padin-Iruegas M. E., Misao Y. et al. Local activation or implantation of cardiac progenitor cells rescues scarred infarcted myocardium improving cardiac function // *Circ. Res.* — 2008. — V. 103, N 1. — P. 107–116.
51. Filipczyk A., Passier R., Rochat A., Mummery C. Cardiovascular development: towards biomedical applicability // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2007. — V. 64, N 6. — P. 704–718.
52. Кузник Б. И., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций // *Усп. совр. биол.* — 1995. — Т. 115, Вып. 3. — С. 353–367.
53. Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем — цитомедины // Там же. — 1983. — Т. 96, Вып. 3. — С. 339–352.
54. Слепушкин В. Д., Павленко В. С., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Влияние полипептидов, выделенных из сердца, на течение экспериментального инфаркта миокарда // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 1987. — № 1. — С. 26–27.
55. Павленко В. С., Хлыстов В. В., Андреева Л. И. и др. Влияние препарата, выделенного из сердца, на биоэнергетику кардиомиоцитов в условиях гипоксии и ишемии // *Патол. физиол. эксперимент. терапия.* — 1992. — № 2. — С. 20–24.
56. Бахтизина Г. З., Хавинсон В. Х., Биктимирова Г. А. и др. Коррекция пептидами сердца поражения миокарда тетраметилтиурамдисульфидом // Там же. — 1992. — № 2. — С. 27–30.
57. Хлыстов В. В., Павленко В. С., Хавинсон В. Х. и др. Ультраструктура околоинфарктной зоны при лечении кардиолином экспериментального инфаркта миокарда // *Арх. патол.* — 1989. — № 9. — С. 27–31.
58. Чекалина Н. І. Ангіопротекторні властивості пептидної фракції аорти при експериментальному атеросклеротичному та аутоімунному ураженні судин: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.05. / Укр. мед. стомат. академія, 2002. — 20 с.
59. Терещенко О. С. Біологічна активність та механізм дії фракції поліпептидів 1-10 кД з тканин гібернуючих та холодоадаптованих тварин: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.22. / Ін-т пробл. кріобіол. і кріомед. НАН України, 1994. — 17 с.
60. Гулевский А. К., Грищенко В. И., Терещенко О. С. и др. Влияние фракции (1-10 кД) мозга якутской лошади на кинетические параметры Ca²⁺-транспортирующих систем в везикулах сарколеммы кардиомиоцитов // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 1992. — № 9. — С. 274–278.

61. Гулевский А. К., Терещенко О. С., Ахременко А. К., Тищенко И. Ю. Фармакологические эффекты из мозга адаптированной к холоду якутской лошади // Сб. науч. тр. «Лечебная гипотермия». — Харьков, 1992. — С. 153–158.
62. Алексеенко Л. П., Орехович В. Н. Эндокринная функция сердца. Структура и биологические свойства пептидов, синтезируемых предсердиями // Мол. биол. — 1987. — Т. 21, Вып. 2. — С. 293–308.
63. Rossi G. P. Dual ACE and NEP inhibitors: A review of the pharmacological properties of MDL 100, 240 // *Cardiovasc. Drug Rev.* — 2003. — V. 21, N 1. — P. 51–66.
64. Серов В. В., Шехтер А. Б. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). — М.: Медицина, 1981. — 312 с.
65. Пат. 35631 Україна, МПК А61К 35/48, А61К 35/54, А61К 38/02. Спосіб виготовлення біологічно активних препаратів з ембріональних тканин / Шорох Д. Б., заявник і патентовласник Шорох Д. Б. — № 96072998; Заявл. 25.07.97; Опубл. 16.04.01, Бюл. № 3, с. 3.1.16.
66. Ролик И. С. Фетальные органопрепараты: клиническое применение. Руководство для врачей. — М.: РегБиоМед, 2003. — 736 с.
67. *Актовегин*. Новые аспекты клинического применения / Под ред. С. А. Румянцевой. — М., 2002. — 280 с.
68. Андриадзе Н. А., Сукоян Г. В., Отаршвили Н. О. и др. Антигипоксанта прямого действия энергостим в лечении ОИМ // *Росс. мед. вести.* — 2001. — № 2. — С. 31–42.
69. Коровина Н. А. Использование коэнзима Q10 в профилактике и лечении. Применение антиоксидантного препарата кудесан (коэнзим Q10 с витамином E) в кардиологии. — М., 2002. — С. 3–7.
70. Нордвик Б. Механизм действия и клиническое применение препарата актовегин. Новые аспекты применения актовегина в клинической практике. — М., 1995. — 260 с.
71. Шпонька И. С. Гистогенетические процессы в развивающемся миокарде млекопитающих: Монография. — Днепропетровск: Пороги, 1996. — 228 с.
72. *Иммунологические методы* / Под ред. Г. Фримля. — М.: Медицина, 1987. — 128 с.
73. *Клеточная и тканевая трансплантация. Биопрепараты.* — Харьков: ИПКиК НАНУ, МНЦ криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МОЗ Украины, 2003. — 67 с.
74. Грищенко В. И., Гольцев А. Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // *Пробл. криобиол.* — 2002. — № 1. — С. 54–84.
75. Шепітько К. В. Вплив препаратів кріоконсервованої плаценти на перекисні показники у хворих на стабільну стенокардію // *Там само.* — 2004. — № 1. — С. 70–74.
76. Ichim T. E., Solano F., Brenes R. et al. Placental mesenchymal and cord blood stem cell therapy for dilated cardiomyopathy // *Reprod. Biomed. Online.* — 2008. — V. 16, N 6. — P. 898–905.
77. Okamoto K., Miyoshi S., Toyoda M. et al. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells // *Exp. Cell. Res.* — 2007. — V. 313, N 12. — P. 2550–2562.
78. Кондаков И. И. Антиатерогенное действие кріоконсервованої плаценти при експериментальном атеросклерозе: Дис. ... канд. мед. наук: 14.01.35. / Ин-т пробл. криобиол. и криомед. НАН Украины, 2008. — 124 с.
79. Грищенко В. И., Сандомирский Б. П. Концепция клеточной терапии // *Пробл. криобиол.* — 2000. — № 1. — С. 3–7.
80. Николаенко А. Н. Концептуальные подходы в разработке высокоэффективных лекарственных препаратов нового поколения класса «Эрбисол» // *Фармакол. вісник.* — 1998. — № 6. — С. 69–74.
81. Гулевский А. К., Моисеева Н. Н., Щенявский И. И. и др. Исследование действия фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота на процессы репарации // *Трансплантологія.* — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 60–62.
82. Гулевский А. К., Грищенко В. И., Моисеева Н. Н. и др. Эффект стимуляции репаративных процессов под влиянием фракции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота // *Доп. НАН України.* — 2008. — № 2. — С. 157–160.
83. Щенявський І. Й. Вплив фракції до 5 кДа з пуповинно-плацентарної крові великої рогатої худоби на вміст глюкози та лактату і пірвату у тканині опікових ран // *Експеримент. клін. фізіол. біохім.* — 2010. — № 1. — С. 50–53.
84. Гулевский А. К., Абакумова Е. С., Моисеева Н. Н., Долгих О. Л. Влияние фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка у крыс // *Укр. біохім. журн.* — 2008. — Т. 80, № 2. — С. 120–127.
85. Гулевський О. К., Абакумова О. С., Моїсєєва Н. М. Вивчення противиразкової активності низькомолекулярної фракції (до 5 кДа) крові великої рогатої худоби в залежності від стадії онтогенезу // *Клін. фармація.* — 2009. — Т. 13, № 2. — С. 54–58.
86. Капелько В. И. Исследование действия коэнзима Q10 (убихинона) при ишемии и реперфузии сердца. Применение антиоксидантного препарата кудесан (коэнзим Q10 с витамином E) в кардиологии. — М., 2002. — С. 8–14.
87. Schenk S., Mal N., Finan A. et al. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor // *Stem Cells.* — 2007. — V. 25, N 1. — P. 245–251.

**ВИКОРИСТАННЯ БІОПРЕПАРАТІВ
У ТЕРАПІЇ ІШЕМІЧНОГО
УШКОДЖЕННЯ СЕРЦЯ**

*О. К. Гулевський
О. С. Абакумова
І. Й. Щенявський*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: danalado@rambler.ru

Розглянуто перспективи застосування в експерименті і в клініці ішемічного ушкодження міокарда біологічно активних речовин: факторів росту, цитомединів, природних антиоксидантів, речовин, що містяться в екстрактах з ювенільних і фетальних органів і тканин тварин. Поряд з добре вивченими і широко використовуваними в клінічній практиці біопрепаратами тваринного походження, такими як кордіалін, актовегін, ербісол, несиритид, енергостим, як перспективні засоби для терапії серцево-судинних захворювань розглядаються екстракти із серця та низькомолекулярна фракція кордової крові. Показано, що використання тканин ембріофетоплацентарного комплексу підвищує репаративну здатність міокарда. Основна відмінність таких біопрепаратів як біогенних стимуляторів полягає в тому, що в їхньому складі є збалансований комплекс біологічно активних речовин, зокрема різних активаторів регенерації і диференціації (фактори росту фібробластів, нервів, фактор, що стимулює ріст макрофагальних і еритроїдних колоній), а також антипроліферативних цитокінів, що запобігають клітинній і системній гіперстимуляції. Крім того, фетальні клітини та їх асоціати практично не імуногенні. Таким чином, якщо буде визначено фактори росту і диференціації, здатні регулювати мітотичну активність кардіоміоцитів, стане можливим спрямовано ініціювати процес диференціювання стовбурових клітин і впливати на регенерацію міокарда людини, а отже, оптимізувати лікування інфаркту міокарда.

Ключові слова: інфаркт міокарда, біологічно активні речовини, фактори росту, цитомедични, антиоксиданти, екстракти тканини серця, кордової крові, фетальних тканин.

**BIOPREPARATIONS USING
IN THE ISCHEMIC HEART
INJURY THERAPY**

*A. K. Gulevsky
Ye. S. Abakumova
I. I. Schenyavsky*

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

E-mail: danalado@rambler.ru

Possibility of biologically active substances using such as growth factors, cytomedines, natural antioxidants, substances contained in extracts from juvenile and fetal organs and animal tissues in the experiments and clinic of ischemic heart injury are discussed. Along with the well-studied and widely used in clinical practice biopreparations such as kordialin, actovegin, erbisol nesiritide, energostim, as promising tools for treatment of cardiovascular diseases, the extracts from the heart and low molecular weight fraction of cord blood are considered. It is shown that using of tissue reparative embriofetoplatsenta complex increases myocardial contractility. The main difference between these biopreparations and biogenic stimulants is that they have a balanced composition of biologically active substances, in particular different activators of regeneration and differentiation (fibroblast growth factors, nerve-stimulating factor and macrophage erythroid colonies) and anti-proliferative cytokines preventing cellular and systemic hyperstimulation as well as other substances able to initiate a directed differentiation of stem cells and to affect regeneration of human myocardium, and hence to optimize the treatment of myocardial infarction. In addition, fetal cells and their associates are almost nonimmunogens.

Thus, if the growth factors and differentiation capable to regulate the mitotic activity of cardiomyocytes are determined, it will be possible to initiate a process of stem cells directed differentiation and affect on the human myocardium regeneration, and hence to optimize the treatment of myocardial infarction.

Key words: myocardial infarction, biologically active substances, growth factors, cytomedines, antioxidants, extracts from heart, cord blood, fetal tissues.

СУЧАСНІ ПРОЦЕСИ І ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА ПИВА



Ю. І. СИДОРОВ

Національний університет «Львівська політехніка»

E-mail: sydorowy@rambler.ru

Отримано 27.09.2011

Розглянуто сучасні тенденції розвитку процесів пивоваріння та бродильних апаратів для їх реалізації. Показано, що на сьогодні найпоширенішим способом виробництва є прискорені процеси за методом Натана в одну технологічну стадію в одному апараті — циліндроконічному танку. Наступним етапом розвитку мав бути перехід до безперервних методів, однак ці, достатньо відомі способи, поки що не набули поширення. Другим напрямом розвитку пивоваріння є введення в дію міні-пивоварень, у тому числі ресторанних комплексів. Основним стимулом розвитку цього напрямку є можливість одержання так званого «живого» пива — високоякісного нефільтрованого продукту, однак сьогодні велику конкуренцію йому становлять масові виробництва, які засвоїли техніку виготовлення «живого» пива на промисловому рівні.

Ключові слова: виробництво пива, циліндроконічний танк, міні-пивоварня.

Технології виробництва пива присвячена численна література. Зазначимо лише книгу Ф. Главачека і А. Лхотського, яка свого часу була «біблією пивовара» [1], літературу 1990-х рр. [2–7], 2000-х рр. видавництва «Профессия» [8–13], а також достатньо новий україномовний підручник [14]. Незважаючи на існування великої кількості сортів пива, зокрема бельгійського ламбіку (без штучного додавання дріжджів), елю (з використанням верхових дріжджів), пива міцністю 41 об.% (шотландська пивоварня Brewdog) та безалкогольного, які потребують застосування особливих технологій, у цьому огляді йтиметься про сучасні тенденції розвитку процесів і бродильних апаратів для одержання традиційного лагерного пива.

Масове виробництво

Технології виробництва пива практично не змінюються протягом століть, що зумовлено характером і специфікою цього харчового продукту. Як і раніше, основними компонентами пива є ячмінний солод, хміль, дріжджі та вода. Традиційно сусло готують у мідних заторних і суловарильних апаратах (рис. 1), однак сьогодні не гіршого результату можна досягти і в апаратах, виконаних з харчової нержавіючої сталі (рис. 2), а фільтрувальні чани замінюють на продуктивніші пластинчасті фільтри (фільтр-преси, рис. 3).



Рис. 1. Сучасний мідний суловарильний апарат (Московська пивоварня)



Рис. 2. Сучасний суловарильний апарат з нержавіючої сталі



Рис. 3. Пластинчастий фільтр для фільтрування сусла

До середини ХХ ст. бродильні апарати виготовляли відкритими, прямокутної або циліндричної форми (у вигляді танків). У разі застосування прямокутних апаратів площу цеху використовують якнайповніше. У бічній стінці прямокутного апарата на висоті 10–15 см від днища вмонтовували патрубок для зливання молодого пива, а в днище — патрубок для зливання дріжджів; усередині встановлювали охолоджувальний змієвик для відведення тепла, що виділяється під час бродіння. Змієвики вмонтовували навіть у бетонні стінки бродильних чанів. Бетонні чани із часом давали тріщини, в яких накопичувалася стороння мікрофлора. Тріщини заповнювали церезином, воском та іншими подібними матеріалами. Зрозуміло, що таке обладнання не відповідало санітарним нормам і негативно впливало на якість пива. Тому згодом набули поширення закриті горизонтальні циліндричні танки об'ємом від 8 до 50 м³, які використовують як для головного бродіння, так і для доброджування зеленого пива в лагерних відділеннях.

На рис. 4 показано зовнішній вигляд сучасного відділення доброджування за традиційною технологією.

Революційні зміни в технології бродіння розпочалися за ініціативою провідних світових транснаціональних компаній, таких як Anheuser-Busch InBev (Бельгія), Guinness (Велика Британія), SABMiller (Велика Британія), Heineken N. V. (Нідерланди), Carlsberg (Данія), та інших західноєвропейських і американських фірм. Стимулом змін було намагання прискорити технологічні процеси з метою одержання найвищих прибутків за мінімуму витрат. Зокрема, компанія Guinness почала використовувати суміш п'яти оригінальних штамів дріжджів, яку

сьогодні застосовують в усіх різновидах пива «Гінес». У цьому разі відбувається бурхливий процес бродіння за високої температури (25 °С). У результаті процес виробництва пива триває лише 2 доби (для порівняння зазначимо, що дозрівання темних і щільних сортів пива, до яких належить і «Гінес», за традиційними технологіями може тривати до 2 років). Однак у такому швидкісному пиві утворюється нестійка піна, тому для підтримання її вдаються до насичення пива азотом.

Іншим шляхом прискорення процесу, яким пішли деякі компанії, є реорганізація виробництва за напівбезперервним способом.

Напівбезперервне бродіння проводять тільки в закритих бродильних апаратах, які комплектують у батареї, що складаються з розброджувача і п'яти бродильних апаратів. Норма додавання дріжджів — 0,6–1 л на 1 гл. Розброджувач заповнюють сусликом з температурою 6–8 °С, перемішують протягом 30 хв і зброджують упродовж 24 год, а потім половину об'єму перекачують у перший бродильний апарат. Далі обидва апарати доливають свіжим сусликом до повного об'єму. З інтервалом в одну добу заповнюють усі бродильні апарати. Пивне сусло зброджують за надлишкового тиску протягом 5–6 діб. Доброджування пива проводять за температури від 0 до 2 °С в закритих апаратах під надлишковим тиском 0,03–0,06 МПа. Тривалість доброджування залежить від сорту пива і коливається від 21 (для пива «Жигулівське») до 90 діб (для пива



Рис. 4. Відділення доброджування у вертикальних ємностях

«Портер»). Стадії розброджування з використанням від'ємно-доливного способу ферментації, бродіння і доброджування можна розглядати як окремі одночасно діючі підприємства, що узгоджені в часі [15].

Наступним кроком у напрямі прискорення технологічного процесу було використання розробок швейцарського вченого Натана, який ще в XIX ст. застосував новий принцип пришвидшення бродіння за рахунок збільшення концентрації дріжджів у вихідному суслі та особливого температурного режиму за відповідної висоти бродильної ємності. Вона повинна мати форму витягнутого циліндра з конічним дном, тобто циліндроконічного танка (ЦКТ). Після прискореного бродіння зелене пиво примусово звільнювали від CO_2 та легкої органіки і промивали свіжою вуглекислою. Унаслідок цих заходів весь процес бродіння і доброджування в одному апараті займав лише 10–14 діб. Перше опробування способу на дослідній установці об'ємом 1 м^3 датується 1908 р., а перше впровадження — на пивоварні «Кулмбах» (Баварія) з використанням ЦКТ об'ємом 80 м^3 у 1928 р. Метод не прижився, оскільки якість пива не досягала німецьких і чеських стандартів. Окрім того, висота стовпа бродильної рідини була такою значною, що зменшувала розміри дріжджової клітини вдвічі, і це не могло не позначитись на процесі загалом. Ще одним притаманним тільки ЦКТ недоліком була неможливість повного усунення дріжджових дек із поверхні. Лише через декілька десятків років удосконалень процесу ЦКТ стали придатними для масового впровадження у 1960–1970-х рр. Детально з історією виникнення ЦКТ можна ознайомитись на сайті [16].

На рис. 5 показано схему ЦКТ.

Сусло з температурою $7\text{--}9 \text{ }^\circ\text{C}$ подають в апарат і заповнюють його на 85%. У потік сусли додають дріжджі в кількості $0,7\text{--}1 \text{ л}$ на 1 гл . За декілька перших діб бродіння температура підвищується до $13\text{--}14 \text{ }^\circ\text{C}$. За цієї температури сусло бродить $6\text{--}7$ діб. Потім пиво в нижній частині апарата охолоджують до $1\text{--}2 \text{ }^\circ\text{C}$, унаслідок чого утворюється щільний осад дріжджів, який виводять з апарата. На 8-му добу пиво нагрівають до $3\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$, на 9-ту — знову охолоджують до $1\text{--}2 \text{ }^\circ\text{C}$ і витримують за цієї температури $5\text{--}6$ діб для завершення процесів доброджування.

Поєднання процесів бродіння і доброджування дало змогу скоротити їх тривалість до $12\text{--}18$ діб залежно від концентрації початкового сусли. Ця технологія характе-

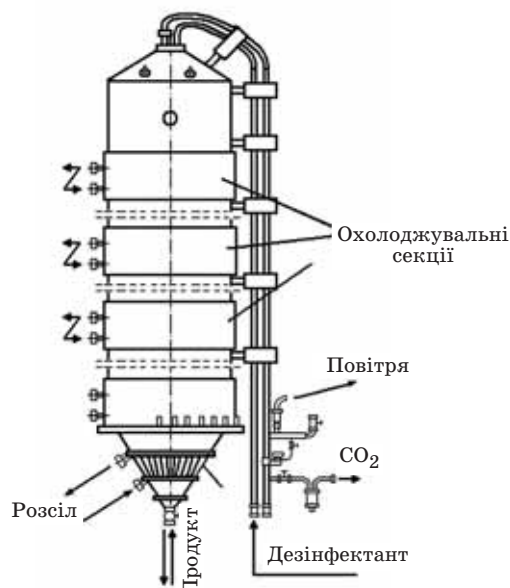


Рис. 5. Схема ЦКТ (пояснення в тексті)

ризується простотою, а капітальні витрати за встановлення апаратів зовні приміщення істотно зменшуються. Проте для отримання елітних сортів пива час бродіння істотно збільшують. Такий тривалий цикл бродіння гарантує м'який, цілісний, унікальний смак пива.

Циліндроконічні апарати мають теплоізоляційне покриття, що уможливило встановлення їх просто неба, а для зручності обслуговування нижню частину їх розташовують в одноповерховому приміщенні (рис. 6).

Сьогодні спосіб одержання пива в ЦКТ є найбільш поширеним і прогресивним, а провідним виробником апаратів є німецька фірма Ziemann [17], яка виготовляє їх з високоякісної харчової нержавіючої сталі. Навіть труднощі, які виникають під час транспортування цих апаратів з Німеччини у країни СНД, не перешкоджають упровадженню їх у вітчизняне виробництво пива. Проте слід зауважити, що російська промисловість також опанувала технологію виготовлення ЦКТ достатньо високої якості (ВАТ «Комсомолец» ім. Н. С. Артемова», Тамбов).



Рис. 6. ЦКТ просто неба

На рис. 7 подано зовнішній вигляд ЦКТ компанії Ziemann (Московський пивоварний завод, 2011 р.) [18].

Революційними змінами в сучасному виробництві пива можна вважати загальне підняття культури виробництва і тотальний контроль на всіх стадіях процесу, в тому числі за поточним станом дріжджових культур (рис. 8).



Рис. 7. ЦКТ у закритому павільйоні



Рис. 8. Сучасна система контролю на пивоварні Warsteiner Brewery (Варштайн, Німеччина)

Наступним етапом масового виробництва пива має стати перехід до безперервної організації процесу. Сьогодні розроблено різні схеми безперервного бродіння суслу і доброджування молодого пива. На рис. 9 наведено одну з них [19].

Основною частиною цієї установки є каскадно-ярусний апарат (7), який є прямокутною місткістю з корозійно-стійкої сталі. Усередині місткості є горизонтальні полиці з відігнутими вниз козирками, призначеними для затримання діоксиду вуглецю. Газ, що накопичується під полицями, періодич-

но проривається вгору і здійснює інтенсивне перемішування рідини, що зброджується, перешкоджаючи зсіданню дріжджів.

Каскадно-ярусна установка працює так.

Гаряче сусло з відстійного чана (4) стікає до сепаратора (3) для відділення осаду, а потім стерилізується нагріванням в апараті (2). Стерильне сусло після збірника (5) поділяється на два потоки. Основна частина його, що пройшла через холодильник (1), надходить у нижню камеру каскадно-ярусного апарата, а друга частина подається в дріжджегенератор (6). Зрілі посівні дріжджі з дріжджегенератора приєднуються до основного потоку холодного суслу перед входом його в каскадно-ярусний апарат. Унаслідок невеликого перепаду тиску, коли сусло в збірнику (5) перебуває під надлишковим тиском стисненого повітря 0,05–0,07 МПа, у каскадно-ярусному апараті під тиском діоксиду вуглецю 0,015–0,025 МПа рідина, що зброджується, поступово піднімається з полиці на полицю каскадно-ярусного апарата. Молоде пиво стікає з верхньої полиці апарата в холодильник (8), а потім — у збірник (9) і сепаратор (10) для відділення дріжджів. Після двох стадій карбонізації (насичення діоксидом вуглецю) в карбонізаторах (11 і 12) пиво надходить у сепаратори для освітлювання, а далі — у розливні автомати. Весь процес головного бродіння триває 48–50 год за температури 20–24 °С.

Для забезпечення нормальної роботи безперервних установок і високої якості пива важливе значення має мікробіологічна чистота як установки, так і раси дріжджів, суслу, повітря, приміщення, де відбувається бродіння. Тому регулярно за графіком проводять ретельну дезінфекцію окремих апаратів і всієї установки, за необхідності замінюючи посівні дріжджі чистою культурою.

Ще за часів СРСР був відомий спосіб безперервного бродіння і доброджування, який передбачає з'єднання бродильних і лагерних танків у батареї, а останніх — у лінію безперервного потоку продукту за температурних режимів класичної технології [20].

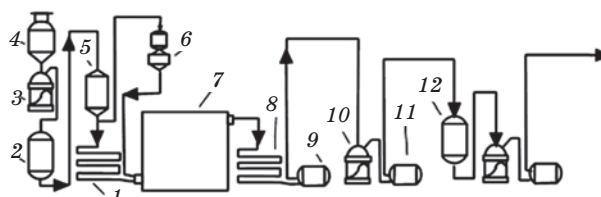


Рис. 9. Каскадно-ярусна установка для безперервного бродіння

Сумарна ємність батареї дорівнювала добутку потоку сусла на необхідний час бродіння і доброджування. З упродовженням методу використовували апаратуру, що існувала на той час, тобто стандартні бродильні місткості та місткості доброджування елементарно послідовно з'єднували в один ланцюг. Унаслідок грубих порушень як у технології, так і в загальній культурі виробництва, якість пива (Жигулівського) за стабільністю не витримувала встановленого терміну (7 днів), тому в СРСР безперервний спосіб не набув поширення. Однак за подібною схемою з 1966 р. працював і працює зараз перший комплексний завод La Cerveceria del Norte (Валенсія, Іспанія) потужністю 30 000 гл/місяць, і пиво, яке він постачає, споживач сприймає як високоякісне [21].

Відомі інші схеми безперервного виробництва пива, зокрема такі, що передбачають використання іммобілізованих дріжджів [22, 23]. Однак усі ці схеми поки що існують у численних наукових статтях і патентній літературі. Проте значна увага до методу рано чи пізно приведе до його реалізації. Зокрема так вважає С. Болтон з компанії Coors Brewers (Велика Британія) [24].

Сьогодні фахівці бельгійської компанії Martens Brewery Group of Bocholt майбутнє розвитку пивоварної технології вбачають у застосуванні безперервних ліній з підготовки сусла (continuous brewhouse) на базі обладнання і технології, пропонованих фірмою Meurabrew [25, 26], яка вже в 2007 р. апробувала процес на промисловому рівні. Повністю автоматизовану пивоварню, яка матиме одну поточну лінію затору і варіння сусла та дві лінії фільтрування (дві — через використання фільтрів періодичної дії), проєктує фірма Norit Process Technology. Застосування мікрофільтраційних мембранних технологій дасть змогу повертати очищені стічні води в технологічний процес. «Пивоварня майбутнього» будуватиметься в китайському місті Фучжу.

Фахівці усвідомлюють, що якість пива, одержаного безперервним способом, відрізнятиметься від класичного періодичного, тому вже сьогодні проводять дослідження щодо способів збереження цієї якості, зокрема аромату [27].

Фахівці компанії SABMiller вважають, що в наступні 30 років з'являться пивоварні, що розташовані на кораблях. Тим самим будуть вирішені проблеми з вартістю води і мобільністю доставлення пива в райони, що бідні на воду [28].

Міні-пивоварні

Другим важливим напрямом розвитку пивної промисловості, незважаючи на те, що «велика п'ятірка» лідерів у цій галузі («Балтика», SunInbev, Heineken, SABMiller і Efes) захопила 87% ринку, є поширення міні-пивоварень, які продукують так зване дороге (20–40 грн/0,5 л), елітне «живе пиво» — нефільтроване або фільтроване, однак непастеризоване пиво з малим терміном зберігання (не більше 3 днів).

Сьогодні споживач звик до фільтрованого прозорого пива, однак процес фільтрування почали застосовувати лише на початку ХХ ст., що викликало обурення німецьких і чеських пивоварів, які вважали, що фільтрування приховує недоліки невдалих партій пива.

У 1980-90-х рр. у Німеччині було введено в дію 100 міні-пивоварень. На сьогодні їх вже 200. І в інших європейських країнах кількість міні-пивоварень також збільшується. Так, у Великій Британії вона досягла 180 і зростає далі. Швидкий розвиток міні-пивоварень відзначено в Японії. З 1994 р. дотепер стало до ладу близько 250 таких підприємств. Кількість ресторанних пивоварень у США досягла 700. Промисловість пропонує ресторанні пивоварні потужністю від 200 до 50 000 л/добу. Серед відомих і активних компаній, які просувають свою продукцію на ринок, можна назвати Kaspar Schulz (Німеччина), Destila (Чехія), Techmpex s.r.o. (Словачія) [29], Potravinarske Stroyarne Svidnik (Словачія), Flecks Brauhaus Technik GmbH (Австрія) [30], Anton Steinecker Maschinenfabrik GmbH (Німеччина) [31], Zhongde Equipment Co., Ltd, Shandong, Jinan Zhuoda Machine Equipment Co., Ltd, Ningbo HGM Food Co., Ltd, BeerFactory (всі — Китай), Agrostahl Ltd, Zip Technologies (обидві — Угорщина), Doktor Burgwiz-Gordeev, Ltd (Німеччина), казахстансько-німецьке СП «Беккер и К» (Казахстан), «Миасский машиностроительный завод», АНО НТЦ «Солод, напитки, концентраты и добавки» (Росія) тощо.

В Україні діють посередницькі компанії, які надають послуги з продажу, монтажу і обслуговування міні-пивоварень відомих фірм. До них, зокрема, належать ВАТ «Бремгас» (Київ), СП «Пивоварні з Китаю» (Київ), Кафанов А. Н., СПД (Запоріжжя), ПП «Екосервіс» (Київ) тощо. Перший міні-пивзавод Zip Technologies був поставлений до України в 1996 р. Кількість підприємств особливо збільшувалась напередодні піднесення пивного ринку в 2001 і 2006 рр.

В основному це були виробництва промислового призначення, у тому числі й середні підприємства досить великої потужності. Однак у тому ж 2006 р. тенденція змінилася. Починаючи з цього періоду й до сьогодні, практично всі постачання припадали на ресторани пивоварні (у тому числі 8 нових об'єктів у 2008 р. і 6 пивоварень у 2009 р.) [32].

Утім, міні-пивзаводи становлять невелику частку світового ринку, зокрема, лише 0,8% російського виробництва пива, а міні-пивзаводи, інтегровані з рестораном, — 0,2% [33].

Розрізняють два типи комплексів «міні-пивоварня — ресторан»: з чіткою і розмитою концепцією. У ресторанах з чіткою концепцією (стара Європа) у меню присутні 2–3 брендированих сорти пива, клієнтура є постійною, атмосфера — домашня; з розмитою (Велика Британія і США) — 5 сортів і більше, які розраховані на космополітичних клієнтів.

На рис. 10–12 показано приклади інтер'єрів комплексу «міні-пивоварня — ресторан» (ресторан «Балтика Бру» в Санкт-Петербурзі; міні-пивзавод IRISTON-1500 з варницею SATENIK на 1 500 л сусла за добу і відділенням бродіння/доброджування WASAMONGA) [34] та англійського пабу.

Для порівняння наводимо найпоширеніший в СРСР спосіб вживання пива на вулицях, у парках тощо (рис. 13).

Пивна промисловість пропонує обладнання для виготовлення пива і в домашніх умовах. Існує низка компаній, що займаються комерційним засвоєнням цього сектору ринку, наприклад, вони випускають відповідне обладнання, готовий хмелювий солодовий екстракт тощо. Слід зазначити, що у виробництві пива в домашніх умовах використовують технологію верхнього бродіння, тому правильніше називати домашнє пиво елем.



Рис. 10. Пивний зал з обладнанням

Для приготування домашнього пива, передусім, потрібна місткість від 25 до 40 л та інше додаткове обладнання (гідрозатвір, термометр, сифонна трубка тощо). Основні етапи домашнього виробництва пива: стерилізація обладнання — приготування пивного сусла — бродіння (6–20 діб) — доброджування (7–20 діб) — природна карбонізація (місткість шпунтують) — дозрівання (від 30 діб для елей і 1–2 роки для дуже густих темних сортів, барлівайнів).



Рис. 11. Пивний зал з відділенням доброджування



Рис. 12. Англійський паб



Рис. 13. Вулична торгівля пивом в СРСР у 1975 р.
(<http://iconotheque-russe.ehess.fr/>)

На рис. 14 показано зразки домашніх пивоварень.

Загалом, термін «міні-пивоварня» має ширше визначення, оскільки до міні-пивоварень відносять не тільки ресторанны комплекси, але й більш потужні заводи, які обслуговують цілі райони. Прийнята така класифікація: мікропивоварня виготовляє від 25 до 5 000 л за добу, міні-пивоварня — від 5 000 літрів і вище, виробничий міні-пивзавод — від 30 000 л за добу. На міні-пивзаводах випускають пиво за повною технологією, як прийнято на великих підприємствах, тобто готують сусло, яке зброджують, пиво фільтрують, пастеризують, розливають у пляшки або в кеги тощо. Конку rentним стимулом розвитку таких підприємств є висока якість пива або низька ціна за рахунок зниження якості.

В Україні пиво виробляють багато компаній, серед яких провідне місце посідає так звана «Велика четвірка»: корпорація «Оболонь», «Славутич, Carlsberg Group», «САН ІнБев Україна» (Anheuser-Busch InBev) і SABMiller Company (всі — транснаціональні), однак є й малі пивоварні, зокрема ТзОВ «Перша приватна browарня» (Львів), ВАТ «Бровар» (Микулинці) тощо, однак три з них у 2008 р. припинили своє існування [35]. Сьогодні запропонувати новий сорт пива з атрибутом «живе» і зробити акцент на його ремісничому походженні — умова необхідна, але вже недостатня. Ці методи використовують і великі міжнародні компанії, які розливають регіональні сорти непастеризованого пива. Економічні питання міні-пивоварень, їхню тактику і стратегію



Рис. 14. Домашні пивоварні:

- a* — обладнання компанії The Hobby Beverage Equipment Company (Лос Анджелес, США);
б — обладнання компанії Braumeister (Німеччина)

щодо виживання в сучасних умовах розглянуто в статтях [32, 36].

Технології, які застосовують у міні-пивоварнях, є принципово традиційними. Як і в давнину, бродіння здійснюють у відкритих місткостях (бочках), однак зараз вони мають дещо інакший вигляд (рис. 15).



Рис. 15. Відкриті бродильні апарати приватної міні-пивоварні

Сьогодні відкриті бродильні чани відійшли у минуле, оскільки не забезпечують елементарних санітарних норм експлуатації.

На малих підприємствах головне бродіння проводять переважно в горизонтальних або вертикальних закритих бродильних чанах, які споряджені оглядовими вікнами, через які зручно спостерігати за перебігом процесу бродіння (рис. 16).



Рис. 16. Закриті чани головного бродіння на міні-пивоварні

Зручнішими є бродильні чани з конічними днищами, в які легше збирати дріжджі після бродіння, зручніше спостерігати за процесом бродіння (компанія Anton Steinecker Maschinenfabrik GmbH) (рис. 17, 18).

Як і раніше, в міні-пивоварнях використовують зменшені копії традиційних заторних і сусловарильних апаратів (рис. 19–21).

Сучасні міні-пивоварні обов'язково споряджують системами «миття на місці» (CIP). На рис. 22 як приклад показано таку систему (ТзОВ «IMS — Innovative Modular Systems», С.-Петербурґ) [34]. Ця компанія



Рис. 17. Сучасний відкритий чан з конічним дном фірми Steinecker



Рис. 18. Монтаж бродильних чанів з конічним дном фірми Steinecker



Рис. 19. Заторне відділення міні-пивоварні великої потужності



Рис. 20. Сусліварильний апарат міні-пивзаводу



Рис. 21. Міні-пивзавод компанії Flecks Brauhaus Technik GmbH



Автоматизована СІР-станція



Ручна СІР-установка для миття ємностей

Рис. 22. СІР-установки на міні-пивоварні

є розробником нової системи пропagaції чистої культури дріжджів (ЧКД), яка є продуктивнішою, дешевшою, з концентрацією клітин на 30% більше, ніж в інших системах, при цьому усунуто ризик контамінації, і за всіма показниками якості ця продукція перевершує конкурентні аналоги. Суть інновації полягає в тому, що установка складається з двох місткостей: у першій відбувається власне процес пропagaції, а друга є буферною з теплоізоляцією, в яку приймається гаряче сусло з варниці. З буферної місткості гаряче сусло безперервним потоком доливається в пропagaтор, який має відповідну систему охолодження. Детально із системою можна ознайомитись у роботах [37, 38].

Отже, наведені в огляді дані свідчать про значний прогрес, досягнутий в останній час в біотехнологічній галузі виробництва пива. Цей прогрес стосується певним чином і України. Але в цьому напрямі слід вирішити ще багато питань, в тому числі й збільшення обсягів відповідних капіталовкладень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Главачек Ф., Лхотский А. Пивоварение. — М.: Пищевая промышленность, 1977. — 624 с.
2. Калуняц К. А. Химия солода и пива. — М.: Агропромиздат, 1990. — 176 с.
3. Калуняц К. А., Яровенко В. Л., Домарецкий В. А., Колчева Р. А. Технология солода, пива и безалкогольных напитков. — М.: Колос, 1992. — 446 с.
4. Косминский Г. И. Технология солода, пива и безалкогольных напитков. — Минск: Дизайн ПРО, 1998. — 351 с.
5. Тихомиров В. П. Технология пивоваренного и безалкогольного производств. — М.: Колос, 1998. — 448 с.
6. Хорунжина С. И. Биохимические и физико-химические основы технологии солода и пива. — М.: Колос, 1998. — 312 с.
7. Kunze W. Technology brewing and malting. International edition. — Berlin: VLB, 1996. — 726 p.
8. Бэмфорт К. У. Новое в пивоварении. — СПб.: Профессия, 2007. — 520 с.
9. Федоренко Б. Н. Пивоваренная инженерия: технологическое оборудование отрасли. — СПб.: Профессия, 2009. — 1 000 с.
10. Шуманн Г. Безалкогольные напитки: сырье, технологии, нормативы: Пер. с нем. — СПб.: Профессия, 2007. — 280 с.
11. Нарцисс Л. Краткий курс пивоварения: Пер. с нем. А. А. Куреленкова. — СПб.: Профессия, 2007. — 640 с.
12. Прист Ф., Кемпбелл И. Микробиология пива: Пер. с англ. — СПб.: Профессия, 2005. — 368 с.
13. Кунце В. Технология солода и пива: Пер. с нем. — СПб.: Профессия, 2001. — 912 с.
14. Домарецкий В. А. Технология солоду і пива: Підруч. для студ. вищ. навч. закл. — К.: ІНКОС, 2004. — 426 с.
15. Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. — Львів: Інтелект-Захід, 2008. — 736 с.
16. Линия производства пива. — www.keg-torg.ru/index.php/2010-08-17-06-28-27/2010-08-18...
17. ZIEMANN GROUP. — www.ziemann.com/cms/index.php?idcatside=35.
18. Московский пивоваренный завод. — <http://marisha-amber.livejournal.com/189090.html>.
19. Производство пива. Раздел 3. Брожение пивного сусла. Способы непрерывного сбраживания сусла. — beermaster1.narod.ru/44.htm.
20. Пиво. — iok.narod.ru/aaa.html.
21. Пивоваренный завод непрерывного действия. — www.pivovod.ru/.../content/content.php?...
22. Ilkka Virkajärvi. Feasibility of continuous maim fermentation of beer using immobilized yeast. — www.vtt.fi/inf/pdf/publications/2001/P430.pdf.
23. Pilkington P. H., Margarits A., Mensour N. A., Russel I. Fundamentals of Immobilized

- Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: a Review // J. Inst. Brew. — 1998. — V. 104. — P. 19–31.
24. *Boulton C.* Fermentation of beer // in *Brewing: New technologies*. Edited by C Bamforth, University of California Davis, USA. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. — 2006. — N 126. — 500 p.
25. *Brewery of the future Process Engineering / The Engineer*. — [www.theengineer.co.uk/channels/process-engineering/...](http://www.theengineer.co.uk/channels/process-engineering/)
26. *The MEURABREW: the brewhouse of the future!* — www.meura.com/uploads/pdf/Meurabrew%20Paper.pdf.
27. *Brányik T., Vicente A. A., Dostálek P., Teixeira J. A.* A Review of Flavour Formation in Continuous Beer Fermentations // J. Inst. Brew. — 2008. — V. 114 (1). — P. 3–13.
28. *The future of brewing: preparing for the worst / Guardian ... (10.11.10)*. — www.guardian.co.uk/.../sabmiller-future-of-brewing.
29. *TECHIMPEX spol. s r. o.* — www.techimpex.sk/contact.php?lang=eng.
30. *Flecks Brauhaus Technik Austria: Microbrewery Plant ...* — www.brauhaus.austria.com/company.htm.
31. *Anton Steinecker Maschinenfabrik GmbH Products, Services ...* — www.balticnordic.com/anton-steinecker-maschinenfabrik...
32. *Ведущие производители минипивзаводов «Пивное дело...* — www.pivnoe-delo.info/.../.
33. *Малый пивоваренный формат*. — www.beer.lg.ua/node/4.
34. *Инновационные модульные системы*. — inmodsys.com.
35. *Украинское пиво* — Википедия. — ru.wikipedia.org/wiki/Украинское_пиво/.
36. *Уникальная технология производства пива помогла компании «Пятый океан» завоевать место на конкурентном рынке*. — www.vlasnasprava.info/.../management.html?...
37. *Кайтуков Ч.* Системы пропагации пивных дрожжей. Часть I // *Индустрия напитков*. — 2006. — № 3 (45). — С. 20–23.
38. *Кайтуков Ч.* Системы пропагации пивных дрожжей. Часть II // *Там же*. — 2006. — № 3 (46). — С. 14–18.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПИВА

Ю. И. Сидоров

Национальный университет
«Львовская политехника»

E-mail: sydorowy@rambler.ru

Рассмотрены современные тенденции развития процессов пивоварения и бродильных аппаратов для их реализации. Показано, что сегодня самым распространенным способом производства являются ускоренные процессы по методу Натана в одну технологическую стадию в одном аппарате — цилиндроконическом танке. Следующим этапом развития должен быть переход к непрерывным методам, однако эти, достаточно известные способы, пока еще не нашли реализации. Вторым направлением развития пивоварения является внедрение мини-пивоварен, в том числе ресторанных комплексов. Основным стимулом развития этого направления является возможность получения так называемого «живого» пива — высококачественного нефилтрованного продукта, однако сегодня серьезную конкуренцию ему составляют массовые производства, которые освоили технику производства «живого» пива на промышленном уровне.

Ключевые слова: производство пива, цилиндроконический танк, мини-пивоварня.

MODERN PROCESSES AND EQUIPMENT FOR BEER PRODUCTION

Yu. I. Sidorov

«Lviv's Polytechnica»
National University

E-mail: sydorowy@rambler.ru

Modern progress trends of processes of brewing and fermenters for their realization are considered. It is rotined that the today most widespread method of production are speed-up processes on the method of Nathan in one technological stage in one vehicle — cylinder-conical tank — CCT. The next stage of development must be passing to the continuous methods, however these, known enough methods, so far did not find realization. The second directions of development of brewing is distribution of mini-brewerys, including restaurant complexes. The basic stimulus of development of this direction is possibility of receipt of the so-called «living» beer — the high-quality unfiltered product, however today large competition make mass productions which mastered the technique of production of «living» beer at industrial level.

Key words: production of beer, cylinder-conical tank, mini-brewery.

УДК 579.841.11 : 577.114.083 : 578.865.1

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aureofaciens*

Е. А. Киприанова¹
Л. Д. Варбанец¹
В. В. Шепелевич²
С. И. Войчук¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Получено 08.01.2013

Из штаммов *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 — компонентов инсектофунгицидного биопрепарата гаупсин — получены липополисахариды и их фракции, исследована их активность в отношении вируса табачной мозаики. Липополисахариды из клеток штаммов В-111 и В-306 оказались высокоактивными противовирусными агентами и угнетали инфекционность ВТМ на модели трех видов растений-индикаторов в концентрации от 0,001 до 10 мг/мл. Первая фракция липополисахаридов (О-специфические боковые цепи) обоих штаммов не ингибировала вирус табачной мозаики, а часто и стимулировала его репродукцию. В то же время олигосахариды кора (вторая и третья фракции липополисахаридов) в различной степени тормозили развитие вирусной инфекции. По данным электронной микроскопии, при непосредственном контакте липополисахаридов с вирусом *in vitro* вирионы «склеивались», образуя «связки», в то время как в контроле наблюдали отдельные свободные вирусные частицы, что свидетельствует о прямом взаимодействии между липополисахаридами штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* и вирусом табачной мозаики.

Ключевые слова: липополисахариды *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, вирус табачной мозаики, снижение инфекционности, электронная микроскопия.

Активный метаболизм, способность к синтезу разнообразных низкомолекулярных соединений и биополимеров позволяют рассматривать обширный род *Pseudomonas* как один из потенциально наиболее перспективных для использования в биотехнологии, медицине, экологии, сельском хозяйстве. Биопрепараты на основе штаммов *P. putida*, *P. fluorescens* и *P. chlororaphis* широко представлены на современном рынке продуктов биотехнологии и с успехом применяются в качестве средства биологической защиты растений. К числу последних принадлежит и биопрепарат гаупсин, созданный на основе двух штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, который защищен патентом Украины [1] и обладает антифунгальной, антибактериальной и энтомопатогенной активностью.

