

УДК 546.26.043

НАНОБІОТЕХНОЛОГІЯ: ШЛЯХ У НОВИЙ МІКРОСВІТ, СТВОРЕНИЙ СИНТЕЗОМ ХІМІЇ ТА БІОЛОГІЇ

О. П. ДЕМЧЕНКО, В. І. НАЗАРЕНКО

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

E-mail: alexdem@ukr.net

Отримано 19.06.2011

Частинки розміром 1–100 нм та композити з молекул і таких частинок неорганічної, органічної та біологічної природи мають унікальні властивості, що не притаманні іншим матеріалам, тому застосування їх зумовлює революційні зміни в існуючих технологіях і створення нових. В огляді описано будову та властивості таких нанокompозитів, а також їх різноманітне біотехнологічне застосування. Обговорюються нові можливості для досліджень і впровадження в індустриальній ензимології, пов'язані зі включенням ензимів у наноструктури. Новітні технології охоплюють і охорону здоров'я, що сприяло виникненню нанофармакології і наномедицини. Тут уперше з'явилися можливості для контрольованого доставлення і вивільнення ліків у клітинах-мішенях. Розглянуто також проблему патентного захисту нових ідей у цій галузі.

Запропоновано розгорнуту дефініцію нанобіотехнології.

Ключові слова: нанобіотехнологія, наночастинки, самоскладання, нанокompозити, наноматеріали у медицині, наноензимологія.

Останнім часом відбувається створення і становлення нової наукової й технологічної дисципліни на стику фізики, хімії та біології. Унікальні властивості металевих наночастинок і напівпровідникових нанокристалів не залишилися поза увагою фізиків, однак їх застосування було б неможливим без розроблення хіміками методів модифікації їхньої поверхні. Спільними зусиллями фізиків і хіміків було створено так звані кон'юговані полімери — макромолекули, яким притаманна не лише електропровідність, але й здатність до колективних ефектів у поглинанні й випромінюванні світла. Запозичення з молекулярної біології принципу самоскладання надмолекулярних структур уможливило суттєве розширення діапазону гібридних наночастинок, що складаються з компонентів, запропонованих неорганічною та органічною хімією, а також хімією полімерів, молекулярною біологією та біоінженерією. Нанотехнологія на основі цього принципу дає змогу створювати нові молекулярні архітектури з величезною точністю і широким діапазоном застосування.

Створення наноструктур може відбуватися двома шляхами. Один із них — це

шлях «від верху до низу», подрібненням частинок більшого розміру. Другий може бути названий шляхом «від низу до верху» і здійснюється з'єднанням молекулярних компонентів. Цей варіант виявився найбільш перспективним, поєднуючи самоскладання зі зшиванням компонентів у реакціях хімічного синтезу. У багатьох випадках це відбувається на платформі наночастинок неорганічного, органічного чи біологічного походження [1, 2].

Водночас спостерігається розвиток біотехнології як наукової і технологічної дисципліни, що ґрунтується на біологічних дослідженнях з використанням матеріалів біологічного походження. Галузями її застосування є передусім сільське господарство, харчова промисловість, медицина та охорона довкілля. Завдяки запиту на створення нових біотехнологій на основі наноматеріалів відбувається взаємне збагачення і переплетіння нанотехнології і біотехнології, що зумовило створення нового напрямку — нанобіотехнології. Таке взаємопроникнення й поєднання двох світів — біомолекул і штучно створених наночастинок — схематично зображено на рис. 1.

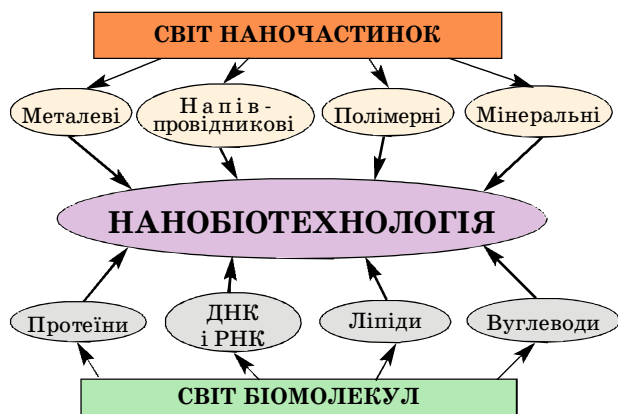


Рис. 1. Взаємодія двох світів — наночастинок і біомолекул — є основою для розвитку нанобіотехнології

Бурхливий розвиток цього напрямку революціонував старі і сприяв створенню нових шляхів для досліджень та розширенню сфер застосування:

- створення нових ліків на основі досліджень взаємодії наночастинок і живих клітин (нанофармакологія);
- доставлення лікарських засобів на рівні цілого організму до клітин-мішеней і їх дозоване вивільнення (нанофармакокінетика);
- використання механізмів прямої дії наночастинок на клітини-мішені (фотодинамічна та гіпотермальна терапія пухлин);
- кількісне визначення речовин, важливих для клінічної діагностики, охорони довкілля та іншого застосування. Аналіз геному і протеому (нанобіосенсорика);
- вивчення взаємодії наночастинок із клітинами. Одержання інформативних зображень живих клітин (наноклітинна біологія);
- візуалізація органів і тканин (нанотомографія);
- ензимні технології на основі наночастинок (наноензимологія);
- концентрація і розділення біосинтетичних молекул (препаративна нанобіотехнологія);
- дослідження негативних впливів наночастинок на живі організми (нанотоксикологія).

У цьому огляді ми намагатимемось висвітлити різні аспекти створення і застосування наночастинок та нанокомпозитів різного походження, будови і призначення.

Будова та властивості наночастинок

Якщо виходити лише з кваліфікації за розміром, наночастинок можуть бути створені з абсолютно різних за складом, походженням і властивостями матеріалів. Проте

лише деякі з них мають перспективу застосування в біотехнологіях. Корові наночастинок (тобто такі, що можуть бути основою для створення функціональних нанокомпозитів) мають, як правило, розмір 1–10 нм. Це відповідає розмірам типових глобулярних протеїнів. Вони значно менші за вірусні частинки (100–200 нм) і, звичайно, за клітини бактерій (~1 μm) та вищих організмів (~10–15 μm). Деякі наноструктури можуть існувати в різних геометричних формах: наносфер, наностержнів, нанопластинок. Наночастинок можна покривати матеріалом іншої природи, що зумовлює різницю властивостей ядра і оболонки. Товщину оболонки, яка може бути багатопшаровою, можна контролювати. Таке різноманіття забезпечує широкий вибір для дослідників.

Є повідомлення [3] про створення наноматеріалів на основі діоксиду церію та можливість іммобілізації на поверхні отриманих наночастинок із заданими властивостями біологічно активних молекул. Також розглянуто перспективи використання нанокристалічного діоксиду церію в біології та медицині. Зокрема, завдяки низькій токсичності й високій кисневій нестехіометрії його можна застосовувати для забезпечення антиоксидантного захисту клітин організму шляхом інактивації активних форм кисню.

Водночас експериментально доведено [4] ушкоджувальний вплив порошкових наночастинок аморфного високодисперсного кремнезему на тканини внутрішніх органів, у патогенезі якого суттєва роль належить порушенню прооксидантно-антиоксидантної рівноваги. Таким чином, інгаляційне надходження наночастинок високодисперсного кремнезему (6–7 нм і 54–55 нм) є небезпечним для здоров'я.

Методи хімічної модифікації поверхні багатьох типів наночастинок досить добре розроблено [5]. Це дозволяє створювати нанокомпозити різної форми, розміру і властивостей. При цьому використовують можливості утворення ковалентних зв'язків на поверхні, а також нековалентних взаємодій, що ґрунтуються на гідрофобно-гідрофільному балансі та взаємодії зарядів.

До загальних властивостей наночастинок слід віднести високе співвідношення поверхні та об'єму. Значну кількість атомів і їхніх реактивних груп експоновано на поверхню, що зумовлює підвищену здатність до утворення ковалентних і нековалентних зв'язків. Ефективну поверхню можна додатково збільшити, застосовуючи пористі та сегментарно-мобільні матеріали. Водночас,

жорсткі комплементарні сегменти поверхні можуть забезпечити вибіркове й ефективне самоскладання, потрібне для створення наноконструкцій.

Важливою характеристикою наночастинок є мультивалентність у хімічних модифікаціях. Це дає змогу створювати наноконструкції приєднанням молекул різної будови і в різній кількості [6]. Нижче розглянуто властивості окремих типів наночастинок. Більш детальний їх опис подано в монографії одного з авторів [7].

Напівпровідникові квантові точки

Велику увагу дослідників до цих матеріалів привернули їхні унікальні оптичні властивості, завдяки яким вони можуть бути не лише основою для створення наноконструкцій, але й надавати їм здатності поглинати та випромінювати світло і ставати видимими у флуоресцентному мікроскопі. Квантові точки можуть забарвлювати живі клітини, а створені на їх основі наноконструкції здатні реагувати на певні концентрації аналізованих речовин [8, 9].

Слід зазначити, що унікальні оптичні властивості квантових точок виявляються лише у частинок розміром 1–20 нм і не спостерігаються у частинок більшого розміру. Завдяки ефектам «квантового обмеження» їх електронні переходи відбуваються так само, як і в органічних молекулах між фіксованими енергетичними рівнями. Але, на відміну від органічних барвників, довжина хвилі їх поглинання і випромінювання залежить від їхнього розміру. Зі збільшенням розміру спектри зсуваються у бік великих довжин хвиль [8, 10]. Таким чином, різний колір забарвлення можна одержати з одного й того самого матеріалу, утворюваного різними за розміром фракціями наночастинок.

Багато квантових точок є композиціями, сформованими з вузькодисперсних нанокристалів CdSe, покритих шаром у декілька атомів іншого напівпровідникового матеріалу ZnS (рис. 2). Оптичні властивості квантових точок становлять інтерес для різноманітного застосування. Їхній спектр поглинання дуже широкий і дозволяє збуджувати флуоресценцію за будь-якої довжини хвилі, коротшої за положення спектра люмінесценції, а спектр люмінесценції дуже вузький. Саме тому квантові точки мають широкий попит у мікроскопії клітин і в сенсорних технологіях. Вони мають надзвичайно високу яскравість, що визначається добутком молярної абсорбції на квантовий вихід випромінювання.

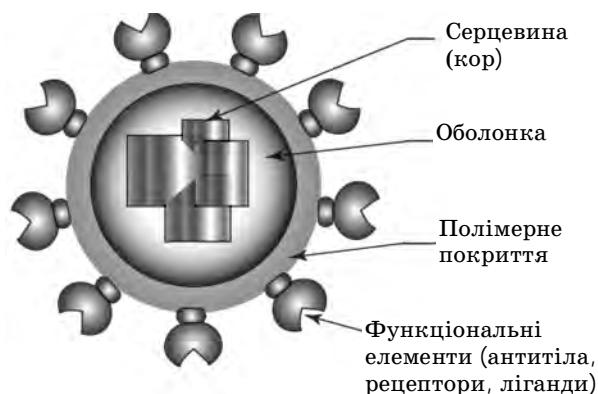


Рис. 2. Типовий наноконструкція з керованою квантовою точкою. Схематичне зображення без дотримання масштабу

Цікавим різновидом квантових точок є нанокристали кремнію. Як відомо, кристалічний кремній не здатен до люмінесценції. Проте, в разі зменшення розмірів кристалів до нанометрових, а також у матеріалах з нанометровою пористою поверхнею спостерігається потужна люмінесценція [11]. Такі частинки використовують у мікроскопії клітин.

Зовсім не просто створити функціональні наноконструкції з квантових точок. Маючи гідрофобні поверхні, вони нерозчинні у воді та інших полярних розчинниках, їхню поверхню нелегко модифікувати. Тому значні зусилля дослідників спрямовані на те, щоб зробити їх зручними для хімічних модифікацій [12]. Для цього розроблено декілька методів [13]:

- ковалентні модифікації для утворення на поверхні наночастинок $-NH_2$, $-SH$ - та $-COOH$ -груп, які можна застосовувати для приєднання інших молекул;
- створення координатних зв'язків. Зокрема, у випадку ZnS це можуть бути реакції полігістидинів із цинком та тіолів з атомами сірки;
- утворення нековалентних взаємодій, зокрема електростатичної природи, шляхом нанесення шару полімеру на його поверхню. Для цього можуть бути використані й різні амфіфільні молекули, що зв'язуються з наночастиною гідрофобною поверхнею, експонуючи полярні групи. Це робить її розчинною у воді й доступною для ковалентних модифікацій. Зокрема, із цією метою застосовують каліксарени, модифіковані карбоксильними групами [14].

Спеціально сконструйовані пептиди можуть поєднувати всі три перелічені вище можливості, створивши поверхню для пришивання різних функціонально важливих

молекул. Методи біоінженерії (комбінаторний мутагенез і відбір з бібліотек, утворених спонтанними мутантами) уможливають отримання невеликих пептидів з великою афінністю і селективністю до таких поверхонь [15]. Для клітинних досліджень можуть бути створені поверхні з моношару ліпідів. Для інших завдань розроблено методи покриття квантових точок моношаром оксиду кремнію. Одержаний таким способом наноккомпозит може включати декілька квантових точок різного розміру і відрізнятися від інших композитів своїм багатоконпонентним спектром люмінесценції. Це дає можливість реалізувати дуже специфічне мічення як наносенсорів, так і живих клітин [16].

Наночастинки благородних металів

Існує декілька простих методів одержання наночастинок зі срібла і золота. Такі частинки набули широкого застосування — від мічення молекул і клітин до медичних засобів і платформ для функціональних наносенсорів. Вони інтенсивно поглинають енергію світла, здатні її розсіювати, випромінювати та перетворювати на тепло. Можуть бути ефективними гасіями люмінесценції інших молекул, проте за певних умов здатні її й підсилювати. Природа поглинання ними світла — плазмонна абсорбція, спектри поглинання досить вузькі й лежать у межах ~410 нм для срібла і ~540 нм для золота (у частинок — менше ~10 нм). Ці їхні властивості добре вивчено [17].

Наночастинки золота і срібла одержують відновленням солей у розчинах, для чого застосовують різні методи: хімічні, фотохімічні, електрохімічні та ін. [17–19]. Ці процедури проводять у присутності детергентів. Час реакції та концентрація детергента визначають розмір частинок. Модифікацію їхньої поверхні здійснюють, уводячи в реакційне середовище молекули, що містять SH-групи [20–21]. Моношар, сформований цими реагентами, уможливує проведення їх подальшої ковалентної модифікації з приєднанням функціонально важливих молекул.

Синтетичні полімери і дендримери

Здатність полімерних молекул утворювати наночастинки контрольованого розміру була відома давно. Полістиролові наночастинки (латекси) навіть використовували як стандарти розміру в мікроскопії і методи

розсіяння світла. Зараз техніку одержання наночастинок добре розроблено для різних синтетичних полімерів: полістиролу, поліметилметакрилату, поліакрилової кислоти, полівінілхлориду тощо. Для цього застосовують міні-емульсійну полімеризацію [22]. Міні-емульсії — це спеціально підібрані гетерофазні системи, в яких стабільні нанокраплини однієї фази диспергуються в іншій фазі. Кожна з таких нанокраплинок є по суті нановимірним реактором, де відбувається синтез полімеру. Завдяки такому обмеженню контролюється розмір синтезованих наночастинок. Така техніка дозволяє здійснювати різні реакції полімеризації, зокрема радикальну, аніонну та ензиматичну полімеризацію. Це дає змогу створювати наночастинки довільної композиції, а також включати в них на стадії формування різні органічні чи неорганічні матеріали, наприклад флуоресцентні барвники. Багато можливостей існує для функціоналізації поверхні наночастинок зв'язуванням пептидів, олігонуклеотидів, біотину, що може надавати їм функціональних властивостей.

Нанобіосенсорні технології часто потребують більшого контролю за розміром наночастинок і локалізації доступних для модифікації поверхневих груп, аніж це можуть забезпечити полімерні латекси. У цьому зв'язку увагу дослідників привернули дендримери — унікальні молекули складної симетричної будови із чітко фіксованими масою і розміром. Це розгалужені полімерні структури сферичної форми, що симетрично «розростаються» із центрального гетероциклу в різних напрямках, що й надає їм сферичної форми [23]. Важко повірити, що відносно проста синтетична хімія може створити об'єкти такої складності й краси!

Кожна гілка дендримера може рости шляхом послідовного розгалуження з додаванням нового шару мономерів, створюючи нове «покоління» частинок — макромолекул, де кожна з них має однаковий розмір і однакове число атомів [24] (рис. 3). Найпопулярніші — поліамідоамінодендримери (англ. абревіатура PAMAM), що є водорозчинними і експонують аміногрупи на своїй поверхні. Внутрішній об'єм дендримерів є сегментарно рухливим, що уможливує створення порожнин, в які включатимуться молекули лікарських засобів і барвників. Враховуючи можливості ефективною і контрольованою модифікації поверхні, дендримери є придатними для широкого застосування [25].

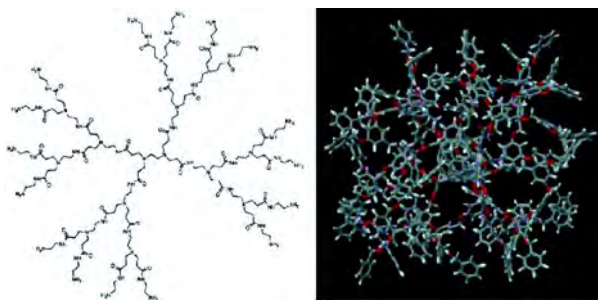


Рис. 3. Дендример поліамідоамін (PAMAM). Хімічна будова (зліва) і модель структури (справа)

Силікатні наночастинки

Міні-емульсійна полімеризація може бути використана і для синтезу наночастинок неорганічної полімерної природи. Перевага силікатних (SiO_2) наночастинок, так званих «нанопіщенок», перед створеними з органічних полімерів полягає у більшій стабільності їх в органічних розчинниках та за екстремальних значень рН. Вони стійкіші в біологічних середовищах і не руйнуються мікроорганізмами. Перевагою може бути і їхня висока питома маса ($1,96 \text{ г/см}^3$), що дозволяє легко відділяти останні з розчинів шляхом седиментації. Поверхнева модифікація та біокон'югація силікатних наночастинок також не створюють проблем, оскільки реактивні групи можна вводити під час синтезу. У літературі детально описано створення наночастинок з поверхневими аміногрупами [26], що можуть бути використані для кон'югацій. На їх основі можна розробляти різні нанокомпозити, зокрема з іммобілізованими ензимами.