В последние годы нашими исследованиями был расширен спектр биологической активности гаупсина и показано наличие у него антифитовирусных свойств, связанных с синтезом бактериями термостабиль-

ных экзополимеров [2]. Представляло интерес выяснить, не вносят ли свой вклад в биологическую активность *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* липополисахариды (ЛПС) этих микроорганизмов, поскольку исследованиями последних лет установлено, что они играют важную роль во взаимоотношениях растений с бактериями рода *Pseudomonas* — возбудителями заболеваний, с одной стороны, и с ростстимулирующими штаммами псевдомонад — с другой [3].

Целью работы была оценка противовирусных свойств липополисахаридов штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 — компонентов биопрепарата гаупсин на модели вируса табачной мозаики (ВТМ).

Материалы и методы

Объектом исследования были ЛПС, полученные из клеток *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306.

Микроорганизмы выращивали в условиях аэрации на качалках (220 об/мин) на среде Кинг А следующего состава (г/л): пептон — 20, K₂SO₄ — 20, глицерол — 20, MgCl₂ — 7, дистиллированная вода (до 1 л) [4]. Культивирование проводили в течение 72 ч при температуре 27 °С.

ЛПС получали экстракцией из высушенных ацетоном и эфиром клеток 45%-м водным раствором фенола при 65–68 °С. Водные фракции диализовали против водопроводной, а затем дистиллированной воды для удаления фенола с последующим удалением нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой, а также ультрацентрифугированием (104 000 g, 4 ч). Очищенные от нуклеиновых кислот ЛПС лиофилизировали.

Для выделения отдельных структурных компонентов молекулы ЛПС расщепляли 3%-й уксусной кислотой (100 °С, 6 ч), осадок липида А получали ультрацентрифугированием (25 000 g, 40 мин), а супернатант концентрировали до объема 10 мл и фракционировали на колонке (70×3 см) с сефадексом G-50 в 0,025 М пиридинацетатном буфере, pH 4,5. В результате были получены фракции О-специфического полисахарида (ОПС) и олигосахаридов кора (ОГ-кора) [5].

Антивирусную активность оценивали по влиянию препаратов на вирус табачной мозаики (ВТМ) (штамм U₁). Суспензию ВТМ (4 мг/мл), очищенную методом дифференциального центрифугирования, сохраняли при 4 °С в ампулах в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,4) и использовали по мере необходимости. В опытах на растениях-индикаторах по определению антивирусной активности ЛПС использовали ВТМ в конечной концентрации 5 мкг/мл; в электронно-микроскопических исследованиях для изучения взаимодействия вируса и ЛПС применяли ВТМ в концентрации 2 мг/мл.

Способность ЛПС тормозить развитие вирусной инфекции изучали методом половинок на сверхчувствительных к ВТМ растениях дурмана (*Datura stramonium* L.) и табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт Иммунный 580 и *Nicotiana glauca* Н.). При этом исследуемые ЛПС в конечных концентрациях 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 мг/мл добавляли к ВТМ (5 мкг/мл) за 30 мин до инокуляции растений (в контроле к ВТМ добавляли дистиллированную воду). Все препараты, кроме липида А, растворяли в дистиллированной воде. Липид А растворяли в 1%-м диметилсульфоксиде (ДМСО).

Степень угнетения вирусной инфекции (I) рассчитывали по формуле:

$$I = (1 - O/K) \cdot 100, \%,$$

где O — среднее количество некрозов в опыте, K — среднее количество некрозов в контроле. Полученные результаты обрабатывали статистически с применением метода парных сравнений. Статистические результаты представляли в виде доверительных интервалов либо $X_{ср.} \pm Sx_{ср.}$

В электронно-микроскопических исследованиях 0,4 мл смеси ВТМ и ЛПС, содержащей 2 мг/мл ВТМ и 5 мг/мл ЛПС, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин (контролем служил ВТМ в той же концентрации, разведенный водой), затем готовили препараты для исследований в электронном микроскопе. Использовали медные сеточки (Sigma, США) с пленкой-подложкой из формвара (Serva, Германия), которые помещали на каплю исследуемого материала, выдерживали 1,5 мин и проводили негативное контрастирование 2%-м водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК). Анализ сеточек осуществляли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 10 000–30 000.

Результаты и обсуждение

Для выделения отдельных структурных компонентов макромолекулы ЛПС (О-специфический полисахарид — ОПС, олигосахарид кора) использовали мягкий кислотный гидролиз, при котором разрушается кетозидная связь между остатком дезоксиоктоновой кислоты (КДО), компонентом олигосахаридов кора и гидроксильной группой при С6-остатке глюкозамина II, входящего в состав липида А. Выпавший при этом осадок липида А отделяли ультрацентрифугированием. Водорастворимые продукты гидролиза ЛПС разделяли гель-хроматографией на сефадексе G-50. Было показано, что нативные ЛПС представляют собой смесь S- и R-типов молекул, о чем свидетельствует присутствие высокомолекулярной фракции ОПС (фракция I) и низкомолекулярных фракций олигосахаридов кора (фракции II и III) (рис. 1).

Для сравнения кроме ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 были также использованы ЛПС, выделенные из других видов бактерий — *Rahnella aquatilis* и *Ralstonia solanacearum*.

ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 и В-306 оказались высокоактивными противовирусными агентами и неизменно

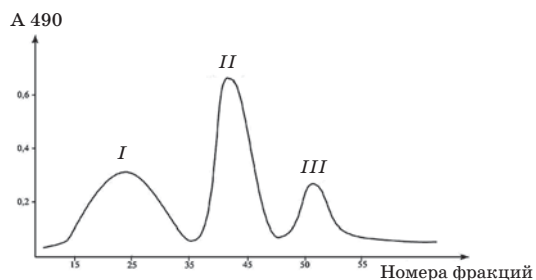


Рис. 1. Профиль элюции на сефадексе G-50 деградированных ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306: I — фракции O-специфического полисахарида; II и III — фракции олигосахарида кора

демонстрировали эффект в отношении ВТМ на растениях семейства *Solanaceae*. При концентрации ЛПС 1–10 мг/мл угнетение инфекционности вируса составляло 98–100%, при 0,1 мг/мл — 57–69%, при 0,01 мг/мл — 43–44%. В концентрации 1 мкг/мл снижение инфекционности вируса составляло в различных экспериментах и на различных растениях-индикаторах от 10,2 до 46,0%. Активность обоих ЛПС была приблизительно одинаковой. В табл. 1 приведены результаты одного из экспериментов на растениях дурмана (*Datura stramonium* L.) и табака (*Nicotiana sanderae* Н., *Nicotiana tabacum* L.).

Установлено, что ЛПС, полученные из микроорганизмов, принадлежащих к другим родам и видам (*Rahnella aquatilis* и *Ralstonia solanacearum*), не были активны в отношении ВТМ, а иногда даже стимулировали образование некрозов (табл. 2).

Известно, что ЛПС фитопатогенных видов псевдомонад принадлежат к особой группе молекулярных структур, так называемых РАМР (Pathogen-Associated Molecular Patterns), подавляющих защитный ответ растения на бактериальную инфекцию [6]. В то же время имеются сообщения о том, что ЛПС ростстимулирующих штаммов бактерий рода *Pseudomonas* (т. е. штаммов, используемых для биоконтроля) действуют противоположным образом: инициируют синтез растениями антимикробных агентов, этилена, гиперчувствительную реакцию, т. е. системную экспрессию защитных механизмов растения [3, 6]. В этой связи представляют интерес данные о защищенном патентом Японии штамме бактерий рода *Pseudomonas*, ЛПС которого является индуктором устойчивости однодольных растений Monocotyledonae к заболеваниям, действуя на общие механизмы устойчивости растений к патогенам [7].

В доступной нам литературе мы не встретили данных о противовирусном действии ЛПС бактерий рода *Pseudomonas*, однако исходя из приведенных выше данных можно предположить, что обнаруженная нами активность штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* может быть связана с неспецифической стимуляцией защитных сил растений, инфицированных ВТМ. Выясняя, какой структурный компонент молекулы ЛПС (липид А, олигосахарид кора или O-специфический полисахарид)

Таблица 1. Угнетение ВТМ-инфекции препаратами липополисахаридов из штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 и В-306 на растениях *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana sanderae* Н.

Штамм	ЛПС, мг/мл	<i>Datura stramonium</i> L.			<i>N. tabacum</i>			<i>Nicotiana sanderae</i> Н.		
		Количество некрозов		I, %	Количество некрозов		I, %	Количество некрозов		I, %
		опыт	контроль		опыт	контроль		опыт	контроль	
В-111	10	0,0	9,6	100 ^b	–	–	–	0	68,8	100 ^b
	1	0,5	3,0	83 ^b	0,6	11,8	95 ^b	1,8	54,6	97 ^b
	0,1	2,3	11,2	79 ^b	–	–	–	13,2	33,6	61 ^b
	0,01	7,0	8,8	21 ^a	12,4	31,6	61 ^a	12,0	21,0	43 ^a
	0,001	9,4	11,1	15 ^a	5,0	9,2	46 ^a	19,0	22,0	14 ^a
В-306	10	0,0	4,6	100 ^b	0,0	12,3	100 ^b	0,2	41,4	100 ^b
	1	1,4	15,8	91 ^b	4,6	21,3	78 ^b	0,85	13,57	94 ^b
	0,1	1,8	7,8	77 ^b	7,2	16,6	57 ^b	6,0	10,4	43 ^b
	0,01	3,4	7,2	53 ^a	29,4	35,4	17 ^a	3,5	6,0	42 ^a
	0,001	5,4	7,6	29 ^a	28,8	28,2	10,2 ^a	11,0	9,6	11,4 ^a

I, % — снижение инфекционности ВТМ; а — 0,1% < P ≤ 1%, b — P ≤ 0,1%; – результат отсутствует.

Таблиця 2. Влияние ЛПС *Rahnella aquatilis* и *Ralstonia solanacearum* в концентрации 10 мг/мл на ВТМ-инфекцию

Микроорганизм	Снижение инфекционности ВТМ (I, %) на растениях	
	<i>Datura stramonium</i> L.	<i>Nicotiana sanderae</i> H.
<i>Rahnella aquatilis</i>	3 ^a	30 ^a
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Стимуляция 74% ^a	Стимуляция 11% ^a

проявляет максимальную противовирусную активность, установили, что О-специфические полисахариды обоих штаммов не ингибировали ВТМ, а иногда и стимулировали его развитие на 10–26% на всех испытанных моделях растений-индикаторов. В то же время фракции олигосахаридов кора (фракции II и III, рис. 2 и 3) в различной степени тормозили развитие вирусной инфекции. Исследовать противовирусную активность липида А нам не удалось. Эта фракция оказалась токсичной для растений-индикаторов и вызывала увядание листьев табака и дурмана. Вместе с тем, согласно данным литературы [3], защитный эффект ЛПС обусловлен частью молекулы, содержащей как липид А, так и связанный с ним олигосахарид кора. Возможно, это объясняет и более низкую по сравнению с нативной молекулой ЛПС активность отдельных фракций олигосахаридов кора. В то же время наши данные о влиянии фракций олигосахаридов кора на ВТМ в целом укладываются в представления о том, что во взаимоотношениях ЛПС с растениями именно олигосахарид кора является активным компонентом, а его роль сводится к угнетению или активации защитных реакций растений.

Можно предположить, что и в наших исследованиях олигосахарид кора стимулировал защитные механизмы растений-индикаторов и препятствовал развитию вирусной инфекции.

С другой стороны, нас интересовало, влияют ли исследуемые ЛПС на ВТМ при их непосредственном контакте *in vitro* в отсутствие растения. Электронно-микроскопические исследования показали, что под влиянием ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 и В-306 свободно расположенные вирионы «склеиваются», образуя плотные скопления, комплексы, «связки» вируса (рис. 4, Б, В), в то время как в контроле наблюдаются отдельные свободные вирусные частицы (рис. 4, А). Эти данные свидетельствуют о прямом взаимодействии липополисахаридов псевдомонад с ВТМ.

Проведенные нами электронно-микроскопические исследования показали высокую интенсивность образования комплексов ВТМ под влиянием ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*.

Аналогичные эффекты наблюдала Е. Н. Полищук при изучении взаимодействия глюкана *Ganoderma adspersum* с ВТМ [8]. Полученные результаты позволили сделать вывод, что глюкан образовывал комплексы с вирионами. Это взаимодействие существенно не влияло на структуру вириона, поскольку образуемый комплекс диссоциировал при разведении смеси, и инфекционная активность ВТМ при этом сохранялась. Автор рассматривает образование комплекса полисахарида с вирусом как один из возможных механизмов антивирусного действия и высказывает предположение,

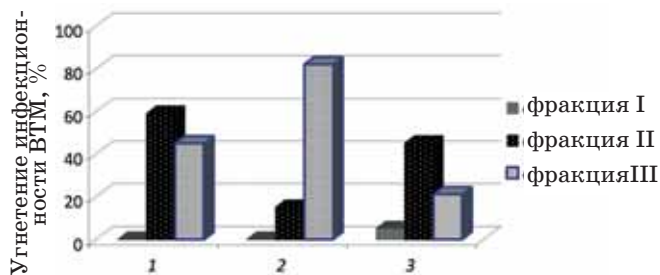


Рис. 2. Противовирусная активность О-специфического полисахарида (фракция I) и олигосахаридов кора (фракции II и III) ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 в концентрации 1 мг/мл на растениях *Nicotiana tabacum* (1), *Nicotiana sanderae* (2) и *Datura stramonium* (3)

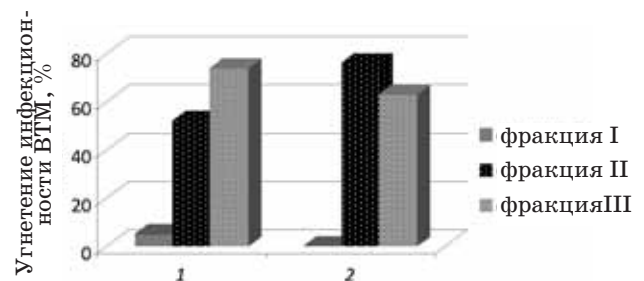


Рис. 3. Противовирусная активность О-специфического полисахарида (фракция I) и олигосахаридов кора (фракции II и III) ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-306 в концентрации 1 мг/мл на растениях *Nicotiana tabacum* (1) и *Nicotiana sanderae* (2)

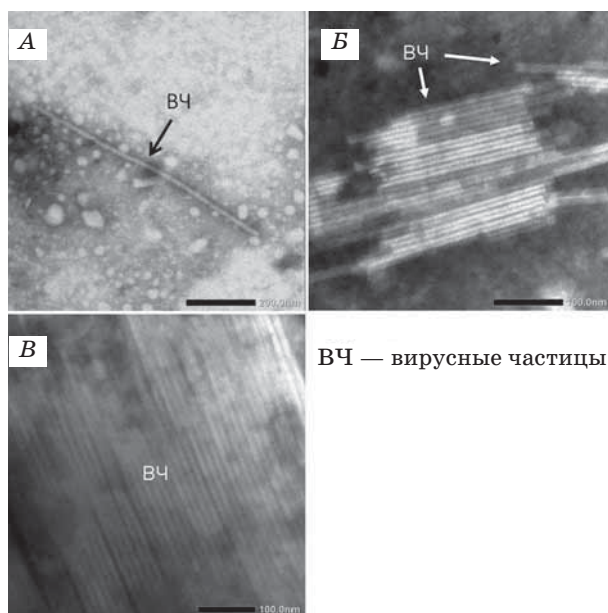


Рис. 4. Электронная микроскопия вируса табачной мозаики, контрастированного фосфорно-вольфрамовой кислотой:

А — вирус разведен водой в конечной концентрации 2 мг/мл (контроль);
Б — смесь ВТМ (2 мг/мл) и ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-306 (5 мг/мл) после их совместного инкубирования в течение 30 мин;
В — смесь ВТМ (2 мг/мл) и ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 (5 мг/мл) после их совместного инкубирования в течение 30 мин.
 Шкала на **А** — 200 нм, **Б** и **В** — 100 нм

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 73682 UA, АО 1N 63/00, С 12 N 1/20. Инсектофунгіцидний препарат гаупсин для боротьби із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О. А. Кіпріанова, С. В. Гораль. — Заявл. 10.03.2004; Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
2. Балко О. І., Кіпріанова О. А., Коваленко О. Г. та ін. Антифiтовiрусна активнiсть бiопрепарату гаупсин // Мiкробiол. бiотехнол. — 2010. — № 2. — С. 51–57.
3. Miller S. H., Mark G. L., Franks A., O'Gara F. Pseudomonas–Plant Interactions in: Bernd H. A. Rehm Ed. Pseudomonas. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. — Darmstadt: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. — P. 331–369.
4. King E. O., Ward M. K., Raney D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein // J. Lab. Clin. Med. — 1954. — V. 44. — P. 301–307.
5. Варбанец Л. Д., Здоровенко Г. М., Книрель Ю. А. Методи дослідження ендотоксинів. — К.: Наук. думка, 2006. — 236 с.
6. Dow M., Newman M. A., Roepenak E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides // Ann. Rev. Phytopathol. — 2000. — V. 38 — P. 241–261.
7. JPN 2007077065 (A), AO1N63/00, AO1N63/02. Resistance-inducing agent for disease of monocotyledonae / Shibuya Naoto, Kaku Hanae, Desaki Yoshitake. — 2007-03-29.
8. Полищук Е., Коваленко А., Антипов И., Оверченко В. Ингибирование инфекционности вируса табачной мозаики в присутствии глюкана *Ganoderma adspersum* (Schular Donk) в изолированных протопластах табака // Вісн. КНУ, Серія «Біологія». — 2012. — Вип. 62. — С. 69–72.

что в процессе образования комплексов имело место ионное взаимодействие *in vitro* между карбоксильными группами остатков глюкуроновой кислоты полисахарида и NH₂-группами капсидного протеина оболочки ВТМ. Возможно, нечто подобное происходит и при действии на вирус ЛПС исследованных нами псевдомонад, хотя механизмы наблюдаемого эффекта требуют специальных исследований.

Таким образом, установлена высокая активность ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* в отношении ВТМ в традиционных опытах на растениях-индикаторах; показана связь этой активности с полисахаридами кора. Электронно-микроскопическими исследованиями продемонстрировано взаимодействие между ЛПС и ВТМ при непосредственном контакте *in vitro*. Полученные данные позволяют предположить, что существуют по крайней мере два пути воздействия липополисахаридов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* на инфекцию, вызванную ВТМ: прямое влияние исследованных ЛПС на вирус при контакте и влияние их на процессы клеточного метаболизма в целом, состоящее в активации защитных механизмов растения.

**ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ
ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ
Pseudomonas chlororaphis
subsp. *aureofaciens***

О. А. Кіпріанова¹
Л. Д. Варбанець¹
В. В. Шепелевич²
С. І. Войчук¹

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

²Київський національний університет
імені Тараса Шевченка

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

**ANTIVIRAL ACTIVITY
OF LIPOPOLYSACCHARIDES
OF *Pseudomonas chlororaphis*
subsp. *aureofaciens***

E. A. Kiprianova¹
L. D. Varbanets¹
V. V. Shepelevich²
S. I. Voichuk¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Taras Shevchenko

Kyiv National University

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Зі штамів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і В-306 — компонентів інсектофунгіцидного біопрепарату гаупсин — одержано ліпополісахариди та їхні фракції і досліджено їхню активність щодо вірусу тютюнової мозаїки. Ліпополісахариди із клітин штамів В-111 і В-306 виявились високоактивними противірусними агентами і пригнічували інфекційність вірусу тютюнової мозаїки на трьох видах рослин-індикаторів у концентрації від 0,001 до 10 мг/мл. Перша фракція ліпополісахаридів (О-специфічні бічні ланцюги) обох штамів не пригнічувала вірус тютюнової мозаїки, а часто й стимулювала його репродукцію. Водночас олігосахариди кору (друга і третя фракції ліпополісахаридів) різною мірою гальмували розвиток вірусної інфекції. За даними електронної мікроскопії, за безпосереднього контакту ліпополісахаридів із вірусом *in vitro* віріони «склеювалися», утворюючи «зв'язки», тимчасом як у контролі спостерігали окремі вільні вірусні частинки, що свідчить про пряму взаємодію між ліпополісахаридами штамів *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* та вірусом тютюнової мозаїки.

Ключові слова: ліпополісахариди *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, вірус тютюнової мозаїки, зниження інфекційності, електронна мікроскопія.

Lipopolysaccharides and their fractions were obtained from strains *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* UCM B-111 and UCM B-306 — components of insectofungicidal gaupsin biopreparation; their activity against tobacco mosaic virus has been studied. Lipopolysaccharides of strains B-111 and B-306 proved to be highly active antiviral agents and inhibited tobacco mosaic virus infectivity for three species of indicating plants in concentrations 0,001–10 mg/ml. First lipopolysaccharides fraction (O-specific side chains) did not inhibit and often stimulated the virus reproduction. At the same time the core oligosaccharides (the second and the third lipopolysaccharides fractions) decreased to different extent the virus infection development. According to electron microscopy data the virions stucked together forming the sneafs at the direct lipopolysaccharides-virus contact *in vitro* whereas the single free virus particles were observed in the control. Evidence of direct interaction between lipopolysaccharides of *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strains and tobacco mosaic virus is provided.

Key words: *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* lipopolysaccharides, tobacco mosaic virus, infectivity inhibition, electron microscopy.

СТВОРЕННЯ ТА ВИВЧЕННЯ КУЛЬТУРИ ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ *Althaea officinalis* L. З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ $\alpha 2\text{В}$ ЛЮДИНИ

Н. А. Матвєєва¹
Ю. Й. Кудрявець²
О. А. Ліхова²
О. Ю. Кваско¹
А. М. Шаховський¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
НАН України, Київ

²Інститут експериментальної патології, онкології
та радіобіології ім. Р. Е. Кавецького НАН України, Київ

E-mail: joyna@ukr.net

Отримано 7.02.2013

Метою роботи було одержання культури «бородатих» коренів *Althaea officinalis* L. з геном інтерферону $\alpha 2\text{В}$ людини (*ifn- $\alpha 2\text{b}$*), визначення вмісту фруктанів та противірусної активності екстрактів із трансгенних коренів. Трансформування листових та кореневих експлантів здійснювали методом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації. Противірусну активність визначали за зниженням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (штам Індіана) у клітинах нирки бика лінії MDBK.

З обох типів експлантів з частотою 100% отримано трансгенні корені алтею. Методом ЗТ-ПЛР підтверджено транскрипцію гена *ifn- $\alpha 2\text{b}$* . Різні клони одержаних «бородатих» коренів відрізнялися за швидкістю росту — приріст маси за 30 діб коливався від 0, 036 \pm 0,008 до 0,371 \pm 0,019 г з однієї точки росту, а також за синтезом фруктанів, вміст яких максимально дорівнював 154,6 \pm 6,62 мг/г сухої маси коренів. Показано, що генетична трансформація у деяких випадках сприяла підвищенню швидкості росту та збільшенню накопичення фруктанів у трансгенних коренях *A. officinalis*.

Екстракти з культивованих *in vitro* коренів виявили високу (до 26 000 МО/г маси) активність проти вірусу везикулярного стоматиту.

Таким чином, було отримано трансгенні корені алтею, які відзначалися високими швидкістю росту, рівнем накопиченням фруктанів та противірусною активністю.

Ключові слова: *Agrobacterium rhizogenes*, *Althaea officinalis* L., генетична трансформація, інтерферон $\alpha 2\text{В}$ людини, фруктани.

Застосування методів генетичної трансформації, зокрема з використанням бактерій роду *Agrobacterium*, уможливило одержання рослин, які синтезують невластиві для них протеїни. Такі рослини викликають досить великий інтерес з огляду на те, що їх можна використовувати як біофабрики для продукування цінних лікарських сполук завдяки включенню до їхнього геному перенесених генів.

Особливий інтерес як об'єкти генетичної трансформації та потенційні продуценти сполук медичного призначення становлять лікарські рослини, адже вони природно синтезують сполуки, які використовують для лікування та профілактики низки захворювань [1].

Відомо, що генетична трансформація із застосуванням агробактерій може сприяти

підвищенню рівня синтезу цінних природних сполук у рослинах. Перенесення до геному рослин цільових генів, що кодують синтез протеїнів з лікувальними властивостями, дає змогу отримувати рослини, які продукують як природні, так і невластиві для даного виду сполуки медичного призначення. Із застосуванням *A. rhizogenes* для генетичної трансформації рослин одержують культуру так званих «бородатих» коренів, які ростуть на живильному середовищі за відсутності регуляторів росту і мають характерний фенотип [2]. Такі корені, так само як і вихідні рослини, є продуцентами природних сполук [3] або сполук, що синтезуються завдяки перенесенню чужорідних генів [4, 5]. Культура коренів є більш генетично стабільною порівняно з культурами клітин [6]. «Бородаті» корені використовують

у біореакторах для продукування цінних сполук [7, 8].

Рослини *Althaea officinalis* (Malvaceae) є лікарськими і набули застосування у народній та традиційній медицині. У коренях і листях алтею синтезуються такі сполуки, як флавоноїди, глікозиди, кумарини та ін. Ці рослини використовують для лікування кашлю, запалення шлунку, як протипухлинний, противірусний, антибактеріальний та імуностимулювальний засіб [9–12].

Незважаючи на давнє та широке застосування рослин алтею у медичній практиці, досі ці рослини практично не використовували як об'єкти біотехнологічних досліджень. Є лише обмежене коло публікацій щодо культивування *in vitro*, зокрема ініціювання росту адвентивних пагонів [13]. У наших дослідженнях рослини алтею було використано для генетичної трансформації з метою одержання культури «бородатих» коренів та вивчення накопичення фруктанів, а також противірусної активності екстрактів із трансгенних коренів.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугувало насіння рослин *Althaea officinalis* L. (виробництва фірми «Насіння України»). Для введення рослин *in vitro* насіння стерилізували у 25%-му розчині комерційного препарату «Білизна» протягом 10 хв, промивали тричі по 5 хв стерильною дистильованою водою і культивували на поверхні агаризованого середовища 1/2МС (середовище Мурасіге–Скуга [14] зі зменшеним удвічі вмістом макро-солей) при температурі 24 °С та 16-годинному освітленні. Як експланти використовували листки 10–14-денних проростків, на яких робили поперечні надрізи, а також корені цих проростків.

Для трансформації застосовували *A. rhizogenes* (штам GV3101) з векторною конструкцією pCB161 [15]. Бактерії вирощували на середовищі LB [16] з антибіотиками (100 мг/л карбеніциліну, 50 мг/л рифампіцину) на ротаційному шейкері (200 об/хв) при температурі 28 °С упродовж 48 год. Трансформацію проводили згідно з раніше описаною методикою [15]. Після кокультивування з агробактеріями експланти вирощували в чашках Петрі на агаризованому середовищі 1/2 МС протягом двох діб, потім переносили на середовище 1/2МС із 600 мг/л цефатоксиму. Оскільки використаний вектор мав ген *nptII*, селекцію трансгенних коренів здійснювали в присутності 25 мг/л

канаміцину, який додавали до живильного середовища через 9 діб після трансформації.

Транскрипцію перенесених генів досліджували, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР), поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Сумарну РНК виділяли за методикою [17]. Використовували набір реактивів Fermentas і праймери, специфічні до генів *ifn-α2b* (5'-ttgatgctcctggcacag-3', 5'-ttctgctctgacaacctc-3', 396 п.н.) та *nptII* (5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' і 5'-gctctagatccagagtcccgcctcagaag-3', 622 п.н.). Вміст поліфруктанів визначали за методикою [18] і перераховували на суху масу коренів.

Для приготування протеїнових екстрактів рослинний матеріал зважували, розтирали з фосфатним буфером (рН 7,0), переносили у центрифужну пробірку та центрифугували 15 хв при 15 000g (+4 °С). Надосад відбирали, переносили в чисту пробірку. До осаду додавали 0,3 мл буфера, 1% додецилсульфату натрію, 1мМ інгібітора протеаз (PMSF), витримували на льоду 10 хв, центрифугували при 3 000 g. Обидва екстракти поєднували. Вміст протеїну визначали за методом Бредфорда [19].

Противірусну активність встановлювали мікрометодом за зниженням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (штам Індіана) у клітинах нирки бика лінії MDBK, які є високочутливими до антивірусної дії інтерферону-альфа людини. Застосовували методику, описану в статті [20]. Результати реєстрували через 24 год. За одну одиницю активності інтерферону приймали розведення зразків, які захищали 50% клітинного моношару від цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту. Титр інтерферону виражали у міжнародних одиницях на 1 г маси коренів (МО/г) або у міжнародних одиницях на 1 мкг загального розчинного протеїну (МО/мкг).

Результати та обговорення

Ріст коренів на експлантах (як на листових, так і на кореневих) починався через 10–12 діб після кокультивування з агробактеріями. Корені формувалися на всіх експлантах (три незалежні експерименти), частота коренеутворення досягала 100% (у кожному експерименті використовували по 40 експлантів). Приріст довжини за 10 днів становив 8–10 мм. Отримані корені мали характерні для «бородатих» коренів ознаки — ріст на безгормональному середовищі, негативний геотропізм, значну розгалуженість (рис. 1).

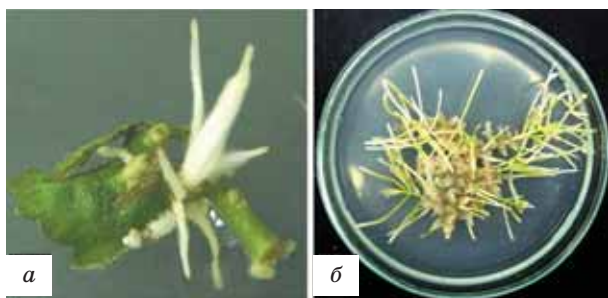


Рис. 1. Коренеутворення на листових експлантах алтею (а) та ріст «бородатих» коренів на безгормональному середовищі МС (б) після трансформування за допомогою *A. rhizogenes* з вектором pCB161

Термінальні ділянки коренів завдовжки близько 10 мм відділяли від експлантів і переносили на поверхню живильного середовища 1/2МС для нарощування біомаси та визначення швидкості росту (за приростом маси за 30 діб). Корені різних ліній, отриманих після *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації, відрізнялися за швидкістю росту. Так, приріст маси коренів за 30 діб коливався від $0,036 \pm 0,008$ до $0,371 \pm 0,019$ г (рис. 2).

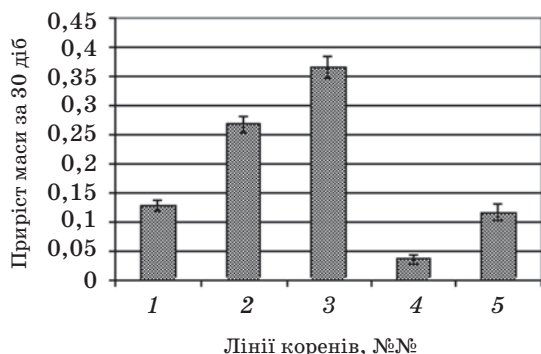


Рис. 2. Приріст маси «бородатих» коренів алтею

Проведені ПЛР-аналізи підтвердили наявність цільового та селективного генів (відповідно *ifn-α2b* та *nptII*), а також *rolB* гена агробактерій. ЗТ-ПЛР-аналіз виявив, що у всіх лініях коренів відбувається синтез мРНК цільового гена (рис. 3), а отже, відсутнє так зване «мовчання» генів, яке може відбуватися в разі трансформування ядерної ДНК рослин.

Відомо, що генетична трансформація може призводити до змін у синтезі запасних сполук. Раніше нами було показано, що трансгенні корені цикорію та салату, трансформовані агробактеріями з різними цільовими генами, у тому числі з геном *ifn-α2b*,

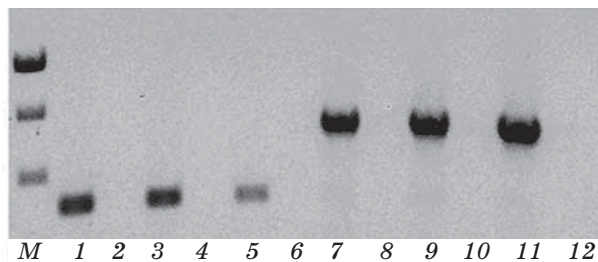


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР генів *nptII* (622 п.н.) та *ifn-α2b* (396 п.н.) трансгенних коренів алтею: М — ДНК-маркер (O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas); парні треки — синтез зворотних транскриптів за відсутності ревертази; непарні — ЗТ-ПЛР з ревертазою

мають підвищений вміст фруктанів [21]. Тому доцільно було визначити, чи вплинула генетична трансформація на синтез фруктанів у трансгенних коренях алтею. Порівняння виявило, що різні лінії коренів відрізнялися одна від одної за вмістом фруктанів, який коливався від $67,20 \pm 4,47$ до $154,62 \pm 6,62$ мг/г сухої маси коренів (рис. 4). У коренях нетрансформованих рослин (контроль) вміст фруктанів дорівнював $69,32 \pm 3,95$ мг/г сухої маси. Отже, для низки ліній трансгенних коренів встановлено достовірне підвищення вмісту фруктанів порівняно з контролем. Порівняння швидкості росту та накопичення фруктанів показало, що найменший вміст фруктанів спостерігався в лінії з найбільшою швидкістю росту, що є цілком закономірним і встановлено нами раніше на трансгенних коренях цикорію. Такі результати також узгоджуються з даними літератури щодо впливу генетичної трансформації на ріст та синтез сполук у трансгенних рослинах. Відомо, що різні лінії (клони) є незалежними трансформантами [22] і можуть

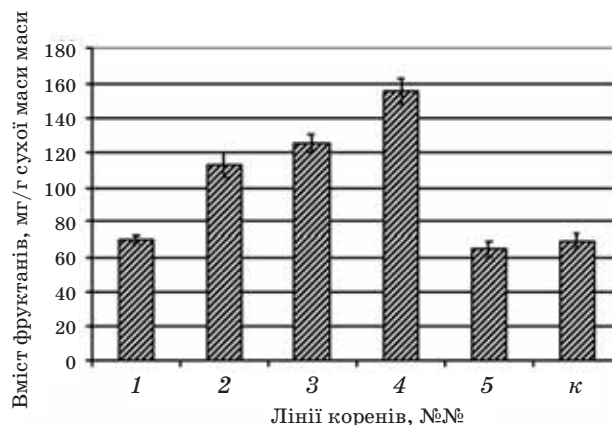


Рис. 4. Вміст фруктанів у трансгенних коренях алтею: 1–5 — незалежні клони, κ — контроль (нетрансформовані корені)

відрізнятися за морфологією, швидкістю росту, синтезом вторинних метаболітів і запасних сполук, що залежить від низки факторів, зокрема інтеграції трансгенів і кількості копій [23, 24].

Дослідження біологічної активності екстрактів із трансгенних коренів стосовно вірусу везикулярного стоматиту виявило пригнічення вірусу та наявність інтерфероподібної активності, причому рівень активності у коренях різних ліній істотно відрізнявся (таблиця).

Наявність гена *ifn- $\alpha 2b$* , синтез мРНК та противірусна активність протеїнових екстрактів із трансгенних коренів алтею

Лінія коренів	ПЛР (<i>ifn-$\alpha 2b$</i>)	ЗТ-ПЛР (<i>ifn-$\alpha 2b$</i>)	Інтерфероподібна активність	
			МО/г маси коренів	МО/мкг загального розчинного протеїну
Алт 1	+	+	181,812	0,446
Алт 2	+	+	22727,274	12,777
Алт 3	+	+	26086,962	16,025

Примітка: + — позитивний ПЛР- та ЗТ-ПЛР-аналізи.

Раніше було показано, що інтерферони людини можуть синтезуватись у трансгенних рослинах різних видів — тютюні, картоплі, рису, моркві тощо. Рівень противірусної активності рекомбінантного інтерферону рослинного походження варіює у достатньо широких межах. Наприклад, противірусна активність екстрактів із трансгенного рису становила до 30 000–45 000 МО/г маси насін-

ня [25], у рослинах моркви — до 50 700 МО/г сирової маси [26], рослинах картоплі — 210–560 МО/г маси [27], алое — 453,9–10 175,9 МО/г маси [28]. Як впливає з наведених у таблиці даних, рівень противірусної активності протеїнових екстрактів з отриманих нами трансгенних коренів алтею коливався від 181,812 до 26 086,962 МО/г маси. Клон № 3, для якого виявлено найвищу противірусну активність, характеризувався і найбільшою швидкістю росту. Отже, ці корені є перспективними для використання у біотехнологіях продукування інтерферону в рослинних системах.

Порівняння противірусної активності, зареєстрованої у наведених роботах, є дещо умовним, адже різні автори екстрагували інтерферон за різних умов, а також використовували різні клітинні лінії для тестування противірусної дії екстрактів. Разом з тим наведені дані свідчать про можливість одержання рослин, культури коренів або клітинних ліній, які здатні синтезувати біологічно активний інтерферон.

Таким чином, з використанням *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації було отримано культури трансгенних коренів алтею з геном інтерферону *$\alpha 2b$* людини. Частота трансформації з листових та кореневих експлантів була однаковою і становила 100%. Лінії (клони) відрізнялися за швидкістю росту та синтезом фруктанів, максимальний вміст яких дорівнював $154,6 \pm 6,62$ мг/г сухої маси коренів. Протеїнові екстракти із цих коренів, одержані шляхом екстрагування фосфатним буфером, виявляли активність проти вірусу везикулярного стоматиту до 26 086,96 МО/г маси коренів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Sevón N., Oksman-Caldentey K. M. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids // *Planta Med.* — 2002. — V. 68, N 10. — P. 859–868.
2. Tepfer D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: phenotypic consequences and sexual transmission of the transformed genotype and phenotype // *Cell.* — 1984. — V. 37, N 3. — P. 959–967.
3. Roychowdhury D., Majumder A., Jha S. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges in: S. Chandra et al. (eds.), *Biotechnology for Medicinal Plants.* — Berlin — Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. — P. 29–68.
4. Banerjee S., Shang T. Q., Wilson A. M. et al. Expression of functional mammalian P450 2E1 in hairy root cultures // *Biotechnol. Bioeng.* — 2002. — V. 77, N 4. — P. 462–466.
5. Mei-Liang Zhou, Xue-Mei Zhu, Ji-Rong Shao et al. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2011. — V. 90, N 4. — P. 1229–1239.
6. Baiza A. M., Quiroz-Moreno A., Ruiz J. A., Loyola-Vargas V. M. Genetic stability of hairy root cultures of *Datura stramonium* // *Plant Cell Tiss.* — 1999. — V. 59, N 1. — P. 9–17.

7. Choi S. M., Son S. H., Yun S. R. et al. Pilot scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system // *Ibid.* — 2000. — V. 62, N 3. — P. 187–193.
8. Kim Y., Wyslouzil B. E., Weathers P. J. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* — 2002. — V. 38, N 1. — P. 1–10.
9. Ali Shah S. M., Akhtar Naveed, Akram M. et al. Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. // *J. Med. Plants Research.* — 2011. — V. 5, N 24. — P. 5662–5666.
10. Rani S., Khan S. A., Ali M. Phytochemical investigation of the seeds of *Althaea officinalis* L. // *Nat. Prod. Res.* — 2010. — V. 24, N 14. — P. 1358–1364.
11. Deters A., Zippel J., Hellenbrand N. et al. Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (*Althaea officinalis* L.): cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells in vitro // *J. Ethnopharm.* — 2010. — V. 127, N 1. — P. 62–69.
12. Sutovska M., Capek P., Franova S. et al. Antitussive activity of *Althaea officinalis* L. polysaccharide rhamnogalacturonan and its changes in guinea pigs with ovalbumine-induced airways inflammation // *Bratisl. Lek. Listy.* — 2011. — V. 112, N 12. — P. 670–675.
13. Naz R., Anis M. Acceleration of adventitious shoots by interaction between exogenous hormone and adenine sulphate in *Althaea officinalis* L. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2012. — V. 168, N 5. — P. 1239–1255.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Phys. Plant.* — 1962. — V. 15, N. 3. — P. 473–497.
15. Матвеева Н. А., Шаховський А. М., Герасименко І. М. та ін. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$ в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // *Біополімери і клітина.* — 2009. — Т. 25, № 2. — С. 120–125.
16. Маниатис Т., Фрич Е. Ф., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
17. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.* — 1987. — V. 163, N 1. — P. 16–20.
18. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 143 с.
19. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — V. 7, N 72. — P. 248–254.
20. Матвеева Н. А., Кудрявец Ю. И., Лихова А. А. и др. Противовирусная активность экстрактов трансгенных растений цикорія и салата с геном інтерферона α -2b человека // *Цитология и генетика.* — 2012. — № 5. — С. 28–35.
21. Матвеева Н. А., Кваско О. Ю. Особливості накопичення поліфруктанів в трансгенних рослинах цикорію *Cichorium intybus* L. // *Вісник укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* — 2011. — Т. 9, № 1. — С. 65–69.
22. Chilton M. D., Tepfer D. A., Petit A. et al. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host-plant root cells // *Nature.* — 1982. — V. 295. — P. 432–434.
23. Batra J., Dutta A., Singh D. et al. Growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root clones in relation to left- and right-terminilinked Ri T-DNA gene integration // *Plant. Cell. Rep.* — 2004. — V. 23, N 3. — P. 148–154.
24. Chaudhuri K. N., Ghosh B., Tepfer D., Jha S. Spontaneous plant regeneration in transformed roots and calli from *Tylophora indica*: changes in morphological phenotype and tylophorine accumulation associated with transformation by *Agrobacterium rhizogenes* // *Ibid.* — 2006. — V. 25, N 10. — P. 1059–1066.
25. Takehiro M., Morita S., Miki Y. et al. Production of biologically active human interferon- α in transgenic rice // *Plant Biotechnol.* — 2006. — V. 23, N. 1. — P. 91–97.
26. Luchakivskaya Y., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant. Cell. Rep.* — 2011. — V. 30, N 3. — P. 407–415.
27. Kenji Ohya, Takeshi Matsumura, Kazuhiko Ohashi et al. Expression of Two Subtypes of Human IFN- α in Transgenic Potato // *Plant. J. Interferon & Cytokine Research.* — 2001. — V. 21, N 8. — P. 595–602.
28. Lowther W., Lorick K., Lawrence S. D., Wen-Shuz Yeow. Expression of biologically active human interferon alpha 2 in Aloe vera // *Transgenic Res.* — 2012. — V. 21, N 6. — P. 1349–1357.

**СОЗДАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ
ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ *Althaea
officinalis* С ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА
 α 2В ЧЕЛОВЕКА**

Н. А. Матвеева¹
Ю. И. Кудрявец²
А. А. Лихова²
Е. Ю. Кваско¹
А. М. Шаховский¹

¹Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины,
Киев

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

E-mail: joyna@ukr.net

Целью работы было получение культуры «бородатых» корней *Althaea officinalis* L. с геном интерферона α 2b человека (*ifn- α 2b*), определение содержания фруктанов и противовирусной активности экстрактов из трансгенных корней. Трансформацию листовых и корневых эксплантов осуществляли методом *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации. Противовирусную активность определяли по снижению цитопатического действия вируса везикулярного стоматита (штамм Индиана) в клетках почки быка линии MDBK. При использовании двух типов эксплантов с частотой 100% получены трансгенные корни алтея. Методом ОТ-ПЦР подтверждено транскрибирование гена *ifn- α 2b*.

Различные клоны полученных «бородатых» корней отличались по скорости роста — прирост массы за 30 дней колебался от 0,036 ± 0,008 до 0,371 ± 0,019 г (из одной точки роста), а также по синтезу фруктанов, содержание которых максимально составляло 154,6 ± 6,62 мг/г сухой массы корней. Показано, что генетическая трансформация в ряде случаев приводила к повышению скорости роста и увеличению синтеза фруктанов в трансгенных корнях *A. officinalis*.

Экстракты из культивируемых *in vitro* трансгенных корней алтея обнаружили высокую (до 26 000 МЕ/г массы) активность против вируса везикулярного стоматита.

Таким образом, были получены трансгенные корни алтея, которые отличались высокой скоростью роста, значительным накоплением фруктанов и высокой противовирусной активностью.

Ключевые слова: *Agrobacterium rhizogenes*, *Althaea officinalis* L., генетическая трансформация, интерферон α 2b человека, фруктаны.

**CONSTRUCTION AND STUDY
OF *Althaea officinalis* TRANSGENIC
ROOTS CULTURE WITH HUMAN
INTERFERON α 2B GENE**

N. A. Matvieieva¹
Yu. I. Kudriavets²
A. A. Lichova²
O. Yu. Kvasko¹
A. M. Shachovsky¹

¹Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

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

E-mail: joyna@ukr.net

The aim of our work was to obtain *Althaea officinalis* L. «hairy» root culture with human interferon α 2b gene (*ifn- α 2b*), to measure fructans content and antiviral activity of extracts from the transgenic roots. Transformation of leaf and root explants was carried out by means of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. Antiviral activity was measured by the reduction in cytopathic effect of vesicular stomatitis virus (Indiana strain) in bovine kidney cells line MDBK.