Негативний заряд поверхні таких частинок може слугувати додатковим фактором стабілізації нанокомпозитів. Окрім того, в них можна дуже легко вводити органічні барвники [27] і люмінесцентні комплекси металів [28], що робить їх перспективними для оптичного мічення. Багато сенсорних технологій розроблено саме на цій основі [29].

Магнітні наночастинки і нанокомпозити

Ефективним препаративним прийомом може бути розділення в суспензії наночастинок за допомогою простого магніту. Однак для цього наночастинки мають бути магнітними і містити нанокристали оксидів заліза. Як правило, тут застосовують суперпарамагнітний Fe_3O_4 , що виявляє свої властивості лише за наявності зовнішнього поля [30, 31]. Такі частинки можуть захоплюватись клітинами-мішенями і слугувати для розді-

лення цих клітин. Їх використовують для контрастування локалізації таких клітин, а також судин і новоутворень методом ЯМР-томографії [32]. Проте найдоцільнішим застосуванням є контроль за участю магнітного поля їх руху в живому організмі до тканин-мішеней. Такі технології перебувають на початкових стадіях свого розвитку [33], однак тут очікується суттєвий прогрес.

Створення гібридних наночастинок, що поєднують магнітні та оптичні властивості, становить великий інтерес. Зокрема, вже є повідомлення про синтез гібридних наночастинок, що складаються з нанокристалів Fe_3O_4 та CdSe. Вони зберігають як магнітні, так і люмінесцентні властивості [34]. Можливі численні варіанти їх застосування в інших комбінаціях у процесі створення нанокомпозитів.

У роботі [35] розглянуто основні експериментальні підходи до цілеспрямованого синтезу поверхнево-активних олігопероксидних речовин і їх використання з метою одержання полімерних і гібридних нанорозмірних носіїв, яким притаманна спрямована функціональність та біосумісність. Конструювання нових олігопероксидних сурфактантів, а також їх похідних — координаційних кластерів з катіонами перехідних та рідкоземельних металів є зручним інструментом для синтезу люмінесцентних, магнітних та інших функціональних нанокомпозитів із регульованим розподілом за розмірами, функціональністю, реактивністю та біосумісністю. Запропоновані методи дозволяють поєднувати стадію формування полімерних, металевих та металооксидних наночастинок зі стадією необоротної модифікації їхньої поверхні функціональними поверхнево-активними олігопероксидами, здатними зв'язувати фізіологічно активні речовини. Функціоналізовані таким чином частинки можуть бути застосовані для біологічних досліджень як поверхневі клітинні маркери, а також для доставлення лікарських препаратів.

Кон'юговані полімери

Відкриття і дослідження цих полімерних молекул було пов'язано з їхніми властивостями як електропровідних полімерів. За результатами досліджень групу дослідників у 1980 році було відзначено Нобелівською премією з хімії. Відкриття унікальних оптичних властивостей цих молекул стало великим стимулом для розроблення надчутливих флуоресцентних сенсорів із широким полем застосування.

Кон'юговані полімери — це полімери з ненасиченими зв'язками між мономерами, що в їхніх структурах відображено як чергування одинарних і подвійних зв'язків (чи ароматичних груп), унаслідок чого система делокалізованих π -електронів розміщена по всій довжині полімеру [36]. Завдяки такій π -електронній кон'югації між мономерами полімерний ланцюг демонструє колективні ефекти в поглинанні й випромінюванні світла. Хімія цих молекул невпинно розвивається. Для збільшення розчинності у воді в їхню структуру вводять полярні групи, а також групи, що забезпечують міжмолекулярну взаємодію при створенні наноконструктивів і надання їм векторних та сенсорних функцій. Їх можна використовувати для поверхневої модифікації інших наночастинок [37], а також створювати з них дендримерні структури [38].

Фулерени і вуглецеві нанотрубки

У створенні біонаноконструктивів беруть участь і фулерени. У разі включення в силікатні наноматеріали вони можуть випромінювати інтенсивну флуоресценцію, і це дає можливість застосовувати їх у мікроскопії [39].

Трубчасті структури — це, мабуть, найбільш механічно жорсткі й функціонально багатогранні модулі для побудови наноконструктивів. Сформовані у вигляді циліндрів, вони мають чітко визначений внутрішній і зовнішній об'єм. Такими є вуглецеві нанотрубки. До гідних уваги властивостей цих структур слід додати здатність до люмінесценції в близькій інфрачервоній ділянці спектра, що може бути використано при конструюванні оптичних сенсорів [40].

Фулеренам притаманні як унікальні фізико-хімічні, так і різноманітні біологічні властивості, а саме: здатність проникати крізь клітинні мембрани та локалізуватись усередині клітини, виявляти антибактеріальні та антивірусні ефекти, впливати на сигнальні системи клітини, на активність окремих ензимів та процеси пероксидного окиснення ліпідів, а також анти- та прооксидантні властивості. Вивчають фізико-хімічні властивості та біодоступність нового класу наносполук — фулеренів C_{60} , способи їх уведення в біологічні системи, токсичність та перспективи використання як біологічно активних сполук [41].

У досліджах на мишах розроблено технологію застосування фулеренів C_{60} у комбінованій терапії з доксорубіцином для лікування злоякісних пухлин і доведено можливість їх використання у протипухлинній терапії [42].

Методи хімічної модифікації вуглецевих нанотрубок для потреб створення наноконструктивів постійно удосконалюються [43]. У літературі описано створення наноконструктивів з металевими і напівпровідниковими наночастинками [44].

Вуглецеві нанотрубки взаємодіють з біополімерами. Було виявлено, що одноланцюгова ДНК (ssDNA) взаємодіє з вуглецевими нанотрубками, спонтанно обгортаючи їх під час утворення π -стекингу між нуклеотидними основами і стінками нанотрубок [45]. Уведення в систему комплементарних молекул ДНК розриває цей зв'язок, що може стати підґрунтям для розроблення ДНК-сенсорів [46]. Щодо застосування таких нанотрубок *in vivo*, то існує певна пересторога з огляду на їхню токсичність.

З використанням методу електронного парамагнітного резонансу та спінових уловлювачів встановлено генерацію супероксидних аніон-радикалів опроміненням у видимій і близькій ІЧ-ділянках світла багатостінними вуглецевими нанотрубками, що містились у водній суспензії. Спостерігався ефект самоіндукованої генерації активних форм кисню і після припинення фотоопромінення. Зроблено припущення щодо застосування фотозбуджених багатостінних вуглецевих нанотрубок у фотодинамічній терапії злоякісних пухлин [47].

В одному з останніх оглядів із цієї тематики [48] йдеться про структуру, хімічну функціоналізацію, електронні та механічні властивості вуглецевих нанотрубок і їх практичне використання в нейроінженерії як ефективних субстратів для культивування нейронів, синтезу нейропротекторів та як блокаторів іонних каналів. Дія аміномодифікованих одностінних вуглецевих нанотрубок активує захисні функції нервової тканини щодо ішемічного ушкодження та зменшує ділянки інфаркту міокарда, спричиненого оклюзією середньої мозкової артерії у щурів.

Структури, сформовані пептидами

Здатність пептидного ланцюга формувати тривимірні структури різної складності та функціонального призначення стимулюватиме дослідників ще багато років. Варіації послідовностей, сформованих 20 амінокислотними залишками, дають неосяжну кількість варіантів таких структур. Зокрема, існують пептиди, що здатні самоскладатися, формуючи надмолекулярні трубчасті утворення. Цілком логічним було б використовувати

вати їх як основу наноконструктив [49]. Найбільший інтерес у цьому сенсі становлять циклічні пептиди, сформовані чергуванням L- і D-амінокислот. Такі планарні кільця здатні складатися у стос із внутрішнім вільним об'ємом [50]. Ці структури, прошиті водневими зв'язками, дуже стабільні; їх створення просте і доступне. Нескладним пептидним синтезом і хімічними модифікаціями можна отримувати наноконструкти, де функціональні елементи приєднано в потрібних місцях.

Інший тип наночастинок, сформованих пептидами, створено за принципом амфифільності. Послідовне чергування полярних і неполярних амінокислотних залишків призводить до формування структур, подібних до тих, що створюються ліпідами [51]. Є багато можливостей для отримання функціональних молекулярних асоціатів, побудованих за цим принципом.

Третій принцип формування пептидних наночастинок було запозичено з відомих прикладів утворення амлоїдних фібрил при деяких нейродегенеративних хворобах. Такі структури утворюються антипаралельними β -складками. Вони винятково стійкі до змін умов середовища і до розщеплення протеазами [52].

Пептидні структури можуть бути додатково прошиті ковалентними зв'язками. Проте часто в цьому навіть нема потреби, оскільки колективна дія нековалентних взаємодій (електростатичних, гідрофобних і водневих зв'язків) уможливорює створення наноструктур достатньої міцності.

ДНК як матриця для наноконструктив

Попри надзвичайно важливу біологічну роль ДНК і РНК вважаємо за доцільне розглянути оліго- і полінуклеотиди різної довжини як матриці для побудови наноконструктив. Їхня велика перевага полягає у можливості сконструювати композиції зі строго детермінованим розташуванням елементів, що може бути запрограмовано послідовністю основ нуклеїнової кислоти [53]. Прикладом такого підходу може слугувати робота [54], в якій основи дезоксиуридину було модифіковано шляхом приєднання порфіринів. Останні могли включатися специфічно в певні елементи послідовності, дозволяючи приєднання нових її компонентів.

На молекулі ДНК як на наноструктурній матриці відбувається самоскладання наноконструктив складної та навіть ієрархічної

будови, причому може досягатись не лише потрібна послідовність елементів, а й правильна їх просторова орієнтація [55]. Приєднання до довголанцюгової ДНК коротколанцюгових її фрагментів з утворенням сегментів подвійної спіралі дає змогу створити досить складну просторову структуру, а до модифікованих біотином коротких ланцюгів молекул стрептавідину — наноконструкти складної будови. Таким способом фінські дослідники [56] відтворили на супрамолекулярному рівні (розділення ~6 нм) національний символ України — тризуб (рис. 4). Оскільки техніку нарощування наноструктур через молекули стрептавідину досить добре розроблено, можливості конструювання таких структур практично необмежені.

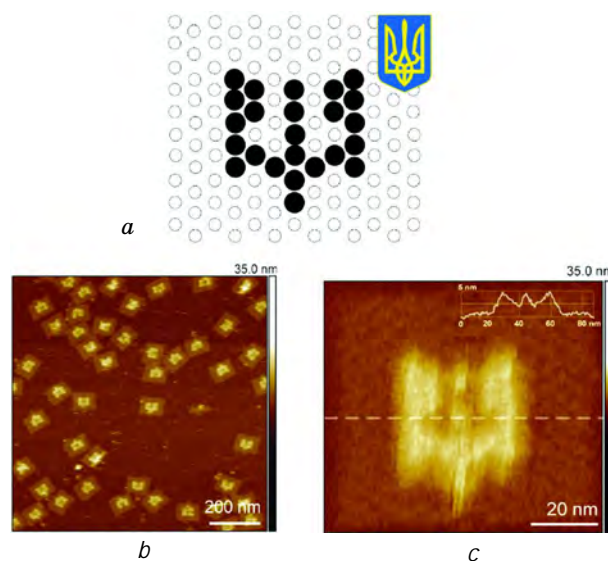


Рис. 4. ДНК із сегментами подвійної спіралі як матриця для контрольованого з'єднання з молекулами стрептавідину:

a — схематичне зображення створюваної структури, що має нагадувати національний символ України — тризуб; *b* — відображення створених структур; *c* — одна зі структур за великого збільшення (показує високу точність складання потрібної структури) [56]

Наночастинки повністю біологічної природи

Використання природних наночастинок на основі спор бактерій, вірусів тощо як основи створення наноконструктив має свої переваги і недоліки. До переваг слід віднести їхню природну однорідність за розміром та можливість чіткого контролю за доступністю поверхневих груп, які можуть бути задіяні для хімічної модифікації і створення структур більшої складності. Компоненти

таких структур можна створювати за допомогою генно-рекомбінантних методів, а їх складання контролювати різними інструментальними засобами. До недоліків слід віднести їхню низьку стабільність до підвищеної температури та дії інших факторів середовища. Їм не притаманні ті надзвичайно корисні властивості металевих чи напівпровідникових наночастинок, що обговорювалися вище. Проте розробки на їх основі тривають. Показано, зокрема, що деякі безпечні для людини віруси можуть специфічно взаємодіяти з раковими клітинами і нести лікарські засоби для їх враження [57]. Різноманітні протеїнові компоненти можуть бути експресовані на поверхні бактеріальних спор [58], що надає їм високої специфічності та розширює можливості застосування.

Створення нанокомпозитів

Хімічний синтез, що є ефективним для малих молекул і лінійних полімерів, має великі обмеження у створенні структур великої складності. Нові рішення потрібні при розробленні гібридних нанокомпозитів з неорганічних, синтезованих органічним синтезом і природних елементів. Тому функціональні наноструктури, як правило, створюють нарощенням і приєднанням готових функціональних блоків.

Самоскладання надмолекулярних систем

Формування наноструктур самоскладанням ґрунтується на принципі комплементарності між партнерами і стабілізації утвореної структури шляхом формування низки нековалентних взаємодій. Завдяки колективному характеру цих взаємодій зв'язок між партнерами може досягати міцності ковалентного зв'язку. Оскільки весь біологічний світ побудований на принципах самоскладання і самоорганізації, цілком логічним є їх використання для створення складних надмолекулярних структур. Електростатичні взаємодії, сольватаційні ефекти (які часто відносять до гідрофобних взаємодій) та водневі зв'язки є основними рушіями в цих процесах. Розглянемо більш детально задіяння водневих зв'язків.

Водневі зв'язки є короткодіючими, односпрямованими і специфічними. З енергією 10–15 кДж/моль ці зв'язки індивідуально дуже слабкі, проте їх колективна дія може сприяти утворенню структур з великою міцністю. Варто нагадати, що саме вони стабілізують α -спіраль у протеїнах і подвійну

спіраль ДНК. Простий димер з утворенням цих зв'язків між донорними (Д) і акцепторними (А) групами типу ААДД вже здатен утворювати досить міцний зв'язок з константою димеризації $5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ [59]. Такі модулі можуть бути ефективно використані при самоскладанні. Багато з них описано в літературі й використовується дослідниками [60].

Інший принцип самозбирання — нашарування на наночастинку «шар за шаром» — ґрунтується на електростатичних взаємодіях зарядженої поверхні корової частинки або нижнього шару з полімером, що несе протилежний заряд і нашарується мономолекулярним шаром [61]. Цей принцип може бути також застосовано для створення нанокристалічних композитів [34, 62] та композитів нанокристалічних частинок з кон'югованими полімерами [63].

Серед протеїнових систем, здатність до самоскладання яких використовують у біотехнології, слід назвати S-протеїни. Ці молекули можуть самозбиратись у стабільні двовимірні кристали — S-шари [64]. Кон'югація із цими протеїнами є одним із методів створення нанокомпозитів.

Афінне з'єднання

Багато прикладів реалізації принципу афінного з'єднання дає нам жива природа. Це і взаємодія антиген — антитіло, і утворення волокон фібрину, і взаємодія ензимів з макромолекулярними інгібіторами. Проте в біотехнології найбільш вживаною при створенні міцних міжмолекулярних взаємодій виявилась пара біотин—авідин (або його бактеріальний аналог стрептавідин) [65]. Протеїн авідин було знайдено в білку курячого яйця. Він зв'язує досить малу молекулу біотину (244,31 Da) з унікально високою афінністю (10^{14} – 10^{15} M^{-1}). Це — найвища афінність за нековалентної взаємодії з відомих у хімії та біохімії. Оскільки кожна молекула авідину зв'язує 4 молекули біотину, ця пара має широкі можливості у разі створення надмолекулярних структур. Стрептавідин, що продукується в бактеріях, має підвищену стабільність до коливань рН і температури. Провести афінне з'єднання цієї пари дуже просто. Якщо стрептавідин-мономер з масою 60 kDa є частиною одного з компонентів наноструктури, а біотин зв'язаний з другим, то ці компоненти знаходять один одного в розчині й необоротно зв'язуються.

Той факт, що органічна хімія досі не спромоглася запропонувати заміну авідину

та стрептавідину, виглядає досить дивним, адже в цьому напрямі було багато спроб. Будемо сподіватися, що якась із них виявиться успішною, і біотехнологія одержить продукт, що здатен конкурувати із цими протеїнами за простотою, стабільністю й вартістю.

Покриття наночастинок ліпідним бішаром

Ліпідні бішарові структури, що є основою біомембран, можуть утворюватися спонтанно, формуючи структури із замкненим об'ємом з мінімальним розміром близько 50 нм. Вони дістали назву ліпідних везикул або ліпосом. Запропоновано використовувати їх як носії ліків, проте на заваді цьому постала їхня низька стабільність. Коло їх застосування може бути істотно розширено в разі утворення наноконструктивів за принципом ядро-оболонка, де ліпідний бішар відіграє роль оболонки, а ядром можуть слугувати наночастинок різного походження. Приклад утворення такої структури наведено на рис. 5.

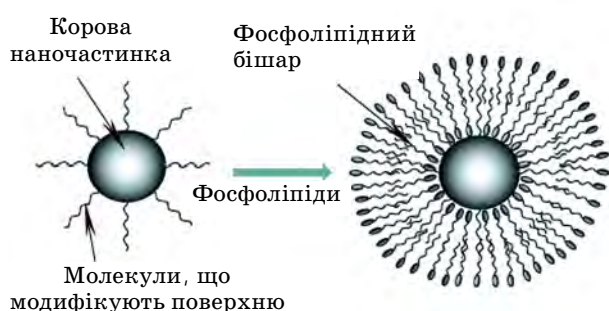


Рис. 5. Схематична ілюстрація самоскладання ліпідного бішару навколо корової наночастинок

Ядро визначає розмір і форму композита і стабілізує цю структуру. Його можна обирати з багатьох варіантів, що зумовлюють його практичне застосування. Так, воно може бути магнітним [66], і це полегшує відокремлення наноконструктивів з реакційного чи досліджуваного середовища, або флуоресцентним, що зумовлює їх візуалізацію [67].

Бішарова структура може включати специфічні молекули, що здатні зв'язуватися з певного типу молекулами і клітинами. Наприклад, інтегрований у бішар моносіалогангліозид GM1 здатен специфічно зв'язувати холерний токсин і може бути використаний для його кількісного визначення [68].