Transformation frequency was 100% for leaf and root explants. RT-PCR confirmed *ifn- α 2b* gene transcription. The clones of transgenic roots differed in mass increasing from 0,036 ± 0,008 up to 0,371 ± 0,019 g in 30 days cultivation and in fructan synthesis from 67,2 ± 4,47 up to 154,6 ± 6,62 mg/g roots dry weight.

Extracts from «hairy» roots culture were characterized by high antiviral activity against vesicular stomatitis virus — up to 26 000 IU/ g of roots fresh weight.

In some cases the genetic transformation shown to lead increasing the growth rate and increasing the level of fructan synthesis in transgenic *A. officinalis* roots. Extracts from cultivated *in vitro* marshmallow transgenic roots were characterized by high level of antiviral activity against vesicular stomatitis virus.

Thus, there were obtained transgenic *A. officinalis* roots, characterized by high growth rate, significant accumulation of fructans and high antiviral activity.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, *Althaea officinalis* L., genetic transformation, human interferon α 2b, fructans.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СТРУКТУРОЙ СЛОЖНЫХ ЭФИРОВ 3-ГИДРОКСИ-1,4-БЕНЗДИАЗЕПИН-2-ОНА И СТЕПЕНЬЮ ИХ ГИДРОЛИЗА КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗОЙ

Е. А. Шестеренко
И. И. Романовская
О. В. Севастьянов
Е. А. Семенишина
В. И. Павловский
С. А. Андронати

Физико-химический институт им. А. В. Богатского
НАН Украины, Одесса

E-mail: romairina@gmail.com

Получено 31.10.2012

Осуществлен синтез ряда новых производных 7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она, содержащих в положении 3 фталимидацильный и гексилацильный фрагменты. Структура соединений установлена методами масс-спектрометрии и спектроскопии ПМР. Впервые исследован гидролиз ранее синтезированных сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она — потенциальных анксиолитических и снотворных средств, катализируемый карбоксилэстеразой микросомальной фракции печени свиньи. Показано количественное ингибирование эстеразной активности микросомальной фракции печени свиньи в присутствии селективного ингибитора карбоксилэстеразы-ди-(*n*-нитрофенил)-фосфата. Установлена нелинейность зависимости степени гидролиза от длины ацильного фрагмента 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов, а также снижение степени трансформации субстрата при введении заместителя в положение 1 молекулы. Для производных с фталимидацильным и гексилацильным фрагментами в положении 3 молекулы увеличение числа СН₂-групп в этих заместителях и введение атома хлора в *o*-положение фенильного кольца приводит к увеличению степени гидролиза.

Ключевые слова: эфиры 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она, карбоксилэстераза, микросомальная фракция.

Карбоксилэстераза печени млекопитающих благодаря широкой субстратной специфичности и высокой стереоселективности [1] является перспективным биокатализатором энантиоселективного гидролиза и синтеза обширного ряда алициклических, карбоциклических и гетероциклических соединений [2, 3].

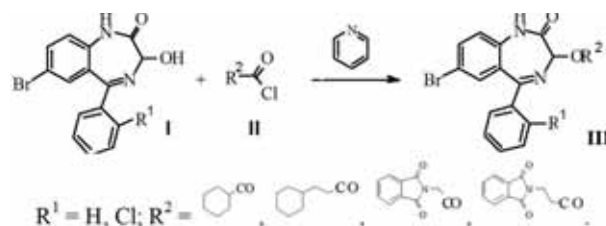
Карбоксилэстераза обладает такими положительными свойствами, как отсутствие коэнзима и суицидальной инактивации, однако из-за нестабильности и высокой стоимости коммерческих препаратов целесообразно использовать ее в составе микросомальной фракции (МФ) печени свиньи.

Ранее нами было показано, что при помощи карбоксилэстеразы МФ возможно получение оптически чистых энантиомеров 3-ацилокси-1,4-бенздиазепин-2-онов [4], потенциальных анксиолитических и снотворных средств [5, 6].

Известно, что структура субстрата влияет на степень его гидролиза, катализируемого карбоксилэстеразой [7, 8], поэтому цель данной работы — исследование влияния заместителей в молекуле производных 1,4-бенздиазепин-2-она на степень их энзиматической трансформации с помощью МФ печени свиньи.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали соединения 1–6 (табл. 1), полученные согласно [8], а также соединения III (7–11, табл. 1), синтезированные по схеме:



Фталимидные производные глицина и β-аланина получены по известной методике [9] сплавлением фталевого ангидрида с соответствующими аминокислотами, хлорангидриды II — обработкой тионилхлоридом соответствующих карбоновых кислот.

Спектры ^1H -ЯМР записаны на приборе Bruker с рабочей частотой 300 МГц, в CDCl_3 и DMSO-d_6 , внутренний стандарт TMS, при t 25 °С. Масс-спектры зарегистрированы методом электронного удара на масс-спектрометре MX-1321 (ионизирующее напряжение 70 эВ, t камеры ионизации 200 °С) и методом FАВ (fast atom bombardment) на масс-спектрометре 7070 EQ VG Analytical (энергия пучка ксенона 6 эВ). Тонкослойная хроматография выполнена на пластинках Silufol UV-254, в системах ацетонитрил–хлороформ–гексан (1:1:3) и бензол–ацетонитрил–гексан–метанол (25:15:5:1), проявление — УФ-светом при $\lambda = 254$ нм. Спектрофотометрические исследования проводили на приборе СФ-46.

В работе использовали МФ печени свиньи, выделенную методом низкоскоростной седиментации при 10 000 g в присутствии ионов Ca^{2+} [10, 11]. В выделенной МФ определяли содержание протеина по методу Лоури в модификации Хартри [12], а также эстеразную активность (по 1-нафтилацетату) [13].

Влияние бис-(*n*-нитрофенил)-фосфата на энзиматическую активность МФ изучали, применяя в качестве субстрата 1-нафтилацетат в условиях, аналогичных таковым при изучении эстеразной активности энзима [13] в диапазоне концентраций ингибитора 0,03–147,0 мкмоль/ дм^3 .

7-Бром-5-фенил-3-фталимидоацетокси-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-он (10). В плоскодонную колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещали 2 г (0,006 моль) 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-она, приливали 10 см^3 безводного хлороформа и 0,4 см^3 пиридина. Смесь перемешивали 10 мин при 0 °С, затем прибавляли суспензию 2-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)этановой кислоты в 10 см^3 безводного хлороформа. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, оставляли на ночь, после чего промывали водой (20 $\text{см}^3 \times 3$), хлороформ упаривали, остаток перекристаллизовывали из этанола. Соединения 7–9, 11 получены аналогичным образом.

Степень гидролиза сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она 1–11 оценивали по их убыли спектрофотометрически гидроксаматным методом при λ 540 нм [14].

Энзиматический гидролиз проводили в течение 2,5 ч в среде диметилсульфоксид: К-фосфатный буферный раствор (0,0167 моль/ дм^3 , рН 7,0) в объемном отношении 2:3, при температуре 37 °С, концентрации субстратов 0,5 ммоль/ дм^3 и эстеразной активности МФ 100 ед/ см^3 . За единицу эстеразной активности принимали количество энзима, катализирующее гидролиз 1 мкмоль 1-нафтилацетата в 1 мин.

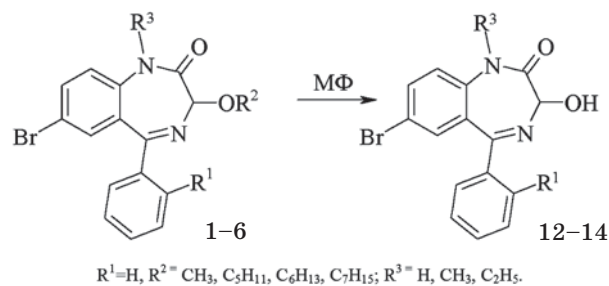
Результаты и обсуждение

Соединения 7–11 идентифицированы методами масс-спектрометрии и спектроскопии ПМР (табл. 1).

Из печени свиньи получена МФ с выходом протеина 38 мг/г ткани и эстеразной активностью 17,25 мкмоль/мг протеина·мин. С помощью выделенной МФ в разработанных условиях [8] осуществлен гидролиз ряда сложных эфиров 3-гидрокси-1,4-бенздиазепин-2-она 1–11.

Для доказательства того, что в гидролизе исследуемых объектов не принимают участия другие энзимы МФ, исследовано ингибирование эстеразной активности микросомальной фракции селективным ингибитором карбоксилэстеразы ди-(*n*-нитрофенил)-фосфатом. Показано количественное ингибирование энзиматической активности МФ печени свиньи в присутствии ингибитора в концентрации 147,06 мкмоль/ дм^3 .

Ранее был проведен энзиматический гидролиз ряда 3-ацилокси-7-бром-5-фенил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов 1–4 с помощью карбоксилэстеразы в составе МФ:




Изучено влияние ацильного фрагмента в молекуле исследуемых субстратов на степень их гидролиза [8]. Показано, что степень гидролиза этих субстратов с помощью микросомальной фракции носит нелинейный характер (табл.1), что может объясняться одновременным влиянием двух факторов — липофильности веществ и стерическими ограничениями встраивания в активный центр энзима, вызываемыми

увеличением длины ацильного фрагмента молекулы. Установлено, что введение алкильных заместителей в положение 1 бензодиазепинового цикла приводит к снижению степени гидролиза в заданных условиях с 38,3% для соединения **1** до 29,3% — для **5** и 24,1% — для **6**, соответственно (табл. 1).

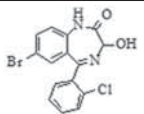
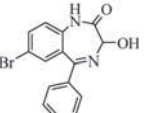
В разработанных условиях осуществлен гидролиз ряда сложных эфиров 7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-она **7–11**, катализируемый карбоксилэстеразой МФ печени свиньи, с образованием в качестве конечных продуктов соответствующих 3-гидроксипроизводных (табл. 2).

Таблица 1. Сложные эфиры 3-гидрокси-7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-она

№	R ¹	R ²	R ³	T _{пл.} , °C	Выход, %	Масс-спектры, m\Z	ПМР, мд				Степень энзиматического гидролиза, %
							СН алифатич.	NH	СН аром.	С(3)-Н	
1	H	CH ₃	H	265–273	74	373*	(DMSO-d6) 2,21 с 3Н (CH ₃)*	9,37*	7,10–7,63*	6,03*	38,3*
2	H	C ₅ H ₁₁	H	158–160	31	429*	2,57–2,62 м 2Н (ОСОСН ₂ -(CH ₂) ₃ -СН ₃) 1,73–1,79 пентет 2Н (ОСОСН ₂ -СН ₂ -(CH ₂) ₂ -СН ₃) 1,35–1,36, м 4Н (ОСОСН ₂ -СН ₂ -(СН ₂) ₂ -СН ₃) 0,88–0,92 т 3Н (СН ₃) *	9,53*	7,10–7,64*	5,95*	53,2*
3	H	C ₆ H ₁₃	H	131–133	20	44*3	2,57–2,62 м 2Н (ОСОСН ₂ -(CH ₂) ₄ -СН ₃) 1,73–1,79 пентет 2Н (ОСОСН ₂ -СН ₂ -(CH ₂) ₂ -СН ₃) 1,30–1,42 м 6Н (ОСОСН ₂ -СН ₂ -(СН ₂) ₃ -СН ₃) 0,86–0,91 т 3Н (СН ₃) *	9,55*	7,10–7,64*	5,95*	48,1*
4	H	C ₇ H ₁₅	H	98–101	20	457*	2,58–2,64 м 2Н (ОСОСН ₂ -(CH ₂) ₅ -СН ₃) 1,71–1,80 пентет 2Н (ОСОСН ₂ -СН ₂ -(CH ₂) ₄ -СН ₃) 1,30–1,41 м 8Н (ОСОСН ₂ -СН ₂ -(СН ₂) ₄ -СН ₃) 0,87–0,91 т 3Н (СН ₃) *	9,26*	7,08–7,63*	6,02*	46,1*
5	H	CH ₃	CH ₃	173–176	42,5	387*	DMSO 3,36 с 3Н (ОСО-СН ₃), 2,20 с 3Н (СН ₃)*	—	7,40–7,93 м 8Н*	5,81 с *	29,3
6	H	CH ₃	C ₂ H ₅	202–205	75	401*	CH ₃ Cl 4,24–4,31 м 1Н (СН ₂), 3,71–3,78 м 1Н (СН ₂), 2,31 с 3Н (ОСО-СН ₃), 1,11–1,13 т 3Н (СН ₂ -СН ₃)*	—	7,33–7,70 м 8Н*	5,89 с*	24,1
7	Cl		H	143–150	24	[M+H] ⁺ 477	2,60–2,67; м 1Н (СО-СН) 1,28–2,16; м 10Н	9,36; с	7,08–7,61; м	6,01; с	31,0
8	Cl		H	90–92	25	[M+H] ⁺ = 519 [M+Na] ⁺ = 541 [M+K] ⁺ = 557	4,30–4,44, м 2Н, (СН ₂) ₂ 4,15–4,21 м 1Н, (СН ₂) ₂ 4,04–4,11 м 1Н, (СН ₂) ₂ 2,16–2,28; м 1Н (СО-СН) 1,10–1,83 м 10Н	9,67; с	7,13–7,60; м	7Н 4,96; с	38,3
9	Cl		H	258–260	76,8	[M+H] ⁺ = 552	4,70–4,85; кв 2Н (СН ₂)	9,59; с	7,15–7,90; м	6,06; с	23,8
10	H		H	249–256	82,6	[M+H] ⁺ = 518	4,71–4,87; кв 2Н (СН ₂)	9,97; с	7,19–7,91; м	6,01; с	0
11	H		H	258–259	72,7	[M+H] ⁺ = 532	4,07–4,12 т 2Н (СН ₂ СОО) 3,04–3,08; т 2Н (NСН ₂)	9,08; с	7,08–7,86; м	5,95; с	20,8

* [8].

Таблиця 2. Характеристики продуктів ензиматического гідроліза сполучень 7–11

Субстрат	Продукти гідроліза	Масс-спектри, m/Z	Т. пл., °С
7–9		365	150–153
10, 11		332	219–220

Изучение степени гидролиза исследуемых субстратов позволило выявить некоторые закономерности. Так, показано, что введение атома Cl в *o*-положение фенильного кольца приводит к повышению степени трансформации соединения **9** по сравнению с **10** (табл. 1).

Увеличение числа CH₂-групп в циклогексилацильном (соединение **8** по сравнению с **7**) и фталимидацильном (соединение **11** по сравнению с **10**) фрагментах молекулы также способствует возрастанию степени гидролиза субстратов. Это может объясняться стерическими затруднениями при взаимодействии с активным центром энзима субстратов с меньшим числом метиленовых групп между гидролизуемой группой и объемным циклическим заместителем. По-видимому, большая подвижность сложнэфирного фрагмента, связанная с увеличением числа CH₂-групп, обеспечивает легкость встраивания в жесткий малый карман активного центра энзима [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Hosokawa M. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs // *Molecules*. — 2008. — V. 13, № 2. — P. 412–431.
2. Bornscheuer U. T., Kazlauskas R. J. *Hydrolases in organic synthesis*. — Weinheim: Wiley-VCH, 2006. — 368 p.
3. Imai T., Hosokawa M. Prodrug approach using carboxylesterases activity: catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue // *J. Pesticide Sci.* — 2010. — V. 35, N 3. — P. 229–239.
4. Шестеренко Е. А., Романовская И. И., Андронати С. А. и др. Стереоселективный гидролиз 1-метил-5-фенил-3-ацетокси-7-бром-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она с помощью свободной и иммобилизованной микросомальной фракции печени свиньи // *Доп. НАНУ*. — 2011. — № 2. — С. 166–172.
5. Сівко Г. І., Кириченко І. М., Мальцев Г. В. та ін. Протисудомна активність складних

Таким образом, с помощью ди-(*n*-нитрофенил)-фосфата показано, что гидролиз производных 7-бром-5-арил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она с использованием микросомальной фракции печени свиньи катализируется карбоксилэстеразой. Установлено, что гидролитическая активность микросомальной фракции в отношении 3-ацилокси-7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она носит нелинейный характер; введение заместителя в положение 1 бензодиазепинового цикла приводит к снижению степени гидролиза. Для производных с фталимидацильным и циклогексилацильным фрагментами в положении 3 молекулы установлено, что увеличение числа CH₂-групп в этих заместителях и введение атома хлора в *o*-положение фенильного кольца способствуют повышению степени гидролиза.

- ефірів 3-гідроксифеназепаму при їх пероральному введенні // *Одес. мед. журн.* — 2006. — Т. 96, № 4. — С. 27–29.
6. Семенішина Е. А., Павловський В. І., Андронати С. А. та ін. Синтез, структура, протисудомні властивості 7-бром-5-(2'-хлор)феніл-1,2-дигідро-3H-1,4-бензодиазепин-2-онів // *Вісн. ОНУ, Сер. Хімія*. — 2010. — Т. 14, № 3. — С. 44–57.
7. Zhu L. M. Applications of pig liver esterases (PLE) in asymmetric synthesis // *Tetrahedron*. — 1990. — V. 46, N 19. — P. 6587–6611.
8. Андронати С. А., Шестеренко Е. А., Севастьянов О. В. и др. Гидролиз сложных эфиров 7-бром-3-гидрокси-5-фенил-1,2-дигидро-3H-1,4-бензодиазепин-2-она микросомальной фракцией печени свиньи // *Вісн. ОНУ, Сер. Хімія*. — 2008. — Т. 13, № 11. — С. 37–45.
9. Гринштейн Дж., Виниц М. *Химия аминокислот и пептидов*. — М.: Мир, 1965. — 815 с.
10. Andronati S., Semenishyna E., Pavlovsky V., Simonov Y. et al. Synthesis, structure and affinity of novel 3-alkoxy-1,2-dihydro-3H-1,4-

- benzodiazepin-2-ones for CNS central and peripheral benzodiazepine receptors // *Eur. J. Med. Chem.* — 2010. — V. 45, N 4. — P. 1346–1351.
11. *Eriksson L. C.* Preparation of liver microsomes with high recovery of endoplasmic reticulum and a low grade of contamination // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1978. — V. 508, N 1. — P. 155–164.
12. *Hartree E. F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — V. 48, N 2. — P. 422–427.
13. *Yang S., Liu K., Guengerich P.* Enantioselective hydrolysis of oxazepam 3-acetate by esterases in human and rat liver microsomes and rat brain S9 fraction // *Chirality.* — 1990. — V. 2. — P. 150–155.
14. *Balls A. K., Wood H. N.* Acetyl chymotrypsin and its reaction with ethanol // *J. Biol. Chem.* — 1956. — V. 219, N 1. — P. 245–256.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ СТРУКТУРОЮ ЕФІРІВ 3-ГІДРОКСИ-1,4-БЕНЗДІАЗЕПІН- 2-ОНУ ТА СТУПЕНЕМ ЇХ ГІДРОЛІЗУ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗОЮ

*Є. А. Шестеренко
І. І. Романовська
О. В. Севастьянов
К. О. Семенішина
В. І. Павловський
С. А. Андронаті*

Фізико-хімічний інститут
ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

E-mail: romairina@gmail.com

Здійснено синтез ряду нових похідних 7-бром-5-арил-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону, що містять у положенні 3 фталімідоацильний і гексилацильний фрагменти. Структуру сполук встановлено методами мас-спектрометрії та спектроскопії ПМР. Уперше досліджено гідроліз раніше синтезованих складних ефірів 3-гідрокси-7-бром-5-арил-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-ону — потенційних анксиолітичних і снодійних засобів, що каталізується карбоксилестеразою у складі мікросомальної фракції печінки свині. Показано кількісне інгібування естеразної активності мікросомальної фракції печінки свині в присутності селективного інгібітора карбоксилестерази — ди-(*n*-нітрофеніл)-фосфату. Встановлено нелінійність залежності ступеня гідролізу від довжини ацильного фрагмента в 3-ацилокси-7-бром-5-феніл-1,2-дигідро-3Н-1,4-бенздіазепін-2-онах, а також зниження ступеня трансформації субстрату в разі введення замісника в положення 1 молекули. Для похідних з фталімідоацильним і гексилацильним фрагментами в положенні 3 молекули збільшення числа CH₂-груп в цих замісниках і введення атому хлору в *o*-положення фенільного кільця сприяє підвищенню ступеня гідролізу.

Ключові слова: ефіри 3-гідрокси-1,4-бенздіазепін-2-ону, карбоксилестераза, мікросомальна фракція.

INTERRELATION BETWEEN 3-HYDROXY- 1,4-BENZODIAZEPINE-2-ONE ESTERS STRUCTURE ON THEIR HYDROLYSIS BY CARBOXYL ESTERASE

*E. A. Shesterenko
I. I. Romanovska
O. V. Sevastyanov
E. A. Semenishina
V. I. Pavlovsky
S. A. Andronati*

Bogatsky's Physico-Chemical Institute
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Odesa

E-mail: romairina@gmail.com

The synthesis of new series of 7-bromo-5-aryl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one derivatives, containing in the tree position phthalimidoacyl and hexylacyl fragments was accomplished. The structure of new compounds was proved by mass-spectrometry and PMR-spectroscopy methods. For the first time, hydrolysis of the earlier synthesized 3-hydroxy-7-bromo-5-aryl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-one esters, potential anxiolytic and hypnotic means, catalyzed by carboxyl esterase in composition of pig liver microsomal fraction was studied. The quantitative inhibition of pig liver microsomal fraction esterase activity in the presence of carboxyl esterase selective inhibitor di-(*p*-nitrophenyl)-phosphate was shown. The nonlinear dependence both of hydrolysis degree with acyl moiety length in 3-acyloxy-7-bromo-5-aryl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepine-2-ones and decreased substrate transformation degree after substituent introduction in the first position of molecule was established. For the derivatives with phthalimidoacyl and hexylacyl-moieties in the molecule 3 position it was shown, that increasing of CH₂-groups number in this substituents and incorporation of chlorine atom in *o*-position of phenyl ring bring to increasing of hydrolysis degree.

Key words: 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-one esters, carboxyl esterase, microsomal fraction.

УДК 578.832.1.083.2

РОЗРОБЛЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПАНДЕМІЧНОГО ШТАМУ ВІРУСУ ГРИПУ А (H1N1 2009) ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

С. В. Степанюк¹
М. І. Вудмаска¹
С. Л. Рибалко²
М. Я. Співак³

¹ПрАТ НВК «Діапроф-Мед», Київ
²ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб
ім. Л. В. Громашевського НАМН України», Київ
³Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

E-mail: Stepaniuk2008@yandex.ru

Отримано 25.07.2012

Віруси грипу А посідають істотне місце в структурі захворюваності людей на гострі респіраторні вірусні інфекції, що становлять майже до 90% від усіх інших інфекційних хвороб. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, тільки на тяжкі форми грипу в світі щорічно хворіють 3–5 млн. людей, із них 45–60% — діти. Економічні збитки від сезонного епідемічного грипу сягають близько 85% економічних втрат від інфекційних хвороб загалом.

Досвід боротьби з грипом, накопичений за останні роки, показав, що для розроблення та проведення ефективних протиепідемічних заходів необхідно побудувати систему постійного моніторингу за циркуляцією вірусу грипу, що ґрунтується на використанні лабораторних методів точної і швидкої ідентифікації та характеристики циркулюючих штамів вірусу грипу А. Серед методів лабораторної діагностики грипу найбільш ефективним вважають метод полімеразної ланцюгової реакції. У роботі наведено дані з розроблення діагностичної тест-системи у форматі двостадійного мультиплексного RT-PCR-аналізу в режимі реального часу для виявлення та генотипування пандемічного вірусу грипу А (H1N12009). Результати лабораторно-експериментальних досліджень тест-системи DIA Influenza H1N1 показали, що вона є ефективною та специфічною для виявлення каліфорнійських штамів пандемічного вірусу грипу А (H1N12009) і може бути використана для діагностики захворювань, зумовлених цим штамом вірусу. Проведені клінічні випробування в ході державної реєстрації в МОЗ України показали чутливість та специфічність тест-системи DIA Influenza H1N1 на рівні 100%.

Ключові слова: пандемічний вірус грипу А(H1N1), полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, діагностична тест-система.

Грип є найпоширенішим інфекційним захворюванням. Під час щорічних епідемій грипу близько 5–15% населення страждають від інфекцій верхніх дихальних шляхів. Смертність констатують переважно в групах високого ризику (літніх, хронічно хворих людей). Хоча важко оцінити об'єми щорічних епідемій, однак, за даними експертів ВООЗ [1–3], у всьому світі реєструють близько 3–5 млн. тяжких випадків захворювання і від 250 000 до 500 000 — зі смертельним наслідком. Висока вірулентність вірусу та постійні мутації, що пов'язані з особливістю геному грипу, призводять до появи нових підтипів вірусу, проти яких у людей немає імунітету. Із цієї причини виникають епідемії та пандемії, що супроводжуються різким підвищенням захворюваності та високою смертністю [4, 5].

У період пандемій захворюваність і смертність від грипу А набувають катастрофічних масштабів. Наприклад, пандемія «іспанки» (1918–1919 рр.) спричинила захворювання близько 600 млн. та загибель 50–100 млн. людей (тобто 30% та 5% населення Земної кулі, відповідно). Пандемія «азійського грипу» (1957–1959 рр.) стала причиною загибелі понад 1 млн.; пандемія «гонконгського грипу» (1968–1970 рр.) — близько 1 млн.; велика епідемія «російського грипу» (1977–1978 рр.) — близько 300 тис. людей [6, 7]. Сучасна пандемія «свинячого грипу» (2009–2010 рр. A/California/07/09 (H1N1) swl) на кінець березня 2010 р., за даними ВООЗ, стала причиною понад 17 тис. летальних наслідків і є наймасштабнішою з погляду витрат і зусиль міжнародного співтовариства, спрямованих на проведення протиепідемічних заходів [8, 9].

Вірус «свинячого грипу» H1N1 було виявлено наприкінці березня 2009 р. в Мексиці, США і Канаді, де було зареєстровано перші випадки захворювання з летальним наслідком. У квітні того самого року ВООЗ оголосила пандемію свинячого грипу, поступово піднімаючи рівень загрози, оскільки вірусна інфекція поширювалась країнами і континентами блискавично [1]. Інфекція нового штаму грипу спричинила вкрай тяжку форму первинної вірусної пневмонії, яка швидко прогресувала і часто призводила до летального результату, чим відрізнялася від клінічної картини захворювання в період спалахів епідемій сезонним грипом [2].

Спостерігаючи за швидким розвитком епідемічного процесу грипу А(H1N1)2009 та беручи до уваги можливі масові захворювання людей в Україні саме на Каліфорнійський штаму вірусу (A/California/07/09 (H1N1)), у квітні 2009 року нами були розпочато дослідження, метою яких є створення діагностичної тест-системи для виявлення та генотипування вірусу грипу А(H1N1)2009 — Каліфорнійський варіант на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Real-Time RT-PCR).

Матеріали і методи

Клінічні зразки носоглоткових змивів хворих на гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) людей. У дослідженнях використовували клінічні зразки в кількості 10 (носоглоткові змиви), отримані від хворих на ГРВІ з Головного військового клінічного госпіталю МО України. Ці зразки попередньо було протестовано за допомогою тест-системи Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), виробництва компанії Seegene Inc (Південна Корея) та рекомендованого ВООЗ протоколу TaqMan Influenza A (H1N1) Assay Sets [1].

Культуральні зразки вірусів грипу А. У роботі було використано алантоїсні культури сезонних штаму вірусу грипу: А/FM1/47 (H1N1); А/Panama/2007/99 (H3N2); В/Hong Kong/330/01. Культури штаму одержали з WHO Collaborating Center for Influenza, CDC (США).

Виділення РНК вірусів. Виділення та очищення вірусної РНК проводили із застосуванням таких наборів реактивів: QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Німеччина), Viral RNA Isolation Kit, NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey-Nagel GmbH, Німеччина) відповідно до протоколу виробника. Для моніторингу крос-контамінації під час виділення РНК використовували негативні контролю (проби стерильної води, не контаміновані ДНК, РНК). Для підви-

щення ефективності етапу виділення РНК в кожен пробу клінічного зразка додавали внутрішній контрольний зразок (ІС).

Виготовлення позитивних контролів тест-системи. Для конструювання позитивних контрольних зразків, що входили до складу тест-системи, застосовували технологію отримання плазмід, що містять рекомбінантні фрагменти кДНК вірусу грипу А. Усі процедури виконували відповідно до протоколів, що описані в посібнику «Molecular cloning: a laboratory manual» [10].

Точність синтезу вставок генів вірусу грипу, вбудованих у плазмід, перевіряли за допомогою автоматичного секвенатора 3100 Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems, США) та набору реагентів BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Дизайн праймерів і ДНК-зондів. У роботі використовували висококонсервативні ділянки досліджуваних нами генів вірусу грипу пандемічних штаму А(H1N1)2009, доступних у базі даних NCBI [11]. Дизайн праймерів і ДНК-зондів (варіант TaqMan probe) здійснювали за допомогою програми Primer Express V.2 (Applied Biosystems). ДНК-зонди містили такі флуоресцентні та нефлуоресцентні барвники: FAM, VIC, BHQ1, BHQ2. Було також використано 3–4 варіанти пар праймерів та зондів до кожного гена вірусу грипу і внутрішнього контролю ІС.

Аналіз Real-Time RT-PCR. Порівнювали такі набори реактивів: AgPath-ID One Step RT-PCR Kit (Ambion, США), TaqMan One Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems, США), qPCRmix-HS, Revertasa-Mint (Євроген, Росія), RevertAid™ H Minus Ferst Standard cDNA Synthesis Kit (Fermentas Inc., Литва). Концентрацію кожного праймера і ДНК-зонду підбирали в різних комбінаціях, компоненти кожного набору — згідно з інструкцією виробника. В реакцію включали 5 µL очищеного препарату РНК вірусу. Реакцію Real-Time RT-PCR проводили з використанням обладнання та програмного забезпечення ABI PRIZM 7000 (Applied Biosystems, США). Підбір оптимальних умов кожної стадії температурного режиму реакції Real-Time RT-PCR здійснювали експериментальним шляхом.

Визначення параметрів специфічності та чутливості діагностичної тест-системи. Специфічність мультиплексної реакції Real-Time RT-PCR оцінювали за перехресною реакцією з РНК, виділеною з культуральних зразків, що містять інші підтипи вірусу грипу, а також неінфіковану культуральну рідину. Окрім того, використовували клінічні зразки здорових людей. Межу чутливості тесту визначали, застосовуючи внутрішньовиробничі панелі ПП-101 ВПП-01, до

складу яких входили зразки біологічного матеріалу з різною концентрацією рекомбінантних плазмід, що містили синтетичні вставки генів вірусу грипу (М-ген, Н1 та N1).

Результати та обговорення

Молекулярно-генетичний аналіз штамів вірусу грипу А (H1N12009). Для розроблення ефективної методики діагностики пандемічного штаму вірусу грипу А(H1N1)2009 нами було досліджено нуклеотидні послідовності близько 20 штамів вірусу, що потрапили до бази даних GeneBank NCBI з березня до травня 2009 р. [11]. Теоретичний аналіз нуклеотидних послідовностей генів вірусу грипу А(H1N1)2009, особливо тих, які було виділено від людей, померлих від високопатогенної грипозної інфекції у Мексиці, США та Канаді в квітні 2009 р., показав спорідненість майже на 95% цих вірусів зі штамом А/California/07/09 (H1N1), що був обраний нами як модель для дослідження і згодом кваліфікований ВООЗ, як Каліфорнійський штамп з пандемічним потенціалом.

Окрім того, у літературі з'явилися результати досліджень інших авторів, що виявили істотні відмінності нуклеотидних послідовностей генів вірусу каліфорнійських штамів від сезонних штамів грипу А (H1N1), які циркулювали серед населення до 2009 р. Вчені у США і в Європі об'єктивно показали, що це — новий варіант вірусу грипу А (H1N1) — потрібний реасортант, який поєднує сегменти РНК, похідні від штамів грипу людини, свиней і птахів [12–16]. Відтак стало зрозуміло, що діагностика пандемічних штамів потребує розроблення таких діагностичних тестів, за допомогою яких можна було б ефективно диференціювати пандемічні від сезонних штамів вірусу грипу.

Використовуючи власні напрацювання 2006 р. під час розроблення тест-системи Real-Time RT-PCR DfA-Influenza H5N1, яка призначена для діагностики пташиного грипу А (H5N1) [17], як діагностичні маркери інфекції пандемічного грипу А(H1N1)2009 ми відібрали лише три гени вірусу грипу: М-ген, ген гемаглютиніну (H1) та нейрамінідази (N1). Вирівнювання генетичних послідовностей зазначених генів вірусу, що були доступні в базі даних GeneBank NCBI, дало змогу визначити консервативні ділянки, які було використано для створення синтетичних позитивних контролів та підбору діагностичних праймерів і зондів.

Створення позитивних контрольних зразків. Синтетичні фрагменти генів гемаглютиніну (H1), нейрамінідази (N1) та М-гена вірусу грипу А фланкували сайтами

рестрикції EcoRI. Точність синтезу нуклеотидних послідовностей, вбудованих у плазмиди, підтверджували секвенуванням. За результатами секвенування було відібрано лише по три варіанти, які перевіряли за допомогою реакції Real-Time RT-PCR.

Використання внутрішнього контрольного зразка (IC-internal control). З метою зменшення появи можливих хибнонегативних реакцій та підвищення специфічності реакції виділення РНК з клінічного матеріалу було використано внутрішній контрольний зразок (IC) на основі фага MS2, який додавали до клінічного зразка на стадії його лізису.

За результатами досліджень J. Dreier et al. [18], найбільшою проблемою аналізу Real-Time RT-PCR є присутність у клінічних зразках інгібіторів, що призводять до появи хибнонегативних результатів. Тому додавання до клінічного зразка екзогенної, неінфекційної РНК як внутрішнього контролю (IC-internal control) допомагає стандартизувати весь процес реакції Real-Time RT-PCR. Авторами запропоновано додавати фаг MS2 до зразків клінічного матеріалу для моніторингу ефективності виділення РНК, зворотної транскрипції та реакції ампліфікації для виявлення РНК вірусів людини.

Використана нами РНК фага MS2 проходила всі етапи виділення одночасно з РНК вірусу грипу і далі зразок очищеної РНК вірусу грипу, що містив одночасно і РНК фага, застосовували для реакції Real-Time RT-PCR на 1-й стадії аналізу: виявлення РНК вірусу грипу та РНК IC-internal control. За результатами ампліфікації IC-контролю оцінювали ефективність процесу виділення РНК із клінічного зразка та самої реакції Real-Time RT-PCR. Нами було підібрано оптимальну кількість внутрішнього контрольного зразка — 5 мкл (суспензії фага MS2 в концентрації не менше 10^{11} клітин на 1 мл) на 150 мкл клінічного зразка, яка дає змогу оцінити процес виділення вірусної РНК і ступінь її деградації. Водночас така гранична доза внутрішнього контролю не перешкоджає ампліфікації вірусної РНК в концентрації нижче 1 000 копій/мл.

Відбір методики виділення РНК з клінічних зразків. На основі попередніх досліджень під час розроблення тест-системи Real-Time RT-PCR для діагностики пташиного грипу ми відібрали методику виділення РНК вірусів за процедурою з використанням міні spin-колонок. Технологія міні spin-колонок передбачає адсорбцію РНК вірусу на кремнієвій мембрані з подальшим процесом очищення РНК від клітинних решток. Серед комерційних наборів, відібраних для дослідження (перелічені в розділі «Матеріали і методи»),

найкращі результати було отримано у разі застосування набору NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey-Nagel GmbH, Німеччина). Ця методика виділення була однаково ефективною як у моно-, так і в мультиплексному варіанті, тобто одночасне виділення й очищення РНК вірусу грипу та РНК внутрішнього контролю з таких клінічних зразків, як слиз, носоглоткові змиви, мокротиння.

Підбір оптимальних умов реакції Real-Time RT-PCR. З метою зменшення часу для проведення реакції виявлення вірусу грипу А та генотипування Каліфорнійського штаму за генами Н1 та N1 ми використали методику зворотної транскрипції РНК та ампліфікації в одній пробірці. На сьогодні є комерційні набори реагентів різних виробників для вирішення поставленого завдання. За показниками точності реакції транскрипції та ампліфікації такі набори не поступаються методикам тестування в різних пробірках. Перевага однопробіркового варіанта полягає в скороченні часу тестування зразка та мінімізації впливу людського фактора на кінцевий результат. У процесі роботи ми встановили, що з перелічених в розділі «Матеріали і методи» реакційних сумішей різних виробників найкращі результати ампліфікації для розроблених нами пар праймерів та ДНК-зондів як на 1-й, так і на 2-й стадії ідентифікації вірусу грипу було отримано у разі використання комерційного набору одночасної зворотної транскрипції та ампліфікації AgPath-ID One Step RT-PCR Kit (Ambion, США).

Після серії експериментальних випробувань було підібрано оптимальні температурні режими роботи для праймерів та ДНК-зондів на кожній стадії ідентифікації вірусу грипу. Температурний режим роботи приладу ABI PRIZM 7000 для 1-ї стадії діагностики – скринінг для виявлення вірусу грипу А: зворотна транскрипція — 45 хв за 45 °С, інактивація ензимів зворотної транскрипції — 10 хв, 95 °С; 1 цикл, ампліфікація — 40 циклів: денатурація — 0,15 хв за 95 °С, відпал праймерів — 0,30 хв, 57 °С, подовження ланцюга ДНК — 0,30 хв за 72 °С.

На 2-й стадії діагностики – генотипування вірусу грипу А(H1N1)2009 – Каліфорнійський варіант: зворотна транскрипція — 45 хв за 45 °С, інактивація ензимів зворотної транскрипції — 10 хв, 95 °С; 1 цикл, ампліфікація — 40 циклів: денатурація — 0,15 хв, 95 °С, відпал праймерів — 0,30 хв за 57 °С, подовження ланцюга ДНК — 0,30 хв за 72 °С.

Методики Real-Time RT-PCR. З метою мінімізації часу для діагностики пандемічного грипу А(H1N1)2009 Каліфорнійський штаб ми розробили методику двостадійного мультиплексного аналізу Real-Time RT-PCR

(варіант TaqMan probe). У процесі створення діагностичної тест-системи було відібрано 8 пар праймерів і ДНК-зондів.

У розробленій нами тест-системі DIA Influenza H1N1, яка призначена для виявлення РНК вірусу грипу А на 1-й стадії діагностики клінічних зразків — скринінгу для виявлення вірусу грипу А — використовували праймери і TaqMan-зонд, кон'югований з двома барвниками — FAM (флуорофор) і BHQ1 (гасник флуоресценції), які ініціюють ампліфікацію ділянки гена М2 вірусу грипу А, що кодує матричний протеїн. Реакцію виявлення гена М2 проводять одночасно з детекцією ІС-контролю в мультиплексному форматі за допомогою праймерів та TaqMan-зонда, який реєстрували каналом JOE. Схему розробленого формату аналізу Real-Time RT-PCR зображено на рисунку.

На 2-й стадії діагностики – генотипування пандемічного вірусу грипу А(H1N1)2009 — застосовували праймери і TaqMan-зонди для ідентифікації гемаглютинину Н1 та нейрамінідази N1. Реакцію генотипування Real-Time RT-PCR проводили в мультиплексному форматі з детекцією каналами FAM — Н1 і JOE — N1. Розроблені праймери та зонди є унікальними, виявляють лише генетичні послідовності каліфорнійських штабів і не мають гомології з іншими субтипами вірусу грипу А.

Оцінка аналітичних характеристик тест-системи. Діагностичну чутливість та специфічність, а також межу детекції тест-системи оцінювали спочатку за допомогою розроблених нами виробничих панелей, потім під час роботи зі штабами вірусу грипу А різних субтипів, на клінічному матеріалі, що містив і не містив вірус грипу (див. розділ «Матеріали і методи»).

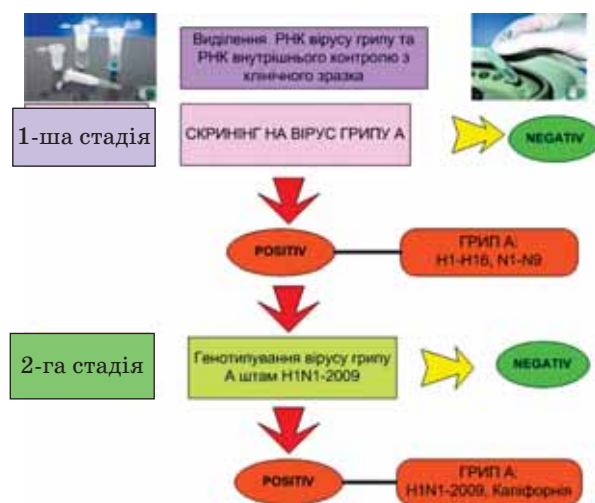


Схема діагностики пандемічного вірусу грипу А(H1N1), Каліфорнійський штаб за допомогою тест-системи DIA Influenza H1N1

За результатами досліджень внутрішньо-виробничої панелі ПП-101 ВПП-01 аналітична чутливість (межа детекції) тест-системи DIA Influenza H1N1 становила 1 000 копій/мл.

Для визначення діагностичної чутливості тест-системи DIA Influenza H1N1 використовували зразки клінічного матеріалу (носоглоткові змиви, мокротиння хворих на грип та зразки референтних препаратів хоріоналантоїсної рідини курячих ембріонів, що містили штами вірусів грипу). Дослідження зазначених зразків проводили паралельно за допомогою двох методик: тест-системи DIA Influenza H1N1 та комерційного набору праймерів і зондів, рекомендованого ВООЗ та CDC-протоколу — TaqMan Influenza A (H1N1) Assay (від 15 липня 2009 р.).

Дослідивши 10 клінічних зразків, які було отримано з військового госпіталю з позитивними результатами, підтвердженими на тест-системі Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Seegene Inc. (Корея), виявили 8 позитивних (№ 754, 258, 57/4, 32, 39, 44, 46, 47). Результати порівняльних досліджень клінічних зразків подано в таблиці.

Три зразки — №57/2, 57/3, 57/4 — було взято від одного хворого з певним інтервалом часу. Два перших зразки ідентифіковано за обома методиками як негативні. У першій

пробі цього пацієнта (зразок №57/2) за допомогою протоколу CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay не було виявлено жодного маркера вірусу грипу пандемічного штаму. У зразку № 57/3 виявили лише маркер гемаглютиніну H1 swine, що не може слугувати доказом наявності у хворого вірусної інфекції грипу пандемічного штаму згідно з рекомендаціями ВООЗ (результати подано в таблиці). Відповідну кореляцію результатів тестування цих зразків спостерігали, досліджуючи їх у тест-системі DIA Influenza H1N1. Єдиною відмінністю виявився позитивний результат у зразка № 57/3 за геном нейрамінідази (N1), але його також не можна трактувати як позитивний відповідно до інструкції тест-системи.

Два перших зразки було взято в період низького вірусного навантаження. Оскільки у тест-системі Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic) вони також мали сумнівний результат, їх ідентифікували як негативні в обох тест-системах. А третій зразок — №57/4 — був чітко ідентифікований обома тест-системами як позитивний за всіма діагностичними маркерами інфекції. Отже, можна стверджувати, що діагностична чутливість розробленої нами тест-системи DIA Influenza H1N1 досягла 100% під час

Результати тестування клінічних зразків за тест-системою DIA Influenza H1N1 (Діапроф-Мед, Україна) та рекомендованим ВООЗ і CDC-протоколом TaqMan Influenza A (H1N1) Assay

№ п/п	№ зразка	Тест-система Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Seegene Inc., Корея	Протокол ВООЗ та CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay				Тест-система DIA Influenza H1N1 (pandemic), Діапроф-Мед (Україна)			
			Грип А загальна (Ct)	Грип А swine H1 (Ct)	H1 swine (Ct)	RNaseP (внутр. контроль) (Ct)	ІС (внутр. контроль) (Ct)	Грип А загальний (Ct)	H1-2009 (pandem) (Ct)	N1-2009 (pandem) (Ct)
1	754	+	⁺ (34,51)	⁺ (31,31)	⁺ (31,26)	⁺ (24,11)	⁺ (19,29)	⁺ (28,37)	⁺ (27,40)	⁺ (30,02)
2	258	+	⁺ (32,33)	⁺ (34,51)	⁺ (30,60)	⁺ (24,00)	⁺ (20,59)	⁺ (32,09)	⁺ (33,86)	⁺ (33,90)
3	57/2	±	-	-	-	⁺ (23,48)	⁺ (21,23)	⁺ (38,27)	-	-
4	57/3	±	-	-	⁺ (38,55)	⁺ (24,93)	⁺ (20,36)	⁺ (36,13)	-	⁺ (33,41)
5	57/4	+	⁺ (32,56)	⁺ (33,73)	⁺ (32,18)	⁺ (23,13)	⁺ (22,56)	⁺ (35,27)	⁺ (25,33)	⁺ (24,60)
6	32	+	⁺ (30,12)	⁺ (29,59)	⁺ (32,44)	⁺ (20,67)	⁺ (20,39)	⁺ (25,39)	⁺ (26,69)	⁺ (25,66)
7	39	+	⁺ (34,89)	⁺ (31,17)	⁺ (28,77)	⁺ (24,36)	⁺ (18,69)	⁺ (27,27)	⁺ (26,33)	⁺ (24,48)
8	44	+	⁺ (38,14)	⁺ (37,81)	⁺ (34,21)	⁺ (24,33)	⁺ (15,18)	⁺ (13,29)	⁺ (20,98)	⁺ (23,51)
9	46	+	⁺ (38,16)	⁺ (36,77)	⁺ (33,12)	⁺ (23,15)	⁺ (15,66)	⁺ (18,19)	⁺ (23,58)	⁺ (26,54)
10	47	+	⁺ (33,38)	⁺ (37,11)	⁺ (36,17)	⁺ (25,12)	⁺ (17,53)	⁺ (25,00)	⁺ (24,89)	⁺ (25,84)

Примітка: + — позитивний результат або наявність сигналу в досліджуваному зразку;
± — невизначений результат або слабо позитивний сигнал в досліджуваному зразку;
- негативний результат або відсутність сигналу в досліджуваному зразку.

дослідження клінічних зразків, взятих від хворих на грип, що підтверджено в двох альтернативних діагностичних тестах: Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Корея, та протоколу CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay.

Дослідження двох референтних зразків хоріоналантоїсної рідини, що містили штами сезонного грипу А/FM1/47 (H1N1) і А/Panama/2007/99 (H3N2) за допомогою розробленої нами тест-системи DIA Influenza H1N1 показали лише позитивний результат на 1-й стадії скринінгу за М-геном, що свідчить про присутність у зразку вірусу грипу А. Водночас, за генами Н1 та N1 у цих зразках було отримано негативні результати, що вказує на відсутність Каліфорнійського штаму пандемічного вірусу грипу А(H1N1)2009.

Специфічність тесту оцінювали, досліджуючи референтний препарат вірус грипу В (В/HongKong/330/01) і неінфіковану хоріоналантоїсну рідину курячих ембріонів. Перехресних реакцій не спостерігали, що свідчить про 100%-ну специфічність тест-системи стосовно представника гетерологічної групи патогенів.

Таким чином, на підставі проведених нами досліджень було розроблено вітчизняну тест-систему DIA Influenza H1N1, яка дає змогу виявляти клінічні зразки, що містять РНК тільки пандемічного вірусу грипу А (Каліфорнійський штаб) з наступною ідентифікацією генів гемаглютиніну Н1 і нейрамінідази N1 одночасно в одній пробірці у форматі двостадійного мультиплексного аналізу Real-Time RT-PCR.

Аналітична чутливість тест-системи DIA Influenza H1N1 становить 1 000 копій/мл.

Діагностична чутливість тест-системи DIA Influenza H1N1 — 100% під час дослідження клінічних зразків, взятих від хворих на грип, що підтверджено двома альтернативними діагностичними тестами: Seeplex® Influenza A(H1N1pandemic), Корея, та протоколу CDC TaqMan Influenza A (H1N1) Assay.

Специфічність тест-системи DIA Influenza H1N1 становила 100% стосовно гетерологічної групи патогенів.

ЛІТЕРАТУРА

1. <http://www.who.int/mediacentre>.
2. <http://www.who.int/csr/disease/swineflu>.
3. <http://www.influenza.spb.ru>.
4. Еропкин М. Ю., Грудинин М. П., Коновалова Н. И. и др. Антигенные и генетические особенности современных вирусов гриппа в России // Материалы I Всерос. ежегодного конгресса по инфекц. болезням. — М., 30 марта–01 апреля, 2009. — С. 67.
5. Киселев О. И., Маринич И. Г., Соминина А. А. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия. — СПб.: 2003. — С. 244.
6. Гендон Ю. З. Пандемия гриппа: можно ли с ней бороться? // Вопр. вирусол. — 1998. — № 1. — С. 43–46.
7. Супотницкий М. В. Пандемия «Испанки» 1918–1920 гг. в контексте других гриппозных пандемий и «птичьего гриппа» // 2006.
8. Lvov D. K., Shchelkanov M. Yu., Prilipov A. G. et al. Evolution of HPAI H5N1 virus in Natural ecosystems of Northern Eurasia (2005–2008) // Avian Dis. — 2010. — V. 54. — P. 483–495.
9. Львов Д. К. и др. Грипп остается непредсказуемой инфекцией // Вопр. вирусол. — 1998. — № 3. — С. 141–144.
10. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. — V. 1 / J. Sambrook, D. W. Russell. — 3rd ed. — New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
11. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
12. Glesen W. P. Emergine infections pandemic influenza // Epidemiol. Rev. — 1996. — V. 18, N 1. — P. 64–76.
13. Taubenberger J. K., Reid A. H., Lourens R. M. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes // Wafure. — 2005. — V. 437. — P. 889–893.
14. Belshe R. B. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918. — Virus // New. Engl. J. Med. — 2005. — V. 353, N 21. — P. 2209–2211.
15. Dawood F. S., Jain S., Finelli L. et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans // New Engl. J. Med. — 2009. — V. 361. — P. 1–10.
16. Zimmer S. M., Burke D. S. Historical perspective — emergence of influenza A(H1N1) viruses // Ibid. — 2009. — V. 361 — P. 279–285.
17. Степанюк С. В., Найдёнов В. Г., Вудмаска М. И. и др. Разработка диагностического теста для выявления вируса гриппа А (H5N1) с применением метода мультиплексного Real-Time RT-PCR // Біол. системи. — 2010. — № 4. — С. 35.
18. Dreier J., Stormer M., Knut K. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse Ntanscription-PCR Assays // J. Clin. Microbiol. — 2005. — V. 43, N9. — P. 4551–4557.

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАНДЕМИЧЕСКОГО
ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А (H1N1 2009)
С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ
РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

*С. В. Степанюк¹, М. И. Вудмаска¹,
С. Л. Рыбалко², Н. Я. Спивак³*

¹ПрАТ НПК «Диапроф-Мед», Киев

²Институт эпидемиологии и инфекционных
болезней им. Л. В. Громашевского
АМН Украины, Киев

³Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: Stepaniuk2008@yandex.ru

Вирусы гриппа А занимают существенное место в структуре заболеваемости людей острыми респираторными вирусными инфекциями, которые составляют почти 90% от всех других инфекционных болезней. По данным Всемирной организации здравоохранения, только тяжелыми формами гриппа в мире ежегодно заболевают 3–5 млн. человек, из них 45–60% — дети. Экономический ущерб от сезонного эпидемического гриппа достигает около 85% экономических потерь от инфекционных болезней в целом.

Опыт борьбы с гриппом, накопленный за последние годы, показал, что для разработки и проведения эффективных противоэпидемических мероприятий необходимо построение системы постоянного мониторинга за циркуляцией вируса гриппа, базирующейся на использовании лабораторных методов точной и быстрой идентификации и характеристики циркулирующих штаммов вируса гриппа А. Среди методов лабораторной диагностики гриппа наиболее эффективным считается метод полимеразной цепной реакции. В работе представлены данные по разработке диагностической тест-системы в формате двухстадийного мультиплексного RT-PCR-анализа в режиме реального времени для выявления и генотипирования пандемического вируса гриппа А (H1N12009). Результаты лабораторно-экспериментальных исследований тест-системы DIA Influenza H1N1 показали, что она является эффективной и специфичной для выявления калифорнийских штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N12009) и может быть использована для диагностики заболеваний, обусловленных этим штаммом вируса. Проведенные клинические испытания в ходе государственной регистрации в Минздраве Украины показали чувствительность и специфичность тест-системы DIA Influenza H1N1 на уровне 100%.

Ключевые слова: пандемический вирус гриппа А (H1N1), полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, диагностическая тест-система.

**DEVELOPMENT OF TEST KIT
FOR DETECTION OF PANDEMIC STRAIN
INFLUENZA VIRUS A (H1N1 2009)
BY REAL TIME POLYMERASE CHAIN
REACTION**

*S. V. Stepaniuk¹, M. I. Vudmaska¹,
S. L. Rybalko², M. Y. Spivak³*

¹PJSC SPC «DIAPROPH-MED», Kyiv

²Institute of Epidemiology and Infectious
diseases of Academy of Medical Sciences
of Ukraine, Kyiv

³Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: Stepaniuk2008@yandex.ru

Influenza viruses A play an important role in the structure of the incidence of people with acute respiratory viral infection, which make up 90% from all other infectious diseases. According to the World Health Organization, only severe flu worldwide suffer annually 3.5 million, of which 45–60% are children. An economic loss from seasonal flu epidemic is in average about 85% of economic losses from infectious diseases in general.

The experience of fighting the flu, accumulated over the years, has shown that to develop and deliver effective preventive measures necessary to build a system of permanent monitoring for influenza virus circulation, based on use of laboratory methods for accurate and rapid identification and characterization of circulating strains of influenza virus A. Among the methods of laboratory diagnosis of influenza, the most effective is a method of polymerase chain reaction. Data on the development of diagnostic test kits in the format of two-stage multiplex RT-PCR-analysis for detection and genotyping of pandemic influenza virus A (H1N12009) are given. The results of laboratory and experimental research of «DIA Influenza H1N1» test system showed that it is effective and specific for detection of California pandemic influenza virus A (H1N12009) strains and can be used to diagnose disease caused by this strain of virus. Clinical trial of the course of the State registration by Ministry of Health of Ukraine have shown sensitivity and specificity of «DIA Influenza H1N1» test systems up to 100%.

Key words: pandemic influenza virus A (H1N1), polymerase chain reaction in real time, diagnostic test system.

БРОДИЛЬНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОЗБРОДЖУВАЛЬНИХ ДРІЖДЖІВ У СИРОВАТКО-СОЛОДОВОМУ СУСЛІ

О. В. Грек¹
О. О. Красуля¹
О. О. Тігунова²

¹Національний університет харчових технологій, Київ
²ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки»
НАН України, Київ

E-mail: olena_krasulya@ukr.net

Отримано 10.12.2012

Експериментально досліджено основні показники бродіння сироватко-солодового сусла з використанням різних штамів лактозброджувальних дріжджів. За результатами досліджень бродильної активності різних видів лактозброджувальних мікроорганізмів у сироватко-солодовому суслі виявлено, що найбільш активно спиртове бродіння за всіма показниками проходило в суслі, ферментованому мікроорганізмами *Zygosaccharomyces lactis 868-K* і *Saccharomyces lactis 95*. Встановлено високу здатність до утилізації вуглеводів солоду, які представлені легкозасвоюваними вуглеводами солодового екстракту. Також проведено органолептичне оцінювання ферментованих сироваткових напоїв, отриманих з відновленої суміші сухої сироватки і солоду та зброджених дріжджами *Zygosaccharomyces lactis 868-K* і *Saccharomyces lactis 95*. Виявлено, що напій, зброджений дріжджами *Zygosaccharomyces lactis 868-K*, має виражений освіжаючий аромат житнього хліба з фруктовими тонами. Спостерігається зростання інтенсивності ароматизації комплексу зразка з мікроорганізмами *Saccharomyces lactis 95*, що свідчить про високі органолептичні показники напою.

Ключові слова: молочна сироватка, сироватко-солодове сусло, лактозброджувальні дріжджі, спиртове бродіння, ферментація, органолептична оцінка.

Молочна сироватка є продуктом з природним набором поживних і біологічно повноцінних компонентів. За якісним складом і кількістю макро- та мікроелементів напої на її основі значно перевершують традиційні освіжаючі напої, включаючи і мінеральні води. Молочна сироватка містить майже всі компоненти молока, має низьку енергетичну цінність і може бути використана для виробництва продуктів дієтичної групи. Також сироватка має високу біологічну цінність, яку зумовлюють протеїнові речовини, а також вітаміни, гормони, органічні кислоти, антитіла та інші. Виробництво ферментованих напоїв на основі молочної сироватки — один з актуальних напрямів переробки побічної молочної сировини. У таких напоях поєднуються цінні компоненти як сироватки, так і продуктів метаболізму мікроорганізмів, утворених під час бродіння (етиловий спирт, леткі кислоти, ензими, різноманітні ароматичні сполуки тощо). У молокопереробній галузі достатньо гострою є проблема утилізації молочної сироватки, яка має високу харчову і біологічну цінність, оскільки містить у своєму складі половину сухих речовин молока.

Також актуальним є раціональне використання сировинних ресурсів у молочній промисловості, що слугує одним з основних факторів підвищення ефективності виробництва. Особливої ваги ця проблема набуває у зв'язку зі значними об'ємами переробки молока і недостатнім упровадженням промислових технологій використання побічної молочної сировини, в основному молочної сироватки. У процесі виготовлення сиру сичужного її вихід становить 70–90%, сиру кисломолочного — 70–80%, казеїну — 75% [1–3].

З підвищенням закупівельних цін на молочну сировину та впровадженням технологій виробництва сучасного асортименту молочно-протеїнових продуктів перероблення молочної сироватки стає дедалі доцільнішим. Існує багато способів її промислової переробки, один з найефективніших та найменш витратних — виробництво напоїв бродіння.

Метою роботи було дослідження бродильної активності різних видів лактозброджувальних мікроорганізмів у сироватко-солодовому суслі та придатності їх для одержання напоїв бродіння на основі відновленої суміші сухої сироватки та солоду.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були лактозозброджувальні мікроорганізми *Zygosaccharomyces lactis* 868-K, *Kluyveromyces lactis* 2452, *Saccharomyces casei*, *Saccharomyces cerevisiae* M-5, *Saccharomyces lactis* 95, *Kluyveromyces lactis* 469 з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України.

Зміну показників біохімічної активності лактозозброджувальних дріжджів у процесі культивування визначали за активною кислотністю середовища, характером спиртового бродиння, глибиною утилізації субстрату. При цьому досліджувані раси в подальшому визначатимуться як *Saccharomyces casei* (1), *Saccharomyces cerevisiae* M-5 (2), *Kluyveromyces lactis* 2452 (3), *Kluyveromyces lactis* 469 (4), *Saccharomyces lactis* 95 (5), *Zygosaccharomyces lactis* 868-K (6) з умовними позначеннями від 1 до 6 відповідно.

Посівний матеріал для дослідів готували таким чином. Культуру вирощували на штрихових пластинах із солодовим суслем у термостаті за температури 30 °C протягом 24 год. Після цього переносили клітини з розрахунку $1 \cdot 10^6$ КУО/см³ середовища в колби об'ємом 2 дм³ з 1 дм³ стерильного солодового суслу (8% сухих речовин). Культивування мікроорганізмів проводили на качалці з 220 об/хв упродовж 24 год за температури 30 °C. Вирощену біомасу виділяли з культуральної рідини шляхом фільтрування на вакуум-фільтрі.

Живильне середовище для зброджування готували таким чином: сухі солод житній ферментований та сироватку змішували в співвідношенні 1:2, далі суху суміш (10%) вносили до попередньо підігрітої до температури 35–45 °C води і проводили відновлення, інтенсивно перемішуючи. Температуру суміші поступово підвищували до 75–80 °C для переведення екстрактивних речовин в розчин, за цієї самої температури здійснювали пастеризацію суслу. Охолоджену до 25–30 °C суміш піддавали декантуванню для видалення денатурованих протеїнів молочної сироватки та осаду солоду. Для зброджування суслу використовували дріжджі в пресованому вигляді з масовою часткою вологи 75%; дозування — 1,25 г на 100 м³. Колби закривали сірчано-кислими затворами і ставили в термостат. Зброджування суслу здійснювали за температури 30 °C. У контрольному варіанті готували сусло на основі води за класичною технологією

з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* P-87 [4]. У процесі бродиння контролювали кількість виділеного діоксиду вуглецю ваговим методом [5]. Зрілу бражку піддавали перегонці для визначення в дистилаті масової частки спирту [6]. У сироватко-солодовому суслі рН визначали потенціометрично [7] (до бродиння 5,65), вміст редуруючих речовин — йодометричним методом [8] (5,24%).

Для подальших досліджень органолептичних показників напоїв бродиння, отриманих з відновленої суміші сухої сироватки і солоду, застосовували сенсорний аналіз. Для його проведення послуговувались кількісним описовим профільним методом з п'ятирівневою шкалою інтенсивності, що дає змогу ілюструвати сенсорні показники напоїв. Для характеристики інтенсивності ознак використовували п'ятибальну шкалу: 0 балів — ознака відсутня, 1 бал — виражена ледь помітно, 2 — слабовиражена, 3 — виражена помірно, 4 — значно виражена, 5 — яскраво виражена.

Результати та обговорення

Відомо, що спиртове бродиння супроводжується не лише накопиченням етанолу, а й виділенням діоксиду вуглецю. Основним показником інтенсивності процесу бродиння є кількість виділеної за одиницю часу вуглекислоти, тому бродиння тривало до закінчення виділення діоксиду вуглецю [9, 10].

Динаміку накопичення вуглекислоти різними видами лактозозброджувальних мікроорганізмів у суслі на основі відновленої суміші сироватки і солоду подано на рис. 1.

Отримані дані свідчать, що досліджені дріжджі мають різну бродильну активність. Пік бродильної активності спостерігається на 1-шу–3-тю добу ферментації. Аналіз

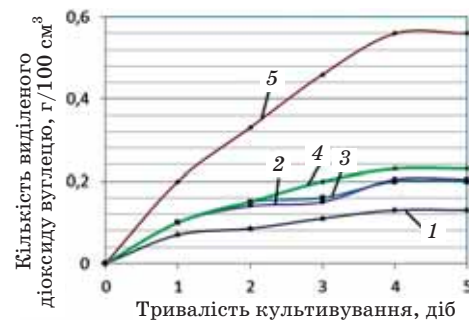


Рис. 1. Динаміка накопичення діоксиду вуглецю в сироватко-солодовому суслі залежно від виду дріжджів:

- 1 — *Saccharomyces casei*;
- 2 — *Saccharomyces cerevisiae* M-5;
- 3 — *Kluyveromyces lactis* 2452;
- 4 — *Kluyveromyces lactis* 469;
- 5 — *Saccharomyces lactis* 95

накопичення діоксиду вуглецю під час бродіння різними видами мікроорганізмів показує, що лактозоброджувальні дріжджі *Zygosaccharomyces lactis* 868-K у сироватко-солодовому суслі розвиваються найінтенсивніше порівняно з іншими штамами (2,45 г/100 см³ суслу на 5-ту добу культивування). Однак порівняно з контролем кількість виділеної вуглекислоти нижча на 1,07 г/100 см³. Дріжджі *Saccharomyces lactis* 95 (зразок 5) утилізують вуглеводи з виділенням на 4-ту добу бродіння 0,5 г діоксиду вуглецю на 100 см³ середовища. Водночас зразки 1–4 мають меншу енергію бродіння (виділяють від 0,13 до 0,23 г/100 см³ суслу). Одержані результати вказують на високу біохімічну активність дріжджів *Zygosaccharomyces lactis* 868-K та *Saccharomyces lactis* 95. Інтенсивне виділення діоксиду вуглецю свідчить про початок основного бродіння, за якого проходить активне зброджування вуглеводів. Згодом кількість виділеного діоксиду вуглецю поступово зменшується і настає стадія доброджування, тривалість якого становить 2/3 часу бродіння. Під час цього процесу проходить дооцукровування вуглеводів ензимами і зброджування отриманих цукрів до спирту і вуглекислоти. В експериментальному дослідженні доброджування суслу закінчується на 4-ту добу (рис. 1). До цього часу майже всі редуруючі вуглеводи були утилізовані дріжджовими клітинами.

Наступний етап дослідження — визначення продуктивності лактозоброджувальних мікроорганізмів за вмістом етилового спирту в бражному дистилаті та активною кислотністю зброженого суслу на кінцевий термін ферментації. Дані щодо активної кислотності та кількості етилового спирту в зброженому суслі за використання різних рас дріжджів наведено на рис. 2.

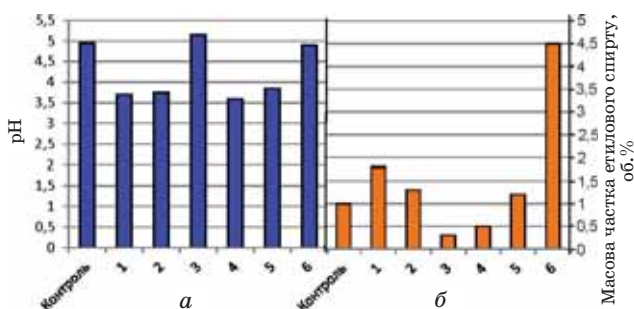


Рис. 2. Активна кислотність (а) та кількість етилового спирту (б) у зброженому суслі за використання різних рас дріжджів (1–6):

- 1 — *Saccharomyces casei*;
- 2 — *Saccharomyces cerevisiae* M-5;
- 3 — *Kluyveromyces lactis* 2452;
- 4 — *Kluyveromyces lactis* 469;
- 5 — *Saccharomyces lactis* 95;
- 6 — *Zygosaccharomyces lactis* 868-K

Як видно з показників суслу після бродіння різними видами дріжджів, найефективнішу бродильну активність виявили мікроорганізми виду *Zygosaccharomyces lactis* 868-K і *Saccharomyces casei* (4,5 та 1,7 об. %). Відносно високий вміст етилового спирту також спостерігався в зразках № 2 та № 5 із *Saccharomyces cerevisiae* M-5 і *Saccharomyces lactis* 95 (1,3 та 1,2 об. %) відповідно. У разі використання інших лактозоброджувальних дріжджів вміст етилового спирту за тих самих умов бродіння нижчий. Щодо активної кислотності, то найвищу здатність до її зміни в процесі ферментації суслу мала культура дріжджів *Kluyveromyces lactis* 2452, показник рН становив 4,3, що було наслідком високої бродильної активності.

Метаболізм лактозоброджувальних дріжджів зумовлений перебігом хімічних реакцій, що каталізуються ензимами і пов'язані з гідролізом лактози і моносахаридів солоду як джерела вуглеводів. У зв'язку з цим ми визначили кількість редуруючих речовин, що залишилися після завершення процесу бродіння суслу із сироватки та солоду різними видами дріжджів (результати подано на рис. 3).

Як видно з рис. 3, у зразках (1–5) вміст редуруючих речовин суттєво не відрізнявся і становив від 3,00 до 4,19%, тобто 20–43% від початкового вмісту. Це свідчить про невисоку активність ензимів, що каталізують гідроліз лактози. В суслі з дріжджами *Zygosaccharomyces lactis* 868-K спостерігався майже повністю завершений процес бродіння та утилізації вуглеводів, вміст редууючих речовин — 0,07%, що суттєво нижче, ніж у контролі (1,03%). Отримані дані свідчать, що дріжджі *Zygosaccharomyces lactis* 868-K мають найвищу бродильну активність щодо вуглеводів сироватки.



Рис. 3. Кількість редууючих речовин у зброженому суслі на основі молочної сироватки та солоду залежно від виду дріжджів: контроль — *Saccharomyces cerevisiae* P-87; 1 — *Saccharomyces casei*;

- 2 — *Saccharomyces cerevisiae* M-5;
- 3 — *Kluyveromyces lactis* 2452;
- 4 — *Kluyveromyces lactis* 469;
- 5 — *Saccharomyces lactis* 95;
- 6 — *Zygosaccharomyces lactis* 868-K

Тривале зброджування сироватко-солодового суслу різними видами дріжджів показало, що мікроорганізми активно розвивались у перші 2 доби ферментації, далі переходили в стаціонарну фазу росту і завершували бродіння на 5-ту добу. З урахуванням результатів досліджень бродильної активності різних видів лактозозброджувальних мікроорганізмів у сироватко-солодовому суслі можна зробити висновок, що найбільш активно спиртове бродіння за всіма показниками проходило в суслі під час зброджування дріжджами *Zygosaccharomyces lactis 868-K* і *Saccharomyces lactis 95*. Вони виявили високу здатність до утилізації вуглеводів, присутніх у солоді, які представлені як лактозою, так і легкозасвоюваними вуглеводами солодового екстракту. Дріжджі *Saccharomyces casei* та *Saccharomyces cerevisiae M-5* виявили дещо нижчу бродильну активність. Проте кількість виділеного етанолу є достатньою згідно з вимогами до ферментованих напоїв [11].

Профілограми смаку і аромату сироватко-солодових напоїв наведено на рис. 4.



Рис. 4. Профілограми смаку і аромату сироватко-солодових напоїв, ферментованих різними штамми лактозозброджувальних дріжджів

ЛІТЕРАТУРА

1. Еникеев А. Ф., Какимов А. К., Какимов Ж. К., Темиргалиева А. С. Пути совершенствования переработки молочной сыворотки // Мол. пром. — 2006. — № 2. — С. 41–42.
2. Pesta G., Meyer-Pittroff R., Russ W. Utilization of whey / In: Oreopoulou V., Russ W., editors. Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. — New York, Springer. — 2007. — P. 193–207.
3. P. Jelen. Whey processing. Utilization and Products/Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). — 2011. — P. 731–737.
4. Рудольф В. В., Балашов В. Е. Производство безалкогольных напитков и розлив минеральных вод. — М.: Агропромиздат, 1988. — 287 с.
5. ГОСТ 6687.3-87. Напитки безалкогольные газированные и напитки из хлебного сырья. Метод определения двуокиси углерода.
6. ГОСТ 6687.7-88. Напитки безалкогольные и квасы. Метод определения спирта.
7. ГОСТ 26781-85. Молоко. Метод измерения рН.
8. ГОСТ 3628-78. Молочные продукты. Методы определения сахара.
9. Хамнаева Н. И., Доржиева Ч. Б. Выделение чистых культур лактображивающих дрожжей из молочных сред // Хранен. перераб. сельхозсырья. — 2009. — № 3. — С. 51–54.
10. Абрамов Ш. А., Халилова Э. А., Магадова С. О. Новое в биотехнологии синтеза этанола в сбраживаемой среде // Там же. — 2006. — № 12. — С. 51–55.
11. ДСТУ 4069:2002. «Напої безалкогольні. Загальні технічні умови».

Сенсорні характеристики зразків

Інтенсивність, бали	Характеристика ознаки
0	Відсутня
1	Виражена ледь помітно
2	Слабо виражена
3	Помірно виражена
4	Значно виражена
5	Яскраво виражена

Органолептичні профілі показують схожість сенсорних характеристик зразків. Так, напій, зброджений дріжджами *Zygosaccharomyces lactis 868-K*, має виражений освіжаючий аромат житнього хліба із фруктовими тонами. Спостерігається зростання інтенсивності ароматичного комплексу зразка з мікроорганізмами *Saccharomyces lactis 95*, що свідчить про високі органолептичні показники напою. Цей напій характеризується гармонійним кисло-фруктовим ароматом з освіжаючим смаком.

Таким чином, було вивчено основні показники бражок, ферментованих різними штамми лактозозброджувальних дріжджів. Проведені дослідження показали, що найбільш придатним до зброджування сироватко-солодового суслу, отриманого з відновленої суміші сухої сироватки та солоду, є штамп дріжджів *Zygosaccharomyces lactis 868-K*.

Високі органолептичні властивості продуктів, отриманих з відновленої суміші сухої сироватки і солоду, визначають доцільність широкого впровадження технології ферментованих сироваткових напоїв з використанням лактозозброджувальних дріжджів *Saccharomyces lactis 95* та *Zygosaccharomyces lactis 868-K* як на молокопереробних заводах, так і на підприємствах з виробництва безалкогольних напоїв. Це дасть змогу забезпечити попит споживачів на даний вид продукції та організацію безвідходного виробництва в молочній промисловості.

**БРОДИЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ
ЛАКТОСБРАЖИВАЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ
В СЫВОРОТОЧНО-СОЛОДОВОМ СУСЛЕ**

*E. В. Грек¹
E. А. Красуля¹
E. А. Тигунова²*

¹Национальный университет
пищевых технологий,
Киев

²ГУ «Институт пищевой биотехнологии
и геномики» НАН Украины,
Киев

E-mail: olena_krasulya@ukr.net

Экспериментально исследованы основные показатели брожения сывороочно-солодового сусла с использованием различных штаммов лактосбраживающих дрожжей. По результатам исследований бродительной активности различных видов лактосбраживающих микроорганизмов в сывороочно-солодовом сусле выявлено, что наиболее активно спиртовое брожение по всем показателям проходило в сусле, ферментированном микроорганизмами *Zygosaccharomyces lactis 868-K* и *Saccharomyces lactis 95*. Установлена высокая способность к утилизации углеводов солода, которые представлены легкоусвояемыми углеводами солодового экстракта. Также проведена органолептическая оценка ферментированных сывороочных напитков, полученных из восстановленной смеси сухой сыворотки и солода, сброженных дрожжами *Zygosaccharomyces lactis 868-K* и *Saccharomyces lactis 95*. Выявлено, что напиток, сброженный дрожжами *Zygosaccharomyces lactis 868-K*, имеет выраженный освежающий аромат ржаного хлеба с фруктовыми тонами. Наблюдается рост интенсивности ароматизации комплекса образца с микроорганизмами *Saccharomyces lactis 95*, что свидетельствует о высоких органолептических показателях напитка.

Ключевые слова: молочная сыворотка, сывороочно-солодовое сусло, лактосбраживаемые дрожжи, спиртовое брожение, ферментация, органолептическая оценка.

**FERMENTATION ACTIVITY
OF LACTOSE-FERMENTATION YEAST
IN WHEY-MALT WORT**

*E. V. Greek¹
E. A. Krasulya¹
E. A. Tigunova²*

¹National University of Food Technologies,
Kyiv

²SI «Institute of Food Biotechnology
and Genomics» of National Academy
of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: olena_krasulya@ukr.net

The main parameters of fermentation of whey-malt wort with the use of different strains of lactose-fermentation yeast was investigated experimentally. According to the findings of investigation of fermentive activity for different types of lactose-fermentation microorganisms in whey-malt wort it was found that the most active spirituous fermentation for all parameters was in wort fermented by microorganisms *Zygosaccharomyces lactis 868-K* and *Saccharomyces lactis 95*. High capacity for utilization of malt carbohydrates represented by easily metabolized carbohydrates of malt extract was determined. Also organoleptic analysis of fermented whey drinks derived from the renewed mixtures of dry whey and fermented malt and yeast *Zygosaccharomyces lactis 868-K* and *Saccharomyces lactis 95* was carried out. It was found that the drink fermented with yeast *Zygosaccharomyces lactis 868-K* had intense refreshing flavor of rye bread with fruit tones. Intensity growth of aromatization for complex of sample with microorganisms *Saccharomyces lactis 95*, indicating high organoleptic indexes of the drink was observed.

Key words: whey, whey-malt wort, lactose-fermentation yeast, spirituous fermentation, fermentation, the organoleptic evaluation.

UDC 634.8:632.93:661.74:663.2

ORGANIC ACIDS CONCENTRATION IN WINE STOCKS AFTER *Saccharomyces cerevisiae* FERMENTATION

V. N. Bayraktar

Odesa Mechnikov National University, Ukraine

E-mail: vogadro2007@rambler.ru

Received 24.08.2012

The biochemical constituents in wine stocks that influence the flavor and quality of wine are investigated in the paper. The tested parameters consist of volume fraction of ethanol, residual sugar, phenolic compounds, tartaric, malic, citric, lactic, acetic acids, titratable acidity and volatile acids. The wine stocks that were received from white and red grape varieties Tairov's selection were tested. There was a correlation between titratable acidity and volatile acids in the wine stocks from white and red grape varieties. High correlation was also found between lactic and acetic acids, between volatile acids, acetic acid and sugar. It was determined that wine stocks with a high concentration of ethanol originated from those yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*, in a fermented grape must of high speed of enzyme activity. The taste of wine stocks correlated with the ratio of tartaric to malic acid. Analysis showed significant differences between the varieties of white and red wine stocks in concentrations of organic acids, phenolic compounds, residual sugar, and volume fraction of ethanol. Positive correlation was indicated for both studied groups for volatile acids and acetic acid, tartaric, malic, lactic acids and total sugar. Prospective yeast cultures with high productivity of alcohol (ethanol) were selected for winemaking biotechnology.

Key words: organic acids, grape varieties, *Saccharomyces cerevisiae*.

Organic acids play an important role in wine biotechnology because of the taste imparted by the concentration, of the different organic acids. Organic acids in wine include tartaric, malic, citric, lactic, acetic, succinic and others. Concentration of organic acids varies depending on different factors such as temperature, pH, concentration of oxygen and carbon dioxide.

Wine taste depends mainly on the ratio of tartaric acid to malic one. If the ratio of these acids is about 2 or less, the wine will not be harmonious and will have a sour aftertaste. On the contrary, wine stock with the best flavor and bouquet will be obtained at a ratio of tartaric to malic acid equal coefficient 3 and more.

Some organic acids have their own specific taste and aroma. For example citric acid gives freshness to wine, succinic acid has salty-bitter taste, and malic acid gives the taste of green apples. However, malic acid may exhibit different flavours depending on the concentrations of ethanol, tannic acids, sugar, aromatic and mineral substances. Making quantitative changes in the ratio of these compounds makes it possible to achieve the tastes of different harmonious acidity [1, 2].

Buffering also plays an important role in formation of taste that results mostly from

potassium ions in malic acid and, to a lesser extent, from small ions of Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Na^+ . In sparkling wines, acidic harmony is controlled by concentrations of sugar and carbon dioxide, but in dry wines it is controlled by concentrations of organic acids [3, 4].

Interaction of organic acids and alcohol, with their degradation products (example of tartaric acid degradation) play an important role in forming of organoleptic properties of wine stocks, which is very important in wine biotechnology.

Organic acids commence to be accumulated in the grapes at the moment when grapes begin to accumulate and concentrate sugar. At the moment of reduced accumulation of organic acids, titratable acidity decreases sharply [5, 6].

During fermentation of grape must with high titratable acidity, decreasing acidity indicates the completion of fermentation. The amount of tartaric and malic acids decrease, however the amount of citric and succinic acids increase, which is natural. Lactic acid is formed, which is impossible to find in the ripe grapes. Wine stocks at a high pH have a sour taste. Therefore, strict adherence to deadlines in harvesting grapes will be a key to successful formation of optimal concentration of organic

acids for preparation of high-quality wines with excellent taste and aroma.

Organic acids in wine are of technological importance and have different dissociation constants. Most of strong organic acids in grapes and wine is tartaric acid — ($K_{\text{dis}}=1.3 \times 10^{-3}$), next is citric acid ($K_{\text{dis}}=8.4 \times 10^{-4}$), malic acid ($K_{\text{dis}}=3.95 \times 10^{-4}$), lactic acid ($K_{\text{dis}}=1.4 \times 10^{-4}$), succinic acid ($K_{\text{dis}}=7.4 \times 10^{-5}$), acetic acid ($K_{\text{dis}}=1.8 \times 10^{-5}$) [7, 8]. Organic acids in wine play an important role in the taste and quality of wines. Because a low content of organic acids resulting in insufficient acidity, wine loses its fullness and roundness of taste and becomes characterless and expressionless [9–11].

Each type of wine must correspond to its optimum acidity. Tingling acidity typical of sparkling wines, up to incompletely fermented or freshly fermented grapes must contain carbon dioxide, which is produced during fermentation. Organic acids preserve the wine from bacterial diseases. Under acidic conditions the redox processes proceed slower, slowing down the maturation of wine, and prevents iron or iron-phosphate turbidity as well. Organic acids influence the bouquet of wine, and form complex esters with alcohols. A special role in the maturation of wines belongs to tartaric acid, which is converted to dioxy-fumaric acid and restores the taste of wine [12, 13].

The aim of this work is to establish correlations between quantitative contents of organic acids and the quality of the resulting wine fermented on yeast culture isolated from different industrial varieties in the Tairov's selection. To achieve this goal, the following tasks were undertaken.

To determine the concentrations of the organic acids in wines made from different industrial varieties of Tairov's selection it was needed to determine among them tartaric, citric, malic, lactic and acetic acids. Based on these determinations it would be easier to determine the quality of investigated wines using the ratio between tartaric and malic acids.

Materials and methods

Samples of wine from different industrial grape varieties were collected after completing fermentation with different yeast cultures of *Saccharomyces cerevisiae* during the vintage season from the vineyard of the Ukrainian Tairov's Research Institute of Viticulture and Oenology, located in the Odessa region of Ukraine. The total number of the species selected for the research was thirteen. The fol-

lowing industrial grape varieties were selected for the research:

– **white wine grape varieties:** Aromatic, Odessa's Muscat, Opalovy (Opaline), Ovidiopol'skij, Selena, Sukholimansky, Zagrey.

– **red wine grape varieties:** Charivny (Magic), Illychevsky Early, Odessa's Black, Odessa's Pearl, Ruby Jubilee, Tairov's Ruby.

Yeast strains:

I. Laboratory yeast cultures isolated from grape must from the vineyard of the Ukrainian Tairov's Research Institute of Viticulture and Oenology.

Yeast culture isolated from white wine grape varieties:

*Y-3444; *MAFF-230106. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Aromatic;

Y-3445; MAFF-230107. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Odessa's Muskat;

Y-3441; MAFF-230103. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Opalovy (Opaline);

Y-3442; MAFF-230104. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Ovidiopol'skij;

Y-3439; MAFF-230101. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Selena;

Y-3440; MAFF-230102. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Sukholimansky;

Y-3443; MAFF-230105. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Zagrey.

The designated yeast culture numbers were derived from those deposited in the MAFF Collection, National Institute of Agrobiological Sciences, Genbank of Japan.

* MAFF — Culture Collection of microorganisms Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tsukuba, Ibaraki, Japan.

Yeast culture isolated from red wine grape varieties:

Y-3438; MAFF-230100. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Charivny (Magic);

Y-3448; MAFF-230110. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Illychevsky Early;

Y-3447; MAFF-230109. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Odessa's Black;

Y-3446; MAFF-230108. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Odessa's Pearl;

Y-3437; MAFF-230099. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Ruby Jubilee;

Y-3436; MAFF-230098. *Saccharomyces cerevisiae* isolated from grape must of the variety Tairov's Ruby.

Pure yeast cultures were isolated from grapes and followed by fermentation by using traditional microbiological methods consisting of inoculation of a sample into a Petri dish with a few modifications of nutrient selective agar for yeast isolation and cultivation. Primary yeast isolation was carried out using Inhibitory Mold Agar medium (IMA) (Becton Dickinson Company, USA). Morphological properties of the yeast culture were analyzed after the primary yeast culture isolation. Yeasts were identified by polymerase chain reaction (PCR) using universal yeast primers. Then yeast cultures were cultivated on a Wort Agar medium (Becton Dickinson Company, USA). Each isolated, yeast culture was deposited in the NRRL Culture Collection (National Regional Research Laboratory), Peoria, USA, in the British National Collection of Yeast Culture (NCYC), Norwich, UK and Genbank of Japan.

All biochemical parameters were tested in the wine stocks followed by fermentation of the white and red grape varieties Tairov's selection.

The volume fraction of ethanol, total sugar (glucose/fructose), and pH were determined by the spectroscopy method using the Bacchus-II spectrometer (Microdom Company, France).

Concentrations of organic acids: tartaric, malic, citric, lactic, acetic and phenolic compounds were determined using a method of liquid chromatography (Ultimate 3000, Dionex Company, Germany).

Statistical deviation and significance were evaluated by the Student's t-test with P — value: $P < 0.1$; $P < 0.05$; $P < 0.01$. We calculated Spearman's rank correlation coefficient for the tested biochemical parameters between tested wine stocks from different white and red grape varieties of the Tairov's selection. Each biochemical test was repeated three times to confirm the exact result. For the groups of white and red wine grape varieties, fermentation made with different *Saccharomyces cerevisiae* yeast cultures dispersion analysis (ANOVA) was done as well. The dispersion analysis (ANOVA) based on the Fisher's test (unifactorial model) was applied, where F- criterion determined whether the relevant samples belong to one from general

aggregate and then possible to pool them or not. Standard deviation was calculated, statistical significance of the difference was evaluated by the Student's t-test.

Results and discussion

The results of the organic acid study in wine stocks received from the white and red grape varieties had specific differences in concentrations of organic acids. Results of organic acids concentrations are given in table 1 for white grape varieties and in table 2 for red grape varieties. The normal ranges of tested parameters in wine stocks are given in Table 3.

The study showed that concentration of ethanol and residual sugar in wine stocks depends on enzymatic activity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains which are used for winemaking. For example, the index of ethanol produced by yeast cultures in wine stocks received from white grape varieties has concentrations of ethanol compared with minimal amounts in: Odessa's Muscat MAFF-230107 more than 125%, Opalovy (Opaline) MAFF-230103 more than 122%, Selena MAFF-230101 more than 112%.

Study of the morphology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast followed by fermentation illustrate that between wine stocks of white and red grape varieties there exist some differences in level of ethanol production. It's more for yeast cultures isolated from white grape varieties and less (moderate) for yeast cultures isolated from red grape varieties. All the yeast cells were stained by Gram method. Some cells of yeast are large and either rounded or oval shaped (Fig. 1–6).

In wines received from red grape varieties, the index of ethanol produced in wine stocks showed maximal concentration of ethanol, compared with minimal amounts in such

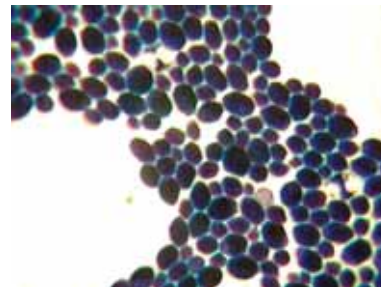


Fig. 1. Morphology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture isolated from white grape variety «Odessa's Muscat» MAFF-230107: the volume fraction of alcohol (ethanol) production — 15.55 v/v%; stained by Gram method; magnification — $\times 720$

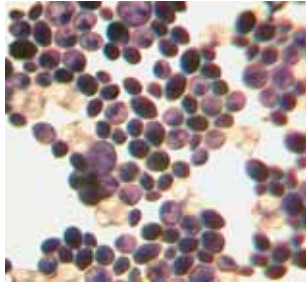


Fig. 2. Morphology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture isolated from white grape variety «Opalovy (Opaline)» MAFF-230103: the volume fraction of alcohol (ethanol) production — 14.94 v/v%; stained by Gram method; magnification — $\times 720$

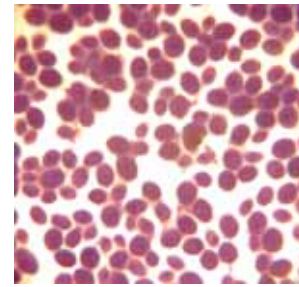


Fig. 4. Morphology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture isolated from red grape variety «Charivniy (Magic)» MAFF-230100: the volume fraction of alcohol (ethanol) production — 12.27 v/v%; stained by Gram method; magnification — $\times 720$

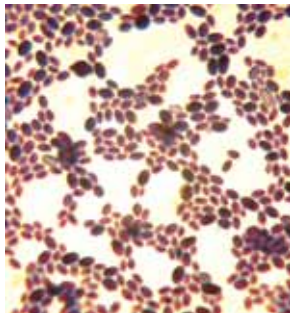


Fig. 3. Morphology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture isolated from white grape variety «Selena» MAFF-230101: the volume fraction of alcohol (ethanol) production — 14.15 v/v%; stained by Gram method; magnification — $\times 720$

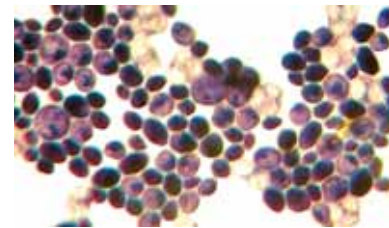


Fig. 5. Morphology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture isolated from red grape variety «Odessa's Black» MAFF-230109: the volume fraction of alcohol (ethanol) production — 11.22 v/v%; stained by Gram method; magnification — $\times 720$

Table 1. Organic acid content (g/L) after fermentation and formation of wine stocks from grape varieties of Tairov's selection (white wine grape varieties)

Wine stocks from white grape varieties	MAFF Collection number in Genbank of Japan	Titrate acidity in terms of tartaric acid (g/L)	volatile acids in terms to acetic acid (g/L)	Tartaric acid (g/L)	Malic acid (g/L)	The ratio of tartaric acid to malic acid	Citric acid(g/L)	Lactic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Common sugar glucose/fructose (g/L)	The volume fraction of the ethanol (% v/v)	Concentration of total phenolic compounds, (mg/L)
Aromatic	230106	5.67±0.35	**0.53±0.02	2.9±0.24	**0.98±0.02	*2.95±0.1	**0.09±0.02	**1.21±0.03	0.39±0.08	**1.14±0.04	13.79±1.08	270.0±30.41
Odessa's Muscat	230107	*4.80±0.1	*1.15±0.1	**1.41±0.02	**1.29±0.04	*1.09±0.1	**0.10±0.01	*0.85±0.1	1.20±0.2	1.07±0.08	15.55±0.8	279.0±22.4
Opalovy (Opaline)	230103	5.19±0.1	0.69±0.05	**1.11±0.03	1.70±0.2	0.65±0.07	**0.23±0.02	**0.67±0.03	**0.25±0.03	*1.61±0.1	14.94±1.6	248.8±16.43
Ovidiopolskij	230104	6.67±0.2	0.43±0.09	5.04±0.3	1.94±0.06	*2.59±0.1	**0.09±0.02	1.45±0.06	**0.23±0.02	2.3±0.2	*7.02±0.1	147.0±13.2
Selena	230101	*6.21±0.1	*0.85±0.1	3.27±0.2	1.55±0.2	2.10±0.2	***0.08±0.01	**0.69±0.04	**0.42±0.02	*1.53±0.1	*14.15±0.1	841.8±11.0
Sukholimansky	230102	5.8±0.5	*0.68±0.1	*3.01±0.1	*1.84±0.1	*1.63±0.1	***0.07±0.01	**0.76±0.02	***0.12±0.01	1.83±0.07	13.4±0.4	384.6±11.0
Zagrey	230105	6.47±0.2	**0.90±0.05	*4.2±0.1	*2.24±0.1	1.87±0.09	***0.06±0.007	**0.41±0.04	**0.54±0.03	**1.05±0.05	9.92±0.4	282.1±13.0

Note: P-value * $P \leq 0.1$; ** $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.01$.