Відомі також синтетичні аналоги ліпосом, що дістали назву полімерсом. Їх конструюють із блок-кополімерів з підвищеною

стабільністю [69]. Галуззю їх застосування має бути передусім доставлення лікарських засобів до клітин-мішеней [70].

Пептиди, що специфічно зв'язуються з поверхнею наночастинок

Як відомо, тіолові й сіланові зв'язки домінують як модифікатори поверхні наночастинок із благородних металів і оксидів, відповідно. Проте останнім часом у багатьох роботах пропонують покривати їх протеїнами, пептидами і нуклеїновими кислотами, чим досягається висока афінність з'єднання. Зокрема, для пошуку пептидів, що зв'язуються з наночастинок, здійснюють відбір пептидів з великих бібліотек, створених за допомогою методів генної інженерії [15, 71]. Цікаво, що такі пептиди можуть демонструвати дивовижну вибірковість до певного типу неорганічної поверхні, не зв'язуючись із поверхнями інших типів.

Підсумовуючи викладене в цьому розділі, слід зазначити, що сучасні методи модифікації поверхонь, а також афінного з'єднання і самоскладання супрамолекулярних структур дають дослідникам потужні інструменти для конструювання наноконструктивів з потрібними властивостями. Маючи на меті біотехнологічне та біомедичне застосування, дослідник має добре розуміти фізичні й хімічні властивості наноструктур і модифікувати їх відповідно до поставлених завдань.

Біокаталітичні наноконструктиви

Технологічне застосування ензимів має на меті їх використання в умовах, відмінних від тих, у яких вони функціонують у біологічному середовищі. Нанобіотехнологія пропонує нові умови і нові напрями застосування ензимів. Включення ензимів у наноструктури дає змогу не лише підвищити їхню стабільність, але й створити нанореактори з особливими умовами їх функціонування. Адже відомо, що хімічні реакції у нанопросторі відбуваються інакше, ніж у макрооб'ємах [72]. Такі нанопростори можуть бути утворені самоскладанням наноконструктивів. На цьому шляху навіть стираються межі між хімічним каталізом і біокаталізом, оскільки реакціями в наноструктурах можна успішно моделювати ензиматичні процеси [73], а спрямований хімічний синтез на наночастинок може створити модель ензиму з бажаною активністю [74].

Імобілізація і коімобілізація ензимів на наночастинках

Імобілізовані ензими вже давно вийшли за межі лабораторних досліджень і міцно увійшли у виробничу практику. Водночас триває пошук носіїв, які б робили іммобілізовані ензими максимально ефективними, і наночастинки демонструють тут свої істотні переваги [75]. Окрім великого співвідношення поверхні й об'єму нанорозмірні біокаталітичні системи демонструють й інші гідні уваги властивості: високу рухливість у реакційному середовищі, різноманітні ефекти від наявності нанопор і взаємодій між наночастинками (рис. 6). Також вони забезпечують високу стабільність і оптимізують біокаталіз. Наночастинки на магнітній основі полегшують контроль за перебігом реакцій і спрощують технологічні процеси.

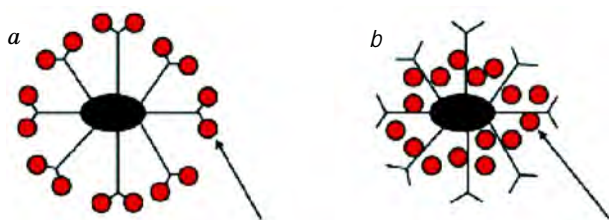


Рис. 6. Два способи включення молекул ліків у дендример: *a* — модифікація поверхні; *b* — ковалентне включення у внутрішній об'єм

До цих переваг можна додати ще одну: іммобілізація на наночастинках дає змогу з великою точністю зібрати кластер ензимних молекул, що каталізує каскад біохімічних перетворень. У таких кластерах продукт однієї реакції не дифундує далеко в розчин, а захоплюється іншим ензимом з відповідним перетворенням [76]. Це робить мультиензимні реакції подібними до тих, що відбуваються в живій клітині, і дуже ефективними.

Високої точності самоскладання мультиензимного комплексу можна досягти, використовуючи ДНК як нанорозмірну матрицю. Таку можливість було нещодавно продемонстровано на прикладі іммобілізації комплексу з глюкозооксидази і пероксидази з активацією біензимного каскаду реакцій [77].

Обернені міцели як нанореактори

Обернені міцели — це нанометрового розміру молекулярні асоціати з детергентів, що в неполярному розчинникові утворюють полярний внутрішній об'єм, здатний включати ензими разом з їхньою гідратною оболонкою, а також водорозчинні субстрати

і продукти реакцій. У біотехнологічних процесах вони набули широкого застосування для екстракції та розділення протеїнів, а також для проведення реакцій з малорозчинними у воді субстратами, чи таких, де утворюються малорозчинні продукти. Цей напрям і далі активно розвивається [78].

Полімерсоми як наносередовище для біореакцій

Полімерсоми, утворені самоскладанням синтетичних блок-кополімерних молекул, є стабільними наноутвореннями. Завдяки можливості включення в їх внутрішній об'єм сизимів та створення пор для проходження субстратів і продуктів реакцій вони можуть бути ідеальними нанореакторами. Більш того, підбір умов «наносередовища» дозволяє змінити напрямок реакцій — від гідролізу до полімерного синтезу [79].

Технологи вчать у природи не лише компартименталізації каталітичних реакцій, а й створенню умов для перетворення субстратів у каскаді реакцій, де продукт однієї реакції стає субстратом іншої. Як виявилось, міцели і ліпосоми недостатньо стабільні для цього, а полімерсоми підходять ідеально [80].

Прискорення біохімічних реакцій у нанокомпозитах

Використання мікрохвиль для прискорення хімічних реакцій має широке коло застосування і навіть зумовило створення спеціальних приладів [81]. Прогрес у біокаталізі скромніший, він обмежений спостереженням зростання активності гіпертермофільних ензимів, що майже неактивні за звичайних умов [82]. Проте останнім часом з'явилися повідомлення, що трипсин, іммобілізований на поверхні силікатних мікросфер із включеними магнітними наночастинками, значно підвищує активність за дії мікрохвиль [83]. Утім, відомо, що саме металеві наночастинки здатні, поглинаючи мікрохвильове випромінення, розігріватися локально, розповсюджуючи нагрів лише на молекулярні відстані й не змінюючи температуру основного середовища. Цим скористалась група дослідників [84], яка домоглася значного прискорення зв'язування аналітів молекулярними сенсорами (зокрема, антитілами), роставаними на поверхні металевих наночастинок. Такий підхід, перенесений на завдання біокаталізу, дасть змогу не лише підсилити дію ензимів, а й управляти нею в широких межах.

Препаративні нанобіотехнології

З розвитком нанобіотехнології такий звичний для кількох поколінь біохіміків метод фракціонування, як колонкова хроматографія, може відійти в минуле. Наноконізати можуть простіше й ефективніше зв'язувати і вилучати певний компонент суміші, а їх регенерація зводиться до простої процедури «у колбі».

Афінна сорбція як метод розділення речовин у суміші невпинно вдосконалюється і використовує як класичні макромолекулярні ліганди, так і нові засоби, зокрема молекулярно-імпринтовані полімери. Це такі полімери, що містять афінні сайти, створені під час їх синтезу в присутності речовини, яку треба виділити або аналізувати. Полімерні ланцюги щільно облягають молекули цієї речовини і створюють максимум взаємодій. Далі речовина видаляється, але ці сайти залишаються. Таку процедуру можна провести з наночастинками таким чином, щоб імпринтований полімер утворився навколо наночастинки [85]. Це може бути магнітна наночастинка [86] чи квантова точка [87]. Важливо, що ця технологія уможливіє розроблення сорбентів, здатних до вибіркового зв'язування широкого класу речовин — від малих органічних молекул до вірусів.

Переваги афінних наноконізатів були б неповними, якби вони не забезпечували простіше, швидше й ефективніше виділення потрібних речовин. Тут до класичних методів фільтрації та діалізу додається більш ефективна седиментація і можливість, у разі магнітних частинок, використовувати магнітне поле. Завдяки високій питомій масі багатьох типів наночастинок (наприклад, $1,96 \text{ г/см}^3$ для силікатів і $19,3 \text{ г/см}^3$ для золота) розділення наночастинок із сорбованими на них речовинами на основі седиментації є дуже простим. Ще простішою виглядає процедура для магнітних наночастинок [88]. Після осадження за допомогою гравітаційного чи магнітного поля залишається проста операція видалення адсорбованої речовини і регенерації наноконізатів.

Наноконізати в клітинних дослідженнях

Ця величезна галузь застосування потребує багатопланового системного розгляду. Ми тут зупинимось лише на деяких аспектах. Слід зауважити, що найбільш ефективними в клітинних дослідженнях є методи побудови зображень з оптичною і, зокрема, флуоресцентною відповіддю. Ці методи да-

ють змогу одержати роздільну здатність на рівні сотень нанометрів, тобто того самого порядку або навіть меншого, ніж довжина хвилі світла видимого діапазону (400–750). Специфічні ж електронні властивості наноматеріалів можна спостерігати на шкалі одиниць до десятків нанометрів, і такі наночастинки виглядають у мікроскопі як точкові випромінювачі. Вони на декілька порядків менші, аніж клітини (розмір найменших бактеріальних клітин $\sim 1000 \text{ нм}$). Це свідчить про те, що наночастинки і їх конізати цілком придатні для побудови внутрішньоклітинних зображень.

Вище було відзначено унікальні фотофізичні властивості квантових точок і великі переваги їх застосування у складі флуоресцентних наноконізатів. Додатковою перевагою їх у клітинних дослідженнях є досить тривалий час флуоресценції (10–40 нс) — більш ніж на один порядок довший за власну флуоресценцію (свічення клітинних пігментів). Тому таку фонову флуоресценцію відсікти дуже просто в інструментах із часовим виміром [89]. Нова техніка двофотонної мікроскопії [90] також ідеально підходить до квантових точок.

Однак існує ще багато невирішених проблем щодо функціоналізації квантових точок і введення їх у клітину [91]. Ці питання слід вирішувати комплексно, з урахуванням поставлених завдань. Одне із запропонованих рішень полягає у зв'язуванні катіонних пептидів, що проникають у клітину [92].

Контрастні агенти в томографії

Методи візуалізації органів і тканин у клінічних дослідженнях пройшли величезний шлях — від Пулюя і Рентгена до сучасних методів ЯМР-томографії, позитронної емісійної томографії (PET) і комп'ютеризованої рентгенівської томографії. Кожен із цих методів має свої недоліки, і спеціалісти розробляють різні можливі прийоми для їх ефективної комбінації. У такій комбінації наночастинки можуть відігравати вкрай важливу роль, підвищуючи роздільну здатність та інформативність зображень [93]. Особливу надію покладають на наночастинки композиційної структури, які мають задовольнити сучасні вимоги до цих методів з одночасною можливістю їх концентрації в об'єктах дослідження, що досягається шляхом біомодифікації.

Магнітні наночастинки здатні підсилювати сигнал ЯМР, і їх введення підсилює контраст в ЯМР-томографії [94]. Перше

покоління таких контрастних агентів уже увійшло в клінічну практику [95]. Нанорозмірні частинки можуть включати радіонукліди (зокрема ^{124}I), що потрібно для ПЕТ, і атоми важких металів, які підсилюють контраст в рентгенівській томографії. Вкрай важливими є властивості поверхні таких частинок. Антибіла, лектини чи аптамери на їхній поверхні здатні забезпечити їх зв'язування з певного виду клітинами. Особливого значення ці нові підходи набувають у разі контрастування ракових пухлин.

Як альтернативу поширеним методам томографії можна розглядати флуоресцентну томографію, що має свої недоліки і переваги [96]. До недоліків слід віднести низьку проникність видимого світла в живі тканини, його сильне екранування і розсіяння. Фактично лише вузький діапазон у близькій ІЧ-ділянці спектра (800–1100 нм) доступний для цього методу, що потребує спеціальної апаратури для дослідження. А до потенційних переваг належить висока інформативність методу у відтворенні метаболічних процесів, оскільки введені флуорофори є не контраст-реагентами, а власне генераторами сигналу. Для його реалізації потрібні не лише 3D-сканери з високим просторовим і часовим розділенням та потужні програми обробки даних, а й флуорофори нового покоління. Великі надії тут покладають на квантові точки, оскільки вони мають дуже високу яскравість і здатні до двофотонного поглинання у близькій ІЧ-ділянці з випроміненням у видимому діапазоні, тобто можуть ефективно контрастувати лімфатичні вузли і ракові пухлини. Показано навіть можливість хірургічних операцій під безпосереднім контролем випромінення квантових точок [97].

Підсумовуючи вищенаведене, слід визнати, що жоден із методів томографії не є ідеальним. Для ЯМР-томографії характерні достатнє просторове розділення, але низька чутливість, а для ПЕТ, навпаки, — висока чутливість за низького розділення [98]. Великі проблеми, пов'язані з поглинанням і розсіянням світла, стоять перед флуоресцентною томографією. Тому найбільш перспективною вважають комбінацію з декількох методів, а для цього необхідні багатофункціональні контраст-агенти і репортери [98]. Водночас це потребує створення наноконструкцій складної будови.

Нанофармацевтика та наномедицина

Нанобіотехнологія пропонує методи і продукти, що зумовлюють радикальні зміни в клінічній практиці. Найбільший прог-

рес спостерігається в діагностиці і лікуванні таких хвороб, як рак, інфекційні та нейродегенеративні патології.

Доставлення та контрольоване вивільнення ліків

Переходячи від властивостей наночастинок і наноконструкцій до їх застосування, розглянемо найважливіші з них. Передусім це, безумовно, наноконструкції-транспортери, що дають змогу адресно і дозовано спрямовувати лікарські засоби до клітин живого організму [99]. Як відомо, більшість засобів, використовуваних у сучасній медицині, є малими молекулами з функціями інгібування окремих ензимів, блокування іонних каналів чи модуляції відповіді клітинних рецепторів. До вкрай важливих лікарських засобів належать пептиди і протеїни, зокрема інсулін. І, зрештою, в це коло починає входити ДНК разом з технологіями генної терапії. Їхню ефективність можна поліпшити шляхом просування у двох напрямках: створенням умов для векторного доставлення ліків у клітини ураженої тканини і задіянням механізмів контрольованого вивільнення цих ліків у тканинах-мішенях. Наноконструкції можуть виконувати такі функції і навіть поєднувати їх (рис. 7).



Рис. 7. Ілюстрація нових можливостей в ензимних технологіях

Упродовж багатьох років учені розробляли фармакологічні засоби доставлення ліків на основі ліпосом [100]. Ліпосомні (на основі фосфоліпідів) форми ліків добре засвоюються організмом і дають можливість доставляти до клітин-мішеней молекули різного розміру і полярності, включаючи антитіла. Одержання ліпосомальних лікарських форм досить просте, проте їхня стабільність невисока. Тому багато зусиль було спрямовано на їх стабілізацію, зокрема шляхом нанесення поверхневого шару полімеру (такого, як поліетиленгліколь) і прошивання ковалентними зв'язками [101]. Такі ліпосоми використовують для збільшення ефективності і зниження токсичності водорозчинних антиракових препаратів, і деякі з них вже увійшли в клінічну практику. В ліпосоми легко вбудовуються молекули, споріднені до клітин-мішеней. Успіх і недоліки ліпосомних технологій надихають учених на пошук нових рішень. Для зв'язування, утримування і повільного вивільнення лікарських речовин почали використовувати нанорозмірні частинки полімерних гідрогелів [102] та дендримери [103, 104] (рис. 8).

На зміну ліпосомам приходять полімерсоми — подібні до них структури, сформовані складанням синтетичних полімерів [105]. Хімічний синтез дозволяє контролювати властивості цих блок-кополімерів і їх складання в наноструктури з вільним внут-

рішнім об'ємом для включення ліків та розвиненою поверхнею, що уможливорює проведення різноманітних хімічних модифікацій з метою збільшення ефективності доставлення цих ліків. Розробляються фактори, інтеграція яких в полімерсоми дозволить контрольовано вивільняти з них ліки [106].

Великою проблемою під час лікування пухлин мозку, а також нейродегенеративних хвороб є подолання гематоенцефалічного бар'єра, що захищає клітини мозку від чужорідних речовин. Проте, як показує досвід провідних лабораторій, і в цьому разі функціональні наночастинки можуть бути використані як ефективні носії ліків [107].

А чи можна управляти концентруванням ліків у певній тканині організму? Чи можна їх вивільняти з наночастинок імпульсно, у певний час і способом? Нанобіотехнологія пропонує оригінальні й ефективні рішення таких складних завдань. Наноккомпозит, наповнений ліками, може містити інтегрований центр специфічного зв'язування з клітиною-мішенню, що забезпечить специфіку дії ліків. Додаткові нанокристалічні включення парамагнітних оксидів заліза дозволять концентрувати наноккомпозити в певному місці організму за допомогою магнітного поля, а також управляти вивільненням ліків за допомогою локального нагрівання [108]. Термочутливі полімери, у структуру яких включено ліки і які мають температурно-залежний структурний перехід, вивільняють ці ліки у процесі нагрівання [109]. Розробляють також різні варіанти вивільнення лікарських препаратів під дією світла та інших компонентів проникного електромагнітного випромінювання [110]. Іде пошук шляхів до повного управління вивільненням ліків з використанням сигналів зворотного зв'язку від пов'язаних з хворобою змін певних функцій організму, концентрацій метаболітів тощо.

Ці досягнення відкривають нові обрії для клінічної практики. Серед останніх досягнень — таблетки інсуліну, які можна ковтати і які уможливають його поступове вивільнення із шлунково-кишкового тракту в кров'яне русло [111].

Генна терапія передбачає доставлення певних генів у живі клітини, що потребує допоміжних факторів — векторів. Ефективними векторами є віруси; їх широко застосовують у дослідженнях. Проте, існують стійкі упередження щодо використання вірусів у генній терапії, передусім те, що вони токсичні й антигенні. Тому для заміни вірусів активно проводять пошук ліпідних і полімерних



Рис. 8. Поліфункціональні наноккомпозити у фармакології та типові носії цих функцій

композицій [112]. У цих спробах синтетичні катіонні ліпіди і водорозчинні нерегулярні катіонні полімери поступаються місцем дендримерам [104]. Маючи високовпорядковану структуру, вони дають змогу здійснювати різноманітні хімічні модифікації, що є перспективним для розпізнавання в генній терапії певного типу клітин. Біфункціоналізовані неорганічні нанокристали також запропоновано для цієї мети [113].

Клітинна терапія

Багато вчених пов'язують майбутній прогрес клінічної медицини з можливостями застосування стовбурових клітин у так званій клітинній терапії хвороб. Насамперед це стосується травматичних станів і дегенеративних патологій [114]. Розвиток цього напрямку неможливий не лише без знання механізмів диференціації цих клітин, а й без інструментів маніпуляції цими клітинами в умовах живого організму. Спрямований рух до потрібних тканин і візуалізація їх місцезнаходження можуть бути здійснені за допомогою включення в них певних наночастинок [115]. Ці проблеми ще далекі від свого розв'язання, проте вважають, що маніпулювання спрямованим рухом може бути здійснено за допомогою інтегрованих у цих клітинах магнітних наночастинок, а їх візуалізація — квантових точок [116].

Кровозамінники

Перші покоління кровозамінників виконували лише одну функцію — запобігти осмотичному шоку за великих втрат крові. Далі з'явилися полімери, що здатні переносити кисень. Розвиток нанобіотехнології дав змогу розробити нові покоління кровозамінників, що здатні не лише переносити кисень і оксид вуглецю, але й бути адекватною заміною еритроцитів. Виконуючи функцію еритроцитів, наноконізати містять під полімерною оболонкою не лише гемоглобін, а й необхідний комплекс еритроцитарних ензимів, зокрема каталазу і супероксид дисмутази, що мають антиоксидантну функцію [117]. Гемоглобін не може бути введений прямо в кров, адже він там легко окиснюється і втрачає гемову групу, а включення в наноконізат разом із комплексом ензимів запобігає цьому процесу. Додаткова перевага таких структур перед донорською кров'ю полягає в тому, що вони не несуть ані антигенів групи крові, ані вірусів [118].

Структуру і властивості таких рукотворних комплексів можна зробити складнішими, включивши додаткові функціональні молекули. Зокрема, існують спроби створення наноконізатів, що містять як гемоглобін, так і фібриноген або його пептидний фрагмент [119]. Їх доцільно застосовувати у випадках, коли значна втрата крові вимагає додаткового введення факторів, що забезпечують її зсідання для загоєння ран.

Наноконізати у гіпертермальній і фотодинамічній терапії пухлин

Як відомо, ракові клітини більш чутливі до підвищених температур, ніж нормальні клітини. Було запропоновано різні методи, що використовують цю властивість для терапії раку. Їх розвиток стримувався відсутністю можливостей для локального і дозованого нагрівання в місці ураження. Завдяки розвиткові нанотехнології з'явилися принципово нові варіанти цих технологій [120]. Зупинимось на двох із них.

Фототермія, що використовує наноконізати з покриттям золотом. Ці конізати поглинають світло в близькій інфрачервоній ділянці, там, де м'які тканини організму відносно прозорі. Лазерне випромінювання, сфокусоване на пухлину, спричинює підвищення температури і загибель ракових клітин [121]. Повідомлялося також про успішну термодеструкцію ракових клітин за допомогою включених в ці клітини наночастинок золота за дії випромінювання радіочастотного діапазону [122].

Магнітна гіпертермія з використанням конізатів із включенням нанокристалів оксидів заліза. Завдяки модифікаціям поверхні вони значно ефективніше захоплюються раковими, ніж нормальними клітинами, а з накладенням магнітного поля розігріваються до температур, що спричинюють їх загибель без руйнації прилеглих нормальних клітин [123]. Більш досконалі наноконізати можуть включати термочутливі полімери, здатні нести хімічні сполуки, такі як лікарські препарати, і вивільнювати їх за термічної дії. Таким чином, на ракову тканину діятиме комплекс деструктивних засобів [124].

Читачі, знайомі з методом фотодинамічної терапії пухлин, можуть легко оцінити переваги цих нових технологій. Фотодинамічна терапія — інший метод фізичної дії на ракові пухлини. В основі його лежить введення в організм певних барвників, що накопичуються в раковій тканині. Під впли-

вом світлового променя в барвникові відбувається фотохімічна реакція, в якій вивільнюється токсичний для клітин синглетний кисень. Підвищенню ефективності цього методу запобігає низька проникність видимого світла в тканини, а зсув поглинання в інфрачервону ділянку знижує енергію електронних переходів у барвнику й унеможлиблює фотохімічний процес. Застосування квантових точок дає змогу радикально змінити технологію фотодинамічної терапії [125]. Завдяки їхній здатності до двофотонного поглинання світла вони можуть збуджуватися в близькій ІЧ-ділянці. Це дозволяє освітлювати тканину в ділянці максимального пропускання світла, а фотодинамічний ефект одержувати у видимій зоні [126]. Додаткова перевага тут також у тому, що двофотонне поглинання світла — це нелінійний процес, що потребує фокусування лазерного променя в дуже малий об'єм, а це суттєво підвищує селективність дії, запобігаючи враженню здорових тканин.

Перспективним вважають використання вуглецевих нанотрубок у протираковій терапії [127]. Оскільки неочищені вуглецеві нанотрубки в суспензії клітин збільшують генерацію активних форм кисню до рівня, що призводить до їх загибелі, а також здатні викликати деструкцію клітин унаслідок гіпертермічного ефекту за дії короткотривалого опромінення у близькому ІЧ- та радіочастотному діапазоні, ці властивості нанотрубок можуть бути застосовані в розробленні методів контрольованого продукування активних форм кисню та фототермії, спрямованих на індукцію окисного стресу та вибірково загибель пухлинних клітин.

Наноматеріали в ортопедичній і стоматологічній практиці

Кісткова тканина є фактично природним наноккомпозитом, що складається з нанокристалів гідроксиапатиту, вбудованих у сформовану з протеїнових фібрил просторову сітку. Тому великі надії покладають на створення нових наноматеріалів, які, маючи аналогічні властивості, могли б слугувати заміниками кісткової тканини або сприяти її утворенню. Сьогоднішні досягнення в цьому напрямі досить скромні, проте вже відомо, що покриття штучними кристалами гідроксиапатиту металевих імплантів запобігає відторгненню і тим самим значно подовжує їх життя [128]. Враховуючи добре розроблену технологію синтезу таких наночастинок [129], можна сподіватися на про-

грес цього застосування. Більш того, вже вдається змодельовати процес біомінералізації і створити нові міцні й біосумісні матеріали [130, 131]. Показано, що вони є не лише біосумісними, але й можуть сприяти регенерації кісткової тканини.

Повідомлялося, що застосування нанокристалічного гідроксиапатиту в стоматологічній практиці сприяє відновленню зубної емалі [132].

Синтетичні вакцини

Традиційно вакцини виготовляють з відповідних патогенів шляхом їх спеціальної обробки (інактивації, фрагментації тощо). Разучі зміни у стратегію створення вакцин внесла нанобіотехнологія. У розробленні синтетичних вакцин використовують наночастинки синтетичних і природних полімерів, що за розміром і формою подібні до вірусів. Широкий набір наночастинок — носіїв антигенів і ад'ювантів може бути використано з метою розроблення вакцин [133, 134]. Епітопи будь-яких патогенів можуть бути легко приєднані до поверхні таких наночастинок, що сприятиме створенню високоспецифічних вакцин. Кон'югація катіонного полімеру з наночастинками золота дає змогу створювати ДНК вакцини [135]. Є повідомлення про створення пептидного наноккомпозита, що нагадує капсид невеликого вірусу. Його експоновані антигенні детермінанти дозволяють одержувати високий титр високоафінних антитіл [136].

Нанотехнології в косметології

Сучасна косметологія потребує створення матеріалів, що здатні проникати в глибокі шари шкіри, несучи біологічно активні компоненти. Як відомо, перше застосування ліпосом було саме в косметиці, і зараз більшість кремів і лосьйонів проти старіння шкіри містять ліпосоми з біологічно активними речовинами. Описані вище методи стабілізації ліпосом не обминули й косметичну індустрію. Для доставлення водонерозчинних інгредієнтів, таких як ретинол і бета-каротин, використовують полімерні нанокapsули [137].

Окремо слід сказати про сонцезахисні креми. Основою багатьох із них є наночастинки оксидів титану (TiO_2) і цинку (ZnO). Вони надійно захищають шкіру від короткохвильового (290–320 нм) ультрафіолетового випромінювання, що викликає запалення і може призвести до раку шкіри.

Цікаво, що у формі наночастинок вони, ефективно розсіюючи світло, не надають шкірі неприємного білого відтінку. Як відомо, такі наночастинок не розчиняються і не деградують у біологічних середовищах. Проте в разі нанесення у вигляді суспензії на шкіру вони не проникають глибоко і не руйнують живі клітини [138].

Застосування нанобіотехнологій у косметичній галузі стає дедалі ширшим. Дослідники не мають права ігнорувати цей величезний ринок, що лише в Європі оцінюється в 10 млрд. євро.

Проблеми захисту інтелектуальної власності

На завершення слід відзначити ще один важливий аспект. Будь-яка галузь, де зароджуються і використовуються нові ідеї, мусить користуватися механізмом захисту цих ідей. Нанобіотехнологія належить до тих галузей, де кожен продукт, що надходить на ринок, має велику наукову складову, і комерційна вартість продукту значною мірою визначається витратами на проведення досліджень. Тому патентний захист інтелектуальної власності має вкрай важливе значення. Патентування і використання патентів є завжди предметом викликів і потрясінь. У нових галузях, таких як нанобіотехнологія, вони загострюються з двох причин: через міждисциплінарний характер розробок і швидкий час їх відмирання під тиском нових технологій. Обговорення цих питань можна знайти в роботах [139, 140], де викладено критерії патентоспроможності нових розробок. Очікують, що впродовж наступних десятиріч нанобіотехнологія і, зокрема, наномедицина пройдуть період «дозрівання», і ліцензійні угоди стануть звичайними явищами, що приноситимуть великі прибутки.

Нанобіотехнологія — це не лише дослідження. Це величезне поле для інвестицій і багатомільярдний фінансовий ринок. Тому для кожного, хто працює в цій галузі, патентна стратегія є необхідною. Інвесторам потрібні не стільки наукові публікації, скільки патенти.

Нанобіотехнологія як галузь науки і технології

У попередніх розділах ми намагалися показати, що нанобіотехнологія, яка виникла на стику двох наукових і практичних дисциплін — нанотехнології та біотехнології,

у свою чергу за своїм предметом, методологією, колом наукових і практичних завдань може бути виділена в окрему галузь. Описуючи властивості наноструктур з біотехнологічним значенням, ми утримувалися від того, аби дати визначення цій новій дисципліні. Однак вважаємо за необхідне зробити це зараз із багатьох причин. По-перше — для стратегічного планування і розвитку програм досліджень. У багатьох країнах схвалені і вже працюють національні наукові програми з нанотехнології, в які нанобіотехнологія входить як окремий розділ. Підтримкою цих досліджень опікуються різні наднаціональні, національні і приватні фонди. Тому важливо знати, підпадають чи не підпадають певні проекти під цю галузь знання. У літературному і патентному пошуку важливо усвідомлювати, в яких класифікаціях такий пошук потрібно здійснювати. І, безумовно, вчені мають розуміти один одного і усвідомлювати свою належність до певної галузі знань.

Визначення нанобіотехнології не може бути зведено до примітивної форми типу «нанобіотехнологія є наукою, яка використовує нанорозмірні частинки», тому що, власне, не розмір, а інші важливі властивості визначають коло пошуку і застосування. З огляду на це вважаємо доречною таку дефініцію: «Нанобіотехнологія — це новонароджена наукова і технологічна дисципліна, що створює наноконкомпозити за участю матеріалів біологічного походження з новими чи поліпшеними властивостями і використовує їх для вивчення і управління процесами в біологічному середовищі». У цьому синтезі ідей, методів і практичних розробок, що формують нанобіотехнологію, нанотехнологічним аспектом є створення і вивчення властивостей корових наночастинок і їх композитів, а біотехнологічний аспект додається функціоналізацією цих матеріалів під конкретні завдання. Коло застосування нових матеріалів є суто біотехнологічним. Варто наголосити, що саме поліструктурні й багатофункціональні наноконкомпозити є об'єктами створення, дослідження і застосування, оскільки ані голі наночастинок, ані біологічні макромолекули будь-якої складності не можуть конкурувати з ними. Такі гібридні системи поєднують молекулярно-пізнавальні та каталітичні властивості біомолекул з електронними, оптичними, магнітними і структурно-конденсуючими властивостями наночастинок. Перспективи цього напрямку яскраві й багатообіцяльні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kumart S. A., Khan M. I. Heterofunctional nanomaterials: fabrication, properties and applications in nanobiotechnology // *J. Nan. Nanotechnol.* — 2010. — V. 10, N 7. — P. 4124–4134.
2. Park S., Hamad–Schifferli K. Nanoscale interfaces to biology // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2010. — V. 14, N 5. — P. 616–622.
3. Щербakov А. Б., Жолобак Н. М., Иванов В. К. Наноматериалы на основе диоксида церия: свойства и перспективы использования в биологии и медицине // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 9–24.
4. Стежка В. А., Леоненко О. Б., Зинченко В. Н. и др. Влияние наночастиц аморфного высокодисперсного кремнезема на систему крови и прооксидантно–антиоксидантное равновесие тканей крыс // Там же. — 2009. — Т. 2, № 2. — С. 86–95.
5. Chi Y. S., Lee J. K., Lee K.–B. et al. Biosurface Organic Chemistry: Interfacial Chemical Reactions for Applications to Nanobiotechnology and Biomedical Sciences // *Bull. Korean Chem. Soc.* — 2005. — V. 26. — P. 361–369.
6. Mulder A., Huskens J., Reinhoudt D. N. Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication // *Org. Biomol. Chem.* — 2004. — V. 2, N 23. — P. 3409–3424.
7. Demchenko A. P. Introduction to fluorescence sensing. — Amsterdam: Springer Verlag, 2009. — 586 p.
8. Medintz I. L., Uyeda H. T., Goldman E. R., Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing // *Nature Materials.* — 2005. — V. 4, N 6. — P. 435–446.
9. Suzuki M., Husimi Y., Komatsu H. et al. Quantum dot FRET biosensors that respond to pH, to proteolytic or nucleolytic cleavage, to DNA synthesis, or to a multiplexing combination // *J. Am. Chem. Soc.* — 2008. — V. 130, N 17. — P. 5720–5725.
10. Medintz I. L., Mattoussi H. Quantum dot–based resonance energy transfer and its growing application in biology // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2009. — V. 11, N 1. — P. 17–45.
11. Veinot J. G. C. Synthesis, surface functionalization, and properties of freestanding silicon nanocrystals // *Chem. Comm.* — 2006. — N 40. — P. 4160–4168.
12. Dubois F., Mahler B., Dubertret B. et al. A versatile strategy for quantum dot ligand exchange // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129, N 3. — P. 482–483.
13. Sapsford K. E., Pons T., Medintz I. L., Mattoussi H. Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots // *Sensors.* — 2006. — V. 6, N 8. — P. 925–953.
14. Jin T., Fujii F., Sakata H. et al. Calixarene–coated water–soluble CdSe–ZnS semiconductor quantum dots that are highly fluorescent and stable in aqueous solution // *Chem. Commun.* — 2005. — N 22. — P. 2829–2831.
15. Tamerler C., Sarikaya M. Molecular biomimetics: nanotechnology and bionanotechnology using genetically engineered peptides // *Philos. Transact A Math. Phys. Eng. Sci.* — 2009. — V. 367, N 1894. — P. 1705–1726.
16. Han M. Y., Gao X. H., Su J. Z., Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules // *Nat. Biotechnol.* — 2001. — V. 19, N 7. — P. 631–635.
17. Burda C., Chen X. B., Narayanan R., El-Sayed M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes // *Chem. Rev.* — 2005. — V. 105, N 4. — P. 1025–1102.
18. Eustis S., El-Sayed M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes // *Chem. Soc. Rev.* — 2006. — V. 35, N 3. — P. 209–217.
19. Демченко О. П., Канюк М. І. Кластери з декількох атомів срібла у флуоресцентних сенсорних технологіях // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 4. — С. 9–19.
20. Zhang L., Zou B., Dong B. et al. Self-assembled monolayers of new dendron-thiols: manipulation of the patterned surface and wetting properties // *Chem. Commun. (Camb).* — 2001. — N 19. — P. 1906–1907.
21. Hamoudi H., Guo Z., Prato M. et al. On the self assembly of short chain alkanedithiols // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2008. — V. 10, N 45. — P. 6836–6841.
22. Landfester K. Synthesis of colloidal particles in miniemulsions // *Ann. Rev. Mater. Res.* — 2006. — V. 36. — P. 231–279.
23. Grayson S. M., Frechet J. M. J. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications // *Chem. Rev.* — 2001. — V. 101, N 12. — P. 3819–3867.
24. Gorman C. B., Smith J. C. Structure-property relationships in dendritic encapsulation // *Acc. Chem. Res.* — 2001. — V. 34, N 1. — P. 60–71.
25. Barrett T., Ravizzini G., Choyke P. L., Kobayashi H. Dendrimers in medical nanotechnology // *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* — 2009. — V. 28, N 1. — P. 12–22.
26. Liu S., Zhang H. L., Liu T. C. et al. Optimization of the methods for introduction of amine groups onto the silica nanoparticle surface // *J. Biomed. Mater. Res. A.* — 2007. — V. 80, N 3. — P. 752–757.
27. Liu Y., Lou C., Yang H. et al. Silica nanoparticles as promising drug/gene delivery carriers and fluorescent nano–probes: recent advances // *Curr. Cancer. Drug. Targets.* — 2011. — V. 11, N 2. — P. 156–163.
28. Lian W., Litherland S. A., Badrane H. et al. Ultrasensitive detection of biomolecules with