Table 2. Organic acid content (g/L) after fermentation and formation of wine stocks from grape varieties of Tairov's selection. (red wine grape varieties)

Wine stocks from white grape varieties	MAFF Collection number in Genbank of Japan	Titrate-ble acidity in terms of tartaric acid (g/L)	volatile acids in terms to acetic acid (g/L)	Tartaric acid (g/L)	Malic acid (g/L)	The ratio of tartaric acid to malic acid	Citric acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Common sugar glucose/fructose (g/L)	The volume fraction of the ethanol (% v/v)	Concentration of total phenolic compounds, (mg/L)
Charivny (Magic)	230100	6.0±0.2	*0.69±0.1	2.74±0.2	*1.45±0.1	*1.88±0.1	0.09±0.03	0.72±0.06	0.24±0.02	*1.55±0.1	12.27±0.5	675.9±13.8
Illychevsky Early	230110	*10.71±0.1	*1.49±0.1	2.27±0.2	0	–	0.09±0.04	6.71±0.2	3.60±0.2	5.38±0.2	*10.54±0.1	1004.2±19.5
Odessa's Black	230109	7.28±0.2	***0.18±0.01	5.81±0.2	**1.36±0.05	4.27±0.04	0.19±0.04	**0.49±0.05	***0.02±0.005	*1.62±0.1	11.22±0.3	543.6±11.0
Odessa Pearl	230108	11.89±0.2	1.6±0.2	2.76±0.2	0	–	***0.17±0.01	*7.51±0.1	3.1±0.3	8.25±0.2	8.11±0.3	1123.4±43.7
Ruby Jubilee	230099	7.49±0.2	0.44±0.04	4.21±0.2	*1.09±0.1	3.86±0.02	0.07±0.02	0.45±0.04	*0.23±0.05	4.15±0.3	7.2±0.3	654.3±18.7
Tairov's Ruby	230098	*6.05±0.1	*0.76±0.05	2.84±0.2	*1.75±0.1	*1.62±0.1	0.11±0.02	0.59±0.04	0.45±0.03	6.23±0.2	12.27±0.5	645.4±15.3

Note: P-value * P ≤ 0.1; ** P ≤ 0.05; *** P ≤ 0.01.

Table 3. Normal range of organic acid content (g/L) after grape must fermentation and formation of wine stocks from grapes

Group of wine stock	Titrate-ble acidity in terms of tartaric acid (g/L)	volatile acids in terms to acetic acid (g/L)	Tartaric acid (g/L)	Malic acid (g/L)	The ratio of tartaric acid to malic acid	Citric acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Common sugar glucose/fructose (g/L)	The volume fraction of the ethanol (% v/v)	Concentration of total phenolic compounds, (mg/L)	pH
For white dry wines	not less than 3.5	1.20	1.5–5	From traces up to 5	3 and more	no more than 0.8	from traces up to 0.5–5	0.4–1.5	less than 4.0	8.5–15	1200–1500	2.8–3.8
For red dry wines	5.0–7.0	1.50	1.5–5	0–5	3 and more	no more than 1.0	1–5	0.4–1.5	less than 4.0	10–15	1800–3700	3.0–4.6

Note: There are no strict standards of content for the concentration of organic acids in dry grape wines. However research Laboratories established their own standards based on grape growing regions.

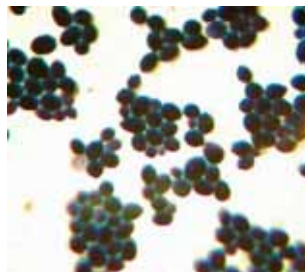


Fig. 6. Morphology of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture isolated from red grape variety «Tairov's Ruby» MAFF-230098: the volume fraction of alcohol (ethanol) production — 12.27 v/v% : stained by Gram method; magnification — ×720

Table 4. Dispersion analysis (ANOVA) represents parameters of organic acid concentration and other components in the wine stocks made from white and red grape varieties of the Tairov's selection

Tested parameters	White dry wine stocks			Red dry wine stocks		
	F	P	r	F	P	r
Titratable acidity/ volatile acids	349.09	<0.0001	-0.47	50.47	<0.0001	0.82
Titratable acidity/tartaric acid	23.27	0.0004	0.95	17.44	0.001	-0.32
Volatile acids/ acetic acid	3.3	0.09	0.82	0.35	0.56	0.94
Tartaric acid/ acetic acid	21.6	0.0005	-0.38	6.38	0.03	-0.60
Tartaric acid/ malic acid	5.9	0.031	0.51	15.88	0.002	0.39
Tartaric acid/ citric acid	29.69	0.0001	-0.65	37.1	0.0001	0.48
Tartaric acid/ phenolic compounds	16.33	0.0016	-0.02	66.38	< 0.0001	-0.64
Tartaric acid/ sugar	7.11	0.02	0.41	2.22	0.16	-0.60
Tartaric acid/ ethanol	57.41	< 0.0001	-0.90	43.79	< 0.0001	-0.10
Tartaric acid/ lactic acid	15.18	0.002	0.32	0.22	0.64	-0.54
Acetic acid/ sugar	22.76	0.0004	-0.65	4.04	0.07	0.67
Acetic acid/ ethanol	108.93	< 0.0001	0.35	67.01	< 0.0001	-0.18
Citric acid/ lactic acid	31.58	0.0001	-0.07	3.59	0.08	0.19
Citric acid/ acetic acid	6.39	0.026	-0.13	3.03	0.11	0.06
Citric acid/ sugar	63.52	< 0.0001	0.1	5.38	0.04	0.07
Citric acid/ ethanol	116.73	< 0.0001	0.37	153.88	< 0.0001	0.04
Lactic acid/ acetic acid	4.71	0.05	-0.16	0.92	0.36	0.98
Lactic acid/ sugar	8.53	0.01	0.50	2.51	0.14	0.68
Lactic acid/ ethanol	101.75	< 0.0001	-0.38	21.07	0.0009	-0.34
Malic acid/ citric acid	92.98	< 0.0001	-0.11	7.0	0.02	-0.11
Malic acid/ total Phenolics	16.46	0.001	-0.11	66.82	< 0.0001	-0.92
Malic acid/ sugar	0.37	0.55	0.36	4.46	0.06	-0.56
Malic acid/ ethanol	88.19	< 0.0001	-0.63	100.5	< 0.0001	0.53
Malic acid/ lactic acid	14.35	0.002	-0.37	1.62	0.23	-0.95
Malic acid/ acetic acid	32.94	< 0.0001	-0.34	0.21	0.65	-0.93
Sugar/ ethanol	90.17	< 0.0001	-0.51	0.03	0.86	-0.42

Note: F — Fisher's criterion. Dispersion analysis (ANOVA) (unifactorial model);
P — value of differences between the investigated groups;
r — Spearman's rank correlation coefficient.

samples fermented using yeast cultures: Charivny (Magic) MAFF-230100 more than 85% and Tairov's Ruby MAFF-230098 more than 85%. Comparative assessment shows that some white wine grape varieties produce much more ethanol compared to red wine grape varieties. This indicates that fermentation activity and ethanol forming capacity of tested wine stocks increases when using yeast strains MAFF-230100 and MAFF-230098. In both white and red grape varieties there exist 2–3 yeast strains which produce maximal amount of ethanol over other yeast strains. Those strains with high enzymatic activity could be used in the alcohol industry to produce ethanol for the pharmaceutical and food industries. Maximal concentration of tartaric acid in wines received from white grape varieties in Ovidiopskij MAFF-230104 was more than 480%. For red wine grape varieties maximal concentration in Odessa's Black MAFF-230109 was more than 548%. The maximal level of malic acid concentration in white wine grape varieties for Ovidiopskij MAFF-230104 was more than 120% and Zagrey MAFF-230105 was more than 260%.

Red wine grape varieties showed maximal concentration of malic acid using yeast culture Charivny (Magic) MAFF-230100 and was more than 45%, Tairov's Ruby MAFF-230098 was more than 75%. Such red wine grape varieties as Illychevsky Early MAFF-230110 and Odessa's Pearl MAFF-230108 did not contain malic acid. This means that spontaneous malolactic fermentation was completed in these wines.

Rating quality of wines by the ratio of tartaric to malic acid was maximal and perfect for white wine grape varieties Aromatic MAFF-230106, the ratio was 2.95 for Ovidiopskij MAFF-230104. We found that quality of wine depends upon the ratio between tartaric and malic acids. We found that due to a high ratio, of dry wine received using yeast culture Odessa's Black MAFF-230109 in perfect quality, where ratio was 4.27. Quality of dry wine received using yeast culture Ruby Jubilee MAFF-230099 is excellent quality, where ratio was 3.86. Parameters of titratable organic acids provide an information of the balance between assimilated and produced organic acids for separate *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture. For acidity, an important role is played by malolactic fermentation. Wines from red grape varieties were bright and lively ruby-red color, with a clear aroma and notes of wild berries, ripe and dried plums with accents of dry vegetable mass. Taste for red wine grape varieties was well structured,

dense, soft and rounded, with delicate acids and almost without bitterness. Such wine stock samples were received with *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains and produced high level of ethanol: white wine grape varieties Ovidiopskij MAFF-230104 and Zagrey MAFF-230105. Samples of wine stock received using *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains, Odessa's Black MAFF-230109 and Ruby Jubilee MAFF-230099 obtained from red grape varieties contained a high volume fraction of ethanol production. The strains which produced high amounts of alcohol (ethanol) are going to be proposed for use in wine biotechnology, pharmaceutical industry, and food industry.

Information given in Table 4 shows positive, moderate and negative correlations, P-value, Fisher-Snedecor test (unifactorial model) frequency in the null distribution in the analysis of variance between tested parameters in both groups of white and red wine stocks (F). Existing high correlation between tested parameters of titratable acidity and volatile acids for wine stocks of red grape varieties ($r = 0.82$; $P = 0.0001$). It is natural because between titratable acidity and volatile acids there exists normal correlation and interdependence.

There is very high correlation between titratable acidity and malic acid in white grape varieties ($r = 0.95$; $P = 0.0004$). There was high correlation between volatile acids and acetic acid in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.82$; $P = 0.09$). We found very high correlations in wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.94$; $P = 0.56$). Such indices are natural because between volatile acids and acetic acid in wine stocks there exists normal correlation and interdependence. We found moderate correlation between tartaric acid and malic acid in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.51$; $P = 0.03$) and there was specified low, but statistically reliable correlation in wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.39$; $P = 0.002$). We found moderate correlation between lactic acid and sugar in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.50$; $P = 0.01$), also moderate correlation was found for wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.68$; $P = 0.1$). We found very high correlation between lactic and acetic acids in wine stocks received from red grape cultivars ($r = 0.98$; $P = 0.3$). We found low correlation between malic acid and sugar in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.36$; $P = 0.5$). We noticed

moderate correlation between malic acid and ethanol in wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.53$; $P = < .0001$). We found low correlations between citric acid and ethanol in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.37$; $P = < 0.0001$).

We found moderate correlation between acetic acid and sugar in wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.67$; $P = 0.07$). We noticed low correlations between tartaric and lactic acids in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.32$; $P = 0.02$). We found low correlations between tartaric acid and sugar in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.41$; $P = 0.02$) and also low correlation between tartaric and citric acids in wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.48$; $P = 0.0001$).

We found very high correlations between titratable acidity and tartaric acid in wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.95$; $P = 0.0004$). We found high correlations between titratable acidity and volatile acids in wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.82$; $P = < 0.0001$).

We noted negative correlation between tartaric and acetic acids for wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.38$; $P = 0.0005$) and for wine stocks received from red grape varieties ($r = -0.60$; $P = 0.03$). In both groups there were negative, but pretty reliable connections.

Negative correlations between tartaric acid and phenolic compounds in wine stocks received from white grape varieties ($r = -0.02$; $P = 0.001$) and in wine stocks received from red grape varieties ($r = -0.64$; $P = < 0.0001$) were observed. In both investigated groups there were negative, but pretty reliable connections. However, between the investigated groups of wine stocks received from white and red grape varieties there was appreciable difference. Negative correlations also existed between the content of tartaric acid and ethanol for wine stocks received from white grape varieties ($r = -0.90$; $P = < 0.0001$) and for wine stocks received from red grape varieties ($r = -0.10$; $P = < 0.0001$).

There is a high correlation between titratable acidity and volatile acids in wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.82$; $P = < 0.0001$). However, the same parameters in white wine stocks received from white grape varieties are absolutely different, because correlation is negative ($r = -0.47$; $P = < 0.0001$). Such great differences results in opposite correlations between white and red stocks. It could be explained by the fact that red wine

stocks contained different ingredients including pigments, anthocyanins, and high phenolic and tannine contents. Therefore, red wine stocks have a high correlation compared with the same in white wine stocks. Very high correlation was indicated between titratable acidity and tartaric acid in white wine stocks that were received from white grape varieties ($r = 0.95$; $P = 0.0004$). However, the same parameters in red wine stocks received from red grape varieties are absolutely different, and correlation showed a negative result ($r = -0.32$; $P = 0.001$).

According to our investigation there were determined the following: a high and very high correlation between volatile acids and acetic acid in white wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.82$; $P = 0.09$) and in red wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.94$; $P = 0.56$); a high correlation between lactic and acetic acid in red wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.98$; $P = 0.36$). However, the same parameters in white wine stocks received from white grape varieties were absolutely different, where correlation showed a negative result ($r = -0.16$; $P = 0.05$); a moderate correlation was found between lactic acid and residual sugar for white wine stocks received from white grape varieties ($r = 0.50$; $P = 0.01$) and for red wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.68$; $P = 0.14$); a moderate correlation between malic acid and ethanol. For wine stocks received from red grape varieties ($r = 0.53$; $P = < 0.0001$) and for white wine stocks received from white grape varieties correlation was negative ($r = -0.63$; $P = < 0.0001$); prospective yeast cultures of *Saccharomyces cerevisiae* for wine biotechnology produced a high volume fraction of ethanol isolated from white grape varieties: Odessa's Muscat MAFF-230107, Opalovy (Opaline) MAFF-230103, Selena MAFF-230101 and yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* isolated from red grape varieties: Charivny (Magic) MAFF-230100, Odessa's Black MAFF-230109, Tairov's Ruby MAFF — 230098.

The author wishes to thank: Svetlana Drevova, Head of the Department of Winemaking. Tarasova Vita, Head of the Laboratory Physical and Chemical studies of wine stocks. Evgeniya Polukarova, Department of winemaking at the Ukrainian Tairov's Research Institute of Viticulture and Oenology, for their real help with the grape must and wine stock samples, providing liquid chromatography, spectrometry in studied samples during

research. Irina Dudenko, Head of the Laboratory of winery for her help with the grape must and wine stock samples. Special thank to Ludmila Gerus, the Department of Genetics and Selection the Ukrainian Tairov`s

Research Institute of Viticulture and Oenology, for her help with grape samples from different grape varieties the Tairov`s selection.

REFERENCES

1. *Kasai E. V., Ageeva N. M.* Modern aspects of biological acid reduction in dry natural wines. // J. Viticult. Winemaking. Moscow. — 2004. — N 6. — P. 14–15.
2. *Spasov H., Mitev P., Stoyanov N. et al.* Selection of wine yeast for red wines production in the region Pomorie // Equipments and technologies of food production. Collection of Scientific Works. — 2010. — Is. 26. — P. 459–466.
3. *Katceva G. N., Aristova N. I., Panov D. A.* The methods of sorbic acid determination in the winemaking // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». — 2009. — V. 22 (61). — N 1. — P. 160–163.
4. *Seliverstova I. V., Ivanov A. A., Severov V. V.* Ion-exclusion determination of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in wines // Bul. Moscow Univ. Ser. II, Chemistry. 2004. — V. 45. — N 1. — P. 47–50.
5. *Bayraktar V. N.* Phenotypes investigation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from different grape varieties following fermentation // Biol. Bull. MDPU. — 2012. — V. 1. — N 2(5). — P. 19–26. http://www.nbuu.gov.ua/portal/Chem_Biol/Bvmdpu/2012_2/Bayraktar.pdf
6. *Taran N., Ponomariova I., Soldatenko E. et al.* Influența acizilor organici asupra indicilor de spumare a vinurilor — materie primă pentru spumante // Viticultura și Vinificația în Moldova. — 2010. — V. 30. — N 6. — P. 14–15.
7. *Gorina V. A., Tanaschuk T. N., Soghoyan K. R. et al.* Especially dairy microflora in winemaking // J. Viticult. Winemaking. Moscow. — 2005. — N 1. — P. 34–35.
8. *Guguchkina T. I., Chemisova L. E., Troshin L. P.* The role of organic acids in the formation of the organoleptic properties of the wine grape variety white Sauvignon protocols // State Scientific Institution. Anapa Zonal Experimental Station of Viticulture and Winemaking. — 2012. — N 5. — P. 1–6.
9. *Ostrouhova E. V., Peskova I. V., Sonina I. G. et al.* Relationship of organoleptic characteristics and physical chemical characteristics of white fortified wines // Ukr. J. Enol. Viticult. — 2010. — N 1. — P. 24–26.
10. *Seliverstova I. V.* Evaluation quality of wines based on the determination of organic acids by ion-exclusive chromatography: dissertation. ... cand. of techn. science: 05.18.07, 05.02.23 / Seliverstova Irina Vasilevna. — Moscow, 2004. — 256 p.
11. *Muratova E. I., Zuzina O. V., Shunyaeva O. B.* Biotechnology of organic acids and protein preparations / Tambov. Tamb. Techn. Univers. — 2007. — 80p.
12. *Ponomariova I. N., Taran N. G., Taran M. N.* Temperature effect on fermentation for aromatic content sparkling wines / State Scientific Institution. Anapa Zonal Experimental Station of Viticulture and Winemaking. 2012. — N 5. — P. 14–18.
13. *Taran N. G., Ponomareva I. N.* Effect of grape must receive at processing grape varieties Chardonnay and Sauvignon on aromatic content and indicators foamy properties wines for sparkling wines / Ibid. — 2012. — N 5. — P. 8–14.

**КОНЦЕНТРАЦІЯ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ
У ВИНОМАТЕРІАЛАХ
ПІСЛЯ ФЕРМЕНТАЦІЇ ДРІЖДЖІВ
*Saccharomyces cerevisiae***

В. М. Байрактар

Одеський національний університет
ім. І. І. Мечникова, Україна

E-mail: vogadro2007@rambler.ru

Досліджували біохімічні показники вино-матеріалів, що впливають на смак і якість вина: об'ємну частку етанолу, концентрації залишкових цукрів, фенольних сполук, винної, яблучної, лимонної, молочної, оцтової кислот, титрувальну та летючу кислотність. Використовували виноматеріали, отримані з білих і червоних сортів винограду Таїровської селекції. Відзначено кореляцію в обох групах між показниками титрувальної та летючої кислотності у виноматеріалах із білих та червоних сортів винограду. Високу кореляцію спостерігали між концентраціями молочної та оцтової кислот, летючою кислотністю і концентраціями оцтової кислоти та загальних цукрів. Встановлено, що виноматеріали з високою концентрацією етанолу отримано з використанням штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що ферментували виноградне сусле з високою швидкістю й активністю бродіння. Смак виноматеріалів залежить від показників відношення винної кислоти до яблучної кислоти. Показано значні відмінності між виноматеріалами, що їх одержано з білих і червоних сортів винограду: у концентраціях органічних кислот, фенольних сполук, залишкових цукрів, а також об'ємної частки етанолу. Для обох досліджуваних груп відзначено позитивну кореляцію між показниками летючої кислотності та концентраціями оцтової, винної, яблучної, молочної кислот і загальних цукрів. Відібрано найбільш перспективні культури дріжджів з високою продуктивністю синтезу етанолу, які можуть бути використані у біотехнології виноробства.

Ключові слова: органічні кислоти, виноградні сорти, *Saccharomyces cerevisiae*.

**КОНЦЕНТРАЦІЯ ОРГАНІЧЕСКИХ
КИСЛОТ В ВИНОМАТЕРИАЛАХ
ПОСЛЕ ФЕРМЕНТАЦИИ ДРОЖЖЕЙ
*Saccharomyces cerevisiae***

В. Н. Байрактар

Одесский национальный университет
им. И. И. Мечникова, Украина

E-mail: vogadro2007@rambler.ru

Исследовали биохимические показатели виноматериалов, влияющие на вкус и качество вина: объемную долю этанола, концентрации остаточных сахаров, фенольных соединений, винной, яблочной, лимонной, молочной, уксусной кислот, титруемую и летучую кислотность. Использовали виноматериалы, полученные из белых и красных сортов винограда Таировской селекции. Отмечена корреляция между показателями титруемой и летучей кислотности в виноматериалах из белых и красных сортов винограда. Высокая корреляция наблюдалась между концентрациями молочной и уксусной кислот, летучей кислотностью и концентрациями уксусной кислоты и общих сахаров. Установлено, что виноматериалы с высокой концентрацией этанола получены с использованием штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, которые ферментировали виноградное сусле с высокой скоростью и высокой активностью брожения. Вкус виноматериалов зависит от показателей отношения винной кислоты к яблочной кислоте. Показаны значительные различия между виноматериалами из белых и красных сортов винограда: в концентрациях органических кислот, фенольных соединений, остаточных сахаров, а также объемной доли этанола. Для обеих исследуемых групп отмечена положительная корреляция между показателями летучей кислотности и концентрациями уксусной, винной, яблочной, молочной кислот и общих сахаров. Отобраны наиболее перспективные культуры дрожжей с высокой продуктивностью синтеза этанола, которые могут быть использованы в биотехнологии виноделия.

Ключевые слова: органические кислоты, виноградные сорта, *Saccharomyces cerevisiae*.

УДК 577.152.321+663.11

ЦЕЛЮЛАЗИ З КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ БАЗИДИОМІЦЕТІВ

К. Г. Древалъ

М. І. Бойко

Донецький національний університет, Україна

E-mail: k.dreval@gmail.com

Получено 14.06.2012

Встановлено, що під час вирощування базидіоміцетів відбувається адсорбція целюлаз на субстраті культивування — фільтрувальному папері. Адсорбовані ензими можна елюювати буферним розчином з високою іонною силою, однак для визначення активності та використання цих ензимів їх слід перевести у розчин з концентрацією солей, близькою до нуля. Розроблено метод одержання ензимних препаратів целюлаз із культуральної рідини базидіоміцетів. Ензимні препарати з високим ступенем очищення одержували в 3 етапи (висолювання протеїнів — діаліз — гель-хроматографія). На основі розробленого методу отримано оригінальні препарати целюлаз базидіальних грибів штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*. Вони містили низку протеїнів, характеризувалися специфічними максимумами виходу з колонки целюлозолітичних ензимів та активністю. Однак спільним є один чіткий максимум виходу з колонки ендоглюканази або целобіаз, що може свідчити про те, що целюлозолітичні комплекси досліджуваних базидіоміцетів не містять множинних форм целюлаз, які б відрізнялися за своєю молекулярною масою. Застосування розробленого методу дало змогу одержати препарати, ступінь очищення яких порівняно з вихідним культуральним фільтратом становить 7,3 для ендоглюканази і 33,3 для целобіази штаму А-Дон-02 *I. lacteus*; 13,1 для ендоглюканази і 25,5 для целобіази штаму Д-1 *I. lacteus*; 29,9 для ендоглюканази і 90,1 для целобіази штаму К-1 *I. lacteus*; 2,1 для ендоглюканази і 30,6 для целобіази штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Ключові слова: базидіоміцети, целюлозолітичні ензими, ендоглюканаза, целобіаза, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.

Біотехнологія дає можливість одержувати необхідні продукти для різноманітних видів людської діяльності [1]. Один із напрямів цієї галузі передбачає утилізацію біоорганічної речовини за допомогою специфічних ензимів [2]. Біоконверсію відтворюваної рослинної сировини у паливо, кормові та харчові продукти, напівпродукти для хімічної та мікробіологічної промисловості у наш час розглядають як одну з ключових галузей біотехнології [1, 2]. Однією з основних причин, що стримує промислове впровадження біодеструкції целюлози, є відсутність високоактивних та економічно ефективних продуцентів ензимів целюлозолітичної дії [3–6]. Поряд із цим целюлозолітичні ензими є найбільш витратною ланкою в процесі біоконверсії целюлози [7].

Традиційними об'єктами одержання препаратів целюлозолітичної дії є аскоміцети та бактерії [8–11], однак останнім часом дедалі більше уваги приділяють базидіальним грибам, оскільки вони мають багато переваг перед традиційними продуцентами целюлаз [12, 13]. Нами знайдено низку

активних продуцентів целюлозолітичних ензимів серед базидіоміцетів, оптимізовано умови їх культивування та встановлено динаміку синтезу ними целюлаз, у результаті чого показано, що нові штамми базидіальних грибів здатні конкурувати з традиційними об'єктами біотехнології целюлаз [14–16].

Для одержання препаратів целюлаз із культуральної рідини використовують загальноприйняті методи виділення та очищення ензимів, комбінуючи їх у різних варіантах [9, 10]. Отриманню целюлаз із культуральної рідини аскоміцетів та бактерій присвячено велику кількість робіт [9, 10, 17–20]. Однак методикам одержання целюлозолітичних ензимів базидіоміцетів приділено недостатньо уваги [21, 22]. Виділення, фракціонування та одержання целюлозолітичних ензимів є складним завданням, пов'язаним із розробленням у кожному конкретному випадку схеми виділення компонентів целюлазного комплексу та її оптимізації [9]. Аналіз показує, що для отримання високоочищеного ензиму потрібно 4–6

стадій [9, 10, 17–20, 23]. Для фракціонування целюлаз із різних організмів-продуцентів використовують відомі методи очищення протеїнів, серед яких найчастіше застосовуваними є осадження сульфатом амонію, етанолом або іншими органічними розчинниками, методи гель- та іонно-обмінної хроматографії, препаративне ізоелектрофокусування та електрофорез [9, 10, 24, 25]. Окрім того, аналіз даних літератури залишає відкритим питання дослідження целюлаз, що можуть адсорбуватися під час культивування грибів на субстраті в живильному середовищі, адже, як відомо [26], більшість целюлозолітичних ензимів мають субстратзв'язувальний домен, унаслідок чого відбувається їх адсорбція на субстраті [10].

Метою роботи було розроблення методу одержання комплексу екзоцелюлаз базидіоміцетів незалежно від ступеня їх адсорбції на субстраті культивування.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були 4 штами вищих базидіальних грибів: K-1, A-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt.

Для дослідження целюлозолітичної активності штами культивували на модифікованому живильному середовищі Чапека з використанням фільтрувального паперу як єдиного джерела вуглецю. Початкове рН живильного середовища доводили до оптимальних значень для кожного штаму [16] на аналізаторі іонів АІ-123 (Україна). Культивування проводили протягом 7 діб [15] за оптимальних для кожного штаму температур [16] у термостатах ТС-80 та ТС-80-М2 (Росія).

Активність ензимів целюлозолітичного комплексу визначали стосовно таких субстратів: фільтрувальний папір (Whatman № 1, щільність 80 г/м²) — загальна целюлозолітична активність (максимум загальної активності целюлаз у культуральних фільтратах стосовно фільтрувального паперу — ФПА), Na-карбоксиметилцелюлоза (С5678, Sigma, Німеччина), гідроксіетилцелюлоза (54290, Sigma, Німеччина) — ендоглюканазна активність та целобіоза (22150, Sigma, Німеччина) — целобіазна активність. Склад реакційних сумішей для визначення ензиматичної активності та умови проведення реакцій — відповідно до рекомендацій IUPAC [27] і загальноприйнятих методик [9, 10]. За одиницю активності (од) приймали

таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкмоль редукуючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв за стандартних умов. Питому активність (од/мг протеїну) визначали як відношення загальної активності культурального фільтрату (од/мл) до вмісту протеїну в культуральному фільтраті (мг/мл). Редукуючі цукри знаходили за методом Шомодї–Нельсона (калібрувальну криву побудовано за глюкозою) [28], а глюкозу — глюкозооксидазно-пероксидазним методом з використанням набору реактивів для визначення глюкози у біологічних рідинах («Реагент», Україна). Вміст протеїну в КФ встановлювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [29].

Штами культивували поверхневим способом у конічних колбах об'ємом 1 000 мл, куди розливали по 500 мл живильного середовища. Осадження протеїнів з культурального фільтрату (КФ) проводили методом висолювання [30], додаючи сульфат амонію до 100%-го насичення, після чого розчин витримували за температури +6±1 °С упродовж 3 діб. Протеїн, який випадав у осад, відділяли від супернатанта на центрифугах ЦЛР-1 протягом 15 хв при 8000 об/хв (температура +6±1 °С). Осад діалізували через напівпроникну мембрану, використовуючи целофан, який пропускає речовини з молекулярною масою до 10 кДа [31] проти дистильованої води за температури +6±1 °С.

Гель-хроматографію розчинів, які отримували після діалізу, здійснювали на колонках діаметром 1 см, висота шару сорбенту Sephadex G-75 (Sigma, Німеччина) становила 30 см. Елюентом слугувала дистильована вода, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракцій — 2 мл. Вміст протеїнів визначали спектрофотометрично.

Ступінь очищення ензимних препаратів визначали як відношення активності ензиму на певному етапі очищення до його активності в початковому культуральному фільтраті [32].

Усі дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх — методом Дункана [33].

Результати та обговорення

Для дослідження адсорбції целюлаз на субстраті — фільтрувальному папері, який залишався після культивування за оптимальних умов штаму A-Дон-02 *Irpex lacteus*

на оптимізованому живильному середовищі протягом 7 діб, фільтрувальний папір відділяли від культуральної рідини за допомогою фільтра Шотта (пор 100). Оскільки для визначення целюлозолітичної активності відповідно до вимог IUPAC використовують цитратний буфер [27], його було обрано для десорбції ензимів із субстрату. Отриманий фільтрувальний папір заливали 3–4-кратним об'ємом 0,5 М цитратного буфера (рН=4,8) і залишали на 24 год за температури $+6\pm 1$ °С. Після цього знову здійснювали фільтрування на тому самому фільтрі. Елюат не виявляв целюлозолітичної активності, однак містив значну кількість протеїну (0,48 мг/мл). Нами зроблено припущення, що ензими, які елюювались із фільтрувального паперу, не виявляли своєї активності через високу іонну силу та концентрацію буферного розчину. Тому до розчину елюату додавали сульфат амонію до 100%-го насичення з метою осадження усіх протеїнів. Осадження, відділення протеїну від супернатанта та наступний їх діаліз проводили, як описано в розділі «Матеріали і методи». У результаті отримано водний розчин протеїнів елюату (концентрація протеїнів — 0,155 мг/мл), в якому визначили активність ензимів (од/мг протеїну):

ФПА	1,16
Ендоглюканазна	178
Целобіазна	948,77.

Встановлено, що під час вирощування базидіоміцетів відбувається адсорбція целюлаз на субстраті культивування — фільтрувальному папері. Адсорбовані ензими можна елюювати буферним розчином з високою іонною силою, однак для визначення активності та використання цих ензимів їх слід перевести у розчин з меншою концентрацією солей.

Наступну роботу було присвячено підбору методів одержання очищених препаратів целюлаз із культуральної рідини базидіоміцетів на прикладі штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus*.

Зважаючи на те, що процес гідролізу целюлози є складним та багатоступеневим [10], потрібна низка ензимів, тому для висолування протеїнів із культурального фільтрату додавали сульфат амонію до 100%-го насичення з метою осадження усіх протеїнів культуральної рідини. Осадження, відділення протеїнів від супернатанта та наступний їх діаліз проводили, як описано в розділі «Матеріали та методи». У результаті отримували водний розчин протеїнів культуральної рідини штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* (концентрація протеїнів 0,760 мг/мл),

позбавлений низькомолекулярних сполук, який виявляв целюлозолітичну активність (од/мг протеїну):

ФПА	24,30
Ендоглюканазна	69,74
Целобіазна	424,58.

В результаті змішування розчину протеїну після діалізу культуральної рідини з розчином протеїну після діалізу елюату з фільтрувального паперу отримано ензимний препарат з концентрацією протеїнів 0,398 мг/мл. Активність целюлаз цього препарату мала такі значення (од/мг протеїну):

ФПА	24,17
Ендоглюканазна	133,51
Целобіазна	665,10.

Значення активності целюлаз препарату не є простою сумою активності першого та другого діалізатів, що ще раз доводить взаємодію компонентів целюлозолітичного комплексу на активність один одного та підтверджує складність взаємодій целюлаз між собою.

З метою подальшого очищення препарат — суміш діалізатів культуральної рідини та елюату з фільтрувального паперу — використовували для нанесення на колонку, заповнену сорбентом Sephadex-75 (рис. 1). Було встановлено, що протеїн виходить з максимумом активності у фракціях 5 та 11. ФПА виявлено у фракціях 8–11 з максимумом у 10-й фракції, ендоглюканазну активність — у фракціях 7–11 з максимумом у 10-й фракції, а целобіазну активність — у фракціях 6–11 з максимумом у 9-й фракції. У фракції 5, відповідно до теоретичних розрахунків [34], виходять сполуки, які за своєю масою знаходяться поза роздільною здатністю цієї колонки, тобто з молекулярною масою понад 70 кДа.

Об'єднанням фракцій 6–11 отримано препарат целюлаз штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* з концентрацією протеїнів 43 мкг/мл і такими значеннями активності:

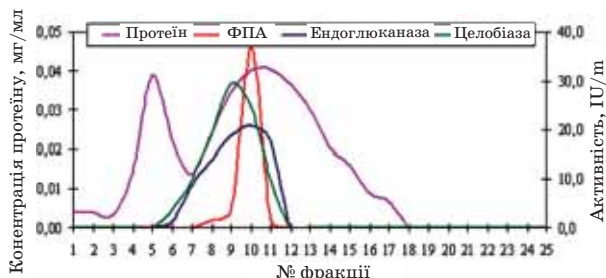
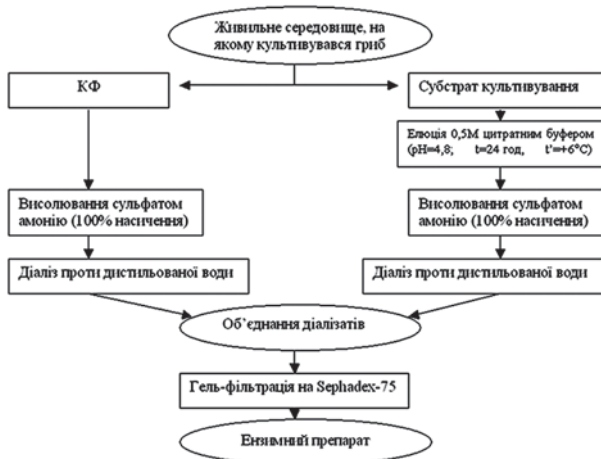


Рис. 1. Хроматограма препарату целюлаз штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* на колонці із Sephadex G-75:
розмір колонки 10×300 мм;
швидкість потоку — 20 мл/год;
об'єм фракції — 2 мл

Загальна целюлозолітична	4,19
Ендоглюканазна	590,00
Целобіазна	912,09.

ФПА ензимного препарату штаму А-Дон-02 *Irpex lacteus* зменшується після очищення його гель-фільтрацією, що можна пояснити розділенням компонентів целюлазного комплексу. Водночас активність ендоглюканази та целобіази зростає, і ступінь очищення цих ензимів порівняно з вихідним культуральним фільтратом становить 7,3 для ендоглюканази та 33,3 — для целобіази.

Таким чином встановлено, що під час культивування базидіоміцетів целюлази адсорбуються на субстраті вирощування — фільтрувальному папері. На підставі отриманих результатів розроблено метод одержання ензимного препарату целюлаз із культуральної рідини базидіоміцетів, який схематично можна зобразити так:



Принципово новим для такого способу є елюція целюлаз із субстрату культивування базидіоміцетів.

Відповідно до розробленої методики було отримано препарати целюлозолітичних ензимів штамів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*. Хроматограми об'єднаних діалізатів подано на рис. 2, 3 та 4 відповідно.

Як видно, протеїн з об'єднаного діалізату штаму Д-1 *Irpex lacteus* виходить з 4 піками, один з яких (фракція № 3) є сукупністю протеїнів, що виходять за межі розділення такої колонки. Фракції 5–10 із целюлозолітичною активністю чітко збігаються з другим піком протеїну, що свідчить про те, що целюлази цього штаму близькі до верхньої межі розділення колонки, тобто їх молекулярна маса становить близько 70 кДа.

Об'єднаний діалізат штаму К-1 *Irpex lacteus* не містив протеїнів з молекулярною масою понад 70 кДа, що впливає із відсутності протеїну у 3-й фракції хроматограми цього штаму (рис. 3). Однак діалізат штаму К-1 *I. lacteus* містив багато низькомолекулярних сполук з молекулярною масою менше 3 кДа, які виходили після 17-ї фракції. Ці низькомолекулярні сполуки можуть бути продуктами гідролізу або денатурації протеїнів культуральної рідини зазначеного штаму. Всього отримано 5 піків протеїну, а целюлозолітична активність поєднана з першими двома з них. Отже, целюлази штаму К-1 *I. lacteus* виходили у 5–11-й фракціях.

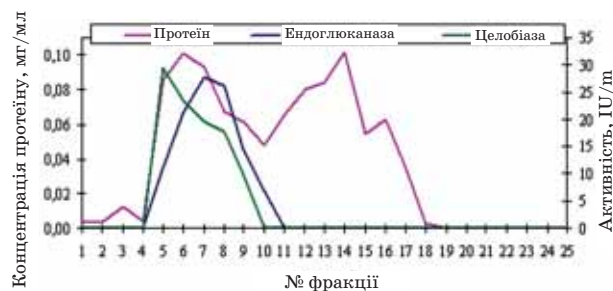


Рис. 2. Хроматограма препарату целюлаз штаму Д-1 *Irpex lacteus* під час пропускання його через колонку із Sephadex G-75: розмір колонки 10×300 мм, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракції — 2 мл

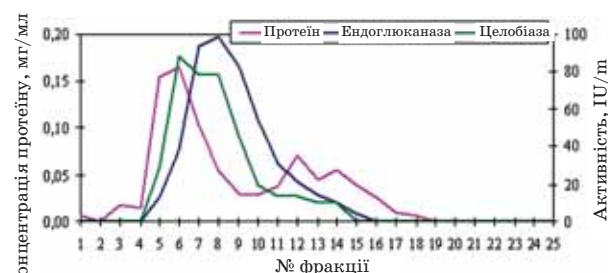


Рис. 3. Хроматограма препарату целюлаз штаму К-1 *Irpex lacteus* під час пропускання його через колонку із Sephadex G-75: розмір колонки 10×300 мм, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракції — 2 мл

Під час гель-хроматографії об'єднаного діалізату штаму AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* одержано 4 піки протеїну, а його целюлази характеризувалися ширшим порівняно з іншими базидіоміцетами діапазоном виходу фракцій з колонки (рис. 4). Пік ендоглюканазної активності цього штаму виходить на дві фракції пізніше порівняно із целобіазною активністю, однак перша та остання фракції ензимів збігались (5–14).

Таким чином, об'єднані діалізати базидіоміцетів містили різні за своєю молеку-

лярною масою протеїни, характеризувалися специфічними максимумами виходу целюлозолітичних ензимів та активністю. Однак спільним для всіх ензимних препаратів є один чіткий максимум виходу з колонки ендоглюканаза або целобіаза, що може свідчити про те, що целюлозолітичні комплекси досліджуваних базидіоміцетів не містять множинних форм целюлаз, які б відрізнялися за своєю молекулярною масою.

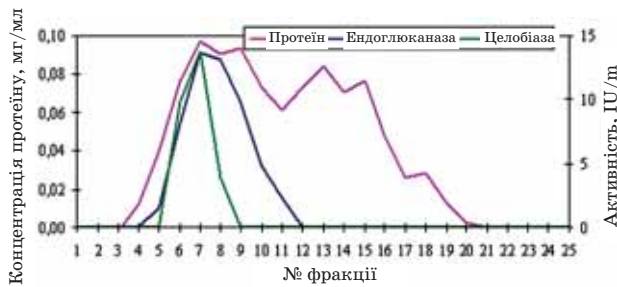


Рис. 4. Хроматограма препарату целюлаз штаму AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* під час пропускання його через колонку з Sephadex G-75:

розмір колонки 10×300 мм, швидкість потоку — 20 мл/год, об'єм фракції — 2 мл

Дані щодо активності целюлаз штамів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* на кожному етапі одержання препарату наведено в табл. 1 (подано середні арифметичні величини, відхилення від середнього арифметичного не перевищувало 5%).

Таблиця 1. Целюлозолітична активність ензимних препаратів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* на різних етапах очищення (од/мг протеїну)

Досліджений розчин	Ендоглюканазна активність	Целобіазна активність	Ступінь очищення	
			Ендоглюканази	Целобіази
<i>Д-1 Irpex lacteus</i>				
Вихідний КФ	78,44	60,20	1	1
Діалізат КФ	243,54	300,11	3,1	4,99
Діалізат елюату	168,90	558,99	-	-
Об'єднаний діалізат	119,83	164,07	-	-
Об'єднана фракція гель-хроматографії	1030,00	1531,88	13,13	25,45
<i>К-1 Irpex lacteus</i>				
Вихідний КФ	44,31	20,05	1	1
Діалізат КФ	104,87	76,51	2,37	3,82
Діалізат елюату	63,62	464,42	-	-
Об'єднаний діалізат	194,74	338,32	-	-
Об'єднана фракція гель-хроматографії	1327,93	1807,24	29,97	90,13
<i>AnSc-1 Daedaleopsis confragosa</i> f. <i>confragosa</i>				
Вихідний КФ	82,88	15,74	1	1
Діалізат КФ	105,40	222,35	1,27	14,13
Діалізат елюату	115,53	368,57	-	-
Об'єднаний діалізат	134,43	404,6	-	-
Об'єднана фракція гель-хроматографії	174,91	481,53	2,11	30,60

Для оцінювання перспективи використання препаратів екзоцелюлаз базидіоміцетів проведено порівняння їх з даними літератури щодо активності целюлаз із різних організмів-продуцентів (табл. 2). Відтак можна стверджувати, що одержані препарати целюлаз базидіальних грибів штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* є більш активними порівняно з існуючими аналогами і можуть бути використані в різноманітних галузях біотехнології (біоутилізація целюлозовмісних відходів, силосування кормів для сільського господарства, целюлозно-паперова промисловість тощо).

Таким чином, розроблено метод отримання повного комплексу екзоцелюлаз базидіоміцетів незалежно від ступеня їх адсорбції на субстраті культивування. Новизна методу полягає в елюції целюлаз 0,5М цитратним буферним розчином (рН = 4,8) із субстрату культивування базидіоміцетів. Одержання оригінальних препаратів целюлаз базидіальних грибів штамів К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* з високим ступенем очищення слід проводити в 3 етапи (висолювання протеїнів — діаліз — гель-хроматографія).

Роботу виконано за спонсорської підтримки суспільної організації «Развитие» (Росія).