- fluorescent dye-doped nanoparticles // *Anal. Biochem.* — 2004. — V. 334, N1. — P. 135–144.
29. Yao G., Wang L., Wu Y. R. et al. FloDots: luminescent nanoparticles // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2006. — V. 385, N 3. — P. 518–524.
 30. Frey N. A., Peng S., Cheng K., Sun S. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage // *Chem. Soc. Rev.* — 2009. — V. 38, N 9. — P. 2532–2542.
 31. Gao J., Gu H., Xu B. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications // *Acc. Chem. Res.* — 2009. — V. 42, N 8. — P. 1097–10107.
 32. Xie J., Huang J., Li X. et al. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications // *Curr. Med. Chem.* — 2009. — V. 16, N 10. — P. 1278–1294.
 33. Islam T., Josephson L. Current state and future applications of active targeting in malignancies using superparamagnetic iron oxide nanoparticles // *Cancer Biomark.* — 2009. — V. 5, N 2. — P. 99–107.
 34. Du G., Liu Z., Wang D. et al. Characterization of magnetic fluorescence Fe₃O₄/CdSe nanocomposites // *J. Nanosci Nanotechnol.* — 2009. — V. 9, N 2. — P. 1304–1307.
 35. Zaichenko O., Stoika R., Mitina N. et al. Novel funktional nanoscale composites on the basis of oligoperoxide surfactants: synteis and biomedical applications // *Біотехнологія.* — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 86–99.
 36. Hoeben F. J., Jonkheijm P., Meijer E. W., Schenning A. P. About supramolecular assemblies of pi-conjugated systems // *Chem. Rev.* — 2005. — V. 105, N 4. — P. 1491–546.
 37. Wosnick J. H., Liao J. H., Swager T. M. Layer-by-layer poly(phenylene ethynylene) films on silica microspheres for enhanced sensory amplification // *Macromol.* — 2005. — V. 38, N 22. — P. 9287–9290.
 38. Zhang L., Feng W. Dendritic conjugated polymers // *Progress in Chemistry.* — 2007. — V. 19, N 2–3. — P. 337–349.
 39. Jeong J., Cho M., Lim Y. T. et al. Synthesis and characterization of a photoluminescent nanoparticle based on fullerene-silica hybridization // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2009. — V. 48, N 29. — P. 5296–5299.
 40. Choi J. H., Strano M. S. Solvatochromism in single-walled carbon nanotubes // *Appl. Phys. Lett.* — 2007. — V. 90, N 22. — P. 223114.
 41. Матишевська О. П., Прилуцька С. В., Гринюк І. І. Фулерени C₆₀ — біологічно активні молекули. 1. Фізико-хімічні властивості та біодоступність // *Біотехнологія.* — 2010. — Т. 3, № 1. — С. 18–26.
 42. Prylutska S. V., Burlaka A. P., Prylutsky Yu. I. et al. Comperative stady of antitumor effect of pristine C₆₀ fullerenes and doxorubicin // *Там само.* — 2011. — Т. 4, № 6. — С. 82–87.
 43. Zhang W., Sprafke J. K., Ma M. et al. Modular functionalization of carbon nanotubes and fullerenes // *J. Am. Chem. Soc.* — 2009. — V. 131, N 24. — P. 8446–8454.
 44. Wildgoose G. G., Banks C. E., Compton R. G. Metal nanoparticles and related materials supported on carbon nanotubes: methods and applications // *Small.* — 2006. — V. 2, N 2. — P. 182–193.
 45. Li Z., Wu Z., Li K. The high dispersion of DNA-multiwalled carbon nanotubes and their properties // *Anal. Biochem.* — 2009. — V. 387, N 2. — P. 267–270.
 46. Yang R., Jin J., Chen Y. et al. Carbon Nanotube-Quenched Fluorescent Oligonucleotides: Probes that Fluoresce upon Hybridization // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2008. — V. 130, N2. — P. 8351–8358.
 47. Burlaka A. P., Lukin S. M., Prylutska S. V. et al. Generation of reactive oxygen species by multi-walled carbon nanotubes under light irradiation // *Біотехнологія.* — 2008. — Т. 3, № 4. — С. 62–66.
 48. Ротко Д. М., Прилуцька С. В., Богуцька К. І., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новітні матеріали для нейроінженерії // *Там само.* — 2011. — Т. 4, № 5. — С. 9–24.
 49. Gao X. Y., Matsui H. Peptide-based nanotubes and their applications in bionanotechnology // *Adv. Mater.* — 2005. — V. 17, N 17. — P. 2037–2050.
 50. Brea R. J., Vazquez M. E., Mosquera M. et al. Controlling multiple fluorescent signal output in cyclic peptide-based supramolecular systems // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129, N 6. — P. 1653–1657.
 51. Castelletto V., Hamley I. W. Self assembly of a model amphiphilic phenylalanine peptide/polyethylene glycol block copolymer in aqueous solution // *Biophys. Chem.* — 2009. — V. 141, N 2–3. — P. 169–174.
 52. del Mercato L. L., Pompa P. P., Maruccio G. et al. Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, N 46. — P. 18019–18024.
 53. Abu-Salah K. M., Ansari A. A., Alrokayan S. A. DNA-based applications in nanobiotechnology // *J. Biomed. Biotechnol.* — 2010. — V. 2010. — P. 715295.
 54. Fendt L. A., Bouamaied I., Thoni S. et al. DNA as supramolecular scaffold for porphyrin arrays on the nanometer scale // *J. Amer. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129, N 49. — P. 15319–15329.
 55. Weizmann Y., Braunschweig A. B., Wilner O. I. et al. A polycatenated DNA scaffold for the one-step assembly of hierarchical nanostructures // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2008. — V. 105, N 14. — P. 5289–5294.
 56. Kuzyk A., Laitinen K. T., Torma P. DNA origami as a nanoscale template for protein

- assembly // *Nanotechnol.* — 2009. — V. 20, N 23. — P. 235305.
57. Singh P., Destito G., Schneemann A., Manchester M. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting // *J. Nanobiotechnol.* — 2006. — V. 4, N2. — Doi: 101186/1477-3155-4-2. — P. 2.
58. Ricca E., Cutting S. M. Emerging Applications of Bacterial Spores in Nanobiotechnology // *Ibid.* — 2003. — V. 1, N 1. — P. 6.
59. Corbin P. S., Lawless L. J., Li Z. T., Ma Y. G. et al. Discrete and polymeric self-assembled dendrimers: Hydrogen bond-mediated assembly with high stability and high fidelity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2002. — V. 99, N 8. — P. 5099–5104.
60. Vriezema D. M., Aragonés M. C., Elemans J. et al. Self-assembled nanoreactors // *Chem. Rev.* — 2005. — V. 105, N 4. — P. 1445–1489.
61. Merrill M. H., Sun C. T. Fast, simple and efficient assembly of nanolayered materials and devices // *Nanotechnol.* — 2009. — V. 20, N 7. — P. 75606.
62. Srivastava S., Kotov N. A. Composite Layer-by-Layer (LBL) assembly with inorganic nanoparticles and nanowires // *Acc. Chem. Res.* — 2008. — V. 41, N 12. — P. 1831–41.
63. Elbakry A., Zaky A., Liebl R. et al. Layer-by-layer assembled gold nanoparticles for siRNA delivery // *Nano Lett.* — 2009. — V. 9, N 5. — P. 2059–2064.
64. Sleytr U. B., Egelseer E. M., Ilk N. et al. S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit // *Febs J.* — 2007. — V. 274, N 2. — P. 323–334.
65. Wilchek M., Bayer E. A. The avidin-biotin complex in bioanalytical applications // *Anal. Biochem.* — 1988. — V. 171, N 1. — P. 1–32.
66. Shinkai M. Functional magnetic particles for medical application // *J. Bioscience and Bioengineering.* — 2002. — V. 94, N 6. — P. 606–613.
67. Mornet S., Lambert O., Dugué E., Brisson A. The formation of supported lipid bilayers on silica nanoparticles revealed by cryoelectron microscopy // *Nano Lett.* — 2005. — V. 5, N 2. — P. 281–285.
68. Carmona-Ribeiro A. M. Bilayer vesicles and liposomes as interface agents // *Chem. Soc. Rev.* — 2001. — V. 30, N 4. — P. 241–247.
69. Discher B. M., Bermudez H., Hammer D. A. et al. Cross-linked polymersome membranes: Vesicles with broadly adjustable properties // *J. Phys. Chem. B.* — 2002. — V. 106, N 11. — P. 2848–2854.
70. Mabrouk E., Cuvelier D., Brochard-Wyart F. et al. Bursting of sensitive polymersomes induced by curling // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2009. — V. 106, N 18. — P. 7294–7298.
71. Sarikaya M., Tamerler C., Jen A. K. et al. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology // *Nat. Mater.* — 2003. — V. 2, N 9. — P. 577–585.
72. Koblenz T. S., Wassenaar J., Reek J. N. Reactivity within a confined self-assembled nanospace // *Chem. Soc. Rev.* — 2008. — V. 37, N 2. — P. 247–262.
73. Fiedler D., Leung D. H., Bergman R. G., Raymond K. N. Selective molecular recognition, C-H bond activation, and catalysis in nanoscale reaction vessels // *Acc. Chem. Res.* — 2005. — V. 38, N 4. — P. 349–358.
74. Huang X., Liu Y., Liang K. et al. Construction of the active site of glutathione peroxidase on polymer-based nanoparticles // *Biomacromol.* — 2008. — V. 9, N 5. — P. 1467–1473.
75. Wang P. Nanoscale biocatalyst systems // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2006. — V. 17, N 6. — P. 574–579.
76. Wilner O. I., Weizmann Y., Gill R. et al. Enzyme cascades activated on topologically programmed DNA scaffolds // *Nat. Nanotechnol.* — 2009. — V. 4, N 4. — P. 249–254.
77. Wilner O. I., Shimron S., Weizmann Y. et al. Self-assembly of enzymes on DNA scaffolds: en route to biocatalytic cascades and the synthesis of metallic nanowires // *Nano Lett.* — 2009. — V. 9, N 5. — P. 2040–2043.
78. Tonova K., Lazarova Z. Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion // *Biotechnol Adv.* — 2008. — V. 26, N 6. — P. 516–532.
79. Nallani M., de Hoog H. P., Cornelissen J. J. et al. Polymersome nanoreactors for enzymatic ring-opening polymerization // *Biomacromol.* — 2007. — V. 8, N 12. — P. 3723–3728.
80. Vriezema D. M., Garcia P. M., Sancho Oltra N. et al. Positional assembly of enzymes in polymersome nanoreactors for cascade reactions // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* — 2007. — V. 46, N 39. — P. 7378–7382.
81. Tokuyama H., Nakamura M. Acceleration of reaction by microwave irradiation // *J. Synt. Org. Chem. Japan.* — 2005. — V. 63, N 5. — P. 523–538.
82. Young D. D., Nichols J., Kelly R. M., Deiters A. Microwave activation of enzymatic catalysis // *J. Am. Chem. Soc.* — 2008. — V. 130, N 31. — P. 10048–10049.
83. Lin S., Yao G., Qi D. et al. Fast and efficient proteolysis by microwave-assisted protein digestion using trypsin-immobilized magnetic silica microspheres // *Anal. Chem.* — 2008. — V. 80, N 10. — P. 3655–3665.
84. Aslan K., Geddes C. D. New tools for rapid clinical and bioagent diagnostics: microwaves and plasmonic nanostructures // *Analyst.* — 2008. — V. 133, N 11. — P. 1469–1480.
85. Tokonami S., Shiigi H., Nagaoka T. Review: micro- and nanosized molecularly imprinted polymers for high-throughput analytical applications // *Anal. Chim. Acta.* — 2009. — V. 641, N 1–2. — P. 7–13.

86. Wang X., Wang L., He X. et al. A molecularly imprinted polymer-coated nanocomposite of magnetic nanoparticles for estrone recognition // *Talanta*. — 2009. — V. 78, N 2. — P. 327–332.
87. Lin H. Y., Ho M. S., Lee M. H. Instant formation of molecularly imprinted poly(ethylene-co-vinyl alcohol)/quantum dot composite nanoparticles and their use in one-pot urinalysis // *Biosens. Bioelectron.* — 2009. — V. 25, N 3. — P. 579–586.
88. Li L., He X., Chen L., Zhang Y. Preparation of core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for recognition of bovine hemoglobin // *Chem. Asian. J.* — 2009. — V. 4, N 2. — P. 286–293.
89. Hanley Q. S., Arndt-Jovin D. J., Jovin T. M. Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging spectroscopy // *Appl. Spectrosc.* — 2002. — V. 56. — P. 155–156.
90. Quentmeier S., Denicke S., Gericke K. H. Two-Color Two-Photon Fluorescence Laser Scanning Microscopy // *J. Fluoresc.* — 2009. — V. 19, N 6. — P. 1037–1043.
91. Biju V., Itoh T., Ishikawa M. Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging // *Chem. Soc. Rev.* — 2010. — V. 39, N 8. — P. 3031–3056.
92. Delehanty J. B., Medintz I. L., Pons T. et al. Self-assembled quantum dot-peptide bioconjugates for selective intracellular delivery // *Biocon. Chem.* — 2006. — V. 17, N 4. — P. 920–927.
93. Cheon J., Lee J. H. Synergistically integrated nanoparticles as multimodal probes for nanobiotechnology // *Acc. Chem. Res.* — 2008. — V. 41, N 12. — P. 1630–1640.
94. Sun C., Lee J. S., Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2008. — V. 60, N 11. — P. 1252–1265.
95. Sosnovik D. E., Nahrendorf M., Weissleder R. Magnetic nanoparticles for MR imaging: agents, techniques and cardiovascular applications // *Basic. Res. Cardiol.* — 2008. — V. 103, N 2. — P. 122–130.
96. Bakalova R., Zhelev Z., Gadjeva V. Quantum dots versus organic fluorophores in fluorescent deep-tissue imaging—merits and demerits // *Gen. Physiol. Biophys.* — 2008. — V. 27, N 4. — P. 231–242.
97. Kim S., Lim Y. T., Soltesz E. G. et al. Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping // *Nat. Biotechnol.* — 2004. — V. 22, N 1. — P. 93–97.
98. Jennings L. E., Long N. J. 'Two is better than one'—probes for dual-modality molecular imaging // *Chem. Commun. (Camb.)*. — 2009. — N 24. — P. 3511–3524.
99. Lee P. Y., Wong K. K. Nanomedicine: a new frontier in cancer therapeutics // *Curr. Drug. Deliv.* — 2011. — V. 8, N 3. — P. 245–253.
100. Samad A., Sultana Y., Aqil M. Liposomal drug delivery systems: an update review // *Ibid.* — 2007. — V. 4, N 4. — P. 297–305.
101. Sarker D. K. Sculpted amphiphilic liposomal particles for modifiable medicinal applications // *Curr. Drug. Discov. Technol.* — 2009. — V. 6, N 1. — P. 52–58.
102. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2008. — V. 60, N 15. — P. 1638–1649.
103. Paleos C. M., Tsiourvas D., Sideratou Z. Molecular engineering of dendritic polymers and their application as drug and gene delivery systems // *Mol. Pharm.* — 2007. — V. 4, N 2. — P. 169–188.
104. Paleos C. M., Tziveleka L. A., Sideratou Z., Tsiourvas D. Gene delivery using functional dendritic polymers // *Expert. Opin. Drug. Deliv.* — 2009. — V. 6, N 1. — P. 27–38.
105. Levine D. H., Ghoroghchian P. P., Freudenberg J. et al. Polymersomes: a new multi-functional tool for cancer diagnosis and therapy // *Methods*. — 2008. — V. 46, N 1. — P. 25–32.
106. Christian D. A., Cai S., Bowen D. M. et al. Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 2009. — V. 71, N 3. — P. 463–474.
107. Patel M. M., Goyal B. R., Bhadada S. V. et al. Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery // *CNS Drugs*. — 2009. — V. 23, N 1. — P. 35–58.
108. Mart R. J., Liem K. P., Webb S. J. Magnetically-controlled release from hydrogel-supported vesicle assemblies // *Chem. Commun. (Camb.)*. — 2009. — N 17. — P. 2287–2289.
109. Brazel C. S. Magnetothermally-responsive nanomaterials: combining magnetic nanostructures and thermally-sensitive polymers for triggered drug release // *Pharm. Res.* — 2009. — V. 26, N 3. — P. 644–656.
110. Alvarez-Lorenzo C., Bromberg L., Concheiro A. Light-sensitive Intelligent Drug Delivery Systems // *Photochem. Photobiol.* — 2009. — V. 85, N 4. — P. 848–860.
111. Woitiski C. B., Veiga F., Ribeiro A., Neufeld R. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 2009. — V. 73, N 1. — P. 25–33.
112. Mintzer M. A., Simanek E. E. Nonviral vectors for gene delivery // *Chem. Rev.* — 2009. — V. 109, N 2. — P. 259–302.
113. Chowdhury E. H. Self-assembly of DNA and cell-adhesive proteins onto pH-sensitive inorganic crystals for precise and efficient transgene delivery // *Curr. Pharm. Des.* — 2008. — V. 14, N 22. — P. 2212–2228.
114. Engel E., Michiardi A., Navarro M. et al. Nanotechnology in regenerative medicine:

- the materials side // Trends Biotechnol. — 2008. — V. 26, N 1. — P. 39–47.
115. *Solanki A., Kim J. D., Lee K. B.* Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging // Nanomed. — 2008. — V. 3, N 4. — P. 567–578.
116. *Ferreira L., Karp J. M., Nobre L., Langer R.* New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells // Cell. Stem. Cell. — 2008. — V. 3, N 2. — P. 136–146.
117. *Chang T. M.* Blood substitutes based on nanobiotechnology // Trends Biotechnol. — 2006. — V. 24, N 8. — P. 372–377.
118. *Chang T. M.* Blood replacement with nanobiotechnologically engineered hemoglobin and hemoglobin nanocapsules // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. — 2010. — V. 2, N 4. — P. 418–430.
119. *Okamura Y., Takeoka S., Eto K. et al.* Development of fibrinogen gamma-chain peptide-coated, adenosine diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute // J. Thromb. Haemost. — 2009. — V. 7, N 3. — P. 470–477.
120. *Jain K. K.* Advances in the field of nanooncology // BMC Med. — 2010. — V. 8. — P. 83.
121. *Terentyuk G. S., Maslyakova G. N., Suleymanova L. V. et al.* Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: toward cancer phototherapy // J. Biomed. Opt. — 2009. — V. 14, N 2. — P. 021016.
122. *Gannon C. J., Patra C. R., Bhattacharya R. et al.* Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells // J. Nanobiotechnol. — 2008. — doi: 10.1186/1477-3155-6-2.
123. *Tseng H. Y., Lee G. B., Lee C. Y. et al.* Localised heating of tumours utilising injectable magnetic nanoparticles for hyperthermia cancer therapy // IET Nanobiotechnol. — 2009. — V. 3, N 2. — P. 46.
124. *Gazeau F., Levy M., Wilhelm C.* Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy // Nanomed. — 2008. — V. 3, N 6. — P. 831–844.
125. *Juzenas P., Chen W., Sun Y. P. et al.* Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer // Adv. Drug. Deliv. Rev. — 2008. — V. 60, N 15. — P. 1600–1614.
126. *Dayal S., Burda C.* Semiconductor quantum dots as two-photon sensitizers // J. Am. Chem. Soc. — 2008. — V. 130, N 10. — P. 2890–2891.
127. *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.
128. *Christenson E. M., Anseth K. S., van den Beucken J. J. et al.* Nanobiomaterial applications in orthopedics // J. Orthop. Res. — 2007. — V. 25, N 1. — P. 11–22.
129. *Gomes P. J., Silva V. M., Quadros P. A. et al.* A highly reproducible continuous process for hydroxyapatite nanoparticles synthesis // J. Nanosci. Nanotechnol. — 2009. — V. 9, N 6. — P. 3387–3395.
130. *Nayar S., Sinha M. K., Basu D., Sinha A.* Synthesis and sintering of biomimetic hydroxyapatite nanoparticles for biomedical applications // J. Mater. Sci. Mater. Med. — 2006. — V. 17, N 11. — P. 1063–1068.
131. *Zhang E., Zou C.* Porous titanium and silicon-substituted hydroxyapatite biomodification prepared by a biomimetic process: characterization and *in vivo* evaluation // Acta Biomater. — 2009. — V. 5, N 5. — P. 1732–1741.
132. *Huang S. B., Gao S. S., Yu H. Y.* Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion *in vitro* // Biomed Mater. — 2009. — V. 4, N 3. — P. 34104.
133. *Peek L. J., Middaugh C. R., Berkland C.* Nanotechnology in vaccine delivery // Adv. Drug. Deliv. Rev. — 2008. — V. 60, N 8. — P. 915–928.
134. *Shahiwala A., Vyas T. K., Amiji M. M.* Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery // Recent. Pat. Drug. Deliv. Formul. — 2007. — V. 1, N 1. — P. 1–9.
135. *Zhou X., Zhang X., Yu X. et al.* The effect of conjugation to gold nanoparticles on the ability of low molecular weight chitosan to transfer DNA vaccine // Biomaterials. — 2008. — V. 29, N 1. — P. 111–117.
136. *Scheerlinck J. P., Greenwood D. L.* Virus-sized vaccine delivery systems // Drug. Discov. Today. — 2008. — V. 13, N 19–20. — P. 882–887.
137. *Choi M. J., Maibach H. I.* Liposomes and niosomes as topical drug delivery systems // Skin. Pharmacol. Physiol. — 2005. — V. 18, N 5. — P. 209–219.
138. *Nohynek G. J., Lademann J., Ribaud C., Roberts M. S.* Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety // Crit. Rev. Toxicol. — 2007. — V. 37, N 3. — P. 251–277.
139. *Bawa R.* Patents and nanomedicine // Nanomed. — 2007. — V. 2, N 3. — P. 351–374.
140. *Bawa R., Bawa S. R., Maebius S. B. et al.* Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents // Nanomedicine. — 2005. — V. 1, N 2. — P. 150–158.

**НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ:
ПУТЬ В НОВЫЙ МИКРОМИР,
СОЗДАННЫЙ СИНТЕЗОМ ХИМИИ
И БИОЛОГИИ**

*А. П. Демченко
В. И. Назаренко*

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

E-mail: alexdem@ukr.net

Частицы размером 1–100 нм и композиты из молекул и таких частиц неорганической, органической и биологической природы обладают уникальными свойствами, которые не свойственны другим материалам, поэтому их применение обуславливает революционные изменения в существующих технологиях и создание новых. В обзоре описаны строение и свойства таких нанокompозитов, а также их разнообразное биотехнологическое применение. Обсуждаются новые возможности для исследований и применение в индустриальной энзимологии, связанные с включением энзимов в наноструктуры. Новейшие технологии охватывают и сферу здравоохранения, что способствовало возникновению нанофармакологии и наномедицины. Здесь впервые появились возможности для контролируемой доставки и высвобождения лекарств в клетках-мишенях. Рассмотрена также проблема патентной защиты новых идей в этой области.

Предложено развернутое определение новой науки нанобиотехнологии.

Ключевые слова: нанобиотехнология, наночастицы, самосборка, нанокompозиты, наноматериалы в медицине, наноэнзимология.

**NANOBIOTECHNOLOGY:
THE ROUTE TO NEW MICROWORLD
CREATED BY SYNTHESIS OF CHEMISTRY
AND BIOLOGY**

*A. P. Demchenko
V. I. Nazarenko*

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

E-mail: alexdem@ukr.net

The particles of 1–100 nm in size and the composites of molecules and these particles of inorganic, organic and biological nature possess unique properties that cannot be attributed to other materials. Their application induces revolutionary changes in existing technologies and creation of new technologies. In this review we analyze the properties of such nanocomposites in relation to their structure and also their versatile applications in biotechnology. We discuss different possibilities for research and development in industrial enzymology that appear due to inclusion of enzymes into nanostructures. Revolutionary new technologies came to the healthcare and brought generation of nanopharmacology and nanomedicine. Here, for the first time the possibilities appeared for controlled targeted delivery of drugs and their controlled release in target cells. We also discuss the problem of patent protection of new ideas in this area.

Expanded definition of nanotechnology is proposed.

Key words: nanobiotechnology, nanoparticles, self-assembly, nanocomposites, nanomaterials for medicine, nanoenzymology.

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ЗА УЧАСТЮ SH2-ДОМЕНІВ

В. В. ГУРМАЧ, О. М. БАЛИНСЬКИЙ, М. О. ПЛАТОНОВ,
П. О. БОРИСКО, Ю. І. ПРИЛУЦЬКИЙ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: prylut@ukr.net

Отримано 11.11.2011

Створення новітніх фармацевтичних препаратів для лікування хвороб, пов'язаних з порушеннями функціонування протеїнових комплексів, є важливою медико-соціальною проблемою, яка потребує комплексного підходу до її вирішення, зокрема врахування останніх досягнень в галузі комп'ютерного моделювання біологічних процесів.

В огляді узагальнено дані літератури щодо структури, функціонування, класифікації, молекулярних порушень доменів SH2 (Src Homology), а також подано характеристику методу молекулярного докінгу, як одного з найперспективніших методів фармакологічних досліджень. Показано, що найбільший інтерес з погляду практичного застосування для отримання нових патентоспроможних інгібіторів протеїн-протеїнових взаємодій методом молекулярного докінгу становлять саме SH2-домени, оскільки вони беруть активну участь у внутрішньоклітинній передачі сигналів, виступаючи як посередники цих специфічних взаємодій.

Ключові слова: протеїнові комплекси, SH2-домени, молекулярний докінг.

Біологічні процеси у живих системах відбуваються за участю великого різноманіття протеїнових молекул, які функціонують завдяки взаємодії одна з одною у складі стабільних або динамічних протеїнових комплексів. Кількість і різноманітність протеїнових взаємодій настільки велика, що графічне подання їх має вигляд надзвичайно складної і заплутаної мережі [1–7]. А відтак знання просторової структури комплексів клітинних протеїнів та їхніх лігандів є важливим кроком на шляху до розуміння механізмів їх функціонування.

У наш час методи комп'ютерного моделювання слугують невід'ємною частиною фундаментальних досліджень, метою яких, зокрема в біології, є з'ясування молекулярних механізмів функціонування протеїнів. Метод молекулярного моделювання, який дає змогу віднаходити комплекси ліганду та протеїну-мішені, називається молекулярним докінгом (МД). Саме за його допомогою створюють бібліотеки інгібіторів протеїн-протеїнових взаємодій на прикладі SH2-, SH3-, PDZ-, бромо-, хромо-доменів і т. д [8].

Найменш дослідженими серед них є SH2-домени. Вони беруть активну участь у внутрішньоклітинній сигналізації, відіграють важливу роль в онтогенезі як посе-

редники специфічних протеїн-протеїнових взаємодій. Наприклад, шляхом блокування SH2-доменів пригнічується прогресування злоякісних пухлин, модулюється передача сигналів на клітинному та органному рівнях.

Метою цієї роботи є узагальнення даних літератури щодо комп'ютерних методів вивчення поведінки SH2-доменів, як важливого фактора внутрішньоклітинного функціонування, та взаємодії їх із речовинами, які модулюють активність і характеристики цих молекулярних комплексів, для створення унікального алгоритму дослідження SH2-доменів з використанням МД, що уможливіє його подальше застосування для передбачення можливих внутрішньоклітинних порушень, пов'язаних з дією SH2-доменів, та їх терапевтичного усунення.

Молекулярний докінг

Зв'язки між протеїнами, нуклеїновими кислотами, вуглеводами та ліпідами відіграють головну роль у передачі сигналів. Окрім того, взаємна орієнтація двох взаємодіючих структур впливає на тип і силу сигналу. За допомогою комп'ютерного моделювання міжмолекулярних взаємодій вдається отримати

оптимальні просторові структурні комплекси ліганду та протеїну-мішені [9]. Їх детальний аналіз дає змогу визначити основні сили, що сприяють зв'язуванню найбільш комплементарних один до одного частин молекул. Як наслідок, існує можливість цілеспрямовано впливати на характеристики такого зв'язування модифікацією однієї або декількох взаємодіючих молекул. Головним результатом МД-розрахунку є визначення оптимальної взаємної просторової орієнтації ліганду/протеїну та протеїну-мішені [10] (рис. 1).

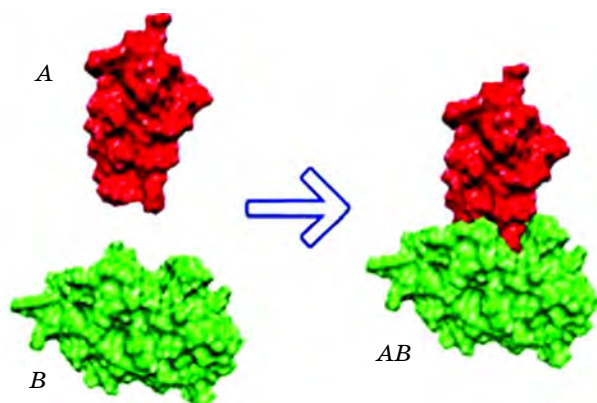


Рис. 1. Схематичне зображення взаємодії протеїнів A і B

МД проводять для прогнозування міцності зв'язування тих чи інших молекулярних комплексів і типу вихідного сигналу, орієнтації малих молекул (можливо, певного фармацевтичного препарату) під час взаємодії з протеїном-мішенню, щоб отримати необхідну інформацію про силу зв'язування та їхню функціональну активність. Отже, цей метод є перспективним для розроблення лікарських препаратів [11]. Виходячи з цього значні зусилля наразі спрямовані на вдосконалення чисельних методів МД з метою передбачення міжмолекулярних взаємодій. Розглянемо два основних методи МД, які зарекомендували себе якнайкраще, — гнучкий докінг та жорсткий докінг.

Метод жорсткого докінгу не враховує конформаційну рухливість як для протеїну, так і для ліганду. У цьому разі завдання докінгу зводиться до пошуку оптимальної орієнтації ліганду (в конкретній конформації) у сайті зв'язування протеїну [12]. З погляду обчислення цей метод є простим [13–15], однак дослідження конформаційно-рухливих лігандів за ним провести складно. Зазвичай жорсткий докінг використовують для оцінювання енергії конкретного молекулярного комплексу [16–18].

Гнучкий докінг враховує конформаційну рухливість ліганду. По суті, він зводиться до автоматичного перебирання конформацій та орієнтацій ліганду в сайті зв'язування і оцінювання енергії міжмолекулярних взаємодій. Рухи включають трансформацію жорсткого тіла ліганду, повороти, зміну його внутрішньої структури і торсійного кута. Кожен рух у конформаційному просторі ліганду зумовлює зміну енергії в системі й після кожного такого руху потрібно ще раз обчислювати її загальну енергію. Головною перевагою цього методу є те, що він моделює процеси, наближені до реальності, тобто ті, які відбуваються за міжмолекулярних взаємодій. Недоліком його є те, що він потребує тривалого часу для розрахунків.

Використання МД є неможливим без застосування так званих скоринг-функцій, за допомогою яких описують міцність зв'язування між двома молекулами. Найчастіше одна з молекул — це невелика органічна сполука, а друга — її біологічна мішень (рецептор, протеїн) [19]. Також скоринг-функції потрібні для вивчення взаємодії між двома різними макромолекулярними структурами, наприклад між двома протеїнами [20] або між протеїном і лігандом, ДНК [21].

Існує три основних класи скоринг-функцій:

1) силове поле: сила зв'язування визначається сумою міжмолекулярних ван-дер-ваальсових та електростатичних взаємодій між усіма атомами двох міжмолекулярних комплексів;

2) емпіричний: базується на підрахунку числа різних типів взаємодій між двома досліджуваними молекулами [22], зокрема кількості атомів ліганду і рецептора, що контактують між собою, або комплексу доступної для розчинника поверхні порівняно з вільним лігандом і протеїном;

3) заснований на знанні/передбаченні: ґрунтується на статистичних спостереженнях міжмолекулярних контактів між 3D-структурами. Структури зазвичай беруть з 3D баз даних (наприклад, Кембриджська структурна база даних). Припускають, що близькі міжмолекулярні взаємодії між різними атомами або функціональними групами виникають випадково частіше, ніж цього очікують. Як наслідок, вони роблять значний внесок у міжмолекулярне зв'язування.

Незважаючи на існування різноманітних варіантів МД, у кожному окремому випадку алгоритм проведення докінгу буде унікальним і залежатиме від структурних та функціональних особливостей досліджуваних

об'єктів. У класичному варіанті МД завдання алгоритму конформаційного пошуку зводиться до перебирання комплексів, утворених унаслідок варіацій торсійних кутів ліганду та його руху, як цілої частини, відносно нерухомої структури протеїну-мішені.

Сучасні алгоритми МД можна звести до такої простої схеми, як «ключ–замок», де потрібно знайти правильну орієнтацію ключа, який відкриває замок. Ту частина протеїну, з якою взаємодіє ліганд, розглядають як замок, а сам ліганд — як ключ. Але для проведення якісного МД потрібно врахувати рухливість як ліганду, так і протеїну, причому діапазон рухливості може бути різним — від невеликих рухів бічних частин до масштабних доменних рухів [23]. Якщо розглядати структуру протеїну в комплексі з лігандом близького хемотипу, то результат МД буде точнішим, ніж якщо брати інший скефолд ліганду або взагалі використовувати апоформу. Це неможливо зробити в рамках схеми «ключ–замок», однак вдається за допомогою схеми «рука в рукавичці» [24].

На перший погляд логічним розв'язанням цієї проблеми є врахування рухливості протеїну в комп'ютерній програмі, за допомогою якої проводять МД. Наявні обчислювальні засоби не дозволяють проводити таке моделювання за прийнятний час для великих баз даних, оскільки молекула протеїну дуже велика і врахування її рухливості за всіма ступенями вільності може призвести до так званого комбінаторного вибуху (астрономічного збільшення числа можливих варіантів). Лише у деяких програмах передбачена обмежена рухливість сайтів зв'язування протеїну (як правило, на рівні невеликої адаптації конформацій бічних частин залишків активного центру). Інший підхід полягає в МД декількох різних конформацій одного й того ж самого протеїну з наступним відбиранням найоптимальніших варіантів з кожного запуску МД. Ще один спосіб полягає в тому, щоб знайти універсальну структуру протеїну-мішені, за участю якої МД давав би задовільні результати для різних класів лігандів, зменшуючи при цьому кількість пропущених, але правильних розв'язків.

Отже, найбільш перспективні, але при цьому й найбільш складні, методи МД враховують конформаційну рухливість не лише ліганду, але й рецептора. На сьогодні існує низка розрахункових програмних пакетів, у яких реалізовано ці можливості. Найпростішим чисельним методом серед них є гнучкий докінг, який дає змогу врахувати конформаційну рухливість бічних ланцюгів

амінокислотних послідовностей, розміщених безпосередньо в сайті зв'язування. У більшості випадків сучасні алгоритми конформаційного пошуку за короткий час знаходять потрібні конформації, близькі до експериментальних. Як приклад, таке моделювання можна провести за участю SH2-доменів, оскільки вони є складовою частиною майже усіх класів протеїнів і на цей час є недостатньо вивченими.

SH2-домени

SH2 — компактний глобулярний домен, який взаємодіє з протеїнами, що містять фосфорильований залишок тирозину (Tyr). Здебільшого він міститься в онкопротеїнах (Src oncoprotein) та в протеїнах, які входять до сигнальних каскадів клітини. Бере участь у знаходженні інших протеїнів, розпізнаванні фосфотирозину на їхній поверхні.

Геном людини кодує близько 120 SH2-доменів, які входять до 110 протеїнів і беруть активну участь у протеїн-протеїнових взаємодіях. Вони присутні у найрізноманітніших класах протеїнів, включаючи протеїнкінази (Src, Lck), фосфатази (SHP2, SHP2), фосфоліпази (PLC γ 1), фактори трансскрипції (STAT), регуляторні протеїни (SOCS), адаптери протеїнів (Grb2), структурні протеїни (SHC) та ін. Широка розповсюдженість SH2-доменів в організмі тварин і майже повна відсутність їх у мікроорганізмах (наприклад, примітивний SH2-фрагмент у дріжджах) дозволяє зробити припущення, що їхня поява пов'язана з ускладненням механізмів передачі сигналів у багатоклітинних організмах [25].

Саме протеїн-протеїнові взаємодії відіграють важливу роль у клітинному рості та розвитку. Вони реалізуються шляхом розпізнавання коротких специфічних амінокислотних послідовностей [26]. Пептидні послідовності є індивідуальними для кожного протеїну і SH2-домен, у свою чергу, відіграє роль посередника, тобто частини, де відбувається зв'язування.

Що стосується структури SH2-домену, то він складається з двох α -спіралей та семи β -структур (рис. 2). SH2-домени мають високу спорідненість до фосфотирозину. Вони є найбільшим класом pTyr — розпізнавальних доменів [27, 28].

Функціонально SH2-домени, як правило, зв'язані з тирозинкіназами протеїнів (РТК). Вони беруть активну участь у внутрішньоклітинній передачі сигналів, що пов'язано з їхньою здатністю специфічно

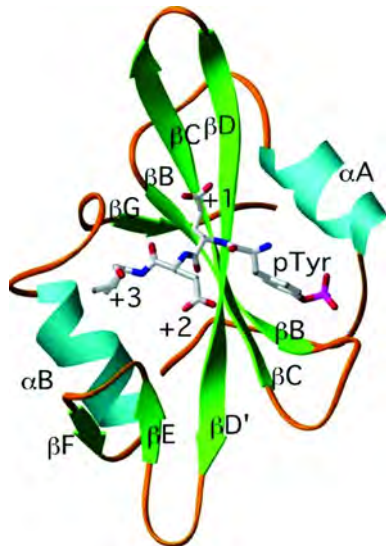


Рис. 2. SH2-домен, зв'язаний із фосфотирозином

розпізнавати фосфотирозин. Завдяки цьому можна визначити локалізацію конкретних сайтів фосфотирозину. Цей процес має фундаментальне значення при передачі сигналів через мембрану: коли сигнал надходить у позаклітинний простір, він контролюється за допомогою рецепторів; потрапивши знов у клітину — контролюється структурами, які здатні розпізнати фосфотирозин. Фосфорилування тирозину призводить до активації протеїн-протеїнових взаємодій, унаслідок чого SH2-вмісні протеїни зв'язуються із фосфотирозиновим сайтом. Оскільки цей процес є досить чутливим до будь-яких змін, він може стати причиною мутацій SH2-доменів або їхніх фрагментів (табл. 1). Здебільшого це стосується 142–169 амінокислотних залишків. Такі мутації порушують специфічні взаємодії SH2-доменів з партнерами і можуть спричинювати збої у клітинній сигналізації, впливати на зв'язування Src із субстратом, зокрема протеїнами цитоскелета і тому можуть бути причиною різноманітних захворювань людини (найчастіше це онкозахворювання; таблиця) [25].