Таблиця 2. Целюлозолітична активність препаратів Д-1, К-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* порівняно з іншими препаратами (дані літератури)

Препарат	Організм-продуцент	Протеїн, мг/мл	Субстрат для визначення активності			Літера- тура
			ФП	Na-КМЦ	Ц	
А-Дон-02	<i>Irpex lacteus</i>	0,04	4,19	590,0	912,1	
Д-1		0,03	0	1030,0	1531,9	
К-1		0,03	0	1327,9	1807,2	
AnSc-1	<i>Daedaleopsis confragosa</i> f. <i>confragosa</i>	0,16	5,60	174,9	481,5	
Rovabio Excel	<i>Penicillium funiculosum</i>	27	1,32	24,8	50,8	[35]
Beta-Glucanase 200L		9	0,58	20,9	20,9	[35]
Б-1	<i>Coriolus hirsutus</i>	–	17,8	13,7	18,0	[36]
UV-64 ВКМ F-3932D	<i>Myceliophthora fergusii</i>	–	–	2,75	2,32	[37]
258	<i>Thielavia terrestris</i>	–	1,8	8,0	1,2	[39]
PV2007	<i>P. verruculosum</i>	–	–	32,1	1,8	[39]
Accellerase 1000	<i>Trichoderma</i>	–	–	23,8	3,8	[39]
Spezyme CP		–	–	21,9	0,4	[39]

Примітка. ФП — фільтрувальний папір; Na-КМЦ — Na-карбоксиметилцелюлоза; Ц — целобіоза. Значення активності наведено в од/мг протеїну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волова Т. Г. Биотехнология. — Новосибирск: Изд-во Сиб. отделения РАН, 1999. — 252 с.
2. Іншина М. Н. Біотехнологія: Навч. посібник. — Суми: Вид-во СумДПУ ім. А. С. Макаренка, 2009. — 172 с.
3. Кухар В. П. Біоресурси — потенційна сировина для промислового органічного синтезу // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 12–27.
4. Banerjee G., Scott-Craig J. S., Walton J. D. Improving enzymes for biomass conversion: a basic research perspective // Bioen. Res. — 2010. — N 3. — P. 82–92.
5. Demain A. L. Biosolution to the energy problem // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — N 36. — P. 319–332.
6. Lin Y., Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects // Appl. Microbiol. Biotech. — 2006. — N 69. — P. 627–642.
7. Wilson D. B. Cellulases and biofuels // Cur. Opin. Biotechnol. — 2009. — V. 20. — P. 295–299.
8. Чешкова А. В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха: Учеб. пособие для вузов. — Иваново: ГОУВПО ИГХТУ, 2007. — 282 с.
9. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целюлозолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. — 1993. — Т. 25. — 152 с.
10. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
11. Рабинович М. Л. Производство этанола из целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42, № 1. — С. 5–32.
12. Трутнева І. А., Дудченко Л. Г., Горова Т. Л. Ферментні препарати з вищих базидіальних грибів у біотехнологічних процесах // Фітотерапія. Часопис. — 2004. — № 3. — С. 43–49.
13. Novotny C., Cajthaml T., Svobodova K. et al. *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential — review // Folia Microbiol. — 2009. — N 54 (5). — P. 375–390.
14. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
15. Древаль К. Г., Кузнецова К. В., Юдіна А. В. та ін. Динаміка синтезу целюлаз вищими дереворуйнівними базидіальними грибами // Мікробіол. біотехнол. — 2011. — № 4 (16). — С. 52–60.
16. Древаль К. Г., Бойко М. І. Культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів. І. Загальна

- целюлозолітична активність культуральних фільтратів базидіоміцетів // Біотехнологія. — 2012. — Т. 5, № 1. — С. 107–114.
17. Eriksen J., Goksuyr J. Cellulases from *Chaetomium thermophile* var. *dissitum* // Eur. J. Biochem. — 1977. — V. 77 — P. 445–450.
 18. Gum E. K., Brown R. D. Comparison of four purified extracellular 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viride* // Biochim. Biophys. Acta. — 1977. — V. 492, N 1. — P. 225–231.
 19. Nidetzky B., Steiner W., Claeysens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis // Biochem. J. — 1994. — V. 303. — P. 817–823.
 20. Daniel J. D., Simonetti A., Hertz P. F. et al. Purification and Characterization of an Extracellular b-glucosidase from *Monascus purpureus* // J. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 18 (5). — P. 933–941.
 21. Ферментные системы высших базидиомицетов / Под ред. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
 22. Комарницький І. К. Изучение целлюлозолитических ферментов у некоторых деразрушающих грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.04 «Биохимия». — К., 1975. — 28 с.
 23. Ding S. Jn., Ge W., Buswell J. A. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvaceae*. Purification, characterization, cloning and expression // Europ. J. Biochem. — 2001. — V. 268. — P. 5687–5695.
 24. Ishikawa E., Sakai T., Ikemura H. et al. Identification, cloning, and characterization of a *Sporobolomyces singularis*-galactosidase-like enzyme involved in galacto-oligosaccharide production // J. Biosci. Bioengin. — 2005. — V. 99, N 4. — P. 331–339.
 25. Magalhaes P. O., Ferraz A., Milagres A. F. Enzymatic properties of two b-glucosidases from *Ceriporiopsis subvermispora* produced in biopulping conditions // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 101. — P. 480–486.
 26. Рабинович М. Л., Мельник М. С. Прогресс в изучении целлюлозолитических ферментов и механизм биодegradации высокоупорядоченных форм целлюлозы // Усп. биол. химии. — 2000. — Т. 40. — С. 205–266.
 27. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity // Pure Appl. Chem. — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
 28. Nelson N. A photometric adaptation of the Shomogyi method for the determination of glucose // J. Biol. Chem. — 1944. — V. 153, N 2. — P. 375–379.
 29. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
 30. Броновицкая З. С., Горетов В. П. Высаливание белков серноокислым аммонием при низких температурах // Прикл. биохим. микробиол. — 1967. — Т. 3, № 6. — С. 707–710.
 31. Кейл Б. Лабораторная техника органической химии. — М.: Мир, 1966. — С. 194–200.
 32. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты: Пер. с англ. — М.: Мир, 1982. — Т. 1 — 392 с.
 33. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посібник. — Донецьк: Касіопея, 1999. — 210 с.
 34. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии: Учеб. пособие для студентов биологических специальностей университетов. — М.: Высш. школа, 1980. — 272 с.
 35. Скомаровский А. А., Марков А. В., Гусаков А. В. и др. Новые целлюлазы для высокоэффективного гидролиза лигноцеллюлозной биомассы // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42, № 6. — С. 674–680.
 36. Мельничук Г. Г., Даниляк М. І., Колеснева Г. В. Порівняльне вивчення целюлаз і глюкоамілаз грибів з родини *Polyporaceae* // Укр. бот. журн. — 1982. — Т. 39, № 2. — С. 13–16.
 37. А. с. 2361915 России. Штамм мицелиального гриба *Myceliophthora fergusii* — продуцент нейтральных целлюлазы, бета-глюканазы и ксиланазы / Синецын А. П., Окунев О. Н., Черноглазов В. М. и др. Заявка № 2008101252 от 21.01.2008, кл. C12N 1/14, C12N 9/42, Бюл. от 20.07.2009.
 38. А. с. 22477 України. Штам гриба *Thielavia terrestris* (Apinis) Malloch et. Cain, 258 — продуцент целлюлазного комплексу з нуклеодеполімеразною активністю / Сирчін С. О., Айзенберг В. Л., Захарченко В. О. та ін. Заявка № 95062987 від 26.06.1995, кл. C12N 1/14? C12P 21/00? A23K 3/02? <.k/ # 3|1998? dil 03/03/1998/
 39. А. с. 2361918 России. Штамм мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* — продуцент комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы и способ получения ферментного препарата комплекса целлюлаз, ксиланазы и ксилоглюканазы для гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы / Синецын А. П., Окунев О. Н., Черноглазов В. М. и др. Заявка № 2008106829 от 26.02.2008, кл. C12N 9/42, C12P 19/00, C12R 1/80, Бюл. от 20.07.2009.

ЦЕЛЛЮЛАЗЫ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

К. Г. Древаль
М. И. Бойко

Донецкий национальный университет,
Украина

E-mail: k.dreval@gmail.com

CELLULASES FROM THE BASIDIO- MYCETES CULTURAL LIQUID

K. G. Dreval
M. I. Boyko

Donetsk National University,
Ukraine

E-mail: k.dreval@gmail.com

Установлено, что во время выращивания базидиомицетов происходит адсорбция целлюлаз на субстрате культивирования — фильтровальной бумаге. Адсорбированные энзимы можно элюировать буферным раствором с высокой ионной силой, однако для определения активности и использования этих энзимов их следует перевести в раствор с концентрацией солей, близкой к нулю. Разработан метод получения энзимных препаратов целлюлаз из культуральной жидкости базидиомицетов. Энзимные препараты с высокой степенью очистки получали в 3 этапа (высаливание протеинов — диализ — гель-хроматография). На основе разработанного метода получены оригинальные препараты целлюлаз базидиальных грибов штаммов К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* и AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*. Они содержали ряд протеинов, характеризовались специфическими максимумами выхода из колонки целлюлозолитических энзимов и активностью. Однако общим является один четкий максимум выхода из колонки эндоглюканаз или целлобиаз, что может свидетельствовать об отсутствии в целлюлозолитических комплексах исследуемых базидиомицетов множественных форм целлюлаз, отличающихся по своей молекулярной массе. Использование разработанного метода позволило получить препараты, степень очистки которых по сравнению с исходным культуральным фильтратом составляет 7,3 для эндоглюканазы и 33,3 для целлобиазы штамма А-Дон-02 *I. lacteus*; 13,1 для эндоглюканазы и 25,5 для целлобиазы штамма Д-1 *I. lacteus*; 29,9 для эндоглюканазы и 90,1 для целлобиазы штамма К-1 *I. lacteus*; 2,1 для эндоглюканазы и 30,6 для целлобиазы штамма AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Ключевые слова: базидиомицеты, целлюлозолитические энзимы, эндоглюканаза, целлобиаза, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.

Adsorption of cellulases on substrate taking place during the cultivation process was determined. Adsorbed enzymes can be eluted by buffer solution with high ionic strength, but for determine their activity they should be transferred into the aqueous solution. On the basis of the results a method for obtaining of cellulases preparations from cultural liquids of basidiomycetes was developed. This method is the elution of cellulases from the cultivation substrate of basidiomycetes. It was found that using of the last allows to obtain enzymatic preparations with a high degree of purification in 3 stages (salting out of proteins — dialysis — gel chromatography). Cellulase preparations received original products of basidiomycetes strains К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* were obtained. They contained different proteins, enzymes with specific peaks out of column and their activity. However, common to them was a distinct maximum of outing from the column by endoglucanases or cellobiases, which may indicate that the studied cellulolytic complexes of basidiomycetes do not contain multiple forms of cellulases with different molecular mass. This method allowed to obtain preparations with different degree of purification in comparing with the original culture filtrate 7,3 for endoglucanase and 33,3 for cellobiase of strain А-Дон-02 *I. lacteus*; 13,1 for endoglucanase and 25,5 for cellobiase of strain Д-1 *I. lacteus*; 29,9 for endoglucanase and 90,1 for cellobiase of strain К-1 *I. lacteus*; 2,1 for endoglucanase and 30,6 for cellobiase of strain AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa*.

Key words: basidiomycetes, cellulolytic enzymes, endoglucanase, cellobiase, enzymatic preparations, *Irpex lacteus*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*.

УДК 577.344:577.19:582.284.3

СВЕТОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РОСТА И МЕЛАНИНООБРАЗОВАНИЯ У *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat

Н. Л. Поединок

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев

E-mail: poyedinok@ukr.net

Получено 21.11.2012

Целью работы было изучение возможности использования различных источников света низкой интенсивности для регуляции роста мицелия и синтеза меланина лекарственным грибом *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat.

Исследования влияния света на линейный рост, накопление биомассы и синтез меланина *I. obliquus* проводили с использованием экспериментальных установок, которые обеспечивали генерацию как лазерного излучения (когерентный свет) с заданными параметрами, так и излучения источников некогерентного света. Показано, что наибольший стимулирующий эффект имел место при облучении мицелия синим светом. Установлено, что дальнейшая реализация фотобиологического эффекта в значительной степени зависит от способа культивирования. Облучение лазерным светом при всех исследованных диапазонах длин волн в большей степени способствовало росту, накоплению биомассы и меланина в мицелии гриба, чем облучение некогерентным светом в том же диапазоне длин волн. Световая обработка позволила существенно сократить длительность ферментации.

Результаты исследований дают основания рассматривать низкоинтенсивный свет в видимой части спектра как перспективный регулятор роста и биосинтетической активности *I. obliquus* в биотехнологии его культивирования.

Ключевые слова: *Inonotus obliquus*, меланин, фотобиологический эффект, лазерный свет, некогерентный свет.

В связи с ухудшением экологической ситуации весьма актуальным становится поиск экологически чистых регуляторов роста и биологической активности грибов в культуре. Одним из таких факторов является природный регулятор всего живого — свет. В настоящее время меланинсодержащие грибы рассматривают как перспективные источники меланинов. Меланиновые пигменты грибов нетоксичны, обладают фото- и радиопротекторным действием, проявляют антиоксидантную, генопротекторную, противоопухолевую, антибактериальную, иммуномодулирующую и гепатопротекторную активность [1, 2].

Inonotus obliquus — широко известный меланинсодержащий гриб, обладающий широким спектром лекарственных свойств [3]. Известны работы, где исследователи рассматривают этот гриб как перспективный продуцент меланинов и меланинсодержащих субстанций [4].

Имеются данные о положительном влиянии освещения в видимой части спектра на

интенсивность пигментации разных видов микромицетов. Сведения о влиянии низкоинтенсивного излучения на рост и синтез меланиновых пигментов макромицетами в литературе практически отсутствуют.

Нами изучена возможность использования различных источников света низкой интенсивности (лазеры, светодиоды) для регуляции роста мицелия и синтеза меланина *I. obliquus*.

Материалы и методы

Объектом исследования была культура базидиального меланинсинтезирующего лекарственного гриба *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat (шт. 1877) из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины.

Культивирование осуществляли при температуре 26 °С на жидкой (12 сут) и агаризованной средах следующего состава: глюкоза — 30 г/л; KH_2PO_4 — 1,1 г/л; MgSO_4 —

0,008 г/л; кукурузный экстракт — 2 мл; пептон — 3 г/л, тирозин 0,2 г/л; тиамин 30 мкг/л. На жидкой среде культивирование проводили поверхностным (без перемешивания) и глубинным (с перемешиванием на круговой качалке со скоростью 160 об/мин) методами. Для изучения биосинтеза меланина *I. obliquus* культивировали глубинным методом в течение 12 сут. Скорость линейного роста [5] и накопления биомассы [6] определяли по общепринятым методикам. Биомассу отделяли от культуральной жидкости фильтрованием. Высушивание ее до абсолютно сухой биомассы (а.с.б.) проводили при 60 °С.

Экстракцию меланина из биомассы осуществляли 2%-м раствором NaOH с коэффициентом разбавления 1:10 в течение 2 ч на кипящей водяной бане. Полученный экстракт охлаждали и подкисляли до pH 2,0 концентрированной соляной кислотой. Коагулированный пигмент отделяли центрифугированием при 6 000 г в течение 15 мин. Полученный осадок растворяли в 2%-м растворе NaOH и использовали для количественного определения меланина, рассчитывая его по калибровочной кривой. Построение ее вели на основании данных фотометрирования растворов пигмента *I. obliquus* различной концентрации при длине проходящего света 490 нм. Для построения калибровочной кривой меланин гриба предварительно очищали методом гель-хроматографии на колонке 1,5×72 см с сорбентом Toyopearl HW-65 (Tojo Soda, Япония) в 0,01 н NaOH [7, 8]. Очищенный меланин с целью обессоливания диализовали против дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

Содержание меланина в среде культивирования определяли прямым фотометрированием культуральной жидкости после отделения мицелиальной массы грибов [4]. Общий выход рассчитывали как сумму меланина, экстрагированного из биомассы гриба (эндомеланины) и меланина, синтезированного грибом, в культуральной жидкости (экзомеланины).

Исследования влияния света на линейный рост, накопление биомассы и синтез меланина *I. obliquus* проводили с использованием экспериментальных установок. Эти установки обеспечивали генерацию как лазерного излучения (когерентный свет) с заданными параметрами (длина волн 476,0 нм — синий, 488,0 нм — синий, 514,0 нм — зеленый и 632,8 нм — красный, 720,0 нм — дальний красный), так и излучения источ-

ников некогерентного света (длина волн 660,0 нм — красный, 520,0 нм — зеленый, 430,0 нм — синий и 720,0 нм — дальний красный). Доза облучения составляла 230 мДж/см². На агаризованной среде облучение мицелия производили на чашках Петри. Далее, в стерильных условиях вырезали диски с облученным мицелием диаметром 5 мм. Их помещали в центр чашек Петри с агаризованной средой для изучения скорости линейного роста либо в ферментационные колбы с жидкой средой (по 15 дисков) для исследования синтеза биомассы и меланина.

Полученные результаты были обработаны статистически [9] с помощью 5-й версии программы Origin. В таблице и рисунках приведены средние статистически достоверные данные при 95% -й вероятности.

Результаты и обсуждение

Поскольку разные виды грибов отличаются по чувствительности к свету, при выборе режимов облучения (230 мДж/см²) руководствовались данными, которые были получены нами и другими исследователями в процессе изучения фотобиологических реакций [10–16].

Изучение влияния света, полученного из разных источников, на рост и биосинтетическую активность *I. obliquus* показало, что наибольший эффект в данном случае наблюдался при облучении мицелия синим светом (таблица; рис. 1, 2). Облучение зеленым светом различного происхождения не оказывало достоверного влияния на рост гриба. В то же время облучение красным светом как в дальнем, так и ближнем диапазоне увеличивало скорость линейного роста и накопление биомассы. Причем дальний красный свет (720 нм) обладал большим стимулирующим эффектом, чем красный с длиной волн 632,8 нм (лазерный) и 660 нм (некогерентный) (таблица). Это отличает *I. obliquus* от каротинсодержащих грибов (*Candida guilliermondii*, *Verticillium agaricinum* и *Puccinia graminis*) [17]. У *Candida guilliermondii* облучение светом длиной волны 660 нм вызывало увеличение скорости деления дрожжевых клеток, у *Puccinia graminis* положительно влияло на прорастание уредоспор, а у *Verticillium agaricinum* — на каротинообразование. Последующее облучение светом 730 нм (дальним красным) полностью снимало указанные эффекты. Авторы рассматривают их как характерный признак каротинсодержа-

ших грибов. Отсутствие такой реакции у *I. obliquus* может свидетельствовать о существовании других механизмов фотобиологических реакций у этого вида. С другой стороны, положительная реакция гриба на облучение в синем и красном диапазоне длин волн говорит в пользу теории об одновременном существовании у меланинсодержащих грибов двух фоторецепторных систем: микохромной и с участием меланиновых пигментов.

Кроме того, следует отметить, что фотобиологический эффект облучения мицелия *I. obliquus* более четко выражен для процессов роста на жидкой среде (таблица). Аналогичные результаты мы получили ранее при изучении факторов стимуляции роста и биосинтетической активности у *Ganoderma lucidum* [18]. Этот факт еще раз свидетельствует о том, что при оценке роста грибов, в том числе и во время проведения скрининга по критерию скорости роста, недостаточно оценивать скорость линейного роста на твердых средах, поскольку этот показатель не учитывает густоту и высоту мицелия. Используя в качестве показателя роста гриба накопление им биомассы на жидких средах, можно более достоверно определить влияние какого-либо фактора на рост мицелия.

Анализ полученных результатов дает основания утверждать, что дальнейшая реализация фотобиологического эффекта в значительной степени зависит от условий существования гриба после облучения, в частности от способа культивирования. В наших исследованиях стимулирующий эффект,

кроме облучения когерентным зеленым светом и некогерентным красным, был более значительным при глубинном культивировании. После облучения в одном режиме количество биомассы мицелия, выращенной на жидких средах одинакового состава, но при разных способах культивирования, существенно различалось (таблица).

Установлено, что облучение лазерным светом при всех исследованных диапазонах длин волн в большей степени способствовало росту, накоплению биомассы мицелия и меланина гриба, чем облучение некогерентным светом. При глубинном культивировании гриба облучение инокулюма когерентным светом примерно в 2 раза более эффективно по сравнению с некогерентным (таблица; рис. 1, 2).

Как правило, при оценке биохимического воздействия света принимают во внимание энергию светового кванта, интенсивность светового потока (количество квантов света на единицу площади в единицу времени), дозу, спектральный состав света. С этой точки зрения лазерные источники способны обеспечить, даже при низкой и средней интенсивности, спектральную густоту (энергию на одиночный частотный интервал), которая недоступна тепловым источникам.

Поэтому, учитывая, что когерентный и некогерентный свет одинаковой длины волны и дозы оказывает одинаковое воздействие на биологические объекты [13], с этими уникальными характеристиками лазерного света можно связать некоторые специфичные механизмы воздействия света на биологические объекты. Установлено,

Влияние света на рост мицелия *I. obliquus*

	Когерентный (лазерный) свет					Некогерентный свет (светодиоды)			
		514,0 нм (зеленый)	476,0 нм (синий)	488,0 нм (синий)	720 нм (дальний красный)	660,0 нм (красный)	520,0 нм (зеленый)	430,0 нм (синий)	720 нм (дальний красный)
Линейный рост на агаризованной среде									
% увеличения скорости роста	11,29± 0,55	6,18± 0,70	23,39± 1,10	26,61± 1,42	18,01± 1,71	10,75± 1,90	-0,70± 0,08	22,31± 1,78	10,22± 0,76
Поверхностный рост на жидкой среде (12 сут)									
% увеличения биомассы	11,10± 0,23	1,31± 0,07	32,22± 1,31	36,64± 1,84	18,62± 0,87	7,90± 0,33	1,81± 0,06	21,03± 0,74	14,22± 0,65
Рост при глубинном культивировании (12 сут)									
% увеличения биомассы	17,20± 0,78	2,15± 0,08	44,09± 1,98	56,99± 2,01	21,51± 1,03	9,68± 0,48	5,38± 0,23	23,66± 0,99	13,98± 0,34

что облучение посевного мицелия *I. obliquus* синим (430 нм, 476 нм и 480 нм) и красным (632,8 нм и 660 нм) светом при глубинном культивировании приводит к увеличению скорости роста культуры и накоплению биомассы гриба (рис. 1).

Полученные результаты позволяют утверждать, что низкоинтенсивный свет

в видимой части спектра может быть использован в биотехнологии глубинного культивирования *I. obliquus* не только как стимулятор роста, но и как стимулятор синтеза меланина (рис. 2). Здесь можно отметить ту же тенденцию — облучение лазерным светом в значительно большей степени индуцировало синтез меланина, чем облуче-

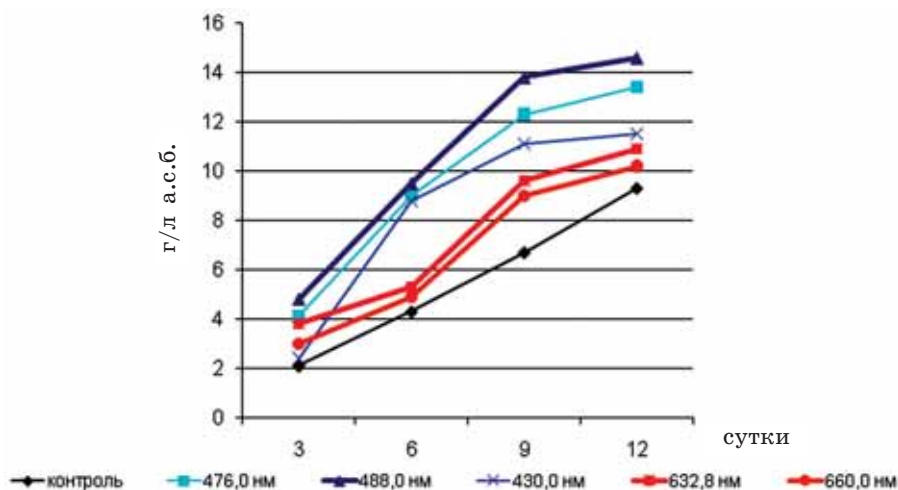


Рис. 1. Динамика накопления биомассы *I. obliquus* при глубинном культивировании

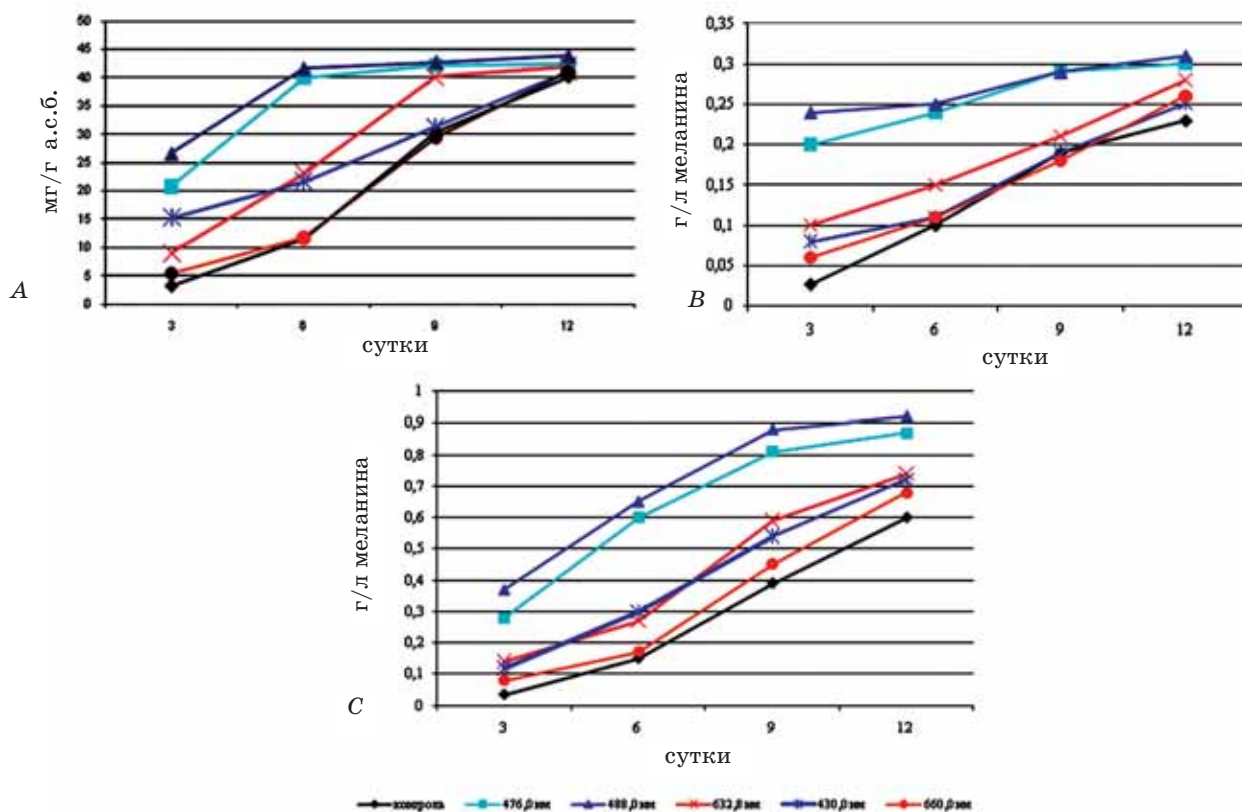


Рис. 2. Динамика накопления меланина *I. obliquus* при глубинном культивировании: А — эндомеланин; В — экзомеланин; С — общий выход меланина

ние неполяризованным светом. Облучение гриба синим светом (476 и 488 нм) увеличивало количество синтезируемого грибом меланина на 43–54%. Изучение динамики накопления меланина показало, что его синтез достигает стационарной фазы после облучения лазерным светом в диапазоне 476–488 нм на 9-е сут, в то время как в контроле на 12-е сут культивирования переход в стационарную фазу не был отмечен.

Суммируя вышесказанное, можно утверждать, что использование на практике адаптационных возможностей меланинодержателя гриба *I. obliquus*, его защитных

свойств, проявляющихся в увеличении синтеза меланина в ответ на облучение видимым светом природы, позволит значительно интенсифицировать биотехнологические этапы получения биомассы и меланина этого ценного лекарственного гриба и увеличит выход конечного продукта.

Кроме того, изучение фотобиологических реакций грибов, накопление экспериментального материала по вопросам стимулирующего действия низкоинтенсивного облучения разной природы на их биосинтетическую активность приблизит нас к пониманию фундаментальных механизмов действия света на организм грибов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борщевская М. И., Васильева С. М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопр. мед. химии. — 1999. — Т. 45, № 1. — С. 13–23.
2. Курченко В. П., Кукулянская Т. А., Новиков Д. А. Биохимическая фармакология грибных меланинов / Усп. мед. микологии: Мат. 2-го Всерос. конгр. по мед. микологии, Москва, 24–25 марта 2004. — С. 156–158.
3. Wasser S. P., Weis A. L. Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: a current perspectives (rewire) // Int. J. Med. Mushrooms. — 1999. — V. 1. — P. 31–62.
4. Бабицкая В. Г., Щерба В. В. Природа меланиновых пигментов некоторых микро- и макромицетов // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 286–291.
5. Соломко Е. Ф., Ломберг М. Л., Митропольська Н. Ю., Чоловська Е. В. Ріст окремих видів лікарських макромицетів на живильних середовищах різного складу // Укр. ботан. журн. — 2000. — Т. 57, № 2. — С. 119–126.
6. Методы экспериментальной микологии: Справочник. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
7. Гриффитс Э. и др. Методы практической биохимии. — М.: Мир, 1978. — 384 с.
8. Остерманн Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1985. — 257 с.
9. Кокунин В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. біохім. журн. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776–790.
10. Хорлин А. Я. Методы исследования углеводов. — М.: Мир, 1975. — 313 с.
11. Duand R. Photomorphogenèse d'un basidiomycète *Coprinus congregatus* Bull. Ex Fr.: influences de variations quantatives et qualitatives de la lumière sur les phases successives du développement des carpophores. Analyse du phénomène du photoreception // Thèse doct. Sci. boil. Lyon: Univ. Claude-Bernard, 1975. — 116 p.
12. Кару Т. Й. О молекулярном механизме терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного света // ДАН СССР. — 1986. — Т. 291, № 5. — С. 1245–1249.
13. Ляндрес И. Г. Механизмы биостимуляции низкоинтенсивного лазерного излучения. — Минск: 1998. — 207 с.
14. Poyedinok N. L., Potemkina J. V. et al. Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllorphomycetidae) // Int. J. Med. Mushrooms. — 2000. — V. 2, N 4. — P. 339–342.
15. Poyedinok N. L., Buchalo A. S., Potemkina J. V. et al. The Action of Argon and Helium-Neon Laser Radiation on Growth and Fructification of Culinary-Medicinal Mushrooms *Pleurotus ostereatus*, *Lentinus edodes* and *Hericium erinaceus* // Ibid. — 2003. — V. 3, N 4. — P. 251–257.
16. Поединок Н. Л., Негрейко А. М. Использование лазерного света при культивировании некоторых видов съедобных грибов // Биотехнология. — 2003. — № 3. — С. 66–78.
17. Жданова Н. Н., Василевская А. И. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. — К.: Наук. думка, 1982. — 168 с.
18. Poyedinok N. L., Potemkina J. V., Negriyko A. M. et al. Light Regulation of Growth and Biosynthetic Activity of Ling Zhi or Reishi of Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetidae) in Pure Culture // Int. J. Med. Mushrooms. — 2008. — V. 10, N 4. — P. 368–378.

**СВІТЛОВЕ РЕГУЛЮВАННЯ РОСТУ
ТА МЕЛАНІНОУТВОРЕННЯ
В *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat**

Н. Л. Поєдинок

Інститут ботаніки ім. Н. Г. Холодного
НАН України,
Київ

E-mail: poyedinok@ukr.net

Метою роботи було вивчення можливості використання різних джерел світла низької інтенсивності для регуляції росту міцелію та синтезу меланіну лікарським грибом *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat.

Дослідження впливу світла на лінійний ріст, накопичення біомаси і синтезу меланіну *I. obliquus* проводили з використанням експериментальних установок, які забезпечували генерацію як лазерного випромінювання (когерентне світло) із заданими параметрами, так і випромінювання джерел некогерентного світла. Показано, що найбільший стимулювальний ефект мав місце за опромінення міцелію синім світлом. Встановлено, що подальша реалізація фотобіологічних ефектів значною мірою залежить від способу культивування. Опромінення лазерним світлом за всіх досліджених діапазонів довжин хвиль більшою мірою сприяло росту, накопиченню біомаси та меланіну в міцелії гриба, ніж опромінення некогерентним світлом у тому самому діапазоні довжин хвиль. Світлова обробка дала змогу істотно скоротити тривалість ферментації.

Результати досліджень дають підстави розглядати низькоінтенсивне світло у видимій частині спектра як перспективний регулятор росту і біосинтетичної активності *I. obliquus* у біотехнології його культивування.

Ключові слова: *Inonotus obliquus*, меланін, фотобіологічний ефект, лазерне світло, некогерентне світло.

**LIGHT REGULATION OF GROWTH
AND MELANIN FORMATION
IN *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat**

N. L. Poyedinok

Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: poyedinok@ukr.net

The study aims to investigate possibilities of using different sources of low-intensity light for the regulation of mycelium growth and melanin synthesis by medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat.

Studies of the light's influence on the linear growth, biomass accumulation and melanin synthesis *I. obliquus* were performed using experimental installations that provide both lasing (coherent light) with specified parameters, as well as sources of incoherent light. It has been demonstrated that the greatest stimulating effect took place during the irradiation of mycelium with blue light. It has been found that further realization of photobiological effect is largely dependent on the method of cultivation. Irradiation with laser light within all studied wavelength ranges was more conducive to growth, biomass and melanin accumulation in the mushroom mycelium than incoherent light irradiation within the same wavelength range. Light treatment made it possible to significantly reduce the duration of fermentation.

The results of studies allow considering low-intensity light in the visible part of the spectrum as a perspective growth and biosynthetic activity regulator of *I. obliquus* in the biotechnology of its cultivation.

Key words: *Inonotus obliquus*, melanin, photobiological effect, laser light, incoherent light.

УДК 635.076:57.043

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ВИДОМ И СОРТОМ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР И РЕЗУЛЬТАТАМИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ ЧЕРЕНКОВ

Л. В. Горбунов¹
И. В. Петров²

¹Институт животноводства НААН, Харьков
²НИИ биологии Харьковского национального университета
им. В. Н. Каразина

E-mail: ilya_cryo@mail.ru

Получено 17.04.2012

Определены оптимальные параметры криоконсервирования черенков ягодных культур: черной смородины (сорта: Дачница, Ювильей, Софиевская, Китайская); красной смородины (Китаевская, Джокер, Святкова), крыжовника (Красень, Малахит, Колобок), малины (Новость Кузмина, Струйка, Скромница), что позволило увеличить жизнеспособность деконсервированных образцов в 2–5 раз по сравнению с существующими способами криоконсервирования. Получены максимальные показатели жизнеспособности черенков исследуемых сортов в результате их температурной адаптации (при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 14–60 сут, ступенчатого охлаждения образцов со скоростью $0,1\text{--}0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$ до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (выдержка 3–7 сут), последующего прямого погружения в жидкий азот, хранения в течение 1–30 сут, отогрева со скоростью $70\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Установлено, что в области допустимых значений параметров, обеспечивающих максимальную жизнеспособность исследуемых черенков березы (контроль) влажность соответствует $32\div 40\%$, для черной смородины — $40\div 50\%$, для малины — $37\div 40\%$ в положительном диапазоне температур и $14\div 28\%$, $30\div 40\%$, $20\div 23\%$ — в отрицательном.

При помощи дисперсионного анализа показано, что вероятность развития деконсервированных черенков растений в значительной степени зависит от сорта и способа криоконсервирования. Отмечено, что сила влияния η^2_{A} , обусловленная индивидуальными свойствами исследуемых сортов ягодных культур, сопоставима с силой влияния η^2_{B} процедуры криоконсервирования.

Показаны отличия средних показателей жизнеспособности исследуемых сортов в пределах одного вида. Установлено, что эти показатели отличались: для черной смородины на 92%, красной — 54%, крыжовника — 48%, малины — 70%. Применение парного критерия Стьюдента позволило в среднем уменьшить в 3 раза ошибку репрезентативности выборки, что дало возможность повысить надежность результатов достоверности различия сравниваемых значений до уровня $P \geq 0,99$.

Выбор сорта черенков, а также способа криоконсервирования существенно влияет на воспроизводимость результатов эксперимента. Анализ воспроизводимости показателей жизнеспособности исследуемых черенков, проведенный при помощи коэффициента вариации C_v , показал, что в процессе криоконсервирования эта величина изменяется: для сортов черной смородины — от 5 до 91%, красной — 9–137%, крыжовника — 22–74%, малины — 18–105%.

Ключевые слова: черенки черной и красной смородины, крыжовника, малины, жизнеспособность, криоконсервирование.

Одной из проблем современной биотехнологии является сохранение необходимых генотипов растительного материала [1]. Наиболее перспективный способ сохранения генетического разнообразия растительного мира — применение методов криоконсервирования. Однако высокие коэффициенты вариации жизнеспособности деконсервированных черенков являются основной причиной низкой воспроизводимости результатов криобиотехнологического эксперимента. Поэтому для получения достоверных результатов необходимо неоднократное

повторение опытов, для которых требуется большое количество биологического материала [2]. Для снижения количества опытов при проведении многофакторного исследования следует повысить воспроизводимость результатов эксперимента, которая, в свою очередь, зависит от индивидуальных особенностей биообъекта и эффективности выбранного способа криоконсервирования.

Повышение воспроизводимости результатов сохранности черенков растений связано с необходимостью исследования их свойств, обусловленных видом и сортом.

Поэтому для сохранения генофонда растительных клеток нужно изучить воспроизводимость результатов криоконсервирования черенков различных сортов и определить оптимальные значения варьируемых параметров, обеспечивающие максимальную сохранность деконсервированных образцов.

Цель работы — исследовать влияние вида (черная и красная смородина, крыжовник, малина) и сорта ягодных культур на жизнеспособность их черенков после криоконсервирования.

Объектом исследования были черенки: черной смородины (*Ribes nigrum* L.) — сорта: Дачница, Ювелей, Софиевская, Китайская; красной смородины (*Ribes rubrum*) — Китаевская, Джокер, Святкова; крыжовника (*Ribes uva-crispa*) — Красень, Малахит, Колобок; малины (*Rubus idaeus* L.) — Новость Кузмина, Струйка, Скромница.

Черенки нарезали из однолетних побегов и делили на отдельные образцы (по 10 штук в каждом), длиной 5–12 см, диаметром 0,5–1,2 см. Черенки имели 2–5 вегетативных почек. Перед проведением исследования определяли начальную влажность и жизнеспособность образцов. Для исследования отбирали образцы с жизнеспособностью 100%.

Жизнеспособность черенков контролировали после каждого этапа высушивания и охлаждения. Для гидратации черенки помещали в эксикатор, размещая их над дистиллированной водой, и выдерживали 14 дней при температуре 5 °С, а затем культивировали в условиях *in vitro* в воде при 20 °С и *in vivo* (укоренение черенков в грунте). Набухание и развитие почек указывало на жизнеспособность исследуемых образцов. Процент жизнеспособности оценивали как отношение количества черенков с распустившимися почками в условиях *in vitro* или *in vivo* к общему их количеству.

Степень влажности для нативных черенков понижали с 50 до 20%, при температуре -2 ± 2 °С и влажности воздуха $85 \pm 5\%$ [4]. Влажность образцов h (%) определяли взвешиванием и рассчитывали по формуле:

$$h = [(m_0 - m_k) / m_0] \cdot 100\%,$$

где m_0 — начальная масса нативного образца, г;

m_k — конечная масса образца после обезвоживания до постоянной массы, г.

Разные скорости замораживания-отогрева, необходимые для криоконсервирования черенков, получали с помощью следующих способов.

Для осуществления режима охлаждения № 1 до температуры -20 и -30 °С, использовали скорости 0,5–1 °С/ч.

Режим № 2 основан на ступенчатом охлаждении со скоростью 0,01–0,1 °С/ч до -30 °С с интервалом 5 °С и выдержкой 1, 3 и 7 сут соответственно. Образцы помещали в бытовые термосы емкостью 1,5 и 2 л и переносили в рефрижераторы. Образцы, охлажденные до температуры -20 и -30 °С, погружали в жидкий азот со скоростью 600–800 °С/мин.

Хранили образцы в рефрижераторах при температурах -5 , -20 и -30 °С, а также в жидком азоте с выдержкой от одних суток до одного года. Оттаивание образцов проводили посредством их выдерживания при температуре воздуха 20 °С, что давало возможность получить скорость оттаивания 70 °С/мин, или со скоростью 1–3 °С/мин, помещая бытовой термос с образцами в холодильник при температуре 5 °С.

Для определения оптимальных значений варьируемых параметров изменяли скорости: дегидратации в процессе сушки — от 0,1 до 1% /сут; охлаждения — от 0,01 до 1 °С/ч; отогрева — 0,1 °С/ч и 70 °С/мин. Выдержка при температурах 5, -5 , -10 , -20 и -30 °С составляла от одних суток до одного года. Оптимизацию технологических параметров для каждого сорта ягодных культур проводили поэтапно после температурной адаптации -10 °С; охлаждения до -30 °С и -196 °С.

Статистический анализ полученных результатов осуществляли по общепринятым формулам качественного и количественного анализа [2]. Средние величины вычисляли для показателя жизнеспособности биообъекта после криоконсервирования [5]. Воспроизводимость результатов криоконсервирования определяли при помощи коэффициента вариации C_v как отношение среднеквадратического отклонения σ к средней величине M ($C_v = \sigma/M$). Повышение воспроизводимости оценивали как отношение коэффициентов вариации для предлагаемого способа и общепринятого.

Сравнительный анализ методов статистической обработки результатов деконсервированного объекта осуществляли в контрольной и опытной группах. Парный критерий Стьюдента t_{Δ} применяли для оценки средней разности между выборками с парносопряженными параметрами, а непарный t_d — с несвязанными [2].

Для определения доли влияния дисперсии исследуемого параметра применяли

показатель, определяющий силу влияния исследуемого фактора η_i : $\eta_i = \sigma_i^2 / \sigma_y^2$, $\sigma_y^2 = \Sigma \sigma_i^2$, где: σ_i^2 — дисперсии биологического, технологического и их совместного действия (биотехнологические факторы); σ_y^2 — общая дисперсия [3].

Для реализации режима охлаждения № 1 предложено термостатирующее устройство (рис. 1), скорость охлаждения в котором регулировали, изменяя напряжение от 0 до 25 В и сопротивление нагревательного элемента 30 и 70 Ом. Устройство помещали в морозильный ларь.

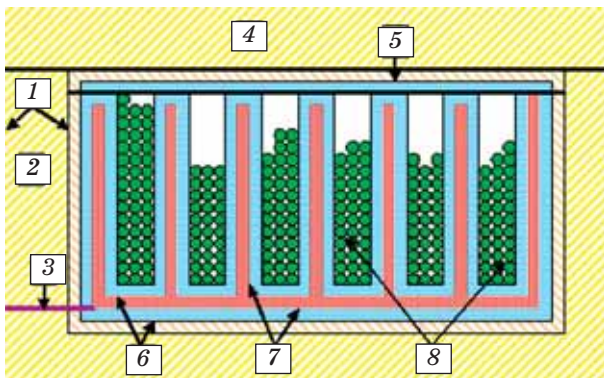


Рис. 1. Схема устройства, предназначенного для замораживания черенков плодово-ягодных культур:

- 1 — корпус устройства, изготовленный из пластика;
- 2 — пенопластовая термоизолирующая прослойка;
- 3 — электрический провод;
- 4 — внешняя крышка устройства;
- 5 — внутренняя крышка устройства;
- 6 — термостатирующий экран, изготовленный из нержавеющей стали толщиной 0,7 мм;
- 7 — вольфрамовая нить накала диаметром 1 мм в тефлоновой оболочке;
- 8 — черенки плодово-ягодных культур

Черенки черной смородины сохраняют 100% -ю жизнеспособность в результате применения различных режимов сушки, ступенчатого охлаждения со скоростью 0,1 °С/ч до -30 °С, погружения в жидкий азот, длительного хранения и последующего оттаивания со скоростью 70 °С/мин при условии, что уровень влажности образцов в диапазоне положительных температур превышает 37% (рис. 2, а), а в диапазоне отрицательных (-30...-196 °С) — 30%.

Для деконсервированных черенков малины максимальная жизнеспособность составила 88% при влажности образцов 23% (рис. 2, б). Влажность образцов при этом должна быть не ниже 20%. Превышение указанных значений влажности приводит к снижению жизнеспособности вследствие роста внутриклеточных кристаллов.

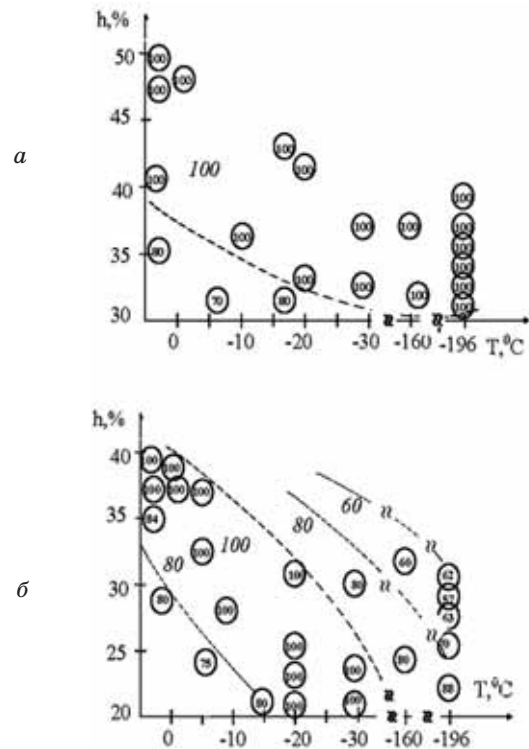


Рис. 2. Жизнеспособность черенков в зависимости от их влажности (h, %) и температуры (Т, °С): скорость охлаждения 0,1 °С/ч, отогрева 70 °С/мин. Номер, очерченный кругом, отражает показатель жизнеспособности черенков (*in vitro*), пунктирной линией обозначен контур, ограничивающий одинаковые величины (а — черенки черной смородины Дачница, б — черенки малины Новость Кузмина)

В контроле для черенков березы показатели критической влажности составили 32 и 14%, соответственно. Ниже установленных значений жизнеспособность исследуемых образцов резко снижалась вследствие чрезмерного обезвоживания клеток (эффект плазмолиза) [6]. Показатель сохранности при этом остается на 100% -м уровне.

Таким образом, различные виды растений имеют разные области допустимых значений влажности и температуры охлаждения черенков. Определение оптимальных параметров криоконсервирования черенков черной смородины и малины дало возможность увеличить жизнеспособность деконсервированных образцов в 2–5 раз по сравнению с существующими способами криоконсервирования [6–11].