Роботи Cantley et al. відзначено як перші систематичні дослідження специфіки протеїн-протеїнових взаємодій за участю SH2-доменів [29]. Використовуючи пептидну бібліотеку з лігандів SH2, було відібрано найбільш оптимальні структурні фрагменти для 25 SH2-доменів, які поділили на 5 груп залежно від наявності в них β D5-складки. Подальші дослідження виявили, що SH2-домени впізнають певні специфічні залишки С-кінця фосфотирозину (pTyr) +1, +2 і +3 (тобто залишки з певною позицією після

pTyr упізнаються окремим SH2-доменом). Звідси випливає, що кожен окремий SH2-домен зв'язується лише з конкретними фосфотирозинвмісним фрагментом (рис. 3). Наприклад, Src SH2 переважно впізнають Glu-Glu-Ile (зв'язувальний фрагмент позначається як pYEEI), тимчасом як Grb2 SH2-домен зв'язується з іншим фрагментом pYVNV. Однак повне розуміння цього ефекту потребує детального вивчення термодинамічних особливостей взаємодії фосфопептидів із SH2-доменами.

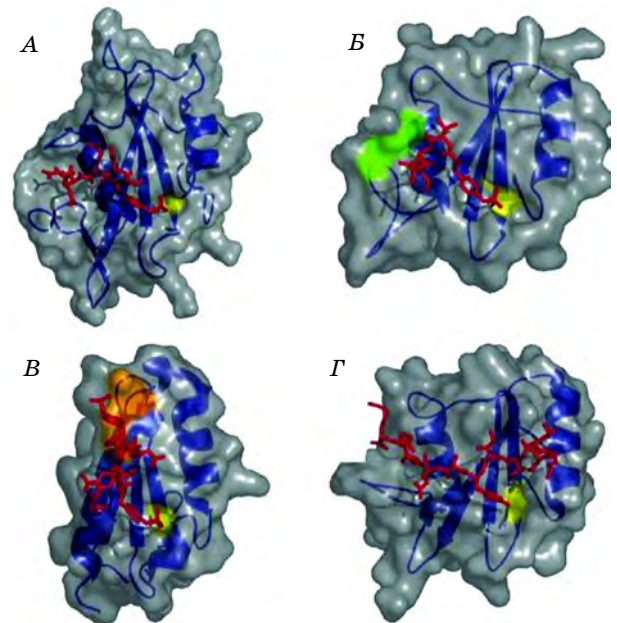


Рис. 3. Варіанти зв'язування SH2-доменів (стрічкова та поверхнева діаграми) [25]:

A — структура SH2-домену, зв'язаного з pTyr-Glu-Glu-Ile-пептидом (PDB, 1SPS). Поверхню SH2-домену показано як напівпрозору частину, а вторинні структурні елементи — голубим кольором; α A — спіраль справа, α B — спіраль зліва; Arg β B5, залишок для зв'язування pTyr, показано жовтим кольором; N-кінець pTyr-пептиду (червоний колір) займає pTyr-зв'язувальну кишеню. Пептид рухається повз центральну β -частину SH2-домену; +1 і +2 глутамати зв'язуються з поверхнею домену, а бічна частина +3 (зліва) входить у гідрофобну кишеню.

B — Grb2 SH2 в комплексі з pYVNV (червоний колір), (PBD, 1BMB) і Trp (зелений колір) стабілізують конформацію β -структури, критично необхідну для високоафінного зв'язування.

C — дві фосфотирозинзв'язувальні кишені подано в одному SH2-домені APS. Одна APS SH2 молекула зв'язана з pYETDpY (червоний колір) пептидом активаційної петлі INSR; pTyr-1158 взаємодіє з Arg-438 (зелений колір), Lys-455 і Lys-457 (помаранчевий колір) створюють іншу кишеню зв'язування для pTyr-1162 (PDB, 1RQQ).

D — SH2D1A/SAP у комплексі з нефосфорильованим SLAM пептидом KSLTIYAQVQK (червоний колір) (PBD, 1D4T)

Захворювання людини, пов'язані з мутаціями генів SH2-доменів

№	Назва SH2-вмісного протеїну	Короткий опис мутацій	Фенотип
1	ABL1	t(9;22) транслокація призводить до злиття з геном BCR	Хронічна лейкемія, гостра лімфобластозна лейкемія
2	ABL2	t(1;12)(q25;p13) транслокація з ETV6/TEL	Гостра мієлогенна лейкемія (Cazzaniga et al., 1999)
3	BLNK	Заміна пари основ у місці сплайсингу призводить до зменшення або повної втрати BLNK-транскриптів	Імунодефіцит людини (Minegishi et al., 1999) Попередник гострого лімфатичного лейкозу (Jumaa et al., 2003)
4	BTK	Мутації сайтів сплайсингу	Хвороба Брутона
5	CVL	Зміни в частинах MLL-гена: t(4;11)(q21;q23) t(11;14)(q23;q32) t(11;22)(q23;q12)	Гостра мієлогенна лейкемія Гостра лейкемія Лімфома В-клітин Саркома
6	CRK	Вилучення з локусу MDLS, MDS, MDCR, DEL17p13.3, C17DELp13.3 частини 17p13.3	Синдром ліценцефалії Міллера–Дікера
7	ITK	t(5;9)(q33;q22) транслокація в SYK	Синдром ліценцефалії Міллера–Дікера
8	JAK2	t(9;12)(p24;p13) зливаються з TEL Мутації лінії клітин V617F	Периферійні Т-клітинні лімфоми (Streubel et al., 2005) Гостра лімфатична лейкемія, хронічна мієлогенна лейкемія
9	JAK3	Унаслідок вставки або видалення нуклеотидів зсувається рамка зчитування або процес взагалі обривається	Справжня поліцитемія
10	LCK	Зниження експресії p56 (lck), можливо через альтернативний сплайсинг екзона 7	Імунодефіцит, лімфопенія (Russell et al., 1995) Гострий лейкоз Т-клітин (Burnett et al., 1991)
11	PTPN11	Унаслідок missense мутації амінокислота D61 замінюється на N-SH2, через що посилюється функціональна активність. Missense мутації у родині екзотів 7, 12 та 13 становлять 95%; мутації родини екзотів та дефекти у родині 13 впливають на протеїнові фосфатази тирозинового домена, унаслідок чого посилюється функціональність	Імунодефіцит (Goldman et al., 1998) Синдром Нунана (Tartaglia et al., 2001) Прогресивна кардіоміопатія (LS) (Digilio et al., 2002) Мієломоноцитарний лейкоз (Tartaglia et al., 2003)
12	SH2D1A	Мутації, пов'язані з неправильним функціонуванням протеїну	Хвороба Брутона
13	STAT1	Унаслідок нуклеотидних заміन передчасно генерується стоп-кодон	Зростає уразливість до вірусних і бактеріальних захворювань
14	STAT5B	Гомозиготні мутації A630P	Імунодефіцит

В роботі [25] автори проаналізували специфіку SH2-доменів з точки зору сайта зв'язування із фосфотирозиновим залишком. Ці результати розширюють уявлення щодо взаємодії SH2-доменів, але вони є обмеженими, оскільки розрахувати вільну енергію для SH2-доменів — надзвичайно складне завдання. Складнощі в обчисленнях також зумовлені великою кількістю електростатичних взаємодій, що виникають під час зв'язування, і значною гнучкістю лігандів. Підходи до розрахунку вільної енергії

зв'язування з використанням термодинамічної схеми відірваності ліганду від свого середовища у цьому разі є недоцільними. Навіть мала статистична похибка у розрахунку вільної енергії ліганду значно перевищує її експериментальне значення.

Для здійснення вищезазначених розрахунків використовують метод симуляції вільної енергії МД. Показано, що такі розрахунки афінності зв'язування фосфотирозинового пептиду pYEEI з Lck SH2 добре узгоджуються з експериментальними даними.

Це свідчить про те, що атомні моделі можуть достатньо точно відтворювати молекулярні взаємодії.

Компоненти SH2-доменів людини

Після видалення повторень і спрощення варіантів псевдогенів загалом визначено 120 SH2-доменів, які містяться в 110 різних протеїнах, 10 з яких мають подвійні SH2-домени. Частину із цих 110 протеїнів людини наведено в таблиці із зазначенням місцезнаходження кожного гена в хромосомах, мутацій та хвороб, пов'язаних з ними.

Згідно з останньою класифікацією, SH2-домени поділено на 11 функціональних категорій, які базуються на модульній структурі домену (рис. 4). Функціональний вплив, наприклад, будь-якого рецептора тирозинкінази (РТК) залежить від підвідділів SH2-вмісних протеїнів (таблиця), які вона мобілізує безпосередньо або опосередковано через фосфорильовані молекули скефолда. Ці дані визначають головні шляхи впливу РТК на внутрішньоклітинні процеси. рТуг-залежні взаємодії в SH2-вмісних протеїнах спрямовують сигнал РТК у визначену точку. Цей процес охоплює фосфорилування тирозину (через цитоплазматичні РТК і тирозинфосфатазу), контроль метаболізму фосфоліпідів (фосфатидилінозитол, інозитолфосфат), регуляцію маленьких ГТФаз (включаючи Ras, Rho і Rap родини) гуанінвмісними обмінними факторами і генну експресію ГТФаз (у рамках сигнальних каскадів). Звідси випливає, що SH2-домени діють як адаптери (Grb2, Crk і Nck), кожен з яких спрямований на групу зв'язувальних протеїнів з подібними функціями. Так, Nck мобілізує цитоскелетні регулятори, зокрема нейронні протеїни N-Wasp і Pak серин/треонінові кінази [30]. Адаптерний протеїн Grb2 зв'язується із Sos-репресором і Gab1 (ген, що кодує Grb2), які беруть участь у MAPK/PI3K сигналізації та взаємодії Crk (специфічний інгібітор кіназ) з гуаніновими обмінними факторами. Крім того, значна частина SH2-доменів регулює тривалість РТК-сигналізації. Наприклад, супресори сигналізації цитокінів SOCS-протеїни, транскрипційно індуквані JAK/STAT-сигналами, блокують JAK-тирозинкіназну активність. Cbl (протеїни убіквітинлігази) індукують убіквітування рТуг-залежного рецептора і, таким чином, створюють зв'язувальні місця для внутрішньоклітинних протеїнів з центрами убіквітинового зв'язування, що беруть участь у клітинному транспортуванні. SH2-

домени також можуть взаємодіяти з активними сайтами рецепторів тирозинкіназ (RTKs). Як приклад, можна навести SH2-домени APS-адаптерного протеїну, який одночасно гомодимеризується і зв'язує фосфорильовану активаційну петлю інсулінового рецептора (INSR), унаслідок чого відбувається стабілізація його активного стану [31]. SH2-домен Grb14 протеїну також зв'язує фосфорильовану активаційну петлю інсулінового рецептора, але при цьому слід врахувати, що в нього є певна послідовність (BPS-частина), розміщена між SH2- та PH-доменами, яка антагонізує рецепторну активність, виступаючи псевдосубстратом [32]. Отже, SH2-домени, окрім того що діють як on/off-регулятори внутрішньоклітинних біохімічних процесів, можуть модифікувати активність, кінетику і субстратну специфічність тирозинкіназних сигналів. Така велика кількість різноманітних зв'язків і каталітичних доменів у протеомі людини дозволяє асоціювати SH2-домен з SH3-, PTB-, PH-, GEF, GAP-доменами, кіназами, фосфатазами (рис. 4). Запуск сигнальних каскадів SH2 доменами починається біля плазматичної мембрани і лише потім запускаються специфічні сигнальні каскади, які індукують клітинний ріст, диференціацію, морфологію і метаболізм.

Однак дослідження SH2-доменів, враховуючи їхні структурні особливості, є не лише складним завданням, але й таким, яке зазвичай не виправдовує затрачених ресурсів. Тому для спрощення розрахунків С-кінці SH2-доменів часто виключають із послідовностей при використанні певних біоінформативних чисельних методів. Незважаючи на те, що С-кінцева ділянка SH2-домену більш консервативна, ніж N-терміналь або центральні послідовності, вона все ж здатна впливати на стабільне проходження фолдингу і зв'язування з лігандом.

За допомогою методу виключення С-кінців SH2-домену з використанням бази даних Pfam та SMART було уточнено амінокислотний склад SH2-доменів. Застосовуючи комп'ютерну програму для вирівнювання послідовностей ClustalW, отримали дерево SH2-доменів (рис. 5). Кожен колір цього дерева позначає функціональний клас протеїнів, які містять певний SH2-домен.

Проаналізувавши функціональні та структурні особливості SH2-доменів, вдалося виділити невелику кількість тих, які раніше досить рідко згадувались у літературі. Наприклад, LOC284948 член родини SH2-вмісних протеїнів, який включає SLP-76, BLNK, MIST/CLNK і SH2D5 (LOC400745), має структуру домену, подібну до Shc-родини.

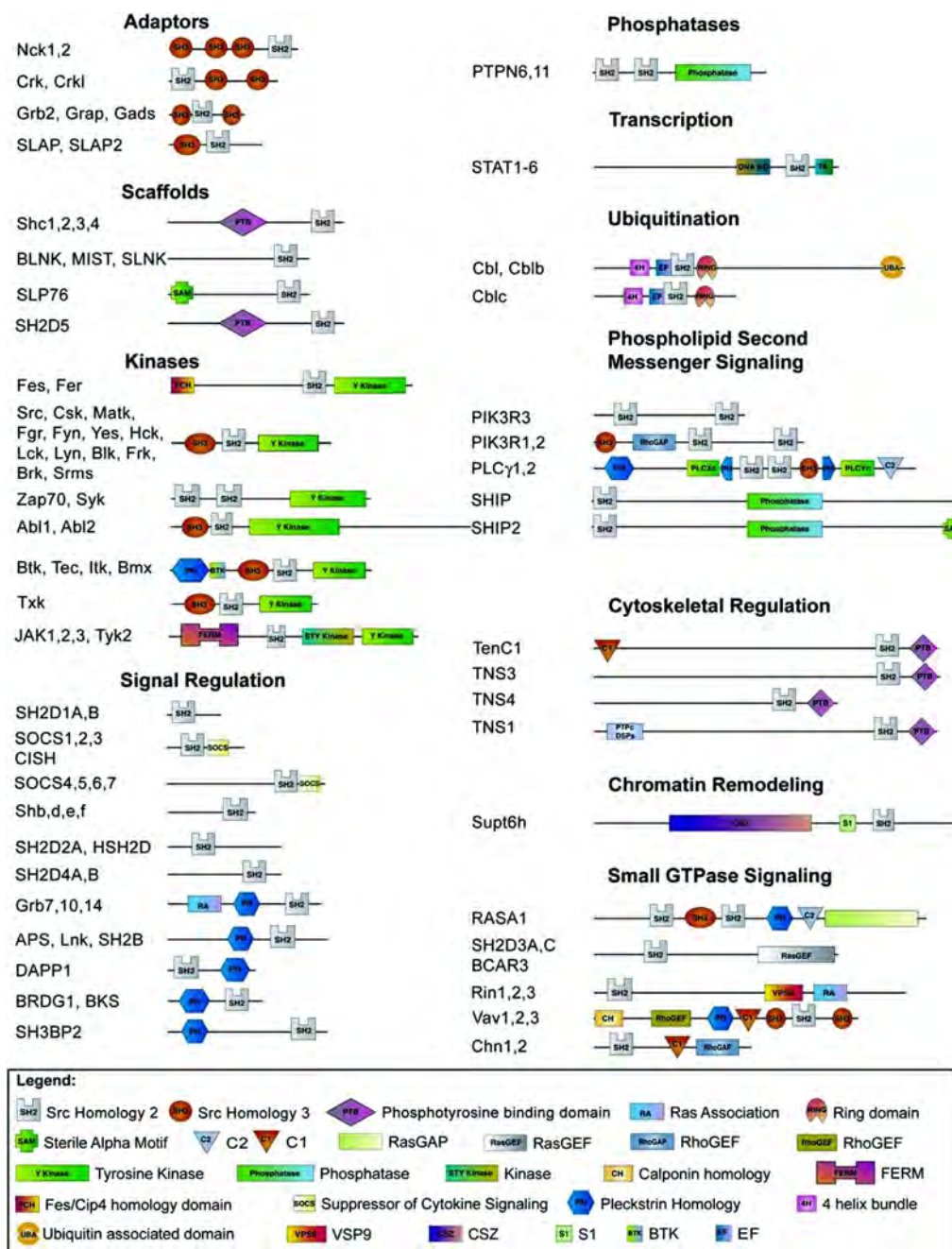


Рис. 4. Протеїни, до складу яких входять SH2-домени [25]

Кожен член родини HSH2D, який бере участь у кровотворенні, містить один SH2-домен. За відсутності інших доменів вони класифікуються, як сигналрегулювальні протеїни. Про їхні клітинні функції відомо мало. Протеїни цієї родини дуже схожі між собою, але відрізняються положенням SH2-доменів, тому їх часто відносять до окремих родин.