Максимальные показатели жизнеспособности образцов (рис. 3) исследуемых сортов получены в результате их температурной адаптации (при -10 °С) в течение 14–60 суток, ступенчатого охлаждения со скоростью 0,1–0,5 °С/ч до -30 °С (выдержка 3–7 суток),

последующего прямого погружения в жидкий азот, хранения в течение 1–30 суток, отогрева со скоростью 70 °С/мин.

Длительность выдержки исследуемых образцов при температуре –10 °С определяли по показателю влажности (рис. 4) в соответствии с величиной, установленной для каждого вида черенков [4].

Анализ проб, состоящих из 5 образцов, полученных на разных этапах криоконсервирования, проводили при помощи парного и непарного критерия Стьюдента.

В пределах одного вида средние показатели жизнеспособности для разных сортов отличались: для черной смородины — на 92%, красной — 54%, крыжовника — 48%,



Рис. 3. Культивирование черенков ягодных культур *in vitro*

Жизнеспособность черенков различных сортов ягодных культур на различных этапах криоконсервирования

Вид	Сорт	Жизнеспособность V (%) и изменение жизнеспособности ΔV (%) черенков после охлаждения до температуры					
		–10 °С		–30 °С		–196 °С	
		ΔV±m	V±m	ΔV±m	V±m	ΔV±m	V±m
Черная смородина	Дачница	2,0±2 ^a	98,0±2 ^a	4,0 ±2,4 ^a	94,0 ±4 ^a	2,0±2,0 ^a	92,0±5,8 ^a
	Ювильей	20,0±7,1 ^b	80,0±7,1 ^b	16,0±2,4 ^b	62,0±8,6 ^b	12,0±3,7 ^b	54,0±13,6 ^b
	Софиевка	6,0±4	94,0±4	34,0±10,8 ^b	60,0±14,1 ^b	54,0±12,1 ^c	6,0±2 ^c
	Китайская	14,0±4	86,0±4	74,0±2,4 ^c	12,0±3,7 ^c	12,0±3,7 ^d	0,0±0 ^d
Красная смородина	Китаевская	8,0±3,7 ^a	92,0±3,7 ^a	8,0±3,7 ^a	84,0±6,8 ^a	30,0±4,5 ^a	54,0±7,5 ^a
	Джокер	32,0±3,7 ^b	68,0±3,7 ^b	62,0±2,0 ^b	6,0±2,4 ^b	2,0±2,0 ^b	4,0±2,4 ^b
	Святкова	34,0±4,0	66,0±4,0	66,0±4,0	0,0±0 ^c	0,0±0	0,0±0
Крыжовник	Красень	16,0±8,1	84,0±8,1	14,0±2,4	70,0±7,1	20,0±8,9	30,0±9,1
	Малахит	18,0±8,0 ^a	82,0±8,0 ^a	14,0±2,4 ^a	68,0±7,3 ^a	20,0±8,9	48,0±15,9 ^a
	Колобок	60,0 ±3,2 ^b	40,0 ±3,2 ^b	32,0±2,0 ^b	6,0±2,4 ^b	8,0±3,7	0,0±0 ^b
Малина	Нов. Кузьмина	4,0±2,4	96,0±2,4	14,0±6,0	82,0±8,0	12,0±2,0 ^a	70,0±7,1 ^a
	Струйка	6,0±2,4 ^a	94,0±2,4 ^a	36,0±10,8 ^a	58,0±12,8 ^a	58,0±12,8 ^b	0,0±0 ^b
	Скромница	32,0±3,7 ^b	68,0±3,7 ^b	64,0±2,4 ^b	4,0±2,4 ^b	4,0±2,4 ^c	0,0±0

Примечание: *m* — ошибка среднеквадратичного отклонения; *n* ≥ 50 — количество черенков в каждой пробе; индексами а, б, с, d обозначены значения, имеющие достоверность различия *P* ≥ 0,95, в пределах каждого столбца и вида растения.



Рис. 4. Взвешивание и сушка образцов

малины — на 70% (таблица). При использовании непарного критерия Стьюдента достоверность различия анализируемых сортов составила для 4 групп черной смородины, 3 групп красной смородины, 2 групп крыжовника, малины с уровнем достоверности $P \geq 0,95$. С применением парного критерия Стьюдента для анализа показателя, усредняющего изменение жизнеспособности ΔV между группами черенков после охлаждения до -30°C и -196°C , ошибка репрезентативности выборки в среднем уменьшилась в 3 раза, что дало возможность повысить достоверность сравниваемых значений до уровня $P \geq 0,99$. Исключением являются данные, полученные для значений жизнеспособности черенков ниже 10%.

Для оценки вариации жизнеспособности деконсервированных черенков разного сорта проведен двухфакторный дисперсионный анализ [2] на основе применения средней величины V и ее разности ΔV . Установлено, что усредненная жизнеспособность деконсервированных черенков красной смородины, крыжовника, малины зависит от выбранного сорта и этапа криоконсервирования. Сила влияния η^2_A (отношение выделенной дисперсии к общей) [3], обусловленная индивидуальными свойствами биообъекта (сортом), составила 0,30, 0,32 и 0,32, что дало значения, сопоставимые с технологическим фактором (процедура криоконсервирования)

η^2_B — 0,43, 0,36 и 0,39 соответственно. Совместное воздействие указанных факторов определило силу влияния η^2_{AB} — 0,23, 0,18 и 0,22, а неучтенных факторов η^2_z — 0,03, 0,14 и 0,06 соответственно.

Установлено, что жизнеспособность черенков черной смородины зависит только от способа криоконсервирования. Сила влияния η^2_A , обусловленная индивидуальными свойствами биообъекта (сортом), составила для черенков 0,09 при уровне достоверности полученных результатов $P \geq 0,95$. Процедура криоконсервирования обладает силой влияния $\eta^2_B = 0,65$. Совместное воздействие биологического и технологического факторов определило силу влияния $\eta^2_{AB} = 0,14$, а неучтенных факторов $\eta^2_z = 0,11$.

Проведение однофакторного анализа на основе критерия Стьюдента дало возможность установить достоверность различия жизнеспособности деконсервированных черенков в зависимости от их сорта, в то время как двухфакторный дисперсионный анализ позволил установить влияние процедуры криоконсервирования и индивидуальных свойств биообъекта.

При переходе к показателям разности средних ΔV сила совместного влияния биологического и технологического факторов η^2_{AB} значительно возрастает: для черенков черной смородины — до 0,40; красной смородины — 0,42; крыжовника — 0,35;

малины — 0,38. При этом сила влияния биологического фактора η^2_A составила — 0,11; 0,15; 0,16; 0,16, а технологического η^2_B — 0,27; 0,36; 0,27; 0,25 соответственно при $P \geq 0,95$. Следовательно, при переходе к показателям разности средних ΔV оценки жизнеспособности черенков черной и красной смородины, крыжовника, малины совместное влияние биологических и физических параметров увеличивает силу влияния в несколько раз.

Анализ воспроизводимости показателей жизнеспособности исследуемых черенков, проведенный при помощи коэффициента вариации C_v , показал, что в процессе криоконсервирования с первого до третьего этапов эта величина изменяется: для сортов черной смородины — от 5 до 91%, красной — 9–137%, крыжовника — 22–74%, малины — 18–105%. Очевидно, различие жизнеспособности черенков разного сорта связано с ростом внутриклеточных кристаллов и зависит от концентрации сахаров в цитоплазме клетки. Однако это явление нуждается в дополнительном исследовании.

Таким образом, для различных видов растений установлены разные области допустимых значений влажности и температуры охлаждения черенков. Определены оптимальные параметры криоконсервирования черенков черной смородины, малины и кры-

жовника, предложен способ замораживания, который дал возможность увеличить жизнеспособность деконсервированных образцов в 2–5 раз по сравнению с существующими способами криоконсервирования.

Вероятность развития деконсервированных черенков растений в значительной степени зависит от его сортотипа, способа криоконсервирования и культивирования. Выбор сорта черенков, а также способа криоконсервирования существенно влияют на воспроизводимость результатов эксперимента.

Установлено видовое отличие между результатами криоконсервирования черенков черной и красной смородины, крыжовника и малины. В пределах одного вида средние показатели для разных сортов деконсервированных черенков черной смородины изменялись до 92%, красной — 54%, крыжовника — 48%, малины — 70%.

Для черенков красной смородины, крыжовника и малины сила совместного воздействия биологического и технологического факторов оказывает значительное влияние на жизнеспособность деконсервированного объекта.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории сохранения НИЦГРУ Института растениеводства им. В. Я. Юрьева за помощь в выполнении данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградова Ю. К., Горбунов Ю. Н., Макридин А. И. и др. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов / *Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами*. — М., 2005. — С. 343–351.
2. Лакин Б. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 254 с.
3. Плохинский Н.А. Биометрия. — М.: Изд-во МГУ, 1961. — 362 с.
4. Горбунов Л. В., Шиянова Т. П., Рябчун В. К. Оптимізація умов дегідратації живців плодово-ягідних культур // *Генет. ресурси росл.* — 2008. — № 5. — С. 182–187.
5. Горбунов Л. В. Воспроизводимость результатов криоконсервирования черенков различных сортов семечковых плодовых деревьев // *Пробл. криобиол.* — 2009. — № 4. — С. 473–480.
6. Туманов И. И., Красавцев О. А., Хвалин Н. Н. Повышение морозостойкости березы и черной смородины до -253 °С путем закаливания // *Докл. АН СССР*. — 1959. — Т. 127. — С. 1301.
7. Sakai A. Survival of the twig of woody plants at -196 °C // *Nature*. — 1960. — V. 185. — P. 393.
8. Towill L. E., Philip L. Forsline Cryopreservation of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) using a dormant vegetative bud method // *Cryoletters*. — 1999. — V. 20. — P. 215–225.
9. Y. L. Wang, X., Liu L. Analysis of genetic variation in surviving apple shoots following cryopreservation by vitrification // *Plant Sci.* — 2004. — V. 166. — P. 677–685.
10. Popov A. S., Popova E. V., Nikishina T., Vysotskaya O. N. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences // *Int. J. Refr.* — 2006. — V. 29. — P. 403–410.
11. Вержук В. Г., Филиппенко Г. И., Тихонова Н. Г., Жестков А. С. Способы криосохранения генеплазмы плодовых культур на примере смородины, жимолости и крыжовника // *Биофиз. живой клетки*. — 2008. — Т. 9. — С. 35–36.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ВИДОМ І СОРТОМ ЯГІДНИХ КУЛЬТУР ТА РЕЗУЛЬТАТАМИ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ЖИВЦІВ

Л. В. Горбунов¹, І. В. Петров²

¹Інститут тваринництва НААН, Харків
²НДІ біології Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна

E-mail: ilya_cryo@mail.ru

Визначено оптимальні параметри кріоконсервування живців ягідних культур: чорної смородини (сорт: Дачниця, Ювілей, Софіївська, Китайська); червоної смородини (Китаївська, Джокер, Святкова); агрусу (Красень, Малахіт, Колобок); малини (Новость Кузміна, Струйка, Скромниця), що дало змогу збільшити життєздатність деконсервованих зразків у 2–5 разів порівняно з існуючими способами кріоконсервування. Одержано максимальні показники життєздатності живців після температурної адаптації при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 14–60 діб, ступінчастого охолодження зразків зі швидкістю $0,1\text{--}0,5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{год}$ до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ з витримкою 3–7 діб, за наступного прямого занурення в рідкий азот, зберігання строком від 1 до 30 діб і відігрівання зі швидкістю $70\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$. Встановлено, що в діапазоні допустимих значень параметрів, що забезпечують максимальну життєздатність досліджуваних живців берези (контроль), значення вологості відповідають $32\pm 40\%$, для чорної смородини — $40\pm 50\%$, малини $37\pm 40\%$ у позитивному діапазоні температур і $14\pm 28\%$, $30\pm 40\%$, $20\pm 23\%$ — у негативному.

За допомогою дисперсійного аналізу показано, що вірогідність розвитку деконсервованих живців рослин значною мірою залежить від сорту і способу кріоконсервування. Відзначено, що сила впливу η^2_A , зумовлена індивідуальними властивостями досліджуваних сортів ягідних культур, є порівнянною із силою впливу η^2_B процедури кріоконсервування.

Показано відмінності середніх показників життєздатності досліджуваних сортів у межах одного виду. Встановлено, що ці показники відрізнялися: для чорної смородини — на 92%, червоної — 54%, агрусу — 48%, малини — 70%. Використання парного критерію Стьюдента дало змогу в середньому зменшити в 3 рази помилку репрезентативності вибірки, що уможливило підвищення надійності результатів достовірності відмінностей порівнюваних значень до рівня $P \geq 0,99$.

Вибір сорту живців, а також способу кріоконсервування істотно впливає на відтворюваність результатів експерименту. Аналіз відтворюваності показників життєздатності досліджуваних живців, проведений за допомогою коефіцієнта варіації C_v , показав, що в процесі кріоконсервування ця величина змінюється: для сортів чорної смородини — від 5 до 91%, червоної — 9–137%, агрусу — 22–74%, малини — 18–105%.

Ключові слова: живці чорної та червоної смородини, агрусу, малини, життєздатність, кріоконсервування.

INTERRELATION BETWEEN TYPE AND CULTIVAR OF BERRY-LIKE CROP AND CUTTINGS CRYOPRESERVATION RESULTS

L. V. Gorbunov¹, I. V. Petrov²

¹Institute of Animal Breeding of National Academy of Agricultural Sciences, Kharkiv

²Research Institute of Biology Karazin Kharkiv National University

E-mail: ilya_cryo@mail.ru

Optimal cryopreservation parameters were determined for the berry-like crop cuttings: blackcurrant (Dachnica, Yuviley, Sofiiivska, Kitayskaya); redcurrant (Kitaivska, Djoker, Svyatkova); gooseberries (Krasen, Malachite, Kolobok); raspberries (Novost' Kuz'mina, Struyka, Skromnica). This procedure allowed increasing viability of deconservation samples in 2–5 times compared to the existing methods of cryopreservation. Maximal values of cutting viability were obtained after their temperature adaptation at $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 14–60 days, stepwise cooling of the samples with $0.1\text{--}0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ rate down to $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (exposure 3–7 days), direct plunging into liquid nitrogen, storage from 1 to 30 days and thawing rate of $70\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. It was found that the in the region of allowable values for maximum viability of investigated birch (control) cuttings humidity values correspond $32\pm 40\%$, for blackcurrant are $40\pm 50\%$, and raspberries $37\pm 40\%$ in affirmative temperature span and $14\pm 28\%$, $30\pm 40\%$, $20\pm 23\%$ in below zero.

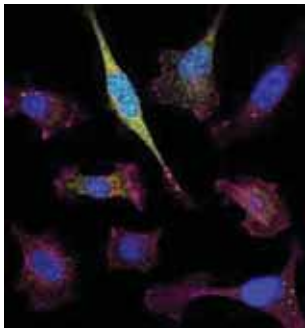
Using dispersion analysis it has been established that the development probability of frozen-thawed plant cuttings significantly depends on the selected cultivar and cryopreservation method. It is noted that the force of influence η^2_A , due to the individual properties of the studied cultivars of berries, is comparable to that of the force of influence η^2_B of cryopreservation procedures.

The differences of average indexes of viability of the studied cultivars were showed within a single species. It was found that these rates are different for black currant by 92%, redcurrant — 54%, gooseberries — 48%, raspberries — 70%. Using paired Student's t-test has reduced to 3 times the error of representativeness of the sample that enabled to improve the reliability of the significance of differences compared to the values of the $P \geq 0,99$. Selection of the cuttings' cultivars and cryopreservation method significantly affect the reproducibility of experimental results. The analysis of reproducibility of indexes of viability of the studied cuttings held by the coefficient of variation, showed that during the cryopreservation this value is changed to blackcurrant cultivars from 5 to 91%, redcurrant — 9–137%, gooseberries 22–74%, raspberry 18–105%.

Key words: cuttings black and red currants, gooseberries, raspberries, viability, cryopreservation.

Створено хрящову тканину із плюрипотентних стовбурових клітин

Група вчених Медичного дослідницького центру Дьюка (Duke Medicine) виростила хрящову тканину з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин, яку можна було використовувати як для усунення дефектів хряща, так і для вивчення остеоартриту. Результати роботи, що їх опубліковано в онлайнній версії журналу *Proceedings of the National Academy of Sciences*, дають підстави припустити, що індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, або iPSCs, можуть бути джерелом для вирощування суглобових хрящів із власних тканин пацієнта.



Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини миші після хондрогенезу.

На додаток до колагену 2-го типу (червоний), F-актину (пурпурний) і ядра (синій) після диференціювання клітини експресують зелений флуоресцентний протеїн під контролем специфічного промотора хондроцитів. Учені використовували сортування клітин з метою одержання тканинно-інженерного хряща для потенційного використання в лікуванні дефектів хряща та розроблення нових препаратів для лікування остеоартриту (фото: Brian Diekman and Johannah Sanchez-Adams)

Як пояснив керівник дослідження Фаршід Гілак (Farshid Guilak), професор ортопедичної хірургії Університету Дьюка, метод одержання індукованих плюрипотентних стовбурових клітин — досягнення, за яке в 2012 р. удостоєний Нобелівської премії Шинья Яманака з Кіотського університету, — передбачає таке перетворення дорослих стовбурових клітин, унаслідок якого вони набувають властивостей ембріональних стовбурових клітин.

Дорослі стовбурові клітини обмежені в своїх можливостях, а використання ембріональних стовбурових клітин пов'язано з етичними питаннями. Проведене на моде-

лі мишей дослідження показало, що є можливість створювати необмежену кількість стовбурових клітин, які можна перетворити на будь-який тип тканини, у даному разі — хрящ, що не здатен регенерувати.

Суглобовий хрящ виконує роль амортизатора суглобів, який дає змогу ходити, підніматися сходами, стрибати і займатися повсякденною роботою, не відчуваючи болю. Але звичайне виснажування або травми знижують його ефективність і призводять до розвитку остеоартриту. Внаслідок того, що суглобовий хрящ має слабкий потенціал для відновлення, ушкодження і остеоартрит є основними причинами захворювань суглобів у людей літнього віку, за яких часто єдиною можливістю відновлення функції суглоба є його заміна.

Група дослідників під керівництвом Брайана Дікмана (Brian Diekman) розробила новітні технології, в результаті застосування яких iPSCs стали перспективною альтернативою іншим методам тканинної інженерії, що ґрунтуються на перетворенні дорослих стовбурових клітин, одержаних з кісткового мозку або жирової тканини.

Однією з проблем, що постали перед дослідниками, було отримання однаково диференційованої популяції хондроцитів — клітин, які утворюють колаген для підтримання хрящів та відсікання інших типів клітин, і здатні утворювати повнофункціональні iPSCs.

Для цього дослідники індукували диференціацію хондроцитів в iPSCs, одержаних від дорослих фібробластів миші, обробляючи клітини культуральним середовищем. Крім того, їм вдалося змусити ці клітини експресувати зелений флуоресцентний протеїн тільки тоді, коли клітини успішно диференціювались у хондроцити. Як тільки iPSCs стали диференціюватися, хондроцити клітин, що світилися під впливом зеленого флуоресцентного протеїну, можна було легко ідентифікувати і відсортувати від небажаних клітин. Отримані хондроцити виробляли велику кількість компонентів хряща, у тому числі колагену, і виявляли характерну для натуральної хрящової тканини жорсткість. А це означає, що вони добре виконуватимуть завдання щодо виправлення дефектів хряща в організмі.

За словами доктора Дікмана, було використано багатоступінчастий підхід із почат-

ковою диференціацією, з подальшим сортуванням та переходом до створення тканини. Таким чином доведено можливість використання iPSCs для одержання високоякісного хряща, придатного як для заміни тканин, так і для вивчення захворювань і можливих методів їх лікування.

На наступному етапі дослідження вчені планують використовувати iPSCs людини для перевірки можливості вирощування хряща. Як зазначив професор Гілак, перевагою цього методу є те, що тепер з'явилася можливість безперервно отримувати хрящ *in vitro*. На додаток до клітинної терапії iPSC-технологія уможливіє створення клітинних і тканинних моделей, які можуть бути використані для скринінгу лікарських препаратів, призначених для лікування остеоартриту. На цей час не існує ефективних терапевтичних методів, здатних зберегти і вилікувати хрящ.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/10/121029154322.htm>

Ключ до розуміння контролю за масою тіла мозком



Підтримання нормальної маси тіла для багатьох людей є проблемою, однак позитивним є те, що наш мозок і тіло працюють спільно для досягнення такого явища, як енергетичний баланс, — відповідності між кількістю споживаних і витрачених калорій. Цей баланс є результатом роботи складного нейробіологічного механізму всередині гіпоталамуса головного мозку, і в разі його порушення можуть виникати процеси ожиріння або анорексія.

Незважаючи на серйозність проблеми, сутність і деталі цього складного явища вивчено недостатньо добре. Робота, виконана під керівництвом дослідників з Медичного центру Beth Israel Deaconess (Beth Israel Deaconess Medical Center, BIDMC, США), допомогла по-новому поглянути на механізм цього процесу і розібратися в ньому. Результати досліджень, що їх опубліковано в журналі *Cell*, демонструють, як нейромедіатор ГАМК (гамма-аміномасляна кислота)

вибірково управляє витратою енергії в організмі, а головне, допомагають пояснити нейроосхеми, що лежать в основі жироспалювальних властивостей коричневого жиру.

Бредфорд Лоуелл (Bradford Lowell), професор медицини Відділення ендокринології BIDMC і Гарвардської медичної школи (Harvard Medical School), повідомив, що їхня група розробила програму досліджень для розшифрування механізмів, за допомогою яких мозок контролює апетит і забезпечує спалювання калорій. Для того, аби зрозуміти цей механізм, потрібно знати функцію спеціалізованих підмножин нейронів і, крім того, нейронів, що містяться ієрархічно вище і задіяні в передачі сигналів, та нейронів, що розташовані ієрархічно нижче і беруть участь у сприйманні сигналів, функціонально визначених нейронами. Донедавна така інформація про гіпоталамус була практично недоступною.

Гіпоталамус — це відділ головного мозку розміром із зернятко, що управляє безліччю важливих функцій в організмі і є центром головного мозку з контролю над енергетичним балансом. Цей баланс встановлюється, коли мозок отримує від організму сигнали про рівень запасу енергії, а потім об'єднує їх із надходженням енергії з довкілля на зразок того, як емоційний стан людини впливає на харчовий раціон і витрати енергії.

У новій роботі вчені досліджували унікальну популяцію нейронів, які локалізуються в основі головного мозку в дугоподібному ядрі гіпоталамуса. Як пояснив Лоуелл, було створено генетично модифіковані миші з конкретним дефектом, який пригнічував вихід цих нейронів з-під контролю інгібіторного нейромедіатора ГАМК. У мишей із цим дефектом розвивалося помітне ожиріння, що було зумовлено порушенням процесу спалювання калорій, тимчасом як харчовий раціон у цих тварин зовсім не змінювався.

В іншій групі піддослідних мишей, у яких ці нейрони могли вибірково включатися в різний час, дугоподібні нейрони діяли через серію нейронів, розташованих ієрархічно нижче, впливаючи на витрату енергії в коричневому жирі. Коричневий жир привернув увагу вчених лише нещодавно, коли дослідження показали, що, на відміну від запасів енергії білого жиру, бурий жир спалює енергію для вироблення тепла. Цей процес називається термогенезом.

Донг Конг (Dong Kong) з лабораторії Лоуела, перший автор цієї роботи, пояснив, що витрата енергії, регульована бурю жировою тканиною, має вирішальне значення для

підтримання маси тіла і запобігає аліментарному ожирінню. Однак цей регуляторний механізм, пов'язаний з головним мозком, вивчено недостатньо. Відкриття нейрональних ланцюгів гіпоталамуса, що контролюють термогенез, є важливим кроком уперед. Окрім того, дослідники виявили, що коли включалися ці нейрони, витрата енергії повністю залежала від виділення ГАМК. Результати дослідження показують, що вивільнення ГАМК із дугоподібних нейронів вибірково спрямовує витрату енергії. Конг констатував, що одержані їхньою групою результати істотно розширили уявлення вчених про механізм контролю над витратою енергії й дали змогу з'ясувати патогенез ожиріння.

Унікальні особливості дугоподібних нейронів мають велике значення, адже відкривається можливість експериментально змінювати контроль витрати енергії головним мозком. Зокрема, нейрони, які отримують ГАМК-опосередковані сигнали від дугоподібних нейронів, імовірно, відіграють важливу роль саме в регулюванні витрати енергії, але не приймання їжі.

Лоуелл наголосив, що зараз важливо мати чітке розуміння функції нейронів, які містяться ієрархічно вище і контролюють дугоподібні нейрони, що відповідають за термогенез, а також розташованих нижче нейронів, які завершують «ланцюг» на бурій жировій тканині. Він і його колеги виявили низку специфічних типів нейронів, які містяться нижче дугоподібних нейронів. Однак для повного уявлення про функціонування цього механізму потрібні додаткові дослідження. Така робота може відкрити нові перспективи для фармакологічних розробок, які уможливають ефективне лікування ожиріння і пов'язаних з ним ускладнень, зокрема цукрового діабету.

Оригінальна стаття:

Dong Kong, Qingchun Tong, Chianping Ye, Shuichi Koda, Patrick M. Fuller, Michael J. Krashes, Linh Vong, Russell S. Ray, David P. Olson, Bradford B. Lowell. GABAergic RIP-Cre Neurons in the Arcuate Nucleus Selectively Regulate Energy Expenditure. Cell, 2012; 151 (3): 645 DOI: 10.1016/j.cell.2012.09.020

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/10/121026153740.htm>

Ученим вдалося отримати пейсмейкер з кардіоміоцитів



Кардіомонітор

Дослідники з Інституту вивчення серця «Седарс-Синаї» (Cedars-Sinai Heart Institute) змогли перепрограмувати кардіоміоцити таким чином, що вони стали працювати як клітини-водії ритму (пейсмейкери). Цього вдалося досягти вбудовуванням в них гена *Tbx18*. Результати проведеної наукової роботи, сумарна тривалість якої становила 10 років, — суттєвий крок уперед на шляху до створення засобів відновлення ритму роботи серця.

Хі Чол Чо (Hee Cheol Cho), співробітник зазначеного інституту, вважає, що хоча раніше вже створювали примітивні біологічні пейсмейкери, проведене дослідження вперше доводить, що використання одного гена може ініціювати перетворення м'язових клітин серця на пейсмейкерні. Одержані пейсмейкери генерували електричні імпульси спонтанно і не відрізнялися від природних пейсмейкерів серця.

Пейсмейкери генерують електричні імпульси, які поширюються серцем строго певним чином — так, щоб м'язові волокна серця скорочувалися в певному ритмі. Якщо пейсмейкери перестають функціонувати правильно, то серце в кращому випадку починає скорочуватись аритмічно; пацієнти, які достатньою мірою здорові для оперативного втручання, сподіваються на вживлення електронного кардіостимулятора. Наразі лише цей пристрій може замінити клітини пейсмейкера, що вийшов з ладу.

Генератором нервових імпульсів, унаслідок поширення яких відбувається скорочення серця, є синусно-передсердний вузол. Він розташований у правому передсерді біля місця впадання верхньої порожнистої вени. У серці налічується близько 10 млрд. клітин. Із них щонайменше 10 тис. є пейсмейкерами. Часто водіїв ритму серця називають SAN-клітинами (SAN — від англ. Sinoatrial node — синусно-передсердний вузол). Після того як у кардіоміоцити було введено ген *Tbx18*, відбувалося формування пейсмейкерних клітин — індукованих пейсмейкерів, або iSAN-клітин. Вони мали всі харак-

теристики, притаманні природним пейсмейкерам. Навіть коли ефект гена Tbx18 зникав, iSAN-клітини зберігали особливості природних пейсмейкерів.

Як засіб уведення гена в клітини використовували спеціально сконструйовану для цієї мети вірусну частинку. Ген Tbx18 відіграє принципово важливу роль у розвитку пейсмейкера ембріонів. У ході проведення лабораторних випробувань *in vitro*, а також досліджень на морських свинках було показано формування з кардіоміоцитів пейсмейкера. При цьому кардіоміоцити брали на себе виконання нативних функцій пейсмейкера і набували їхніх характерних рис.

Зроблені раніше спроби створити пейсмейкерні клітини з кардіоміоцитів не мали успіху. Тоді синтезовані водії ритму більшою мірою нагадували м'язові клітини, ніж пейсмейкери. Для одержання пейсмейкера намагалися використовувати ембріональні стовбурові клітини. Однак цей підхід має обмежені можливості, оскільки підвищує ймовірність розвитку онкологічних захворювань.

Більш докладний опис результатів проведеного дослідження можна віднайти у виданні *Nature Biotechnology* від 8 січня.

Джерело:

[http://www.sciencedaily.com/
releases/2012/12/121216132509.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2012/12/121216132509.htm)

Генетичні механізми синтезу інсуліну: метод аналізу геному допомагає відслідковувати генетичну природу цукрового діабету

У дослідженні, результати якого опубліковано в онлайнній версії журналу *Nature Genetics*, вчені виявили три нові й відносно рідкісні генетичні варіанти, які впливають на синтез інсуліну. Таким чином одержано нові дані щодо генетичних причин розвитку цукрового діабету.

На думку Карена Мохлке (Karen Mohlke), одного з провідних авторів дослідження, ад'юнкт-професора зі Школи медицини при Університеті Північної Кароліни (University of North Carolina School of Medicine, США), вивчення генетичних поліморфізмів, навіть таких, що рідко трапляються, допомагає вченим встановити механізми, за якими гени впливають на стан здоров'я людини і розвиток захворювань. За його словами, результати нового дослідження допомогли з'ясувати значення поліморфізмів генів у процесингу та секреції молекул інсуліну.

Це дослідження, проведене з використанням екзомного генотипування, дало змогу розробити метод визначення генетичного поліморфізму, який є менш високовартісним порівняно з генетичним секвенуванням. Він дозволяє вченим швидко проводити скринінг зразків ДНК для конкретних генів і є особливо корисним для тестування видів поліморфізму, що рідко трапляються.

За допомогою цього методу було протестовано велику кількість людей — у даному разі понад 8 000. Учені очікують, що цей тип аналізу буде корисним для пошуку рідкісних видів, пов'язаних із безліччю складних ознак, у тому числі ожирінням або раком.

Учені використовували дані, які були отримано у великомасштабному дослідженні стану здоров'я населення, проведеному фахівцями з Університету Східної Фінляндії (University of Eastern Finland, Фінляндія). Дослідницька група під керівництвом Джероен Х'юг (Jeroen Huyghe) з Університету Мічигану в Енн Арбор (University of Michigan, США) виконала статистичну обробку результатів дослідження, за якої було інтегровано генетичні дані з історій хвороби 8 229 людей, що живуть у Фінляндії.

Діабет, від якого потерпають понад 25 млн. людей у Сполучених Штатах, є наслідком нездатності організму виробляти або використовувати інсулін. Учені вважають, що за цієї хвороби не слід зосереджувати увагу на одному гені, оскільки є низка генів, що впливають на стан здоров'я і спосіб життя, збільшуючи шанси людини зазнати захворювання.

Результати досліджень показали, що поліморфізми трьох генів — TBC1D30, KANK1 і PAM — пов'язані з порушенням синтезу або процесингу інсуліну в організмі людини, причому такий взаємозв'язок виявляється навіть у пацієнтів, які не були хворі на цукровий діабет. Зазначені гени можуть слугувати індикатором схильності людини до розвитку цукрового діабету.

На наступному етапі дослідження вчені планують вивчати далі питання, як саме ці гени можуть призвести до виникнення діабету. Вони також сподіваються, що отримані результати сприятимуть застосуванню іншими дослідниками екзомного аналізу для вивчення впливу генетичних чинників на інші тяжкі захворювання.

Джерело:

[http://www.sciencedaily.com/
releases/2012/12/121223152412.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2012/12/121223152412.htm)

Створено каталог шкідливих генетичних варіантів у здорових людей

Дослідники з Кембриджа і Кардіфа з'ясували, що в середньому нормальна здорова людина є носієм близько 400 потенційно небезпечних варіантів ДНК і двох варіантів, безпосередньо асоційованих із захворюваннями. Вони продемонстрували, що в результаті наявності таких генетичних варіантів у одного з 10 досліджуваних людей може розвинутися відповідне захворювання. Фахівцям давно відомо, що у всіх людей є певні ушкодження генетичних варіантів, які або зовсім не впливають на стан здоров'я, або справляють слабкий вплив. Однак дослідникам вдалось уперше визначити й кількісно оцінити такі варіанти у кожного з учасників експерименту. Загалом їх нараховано 400 й, імовірно, це число збільшуватиметься, оскільки зараз проводять генетичні дослідження, які дають змогу ефективніше виявляти рідкісні генетичні варіанти. Проте такі дослідження висувають на перший план етичні питання, що пов'язані з анонімними дослідженнями і випадковими висновками.

Упродовж понад півстоліття дослідники в галузі медичної генетики намагалися встановити величину шкоди, що її завдають небезпечні варіанти в геномі людини. Дослідження, що їх проводять під керівництвом д-ра Ялі Ксю (Yali Xue) з Інституту Сенджера (Wellcome Trust Sanger Institute), врешті-решт наблизили вчених до розуміння масштабів цих руйнівних мутацій. Автори вперше провели кількісне оцінювання вмісту потенційно небезпечних варіантів у геномі нормальних здорових людей шляхом порівняння двох баз даних. Вони зіставляли інформацію, що стосується повногеномних послідовностей ДНК у 179 осіб, які брали участь у пілотному проекті «1000 геномів» і з малим ступенем імовірності мали явні вияви генетичних захворювань на момент відбору проб для аналізу ДНК. Окрім того було використано інформацію з детального каталогу бази даних людини, асоційовану з хвороботворною мутацією гена людини (HGMD) з літературних джерел.

У багатьох випадках ушкоджені гени становили окремі «рецесивні» генетичні варіанти (алелі), які навряд чи могли завдати шкоди здоров'ю його носія. Рецесивний алель справлятиме свій вплив тільки за наявності двох варіантів — по одному в кожній хромосомі.

Однак, як виявилось, один із кожних 10 учасників дослідження зазнавав потенційного клінічного впливу генетичних варіантів. Це пов'язано з тим, що такі особи або

несуть дві копії конкретного рецесивного захворювання, або, альтернативно, домінантного генетичного варіанта. Домінуючі генетичні варіанти захворювання можуть спровокувати клінічний симптом за наявності в геномі навіть однієї копії.

За словами керівника дослідження професора Девіда Купера (David Cooper) з Університету Кардіфа (Cardiff University), було встановлено, що більшість людей мали потенційні хвороботворні мутації, генетичне захворювання, перебіг якого насправді дуже м'який або виявляється тільки в останні десятиліття життя. Тепер став очевидним той факт, що навіть в організмах нормальних здорових людей є безліч ушкоджених або навіть повністю інактивованих протеїнів, що не виявляють будь-якого помітного негативного впливу на їхнє здоров'я. Украв складно прогнозувати в кожному конкретному випадку клінічні наслідки наявності того чи іншого генетичного варіанта. Проте зі вступом в нову еру персоналізованої медицини такі бази даних, як HGMD, можуть полегшити вирішення цього завдання.

Ці бази почали з'являтися протягом двох останніх десятиліть, однак робота з їх створення ще далека від завершення. Хвороботворні патологічні варіанти генів загалом трапляються досить рідко і всеосяжний пошук таких мутацій у багатьох популяціях лише розпочато.

Відібраний для цього дослідження генетичний матеріал було отримано анонімно, а відтак учасники не могли отримати жодної інформації про ризики розвитку у них конкретного генетичного порушення. Така ситуація дедалі більше стає етичною проблемою для медичних генетиків.

Усі геноми містять недоліки, деякі з людей несуть шкідливі варіанти, але не піддаватимуться ризику захворювання з тієї чи іншої причини. Для інших вони не матимуть наслідків для здоров'я, але своєчасне попередження про можливість захворювання може бути корисним. Досі ще не з'ясовано, чи можуть випадкові висновки стосуватися людей, які добровільно передають свої зразки для досліджень.

З урахуванням того, що секвенування ДНК набуває дедалі ширшого застосування, першочерговим завданням генетиків є вироблення найбільш етичного підходу до поводження з одержуваною в результаті досліджень конфіденційною інформацією.

Джерело:

*[http://www.sciencedaily.com/
releases/2012/12/121206121904.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2012/12/121206121904.htm)*

Біомаркування часу. Новий метод визначення біологічного віку



Жінки живуть довше за чоловіків. Люди можуть виглядати і відчувати себе молодшими або старшими за свій хронологічний вік. Хвороби здатні впливати на процеси старіння. З погляду біології наш годинник відраховує час по-різному.

У новому дослідженні вчені з Університету Каліфорнії зі школи медицини в Сан-Дієго разом з колегами з інших країн описують маркери і моделі, які уможливають кількісне оцінювання процесу старіння на молекулярно-генетичному рівні, що забезпечує не тільки вищий ступінь точності визначення біологічного віку людини, але також, можливо, і прогнозування або вилікування захворювань, що розвиваються з плином часу. Результати досліджень було опубліковано в онлайн-випуску журналу *Molecular Cell*.

Професор офтальмології та генетики людини Кан Занг (Kang Zhang, з Офтальмологічного центру Каліфорнійського університету Шайлі (Shiley Eye Center) в Сан-Дієго підтвердив добре відомий факт, що різні люди старіють із неоднаковою швидкістю. Деякі у свої 70 років виглядають так, ніби їм лише 50, а інші в свої 50 мають вигляд за 70 років.

Виявлення маркерів і точне кількісне визначення фактичної швидкості старіння у людей досі не мало успіху. Наприклад, дослідники запропонували використовувати як маркер старіння теломери — повторювані нуклеотидні послідовності, які знаходяться на кінцях хромосом і коротшають з віком. Однак, як виявилось, окрім старіння, цей показник піддається впливу інших чинників, зокрема стресу.

У новій статті, опублікованій в журналі *Molecular Cell*, Занг і його колеги описують результати роботи з вивчення метилування ДНК — фундаментального процесу, що триває впродовж усього життя. Під час цього процесу метильні групи прикріплюються до молекул цитозину ДНК або від'єднуються від них, унаслідок чого відбувається пригнічення або активація експресії генів. Дослідники визначили більш ніж 485 000 маркерів метилування, розкиданих по всьому геному, в зразках крові 656 людей віком від 19 до 101 року.

Професор Занг вважає цей спосіб прогнозування старіння людини вельми надійним, і згодом його було підтверджено аналізом кількох сотень зразків крові, взятих від іншої групи людей.

Учені виявили, що метилом — повний набір маркерів метилування людини — і зміни в масштабах цілого геному цілком передбачувано змінюється з плином часу. Це уможливило визначення фактичного біологічного віку людини за допомогою аналізу крові.

На думку авторів дослідження, точно прогнозувати вік може саме метилом, а не тільки кілька ключових генів. З плином часу зони метилування розпадаються вздовж усього геному. Для геному молодих людей характерними є добре помітні межі чітко структурованих зон метилування. Однак швидкість, з якою це відбувається, варіює, і з часом зони метилування стають більш розмитими, а їхні межі втрачають чіткість.

Учені стверджують, що на молекулярному рівні очевидним є існування розходжень у швидкості старіння окремих індивідів і навіть у швидкості старіння різних органів однієї людини. Більш того, швидкість старіння злоякісних і нормальних тканин різна.

Професор Занг вважає, що важливе значення може мати застосування одержаних результатів для оцінки біологічного віку і визначення швидкості старіння людини. Ця інформація є вкрай важливою для медицини. Її можна було б використовувати, наприклад, для порівняння методів лікування хворих з метою оцінки впливу терапії, в результаті якої пацієнти стають здоровішими і молодшими. Наразі вже є можливість проводити скринінг сполук і перевіряти, яким чином сповільнюється процес старіння — на рівні тканин чи клітин.

На думку авторів дослідження, отримані результати матимуть практичне застосування. Зокрема, їх можна використовувати в криміналістиці для визначення віку людини за результатами вивчення клітин, виділених з крові або зразка тканини. У найближчому майбутньому вчені планують оцінити можливість прогнозувати стан здоров'я людей за характером метилування і виявити переваги молекулярної діагностики порівняно з існуючими клінічними і фізичними маркерами. Дослідники вважають запропонований ними підхід дуже перспективним.

Джерело:

[http://www.sciencedaily.com/
releases/2012/11/121121130633.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2012/11/121121130633.htm)

Як низькокалорійна дієта впливає на тривалість життя: захист клітини від ушкоджень, спричинених хронічними хворобами

Учені науково-дослідних інститутів Гладстона виявили новий механізм, за допомогою якого низькокалорійна дієта з малим вмістом вуглеводів — так звана «кетогенна дієта» — може відтермінувати вияви процесу старіння. Це фундаментальне відкриття показує, як така дієта може уповільнити процес старіння і, можливо, одного прекрасного дня дасть змогу вченим поліпшити лікування або профілактику вікових захворювань, включаючи хвороби серця, Альцгеймера і численні форми онкозахворювань.

Оскільки старіюче населення продовжує зростати, вікові захворювання стають дедалі поширенішим явищем. У Сполучених Штатах на сьогодні майже кожна шоста людина за віком старша 65 років. Серцево-судинні захворювання залишаються вбивцею людей номер один, випередивши рак і хворобу Альцгеймера. Такі захворювання є тяжким випробуванням для пацієнтів, їхніх родин та всієї системи охорони здоров'я. Але зараз дослідники з лабораторії Гладстона визначили ту роль, яку відіграють хімічні сполуки в організмі людини в процесі старіння, що може бути ключем до створення нової терапії або профілактики різних вікових захворювань.

Група дослідників під керівництвом д-ра Вердена (Verdin), який очолює Центр боротьби з ВІЛ і старінням у Гладстоні, а також є професором в Університеті Каліфорнії (Сан-Франциско, філія у Гладстоні), опублікувала в журналі *Science* результати своїх досліджень, що стосуються ролі сполуки β-оксидутират (βОНВ) — так званого «кетонного тіла», що є побічним продуктом тривалого додержання низькокалорійної дієти з малим вмістом вуглеводів. У людей з такими захворюваннями, як цукровий діабет типу I, кетонні тіла, такі як βОНВ, можуть бути токсичними для організму за дуже високих концентрацій. Однак д-р Верден і його колеги встановили, що за нижчих концентрацій βОНВ захищає клітини від окиснювального стресу, який виникає в тому разі, коли певні молекули досягають токсичного рівня в організмі, що призводить до появи ознак старіння.

За словами д-ра Вердена, багаторічні дослідження показали, що зменшення калорійності харчування уповільнює процеси старіння і збільшує тривалість життя, однак механізм цього ефекту залишається нез'ясованим. Цілком очевидно, що βОНВ, як основне джерело енергії для організму під

час фізичних вправ або голодування, блокує клас ензимів, які могли б сприяти окиснювальному стресу, захищаючи тим самим клітини від старіння.

Окиснювальний стрес виникає внаслідок того, що клітини використовують кисень для одержання енергії, але це також активує й інші потенційно токсичні молекули, відомі як вільні радикали. У міру старіння клітин вони стають менш ефективними щодо знешкодження вільних радикалів, що призводить до ушкодження клітин, окиснювального стресу і старіння.

Разом з тим, д-р Верден з колегами виявили, що βОНВ можуть сприяти і затримці цього процесу. У серії лабораторних експериментів — спочатку в клітинах людини в чашці Петрі, а потім у тканинах, взятих у мишей — дослідники стежили за біохімічними змінами, які відбуваються з уведенням βОНВ за постійної калорійної недостатності. Дослідники виявили, що обмеження калорій сприяє виробленню βОНВ, який блокує діяльність класу ензимів, так званих гістондеацетилаз, або HDACs.

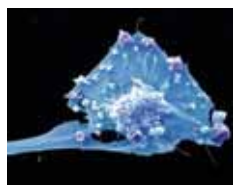
Зазвичай HDACs гальмує пару генів — Foxo3a і M2. Підвищення рівня βОНВ блокує дію HDACs, активуючи ці два гени. Після активації гени запускають процес, що забезпечує стійкість клітин до окиснювального стресу. Це відкриття не тільки виявило нову роль сигнальної системи βОНВ, але також може бути способом сповільнення негативних наслідків старіння у всіх клітинах організму.

За словами авторів, це — прорив у розумінні основних механізмів, що лежать в основі функції HDACs, які беруть участь у процесі старіння і виникненні неврологічних захворювань. Ці результати нових дослідницьких напрямів, присвячених пошуку нових методів лікування вікових хвороб, у тому числі раку, захворювань серцево-судинної системи, хвороби Альцгеймера, Паркінсона, аутизму та черепно-мозкової травми, які вражають мільйони людей і можливості лікування яких вельми обмежені. Ідентифікація βОНВ як сполучної ланки між низькокалорійною дієтою та захистом від окиснювального стресу відкриває безліч нових шляхів для дослідників у боротьбі з хворобами. Вчені збираються продовжити вивчення механізмів дії βОНВ та особливостей його впливу на стан таких органів, як серце і мозок.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/12/121206142025.htm>

Протеїн CtBP підвищує ризик розвитку раку молочної залози



Знімок клітини пухлини молочної залози

Як повідомляють співробітники Національного інституту онкології США, протеїн, пов'язаний із розвитком захворювань, що спричинені порушенням обміну речовин, таких як цукровий діабет і ожиріння, може бути залучений у розвиток агресивних форм пухлин молочної залози. Порушення обміну речовин може відбуватися через збільшення споживання вуглеводів, які здатні зумовлювати підвищену активність С-кінцевого зв'язувального протеїну (C-terminal binding protein, CtBP). Гіперактивність CtBP є чинником, що підвищує ймовірність розвитку раку молочної залози.

Кевін Гарднер (Kevin Gardner), керівник відділу регуляції транскрипції при кафедрі генетики Національного інституту онкології (NCI's Transcription Regulation Section, Genetics Branch), вважає, що правильний раціон харчування у сукупності з фармакологічними методами гальмування активності CtBP може розірвати зв'язок між ожирінням і раковими захворюваннями.

Результати проведених раніше досліджень показали, що існує тісний взаємозв'язок між ожирінням і раковими захворюваннями. Однак механізм, що лежить в основі цього взаємозв'язку, вивчено недостатньо. Результати попереднього дослідження, присвяченого CtBP і проведеного в лабораторії Гарднера, показали, що цей протеїн пригнічує експресію гена, пов'язаного з розвитком раку молочної залози (BRCA1). Інгібіторна активність CtBP виявлялась як відповідь на високу метаболічну активність клітин, завдяки чому забезпечувалося засвоєння вуглеводів. Отже, є підстави припустити, що ожиріння і приріст маси тіла можуть призводити до розвитку раку молочної залози через пригнічення синтезу продукту гена BRCA1. Це гальмування є наслідком споживання великої кількості вуглеводів.

Проведена на цей час в лабораторії Гарднера робота базується на результатах описаних вище досліджень. Учені проаналізували дані, що їх отримано в ході проведено-

ня дослідження з вивчення експресії генів. Це було зроблено для того, аби визначити, чи були метаболічні шляхи, що гальмують CtBP, менш активними у пацієнок з більш агресивними формами раку молочної залози. Для початку фахівці провели низку лабораторних випробувань, використавши клітини пухлин молочної залози людини. Вони проаналізували зв'язок між CtBP і генами, з якими зв'язується цей протеїн, регулюючи їх експресію. Встановлюючи структуру генів, автори дослідження виявляли, де і як CtBP зв'язується з генами, що мають стосунок до розвитку раку молочної залози. Після цього вони проаналізували експресію генів у клітинах, в яких була знижена активність CtBP у результаті РНК-інтерференції або рівень споживання вуглеводів клітинами.

Проведене дослідження показало, що зі зниженням активності CtBP зростає ефективність репарації ДНК, клітини починають стабільно розвиватися, краще контролюють процес свого росту. Крім того, було встановлено, що метаболічні шляхи, на які впливає CtBP, у разі більш агресивних форм раку молочної залози перестають функціонувати належним чином. Пацієнтки, у пухлинах яких виявляли підвищений вміст CtBP, мали меншу тривалість життя. Гальмування активності CtBP за допомогою спеціального інгібітора, що зв'язується з CtBP, призводило до усунення ефектів, що виникають за гальмування генів молекулами CtBP у клітинах пухлин, навіть за підвищеного рівня метаболічної активності, необхідної для засвоєння вуглеводів.

Більш докладний опис результатів проведеного дослідження можна віднайти в журналі *Nature Communications*.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1700.html>

Лікування судинних розладів шляхом використання клітин амніотичної рідини

У журналі *Cell* опубліковано результати нового підходу для одержання великої кількості клітин кровоносної системи, відомих як клітини ендотелію судин (VECs), із клітин амніотичної рідини (ACs) людини. Стратегія, що її застосовано на мишах, виявилася багатообіцяльною і відкриває можливості для одержання великої кількості VECs, необхідних для регенерації органів і лікування різноманітних судинних захворювань.

Перший автор дослідження Шахін Рафії (Shahin Rafii) з Медичного коледжу Вейля Корнелла (Weill Cornell Medical College) констатує, що на цей час не існує лікування, доступного для широкого кола пацієнтів із захворюваннями судин, легенів, з емфіземою, діабетом і неврологічними розладами, зокрема пацієнтів, які зазнали інфаркту, інсульту, травми. Можливість заміни ушкоджених або дисфункціональних ендотеліальних клітин нормальними культивованими ендотеліальними клітинами сприятиме розробленню нової терапії для лікування захворювань, що вражають мільйони пацієнтів у всьому світі.

VECs утворюють усю систему кровообігу, в тому числі серця і кровоносних судин, і допомагають контролювати артеріальний тиск, сприяють утворенню нових кровоносних судин, а також підтримують відновлення та репарацію ушкоджених органів. Широкий спектр судинних захворювань пов'язаний з порушеннями у VECs. Тому для успішного лікування потрібно створити здорові клітини для трансплантації відповідним пацієнтам. Однак незабаром довелося відмовитися від застосовуваних раніше стратегій із використанням стовбурових клітин: VECs, отримані зі стовбурових клітин, були нестабільними і, як правило, мали тенденцію до перетворення на васкулярні клітини. Крім того, їх кількість не могла швидко збільшуватися, що обмежувало потенціал для клінічного використання.

Для усунення цих обмежень Рафії зі своєю групою розробили безпечний підхід до одержання великої кількості стабільних VECs із амніотичних клітин, які екстрагуються під час рутинної процедури амніоцентезу і, отже, є постійним джерелом клітин. Для перепрограмування амніотичних клітин на зрілі й функціональні VECs, так звані Rac-VECs, дослідники включали і вимикали специфічні гени за допомогою E-двадцять шостого сімейства (E-twenty-six family) транскрипційних факторів – протеїнів, які зв'язують ДНК і мають важливе значення для розвитку VEC.

Rac-VECs були подібними до VECs дорослих людей — вони експресували нормальний набір судинно-специфічних генів. Після трансплантації Rac-VECs у регенеруючу печінку миші вони формували стабільні, нормальні, функціонально активні кровоносні судини. За словами Рафії, це було справжнім відкриттям, що уможливило використання ендотеліальних клітин для лікування численних судинних розладів у відповідних пацієнтів.

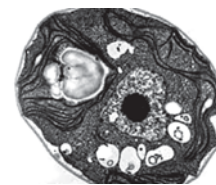
Матеріали дослідження подано в статті Ginsberg M. et al. *Efficient direct reprogramming of mature amniotic cells into endothelial cells by ETS factors and TGF suppression*. *Cell*. 2012 Oct 26; 151 (3) :559-75. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.032. Epub 2012 Oct 18.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/10/121018123044.htm>

Нові дані, що стосуються процесу автофагії

Співробітники медичного факультету Каліфорнійського університету Сан-Дієго з'ясували механізм регуляції автофагії – фундаментального біологічного явища, яке дозволяє клітинам виживати за несприятливих умов, а організмові позбавлятися від непотрібних клітин.



Знімок клітини ссавців, отриманий за допомогою електронного мікроскопа

Провідний автор дослідження Кун-Лінь Гуан (Kun-Liang Guan), професор кафедри фармакології, співробітник Центру Мура дослідження ракових захворювань при Каліфорнійському університеті (UC San Diego Moores Cancer Center), та його колеги повідомляють про те, що ензим під назвою АМРК, як правило, залучений у процес регулювання енергії в клітині, регулює також і роботу ензимів, що здійснюють автофагію.

Прийнято вважати, що автофагія (в перекладі з грецької «самопоїдання») індукується для того, щоб захистити клітину від загибелі у разі виникнення несприятливих умов, таких, наприклад, як нестача поживних речовин, ушкодження органел (зокрема рибосом або мітохондрій), інфекція. Подібно до того, як людський організм, схильний до впливу сильного морозу, знижує метаболічну активність у кінцівках, аби зберегти постійну температуру найважливіших частин організму і забезпечити можливість нормального функціонування внутрішніх органів, автофагія супроводжується деградацією і синтезом певних клітинних компонентів для забезпечення виживання клітин.

Автори проведеного дослідження виявили, що ензим АМРК регулює різні комплекси класу ензимів під назвою Vps34-кінази. Деякі Vps34-кінази залучені до регуляції переміщення везикул всередині клітин. Інші комплекси Vps34 беруть участь в автофагії. Професор Гуан і його колеги вважають, що АМРК гальмує деякі ензими, що не мають стосунку до автофагії, і активує такі, що забезпечують перебіг цього процесу.

Проведене дослідження розширює уявлення щодо процесу, необхідного для підтримки в інтактному стані клітинних функцій та виживання організму. За словами професора Гуана, автофагія — це важливий спосіб очищення клітин від ушкоджених компонентів, які можуть завдати їм шкоди, і одержання поживних речовин за умов голодування. На його думку, порушення перебігу цього процесу пов'язано з розвитком деяких захворювань, зокрема онкологічних і нейродегенеративних. Окрім того, у клітинах накопичуються ушкодження, відбувається їх старіння.

Більш докладний опис результатів проведеного дослідження можна віднайти в журналі *Cell*.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1682.html>

Виявлено мутацію, пов'язану з розвитком бічного аміотрофічного склерозу

Виявлено раніше невідому генетичну мутацію, пов'язану з розвитком бічного аміотрофічного склерозу (БАС). Можливо, її вдасться використати для підвищення ефективності боротьби із цим захворюванням.

Д-р Майкл Стронг (Michael Strong), декан факультету медицини і стоматології (Schulich School of Medicine & Dentistry), співробітник Інституту робототехніки університету Західного Онтаріо, та його колеги виявили мутації в гені ARHGAP28, що є в геномі хворих на БАС. Аналізуючи спадкові та спорадичні форми захворювання, вони виявили, що практично у всіх розглянутих випадках в організмі виявляються аномальні протеїни — продукти зазначеного вище гена.

Бічний аміотрофічний склероз, відомий як хвороба Лу Геріга, — тяжке прогресуюче захворювання, за якого відбувається ураження рухових нейронів, що забезпечують зв'язок м'язових волокон з головним мозком. За даними статистики, 90% людей,

яким ставлять такий діагноз, умирають у середньому через п'ять років з моменту виявлення хвороби. Зараз у Канаді налічується близько 2 тис., а в США 30 тис. людей, які живуть з діагнозом БАС.

Автори проведеного дослідження переконані в тому, що БАС — це порушення метаболізму РНК, а саме іРНК. Учені вважають, що мутантний протеїн відіграє принципово важливу роль у розвитку захворювання.

Д-р Стронг констатує, що кожного разу, коли вчені стикаються з деградацією клітин, вони виявляють цей протеїн, який накопичується у клітинах в аномальній кількості. На його думку, виявлення мутації в гені, що кодує зазначений протеїн, є великим досягненням.

На відміну від багатьох протеїнів, які виконують лише одну функцію, аномальний протеїн, що його виявлено в нормі, виконує дві функції. Одна його частина взаємодіє з РНК, тоді як друга бере участь у процесі регенерації. Вчені вважають, що функції, які виконує цей протеїн, перешкоджають одна одній, тобто він не може виконувати обидві функції одночасно.

На думку д-ра Стронга, у разі наявності БАС відбувається зміна частини протеїну, що відповідає за взаємодію з РНК, при цьому втрачається здатність відповідати на виникнення клітинних ушкоджень. Учений вважає, що зараз потрібно з'ясувати, як саме і що перемікає протеїн за виконання тих чи інших функцій.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1677.html> і
<http://www.hindawi.com/journals/nri/2012/806306/>

Експериментальна терапія допомагає подолати гематоенцефалічний бар'єр під час лікування неврологічних хвороб

Дослідникам вдалося вирішити серйозну проблему, що стосується лікування захворювань головного мозку. Розроблена ними нова експериментальна молекулярна терапія допомагає долати гематоенцефалічний бар'єр під час лікування неврологічної лізосомальної хвороби в організмі мишей.

Результати роботи, проведеної дослідниками Дитячого госпіталю при Медичному центрі Цинциннаті (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, США), опубліковано в журналі *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*.

Керівник дослідження Дао Пан (Dao Pan), співробітник Інституту онкологічних та гематологічних захворювань (Cancer and Blood Diseases Institute) при Дитячому госпіталі констатує, що в ході цієї роботи було створено методику застосування неінвазивних процедур, що дає змогу долати гематоенцефалічний бар'єр і доставляти великі молекули терапевтичних агентів для лікування неврологічних хвороб, зумовлених накопиченням лізосом. Це відкриття сприятиме розробленню лікарських препаратів, які можна буде протестувати за інших захворювань мозку, таких як хвороби Паркінсона та Альцгеймера.

Вчені одержали високомолекулярну речовину, з'єднавши частину протеїну, так званого аполіпопротеїну Е (APOE), з терапевтичним лізосомальним ферментом α -L-ідурондазою (IDUA). Назвавши отримані речовини IDUAe1 і IDUAe2, дослідники спочатку використовували їх для оброблення культивованих у лабораторії клітин людей, хворих на мукополісахаридоз типу I (MPS I). Окрім того, одержані речовини було протестовано на моделі МПС I на мишах.

Мукополісахаридоз типу I є одним з найпоширеніших лізосомних захворювань, що вражають центральну нервову систему, а у формі, що рідко трапляється, виявляється як синдром Гурлера. У людини проявами захворювання можуть бути гідроцефалія, відставання в розвитку або когнітивні відхилення. Якщо не проводити лікування, багато пацієнтів помирають, не досягнувши й 10-річного віку.

Лізосоми є частиною внутрішнього вмісту клітини, яка виступає в ролі системи утилізації відходів і сприяє очищенню клітин та зберіганню нормальної функції. У разі лізосомної хвороби, такої як MPS I, у лізосомах відсутні ферменти, які є необхідними для розщеплення певних речовин. Це призводить до накопичення продуктів метаболізму в клітинах і порушення їх функціонування.

За MPS I у клітинах відсутній фермент IDUA, унаслідок чого в головному мозку та інших органах відбувається накопичення глікозаміногліканів. У ході цього дослідження вчені випробували процедуру доставлення IDUA в клітини головного мозку, попередньо розробивши спосіб доставлення ферменту через гематоенцефалічний бар'єр до нейронів.

Гематоенцефалічний бар'єр є фізіологічною перешкодою, яка змінює проникність дрібних кровоносних судин — капілярів — у мозку. Її мета полягає в захисті мозку, запобігаючи проникненню лікарських пре-

паратів, патогенних мікроорганізмів та інших чужорідних субстанцій у тканини головного мозку. Саме тому цей бар'єр становить проблему під час лікування захворювань мозку за допомогою ліків.

Дослідники експериментували з низкою похідних ApoE — протеїном, який зв'язується з рецепторами жирних кислот на клітинах ендотелію, що вистилають внутрішню поверхню капілярів гематоенцефалічного бар'єру. Вони виявили, що приєднання компонентів ApoE до ферменту IDUA дозволяє модифікувати протеїн, надавши йому здатності приєднуватися до ендотеліальних клітин і проходити їх, потрапляючи в тканини мозку.



Дослідники вирішили серйозну проблему в лікуванні захворювань головного мозку, створивши експериментальну молекулярну терапію, що дає змогу долати гематоенцефалічний бар'єр для лікування неврологічних лізосомних хвороб у мишей (фото: © pixologic / Fotolia)

Дослідники ввели експериментальний препарат IDUAe1 у хвостову вену мишей з MPS I. Встановлено, що, на відміну від доступних на цей час немодифікованих ферментних препаратів, модифікований фермент проникає через гематоенцефалічний бар'єр і потрапляє в нейрони мозку та астроцити залежно від дози. У клітинах мозку мишей нормалізувався рівень глікозаміногліканів і лізосомальних ферментів бета-гексозамінази. У разі продовження лікування шляхом генної терапії з використанням гемопоетичних стовбурових клітин нормальний рівень цих речовин зберігався до кінця п'ятимісячного періоду спостереження.

Дослідники мають намір проводити далі доклінічні випробування з метою підтвердження ефективності препарату на основі IDUA для лікування MPS I, маючи водночас на увазі, що застосування результатів, одержаних на лабораторних мишах, до людини,

може зумовити додаткові труднощі. Крім того, вчені планують перевірити можливість розроблення подібних нейротерапевтичних препаратів, що долають гематоенцефалічний бар'єр, для лікування інших захворювань.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2013/02/130204153712.htm>

Пияцтво підвищує ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу шляхом стимуляції розвитку інсулінорезистентності



Пияцтво — останній крок на шляху до алкоголізму. Як показують результати дослідження, проведеного співробітниками Інституту вивчення проблем ожиріння, діабету і обміну речовин при Медичному комплексі Маунт-Синай (Diabetes Obesity and Metabolism Institute at the Icahn School of Medicine at Mount Sinai), пияцтво спричинює резистентність до інсуліну — патологію, яка суттєво підвищує ризик розвитку цукрового діабету 2-го типу. Як з'ясувалося, алкоголь порушує роботу інсулінрецепторної сигнальної системи.

Професор Крістоф Буттнер (Christoph Buettner), провідний автор дослідження,

пояснив, що інсулінорезистентність — це патологія обміну речовин, що призводить до виникнення цукрового діабету 2-го типу та атеросклеротичної хвороби серця (атеросклеротичного звуження коронарних артерій). Організм людини, яка регулярно багато п'є протягом років (нехай навіть один раз на тиждень), може протягом тривалого часу (аж до декількох років) перебувати в стані нечутливості до дії інсуліну.

У рамках проведеного дослідження автори піддавали щурів дії алкоголю протягом трьох днів поспіль. Так учені намагалися розвинути в організмі тварин стан, аналогічний тому, що розвивається в організмі людини, яка п'є регулярно й багато. Контрольна група тварин отримувала ту саму кількість калорій (без алкоголю). Після того як алкоголь перестав виявлятися в крові, дослідники аналізували метаболізм глюкози за допомогою або тестів на толерантність до глюкози, або інфузій інсуліну. У плазмі крові тварин, які зазнавали дії алкоголю, виявляли підвищений вміст інсуліну (порівняно з контрольною групою).

Підвищений вміст інсуліну в плазмі крові — основний компонент метаболічного синдрому (групи факторів, які підвищують ймовірність розвитку цукрового діабету 2-го типу, атеросклеротичної хвороби серця та інсульту).

Більш докладний опис результатів проведеного дослідження можна віднайти в журналі *Science Translational Medicine*.

Джерело:

<http://sci-lib.com/article1695.html>

Матеріал підготувала
О. С. Виноградова

КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗІУМИ, ВИСТАВКИ

АСHEMASIA 2013 – 9-й МІЖНАРОДНИЙ КОНГРЕС І ВИСТАВКА З ХІМІЧНОГО МАШИНОБУДУВАННЯ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ



Дата проведення: 13–16.05.2013 р.

Місце проведення: Пекін, Китай.

Веб-сайт: <http://www.exposclub.ru/db/exhibition/view/7357/>

Питання для обговорення: сировина й обладнання для хімічної та нафтохімічної промисловості, основна та неорганічна хімія, агрохімія, нафтопереробка і нафтохімія, паливо, мастильні матеріали, органічний синтез, синтетичні смоли, пластмаси, переробка пластмас, хімічні волокна і нитки, композиційні матеріали, склопластики, лакофарбові матеріали, синтетичні каучуки, гумотехнічні вироби, шини, побутова хімія, парфумерія та косметика, малотоннажна хімія, реактиви, каталізатори, кінофотоматеріали, магнітні носії, мікробіологічний синтез, біотехнології, лікарські субстанції, товари народного споживання, проектування хімічних підприємств, складів, терміналів, управління хімічним виробництвом, транспортування хімічної та нафтохімічної продукції, тара й пакування, хімічні технології, наукові дослідження, прилади та засоби автоматизації, лабораторне обладнання і посуд, охорона довкілля, інформаційні технології, галузеві асоціації, професійні спілки, технічна література, ЗМІ.

VI МЕЖДУНАРОДНАЯ СТУДЕНЧЕСКАЯ НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» VI Міжнародна студентська наукова конференція «Актуальні проблеми інфекційної патології та біотехнології»

Дата проведення: 14–15.05.2013 р.

Місце проведення: Ульяновськ, РФ.

Веб-сайт: <http://konferencii.ru/info/id/103387>

Основні тематичні напрями конференції:

- дослідження в галузі мікробіології та вірусології;
- актуальні проблеми біотехнології (у тому числі нанобіотехнології) та імунології;
- проблеми епізоотології та епідеміології;
- експертиза харчової сировини і продуктів харчування;
- діагностика, лікування та профілактика інфекційних хвороб тварин і людей.

4TH ANNUAL THERAPEUTIC PROTEIN PRODUCTION EVENT 4-та щорічна конференція з питань одержання терапевтично активних протеїнів



Дата проведення: 15.05.2013 р.

Місце проведення: Лондон, Велика Британія.

Веб-сайт: www.regonline.co.uk/protein2013

Тематика конференції:

- виробництво терапевтично активних протеїнів із бактеріальних систем;
- нова технологія для візуалізації, визначення розмірів і підрахунку невидимих неозброєним оком протеїнових груп;

- технологія переробки моноклональних антитіл;
- розроблення технології одержання агоністів і антагоністів гормону росту пролонгованої дії;
- технологія зшивання для виробництва терапевтично активних протеїнів;
- аналіз залишків клітини-хазяїна для виробництва нових протеїнів і біоподібних протеїнів: вимоги, правила і застосування нових технологій;
- технології полірування: як ефективно позбутися від домішок і потенційних забруднювачів.

**CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY
FOR ADVANCEMENT OF CYTOMETRY CYTO 2013**
**Конгрес Міжнародного товариства розвитку цитометрії
CYTO 2013**



Дата проведення: 19–22.05.2013 р.
Місце проведення: Сан-Дієго, США.
Веб-сайт: <http://cytoconference.org/cyto/2013/Home.aspx>

Тематика конференції:

- нові полімерні флуорохроми та їх застосування в пситометрії (psytometry) багатоколірного потоку;
- проточна цитометрія;
- пристрій групової ідентифікації для користувачів потоками цитометра.

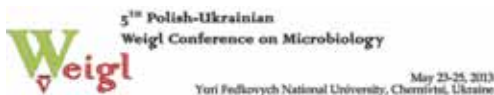
**6-я ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ СТУДЕНТОВ, АСПИРАНТОВ И МОЛОДЫХ
УЧЕНЫХ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ТЕХНОЛОГИИ
И ОБОРУДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ
И ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ТОХБИПП-2013)**
**6-та Всеросійська науково-практична конференція студентів,
аспірантів та молодих учених з міжнародною участю
«Технології та обладнання хімічної, біотехнологічної і харчової
промисловості» (ТОХБИПП-2013)**

Дата проведення: 22–24.05.2013 р.
Місце проведення: Бійськ, РФ.
Веб-сайт: <http://konferencii.ru/info/id/103367>

Тематика конференції:

- технологічне та апаратурне забезпечення процесів хімічної, біотехнологічної, харчової та фармацевтичної промисловості;
- інтенсифікація процесів хімічних, харчових технологій і біотехнологій;
- аastosування нанотехнологій у хімічній, харчовій та біотехнологічній промисловості;
- моделювання технологічних процесів;
- ресурсозберігальні технології в харчовому та хімічному машинобудуванні і суміжних галузях;
- сучасні засоби і методи аналізу сировини, продуктів і виробів;
- економіка, організація та управління підприємствами галузі;
- стандартизація, сертифікація, управління якістю та безпека процесів і продуктів технологій.

**5TH POLISH-UKRAINIAN WEIGL CONFERENCE
ON MICROBIOLOGY**
**V Міжнародна польсько-українська
Вейгелівська конференція з мікробіології**



Дата проведення: 23–25.05.2013 р.
Місце проведення: Чернівці, Україна.
Веб-сайт: <http://www.cellbiol.lviv.ua/weigl5/index.html>

Основне питання, що розглядатиметься на конференції, — ознайомлення з найновішими досягненнями в галузі мікробіології та імунології.

Робоча програма Конференції включатиме засідання таких секцій:

- клітинна біологія та молекулярна генетика мікроорганізмів;
- медична мікробіологія;
- імунологія;
- систематика мікроорганізмів та екологія;
- біотехнологія.

**МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ
КОНФЕРЕНЦИЯ «ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ
В АГРАРНОЙ СФЕРЕ»**

**Міжнародна науково-практична конференція «Проблеми
розвитку біотехнології в аграрній галузі»**

Дата проведення: 24–25.05.2013 р.
Місце проведення: Єкатеринбург, РФ.
Веб-сайт: [http://konferencii.ru/list/search% 5BtopicId% 5D/38/isTopic/1](http://konferencii.ru/list/search%5BtopicId%5D/38/isTopic/1)

Мета проведення конференції — обговорення новітніх досягнень та аналіз прикладних аспектів біотехнології в АПК і сільському господарстві.

Напрями роботи конференції:

- сільськогосподарська біотехнологія;
- біотехнології в харчовій і переробній промисловості;
- біотехнології в галузі охорони навколишнього природного середовища;
- розвиток освіти і науки в галузі біотехнології;
- міжнародне співробітництво в галузі біотехнології.

BIO-IT WORLD ASIA 2013

Конференція з питань біоінформаційних технологій



Дата проведення: 28–31.05.2013 р.
Місце проведення: Сінгапур.
Веб-сайт: <http://www.Bio-ITWorldAsia.com>

На конференції обговорюватимуться питання, що стосуються інноваційних і передових технологій у галузі оброблення великих обсягів даних та аналітики, геноміки, молекулярної діагностики і трансляційної інформатики, які справляють прямий або непрямий вплив на підвищення ефективності клінічних досліджень, охорони здоров'я та доставлення лікарських препаратів, клінічного управління даними і проведення клінічних випробувань, біоінформатики та геноміки раку, молекулярної діагностики.

TARGETING ALZHEIMER'S DISEASE 2013 **Конгрес із питань таргетингу хвороби Альцгеймера**



Дата проведення: 04–06.06.2013 р.

Місце проведення: Філадельфія, США.

Веб-сайт: <http://www.worldpharmacongress.com/Alzheimers-Disease-Conference/>

Проблеми для обговорення:

- безпека біопрепаратів і біоаналогів;
- використання стовбурових клітин для скринінгу безпечних ліків;
- вступ до вивчення метаболізму препарату та його ролі в токсичності ліків;
- епігенетичні механізми болю;
- застосування нанотехнологій в інноваційній терапії;
- стратегічний план для проведення аутсорсингу доклінічної діагностичної візуалізації;
- досягнення в галузі обробки зображень.

HFP2013: MOLECULAR MECHANISMS OF HOST–PATHOGEN INTERACTIONS AND VIRULENCE IN HUMAN FUNGAL PATHOGENS

Симпозиум «Молекулярні механізми взаємодії хазяїн–патогенний організм і вірулентність для патогенних грибів людини»

Дата проведення: 25–31.05.2013 р.

Місце проведення: Ля Коль сюр Луп, Франція (La Colle-sur-Loup, France).

Веб-сайт: www.pasteur.fr/hfp2013

Огляд сучасних знань про досягнення в галузі молекулярних досліджень патогенних грибів.

Обговорюватимуться проблеми порівняльної та еволюційної геноміки, сигналізації і морфогенезу, спарювання, взаємодії хазяїн–гриб, динаміка клітинної стінки, протигрибковий імунітет, експериментальні моделі грибкових інфекцій.

CHROMOSOME INSTABILITY AND ANEUPLOIDY IN CANCER: FROM MECHANISMS TO THERAPEUTICS

Конференція: «Хромосомна нестабільність та анеуплоїдія за злоякісних новоутворень: від механізмів до терапії»

Дата проведення: 27–29.05.2013 р.

Місце проведення: Мадрид, Іспанія.

Веб-сайт: [cnio.es / eventos / index.asp](http://cnio.es/eventos/index.asp)

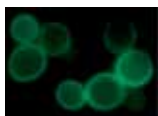
На конференції обговорюватимуться успіхи, досягнуті в розумінні того, як анеуплоїдія сприяє ініціації та прогресуванню розвитку онкологічних захворювань у людини.

Теми для обговорення:

- механізми походження анеуплоїдії;
- вплив анеуплоїдії на клітинну проліферацію і виживання на моделі злоякісних пухлин;
- CIN-гени раку в людини;
- моделювання анеуплоїдії на мишах;
- програмування анеуплоїдії як можливості протипухлинної терапії.

THE 6TH INTERNATIONAL COARSE IN YEAST SYSTEMS BIOLOGY

6-та Міжнародна конференція із системної біології дріжджів



The 6th International Course in Yeast Systems Biology
June 3-10, 2013 - Gothenburg, Sweden

Дата проведення: 03–10.06.2013 р.
Місце проведення: Гетеборг, Швеція.
Веб-сайт: www.icysb.se

Конференція сприятиме обміну досвідом аспірантів, молодих фахівців і вчених у галузі експериментальної біології та медицини і / або теоретичних наук (фізики, математики, техніки) з метою інтеграції математичного моделювання та моделювання з використанням експериментальних досліджень для вирішення біологічних або медичних питань. Особливий акцент буде зроблено на динамічному моделюванні клітинних шляхів і аналізах на одноклітинному рівні. Як експериментальний організм використовуватимуться дріжджі. Виявлені закономірності можна буде застосовувати до будь-якого організму, включаючи людину.

КОНФЕРЕНЦІЯ МОЛОДИХ УЧЕНИХ «АКТУАЛЬНІ ПРОБЛЕМИ БІОХІМІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ – 2013»

Дата проведення: 06–07.06.2013 р.
Місце проведення: Київ, Україна, на базі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України

ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY (EMBC 2013)

Щорічна міжнародна конференція Товариства з інжинірингу в медицині та біології



Дата проведення: 03–07.07.2013 р.
Місце проведення: Осака, Японія.
Веб-сайт: <http://embc2012.embs.org/>

Тематика:

- Біомедична обробка сигналів.
- Біомедична візуалізація та обробка зображень.
- Медико-біологічна апаратура, біосенсори і біомікро / нанотехнології.
- Біоінформатика та обчислювальна біологія, системна біологія і методологія розроблення моделей.
- Інжиніринг серцево-судинної та дихальної систем.
- Клітинна і тканинна інженерія та біоматеріали.
- Біомеханіка та робототехніка.
- Лікувально-діагностичні системи, прилади і технології, клінічна інженерія.

NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR AND INTERSTRAND CROSSLINK REPAIR – FROM MOLECULES TO MAN Ексцизійна репарація нуклеотидів і міжниткова поперечна репарація – від молекул до людини



Дата проведення: 09–13.07.2013 р.
Місце проведення: Смоленіче, Словаччина.
Веб-сайт: www.exon.sk/smolenice2013

Вчені ЄС і США обговорюватимуть, як формуються механізми синтезу протеїнів і сортування геномної ДНК для виявлення конкретних місць ушкоджень, які відновлюються за двома механізмами репарації, що має вирішальне значення для здоров'я людини та її розвитку.

12TH SYMPOSIUM ON BACTERIAL GENETICS AND ECOLOGY (BAGECO 12)

12-й симпозиум з генетики та екології (BAGECO 12)



Дата проведення: 09–13.07.2013 р.

Місце проведення: Любляна, Словенія.

Веб-сайт: www.bageco2013.org

На симпозиумі обговорюватимуться досягнення в галузі еволюції прокариотів і горизонтального перенесення генів; соціально-мікробіологічного та мікробного мережевого угруповання; мікробних взаємодій з еукаріотичними хазяями; фактори мікробного різноманіття та екологічні аспекти; корисні мікроби, а також мікробна відповідь на антропогенний вплив та досягнення в галузі біотехнології.

A JOINT FEBS / EMBO LECTURE COURSE BIOMEMBRANES: MOLECULAR ARCHITECTURE, DYNAMICS AND FUNCTION

Об'єднаний курс лекцій FEBS / EMBO з біомембран: молекулярна архітектура, динаміка і функція



Дата проведення: 10–20.06.2013 р.

Місце проведення: Корсика, Франція.

Веб-сайт: testweb.science.uu.nl/cargese2013



Мета лекцій – дати інтегроване уявлення про структуру, функції та генезис біологічних мембран, підходи й методи дослідження мембран.

BIOLOGICAL SURFACES AND INTERFACES

Біологічні поверхні та інтерфейси

Дата проведення: 30.06.–05.07.2013 р.

Місце проведення: Сант Феліу де Гуксольз, Іспанія.

На конференції здійснюватиметься обмін ідеями між біологами, хіміками, фізиками, інженерами та лікарями в цій галузі, що швидко розвивається, охоплюючи біосенсори, біочипи, тканинну інженерію, медичні імплантати, лікування стовбуровими клітинами, наномедицину і доставлення ліків.

Тематика конференції:

- платформи біоміметичних поверхонь;
- біомембрани і супрамолекулярні матеріали, контролювання клітинного відгуку за розробленими поверхнями, м'яка матерія;
- нанотехнології, оптичні, магнітні та механічні системи виявлення аж до чутливості однієї молекули, біоструктури.

КОНГРЕС ФЕДЕРАЦІЇ ЄВРОПЕЙСЬКИХ БІОХІМІЧНИХ ТОВАРИСТВ 2013 «БІОЛОГІЧНІ МЕХАНІЗМИ»



Дата проведення: 6–11.07.2013 р.
Місце проведення: Санкт-Петербург, РФ.
Веб-сайт: www.febs-2013.org/eng/default.aspx

На конгресі обговорюватимуться такі аспекти: імунологія; РНК; біохімія вуглеводів; біологія стовбурових клітин; механізми протеолізу; бактеріологія; біоінформатика; біохімічні методи досліджень.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY AND FOOD ENGINEERING ICBFE

Міжнародна конференція з питань біотехнології та розроблення продуктів харчування ICBFE



Дата проведення: 24–25.08.2013 р.
Місце проведення: Сінгапур.
Веб-сайт: <http://www.icbfe.org/>

2-га Міжнародна конференція з біотехнології і техніки харчових технологій (ICBFE 2013) є головним форумом для презентації нових досягнень та результатів досліджень в галузях теоретичної, експериментальної і прикладної біотехнології та харчових технологій.

Тематика конференції:

- нановиробництво;
- наноматеріали;
- біотехнологія;
- прикладна біотехнологія у виробництві нових, більш якісних продуктів харчування;
- фізична хімія і термодинаміка у біотехнології;
- поліпшення екологічних процесів відновлення;
- біохімічна та біомолекулярна інженерія;
- біо- та біомедична інженерія;
- біологічна і медична хімія;
- сільськогосподарська біотехнологія;
- біотехнологія тварин;
- біокаталіз, органокаталіз і нанобіотехнологія;
- біоінформатика;
- біологічна та біомедична візуалізація;
- біоміметичні та самозбиральні матеріали;
- біоремедіація забруднених місць;
- біосенсиори та молекулярна діагностика;
- клітинна і тканинна інженерія;
- екологічна біотехнологія;
- інженерна ензимологія;
- харчова біотехнологія;
- регуляція функціонування генів;
- промислова біотехнологія;
- морська біотехнологія;
- медична біотехнологія;
- нанобіотехнології;
- наночастинки, нанокомпозити, нанопористі матеріали для біододатків;
- фармацевтична біотехнологія;
- біотехнологія рослин;
- протеїни і системи доставлення генів;
- структура та послідовність РНК і ДНК.

ANNUAL WORLD CONGRESS OF MARINE BIOTECHNOLOGY — WCMB 2013

Щорічний міжнародний конгрес із питань морських біотехнологій — WCMB 2013



Дата проведення: 23–25.09.2013 р.
Місце проведення: Ханчжоу, Китай.
Веб-сайт: <http://www.bitconferences.com/wcmb2012/welcomemessage.asp>

На конгресі планується обговорення тем, пов'язаних з новітніми досягненнями в галузях морської біотехнології, біотехнології водоростей, морських природних сполук, морської біоенергетики, ресурсів і охорони навколишнього середовища, біоремедіації щодо застосування морської біотехнології.

BIOETHICS EDUCATION: CONTENTS, METHODS, TRENDS — INTERNATIONAL CONFERENCE

Міжнародна конференція з питань викладання біоетики — зміст, методи, тенденції

Дата проведення: 19–21.11.2013 р.
Місце проведення: Неаполь, Італія.
Веб-сайт: <http://www.isas.co.il/bioethics2013/>

Основні аспекти для обговорення:

- біоетика і право;
- психіатрія та біоетика;
- хірургія і біоетика;
- екобіоетика;
- реабілітація і біоетика;
- біополітика та етика.

2014 JOINT ISBRA / RSA WORLD CONGRESS - INTERNATIONAL SOCIETY FOR BIOMEDICAL RESEARCH ON ALCOHOLISM Світовий конгрес Міжнародного товариства біомедичних досліджень алкоголізму — 2014 JOINT ISBRA



Дата проведення: 21–25.06.2014 р.
Місце проведення: Сіетл, США.
Веб-сайт: <http://www.isbra.com/>

Метою конгресу є обмін передовим досвідом на міжнародному рівні з усіх аспектів біомедичних досліджень проблем алкоголізму та пов'язаних з алкоголем біомедичних явищ. Ці дослідження на міжнародному рівні є важливим внеском у розуміння значення дослідження алкоголізму та підвищення результативності його лікування.

III МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА-КОНФЕРЕНЦИЯ «БИОИНДУСТРИЯ» III Міжнародна виставка-конференція «Біоіндустрія»



Дата проведення: 16–18. 10. 2013 р.
Місце проведення: Санкт-Петербург, Росія.
Веб-сайт: <http://molbiol.ru/forums/lofiversion/index.php/t525067.html>

В експозиції виставки будуть представлені такі розділи, як біотехнологія і жива природа, біотехнологія та індустрія здоров'я, біоінженерія та біоінформатика, інфраструктура біотехнологічної індустрії.

К 75-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ БОРИСА ПЕТРОВИЧА САНДОМИРСКОГО



30 апреля 2013 года исполняется 75 лет со дня рождения известного ученого в области криомедицины и криобиологии, заслуженного деятеля науки и техники Украины, доктора медицинских наук, профессора Бориса Петровича Сандомирского.

В 1961 г. Б. П. Сандомирский окончил Харьковский медицинский институт, работал врачом-хирургом; с 1971 г. — заведующий отделением ожогового центра. В 1971 г. защитил кандидатскую диссертацию, в 1984 — докторскую, с 1986 г. — профессор.

С 1974 г. научная и научно-организационная деятельность Бориса Петровича связана с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, в котором с 1979 г. он бессменно руководит отделом экспериментальной криомедицины. Проблематика его исследований сосредоточена в области экспериментальной и клинической криомедицины и направлена на изучение процессов, протекающих в органах и тканях после действия низких температур. Изучение своеобразия процессов воспаления при криовоздействии в условиях ряда патологических состояний дало возможность создать и научно обосновать способы холодого лечения ожоговых и гнойных ран (за цикл работ по исследованию действия низких температур на кожу с целью создания новых методов криотерапии и криоконсервирования в 1985 г. Б. П. Сандомирский с сотрудниками отдела был удостоен премии им. А. А. Богомольца АН УССР), язвенной болезни 12-перстной кишки, хронического тонзиллита.

Логическим продолжением работ этого плана является изучение возможности благоприятного воздействия холода на деструктивно-восстановительные процессы в печени, пораженной хроническим гепатитом и циррозом. На животных различных видов детально изучен морфогенез деструктивно-дистрофических и восстановительных процессов в печени после локального действия низких температур. Установлена роль микроциркуляторных изменений в процессе формирования первичного и вторичного крионекроза. Проведенное прижизненное наблюдение влияния дозированного локального криовоздействия на нормальную и цирротически измененную печень позволило установить зависимость местных микрогемодиализных реакций и изменений в системе крови от времени и глубины охлаждения, ограничить значимые температурные зоны и выявить главные направления патоморфоза в них. Создана математическая модель распределения температурных полей при локальной криодеструкции печени, хорошо коррелирующая с экспериментальными данными.

Установлено, что криодеструкция 10% объема печени приводит к стимуляции регенераторных способностей этого органа. Этот факт послужил основой для создания новых способов лечения хронических воспалительных заболеваний печени.

В 80–90-е гг. Б. П. Сандомирский большое внимание уделяет созданию аппаратуры. Так, разработка и внедрение в лечебную практику специального эндоскопического криоинструмента — криоэлектрокоагулятора (КЭК-1), лапароскопического криоинструмента для холодого лечения печени, осуществлялись при его непосредственном участии. В 1991 году по инициативе Бориса Петровича был создан Харьковский независимый фонд материальной помощи в повышении квалификации врачей («Харьков-Квалимед»). Благодаря его энергии и организаторским способностям у многих практических врачей из разных регионов Украины и России появилась возможность приобрести криоаппаратуру, получить новые знания, освоить метод криотерапии непосредственно в лучших клиниках города Харькова.

В 90-е годы Б. П. Сандомирский возглавляет исследования, ориентированные на создание технологий получения и применения криоконсервированных клеток и фрагментов тканей для клинического применения (ксеногепатоциты, культуры инсулинпродуцирующей ткани поджелудочной железы, фрагменты селезенки и печени).

Многолетние исследования руководимого Б. П. Сандомирским отдела были сфокусированы на получении с использованием криобиологических технологий экстрактов из ксенотканей и органов, изучении биологических свойств этих экстрактов, содержащих низкомолекулярные соединения пептидной природы. Исследовано влияние условий криоконсервирования фрагментов органов свиней и новорожденных поросят на их сохранность и состав получаемых из этих фрагментов водно-солевых экстрактов. Определено, что молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах зависит от органа и возраста животных.

Экстракт поджелудочной железы нормализует биохимические показатели при экспериментальном сахарном диабете, а экстракт печени стимулирует процессы репарации в пораженном органе при токсическом гепатите и циррозе печени. Введение экстракта селезенки положительно влияет на протекание сахарного диабета и токсического гепатита и сокращает сроки заживления ожоговых ран. Смесь экстрактов способствует торможению роста карциномы Герена и увеличивает продолжительность жизни крыс.

В отделе проведены исследования по применению криохирургических методов и их комбинаций при экспериментальном циррозе печени. В качестве факторов воздействия исследованы криодеструкция ткани печени, криоденервация печеночной артерии и введение экстрактов печени и селезенки. Показана высокая лечебная эффективность таких комбинаций на модели экспериментального цирроза печени.

В последнее время по инициативе Б. П. Сандомирского ведется активная разработка биологических гипоиммуногенных сосудистых протезов малого диаметра на основе ксеногенных артерий. Разработана методика девитализации ксеногенных артерий с помощью комбинированного действия двух физических факторов – низких температур и ионизирующего облучения. Было установлено, что обработка артерий предложенным методом приводит к полной деэндотелизации и разрушению гладкомышечных клеток сосудистой стенки, т. е. разрушению основных факторов иммуногенности. Низкие температуры использованы не только в качестве повреждающего фактора, но и с целью долгосрочного хранения артерий. Полученные биопротезы представляют собой гипоиммуногенный соединительнотканый каркас. Экспериментальное сосудистое протезирование продемонстрировало адекватное функционирование девитализированных ксеноартерий по меньшей мере в течение 24 месяцев без развития тромбозов и стенотических изменений. При этом наблюдалось постепенное заселение соединительнотканного каркаса клетками реципиента. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения широкомасштабных доклинических исследований с последующим внедрением разработанных биопротезов в клинику и создания низкотемпературного банка сосудистых биопротезов.

Под руководством Б. П. Сандомирского сотрудниками отдела разработана и внедрена модель локального крионекроза сердца, позволяющая прогнозировать зону поражения миокарда с высокой степенью повторяемости эксперимента. В отличие от других экспериментальных методик некроза миокарда (коронарогенного и некоронарогенного генеза), локальная криодеструкция сердца дает возможность с достаточной степенью надежности прогнозировать глубину повреждения сердечной мышцы при заданных параметрах криовоздействия с формированием как субэпикардального, так и трансмурального некроза миокарда. На модели локальной криодеструкции сердца проводятся исследования по изучению ремоделирования и регенерации сердца при различных вариантах лечения некроза миокарда.

Б. П. Сандомирский является членом специализированного ученого совета Д 64.242.01 при ИПКиК НАН Украины, членом научных обществ ученых Украины, а также членом Международного общества по эндотоксинам, Европейского общества низкотемпературной биологии, Европейского общества искусственных органов (ESAO), членом редакционной коллегии журналов «Проблемы криобиологии» и «*Biotecnologia Acta*».

Результаты теоретических экспериментальных и клинических разработок Б. П. Сандомирский регулярно представляет на отечественных и международных научных конференциях. Он является автором более 400 научных работ, в том числе 8 монографий, 39 патентов и авторских свидетельств. Под руководством Б. П. Сандомирского защищены 2 докторские и 18 кандидатских диссертаций.

Коллектив Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины и редакция журнала «*Biotecnologia Acta*» сердечно поздравляют Бориса Петровича со славным юбилеем, желают ему доброго здоровья, долгих лет творческой жизни, успехов во всех его добрых делах и начинаниях.

ПЕРЕДПЛАТА — 2013

З питань організації передплати в **Україні**, оформлення замовлень та обробки передплатної документації звертайтеся, будь ласка, до

1. «Каталогу видань України»:

Підписний індекс 37796.

2. Передплатного агентства «Укрінформнаука»:

тел. / факс +38 (044) 239-64-57, моб. +38 (050) 154-77-83.

Електронна пошта: innovation@nas.gov.ua.

Поштова адреса: вул. Володимирська, 54, кімн. 144, м. Київ-30, 01601.

З питань організації передплати в **Росії** звертайтеся, будь ласка, до компанії «Інформнаука»:

тел. 8 (495) 787-38-73, факс: 8 (499) 152-54-81.

Електронна пошта: perova@viniti.ru

Поштова адреса: ТОВ «Інформнаука», вул. Усієвича, 20, м. Москва, 125190, Росія.



Ви можете оформити передплату або придбати свіжі номери журналу «Biotechnologia Acta» в електронній бібліотеці PressPoint: www.presspoint.ua