Транскрипційний фактор Supt6h є архаїчним протеїном, який зберігся від дріжджів до людини [34]. Він містить найпримітивніший варіант SH2-подібних послідовностей, що трапляються лише у дріжджах. На

відміну від більшості SH2-вмісних протеїнів, Supt6h не розширив своє різноманіття у більш складних організмах. Але той факт, що SH2-домен зберігся у Supt6h, свідчить про важливість його функціональної ролі в організмі. Слід також зазначити, що SH2-домен протеїну Supt6h не має рTyr-спорідненості. Це притаманно багатьом іншим SH2-доменам. Так, член родини протеїнів JAK TYK2 має His, а не критичний ArgB5, який координує фосфогрупу рTyr. Хоча SH2-домени людини JAK1, JAK2, JAK3 мають ArgB5, вони відрізняються

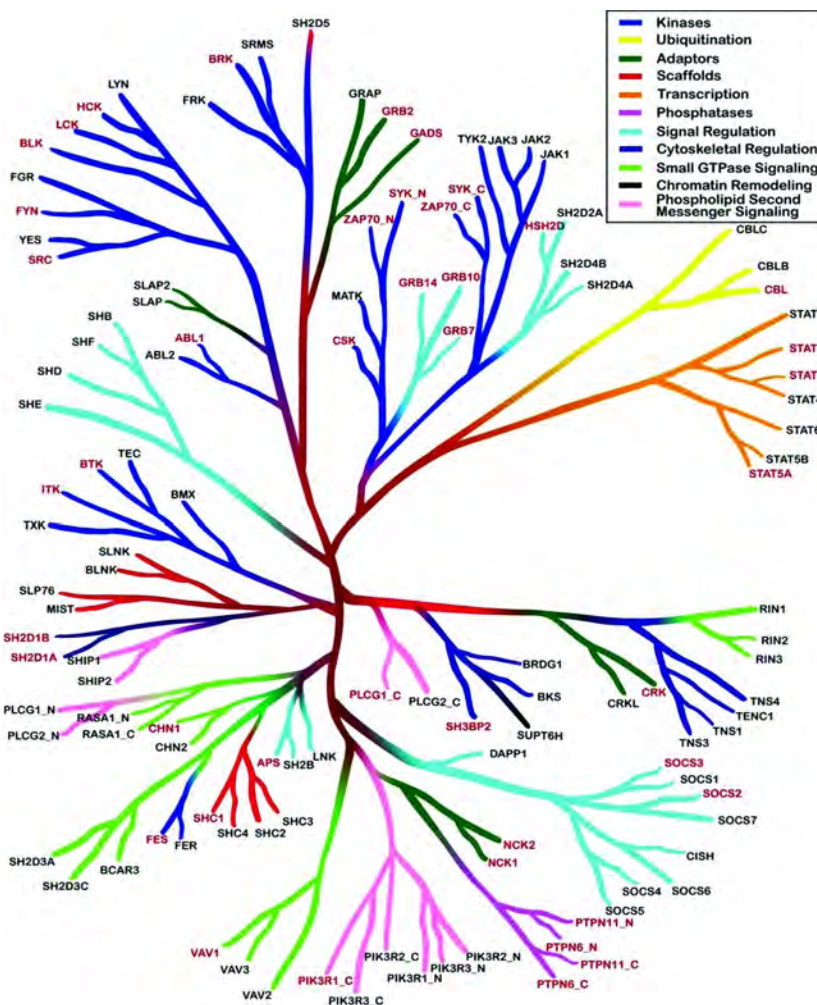


Рис. 5. Дендрограма SH2-доменів людини, яка демонструє послідовну подібність між SH2-доменами, наведеними в таблиці [33]

в N-кінцевій частині. Заміна ArgB5 у JAK1 SH2-домені не впливає на локалізацію і функціонування JAK1 [35]. Інтактний SH2-домен потрібен для JAK для того, щоб зв'язуватись із цитокіновими рецепторами. Незважаючи на те, що в JAK SH2-доменах може бути відсутня рТуг-зв'язувальна здатність, вони залишаються важливими рецепторами розпізнавання. Дійсно, моделювання JAK2 передбачає, що SH2-домен може взаємодіяти з N-кінцем FERM-доменом [35]. Так само в SH2-доменах Rin 2 (HisbB5) та SH2D5 може бути відсутнім ArgbB5. Вони також можуть не зв'язувати рТуг-ліганди, хоча наразі відомо про функціонування SH2-доменів в обох протеїнах.

Деякі SH2-домени можуть зв'язувати ліганди без пептиду. Так, SH2-домен фосфатидилінозиту (PI) може зв'язувати PI (3, 4, 5) P3, який перешкоджає розпізнаванню рТуг-вмісних пептидів і, таким чином, забезпечує зворотний зв'язок інгібування

SH2-фосфопротеїнових взаємодій. Подібно до цього Src SH2 може зв'язатись із PIP3 [фосфатидилінозитол (3, 4, 5) трифосфат].

Отже, найбільш перспективні, але при цьому й складні, методи МД дають змогу враховувати конформаційну рухливість не лише ліганду, але й рецептора. У кожному окремому випадку методика проведення МД є різною залежно від структурних і функціональних особливостей протеїну-мішені. Проведений аналіз різноманіття SH2-доменів, їхніх біохімічних властивостей доповнює наявну інформацію щодо протеїнів тирозинкіназ та тирозинфосфатаз [36], а також організації та функцій SH2-вмісних протеїнів. Розглянуті дослідження SH2-доменів методами МД уможливають оптимізацію шляхів створення (дизайну) нових фармацевтичних препаратів для лікування хвороб, пов'язаних із функціонуванням SH2-доменів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Alm E., Arkin A. P. Biological networks // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 2003. — V 13. — P. 193–202.
2. Claverie J. M. Gene number. What if there are only 30,000 human genes? // *Science.* — 2001. — V. 291. — P. 1255–1257.
3. Cesareni G., Ceol A., Gavrilu C. et al. Comparative interactomics // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579. — P. 1828–1833.
4. Pieroni E., de la Fuente van Bentem S., Mancosu G. et al. Protein networking: insights into global functional organization of proteomes // *Proteomics.* — 2008. — V. 8. — P. 799–816.
5. Li S., Armstrong C. M., Bertin N. et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans* // *Science.* — 2004. — V. 303. — P. 540–543.
6. Rual J. F., Venkatesan K., Hao T. et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network // *Nature.* — 2005. — V. 43, N 7062. — P. 1173–1178.
7. Stelzl U., Worm U., Lalowski M. et al. A human protein-protein interaction network // *Cell.* — 2005 — V. 122. — P. 957–968.
8. Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-sh2 domain interactions to complex cellular systems // *Ibid.* — 2004. — V. 116. — P. 191–203.
9. Lengauer T., Rarey M. Computational methods for biomolecular docking // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 1996. — V 6. — P. 402–406.
10. Косинский Ю. А., Пырков Т. В., Луценко С. В., Ефремов Р. Г. Предсказание структуры комплексов белок-лиганд: от компьютерной модели к биологической функции // *РХЖ.* — 2006 — Т. 2. — P. 36–44.
11. Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications // *Nat. Rev. Drug. Disc.* — 2004. — V. 3. — P. 935–949.
12. Shoichet B. K., Kuntz I. D., Bodian D. L. Molecular docking using shape descriptors // *J. Comput. Chem.* — 2004. — V. 13. — P. 380–397.
13. Cai W., Shao X., Maignet B. Protein-ligand recognition using spherical harmonic molecular surfaces: towards a fast and efficient filter for large virtual throughput screening // *J. Mol. Graph. Model.* — 2002. — V. 20. — P. 313–328.
14. Morris R. J., Najmanovich R. J., Kahraman A., Thornton J. M. Real spherical harmonic expansion coefficients as 3D shape descriptors for protein binding pocket and ligand comparisons // *Bioinformatics.* — 2005. — V. 21, N 10. — P. 2347–2355.
15. Kahraman A., Morris R. J., Laskowski R. A., Thornton J. M. Shape variation in protein binding pockets and their ligands // *J. Mol. Biol.* — 2007. — V. 368, N 1. — P. 283–301.
16. Meng E. C., Shoichet B. K., Kuntz I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation // *J. Comput. Chem.* — 2004. — V. 13. — P. 505–524.
17. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *Ibid.* — 1998. — V. 19. — P. 1639–1662.
18. Feig M., Onufriev A., Lee M. S. et al. Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures // *Ibid.* — 2004. — V. 25, N 2. — P. 265–284.
19. Jain A. N. Scoring functions for protein-ligand docking // *Curr. Protein Pept. Sci.* — 2006. — V. 7, N 5. — P. 407–420.
20. Lensink M. F., Mendez R., Wodak S. J. Docking and scoring protein complexes // *Proteins.* — 2007. — V. 69, N 4. — P. 704–718.
21. Robertson T. A., Varani G. An all-atom, distance-dependent scoring function for the prediction of protein-DNA interactions from structure // *Ibid.* — 2007. — V. 66, N 2. — P. 359–374.
22. Bohm H. J. Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs // *J. Comput. Aided Mol. Des.* — 1998. — V. 12, N 4. — P. 309–323.
23. Betts M. J., Sternberg M. J. An analysis of conformational changes on protein-protein association: implications for predictive docking // *Prot. Eng.* — 1999. — V. 12, N 4. — P. 271–283.
24. Jorgensen W. L. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding // *Science.* — 1991. — V. 254. — P. 954–955.
25. Liu B. A., Jablonowski K., Raina M. et al. The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling // *Mol. Cell.* — 2006. — V. 22, N 6. — P. 851–868.
26. Gu H., Neel B. G., Pao L. The Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling // *Trends Biochem. Sci.* — 2003. — V. 28, N 6. — P. 284–293.
27. Pawson T., Gish G. D., Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring // *Trends Cell Biol.* — 2001. — V. 11, N 12. — P. 504–511.
28. Huang H., Li L., Wu C. et al. Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain // *Mol. Cell. Proteomics.* — 2008. — V. 7, N 4. — P. 768–784.
29. Czar M. J., Kersh E. N., Mijares L. A. et al. Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2001. — V. 98. — P. 7449–7454.
30. Buday L., Wunderlich L., Tamas P. The Nck family of adapter proteins: regulators of

- actin cytoskeleton // Cell. Signal. — 2002. — V. 14, N 9. — P. 723–731.
31. *Chiang Y. J., Kole H. K., Brown H. et al.* Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation // Nature. — 2000. — V. 403, N 6766. — P. 216–220.
32. *Depetris R. S., Hu J., Gimpelevich I. et al.* Structural basis for inhibition of the insulin receptor by the adaptor protein grb14 // Mol. Cell. — 2005. — V. 20, N 2. — P. 325–333.
33. <http://sh2.uchicago.edu/tree.html>.
34. *Giordanetto F., Kroemer R. T.* Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7 // Prot. Eng. — 2002. — V. 15, N 9. — P. 727–737.
35. *Radtke S., Haan S., Jorissen A. et al.* The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression // J. Biol. Chem. — 2005. — V. 280, N 27. — P. 25760–25766.
36. *Manning G., Whyte D. B., Martinez R. et al.* The protein kinase complement of the human genome // Science. — 2002. — V. 298, N 5600. — P. 1912–1934.

МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА С УЧАСТИЕМ SH2-ДОМЕНОВ

*В. В. Гурмач
О. М. Балинский
М. О. Платонов
П. А. Бориско
Ю. И. Прилуцкий*

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

E-mail: gyrmach@gmail.com

Создание новейших фармацевтических препаратов для лечения болезней, связанных с нарушениями функционирования протеиновых комплексов, является важной медико-социальной проблемой, что требует комплексного подхода к ее решению, в том числе учета последних достижений в области компьютерного моделирования биологических процессов.

В обзоре обобщены данные литературы по структуре, функционированию, классификации молекулярных нарушений доменов SH2 (Src Homology), а также дана характеристика метода молекулярного докинга, как одного из наиболее перспективных методов фармакологических исследований. Показано, что наибольший интерес с точки зрения практического применения для получения новых патентоспособных ингибиторов протеин-протеиновых взаимодействий методом молекулярного докинга представляют именно SH2-домены, поскольку они принимают активное участие во внутриклеточной передаче сигналов, выступая посредниками этих специфических взаимодействий.

Ключевые слова: протеиновые комплексы, SH2-домены, молекулярный докинг.

MOLECULAR DOCKING METHOD INVOLVING SH2-DOMAINS

*V. V. Hurmach
A. M. Balynskyi
M. O. Platonov
P. O. Borysko
Yu. I. Prylutskyy*

Kyiv National Taras Shevchenko University

E-mail: gyrmach@gmail.com

The creation of new pharmaceuticals for treating diseases associated with impaired functioning of protein complexes is an important medical and social problem that requires a comprehensive approach to its solution, including consideration of recent advances in computer modeling of biological processes.

The review summarizes literature data about structure, functioning, classification, molecular disturbances of SH2-domains (Src Homology) and also provides description of the method of molecular docking as one of the most promising methods for pharmacological studies. It is shown that SH2-domains are of the most interest in terms of practical applications for new patentable inhibitor protein — protein interactions using molecular docking, because they are actively involved in intracellular signal transmission acting as mediators of specific interactions.

Key words: protein complexes, SH2-domains, molecular docking.

BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF HYDROCARBONS BIODEGRADATION

O. A. VASYLCHENKO, O. R. ALIIEVA, O. L. MATVEYEVA, A. M. SALATA

National Aviation University, Institute of Ecological Safety, Kyiv

E-mail: vasilchenko@nau.edu.ua

Получено 18.11.2011

In review the present situation of petroleum pollution, its consequences and basic oil composition are described. The up-to-date survey of hydrocarbon degradation microbiology and major strains are presented with respect to following practical introduction of obtained data. A general characteristic of oil hydrocarbons biodegradation is done. Biodegradation metabolism of petroleum products different categories and its biochemistry are described. Principal biochemical pathways are indicated. Biotechnological properties of hydrocarbon degrading microorganisms including that of industrial significance are investigated. Much attention is given to biological and environmental factors that influence completeness and rate of hydrocarbons biodegradation. It was established that microorganisms consortium biodegradation is faster and more complete than single species ones. The effects of hydrocarbons presence in medium on biochemical and cytological levels of microbial metabolism are also analyzed. The major methods of microbial resistance to petroleum products toxic influence are described. It is shown that one of the most important among them is metabolic processes shifting towards surfactants.

Key words: hydrocarbons, petroleum pollution, biodegradation, microorganisms.

Petroleum Pollution Characteristics

A problem of environmental pollution by oil and petroleum products is very serious today. Many areas with excess of maximum allowable petroleum products concentrations in soils and water are found in Ukraine. Most often this fact applies to regions near the airfields, fuel depots, oil storage depots, refineries, oil wells, parking lots, gas stations, etc. Pollution has become so critical in some regions that oil products in soils and groundwater are not only toxic, but fire hazardous [1].

World oil production increased by 1.8 million barrels/day and was 3913.7 million tons in 2010 [2]. Environmental pollution by oil and refined products is negative consequence of such intensification of oil production. Oil and petroleum products are released into the environment due to violations of technology, various emergency situations. The components of gas streams are deposited on the surface of plants, soil and water bodies. Part of hydrocarbons is returned to the earth's surface with precipitation leading to secondary contamination of land and water. Microbial and chemical hydrocarbons degradation causes their evaporation, which may serve as a source of soil and air pollution.

Hydrocarbons form a gas areola in the aeration zone during evaporation from the oil-contaminated ground water surface. Having a property of explosive mixture formation at certain vapor and air ratio they can explode if high-temperature source is introduced into this mixture. Oil and petroleum products vapor have a toxic effect on human organisms. Sulfur crude oil and petroleum products fumes are particularly toxic, as well as leaded gasoline [3].

Interactions of oil and petroleum products with soils, microorganisms, plants, surface water and groundwater have their own characteristics depending on the type of oil products.

The principal effects of oil pollution are the danger of fire, the toxic effect of the oil, and the physical coating of the environment. Their relative importance depends on the type and amount of oil, and where it is spilled. The danger of fire is greatest with light oils, and with crude oil. The extent and amount of toxic damage depend on the season of the year, and the stage of life that the various organisms have reached at the time of the pollution. Whereas adult fish may be able to swim away, and avoid the toxic area, larvae, and less mobile creatures, may have no such escape. They may be killed, or may have experience

changes in their feeding or reproductive cycles that may materially affect fish stocks size and species composition. Physical coating of the sea surface is not as much problem as physical coating of the shore [4].

Oil element and qualitative composition

Oil includes a large range of complex and diverse products. «Crude» or unrefined oil is a natural substance, produced over millions of years by the decomposition of vegetable matter. Crude oils is a «dirty» oil, since it contains tars and waxes, and it evaporates rapidly, since it also contains petrol, kerosene, and other «light fractions», and this makes it highly dangerous. Refined oils range from petrol and kerosene, to diesel fuel and heavy oils such as lubricating and boiler oil. The light oils are highly volatile, and so present a high fire danger. They are also highly toxic. The heavy oils are much less dangerous, but they may be very dirty and persistent [5].

Oil or petroleum is natural disperse system of liquid organic compounds, the main parts of which are hydrocarbons of various molecular weights. It is a mixture of about 1000 individual substances [6]. Oil in common usage includes all liquid, gaseous, and solid (e.g., paraffin) hydrocarbons. Lighter hydrocarbons as methane, ethane, propane and butane occur as gases, while pentane and heavier ones are in the form of liquids or solids [7].

The proportion of light hydrocarbons in the petroleum mixture varies greatly among different oil fields, ranging from as much as 97% by weight in the lighter oils to as little as 50% in the heavier oils and bitumens. The hydrocarbons in crude oil are mostly alkanes, cycloalkanes and various aromatic hydrocarbons while the other organic compounds contain nitrogen, oxygen and sulfur, and trace amounts of metals such as iron, nickel, copper and vanadium. The exact molecular composition varies widely from formation to formation but the proportion of the most chemical elements varies over fairly narrow limits as follows shown in table 1 [6].

Sulfur components are mostly mercaptans, cyclic and acyclic sulfides and thiophenes. Nitrogen compounds are included in composition of heterocycles and aromatic amines such as pyridine, aniline, pyrrole and their analogues. The major part of oxygen components are acids, phenols, alcohols, ketones, ethers. Vanadium and nickel compounds are the most common among organometallic compounds of petroleum [6].

Table 1. Element composition of petroleum by weight

Element	Percent range
Carbon	33–87%
Hydrogen	10–14%
Nitrogen	0.1–2%
Oxygen	0.05–1.5%
Sulfur	0.05–6%
Metals	< 0.1%

Four different types of hydrocarbon molecules appear in crude oil. The relative percentage of each varies from oil to oil, determining the properties of each petroleum type. Average content and range of hydrocarbon molecules different types are given in table 2 [7].

Table 2. Qualitative composition of petroleum by weight

Hydrocarbon	Average	Range
Paraffins	30%	15–60%
Naphthenes	49%	30–60%
Aromatics	15%	30–60%
Asphaltics	6%	remainder

Alkanes are a significant portion of oil, most of them are naphthenes. Commonly, they are cyclopentane and cyclohexane with 1–3 radicals, decalin, bicyclohexane, norbornane and their alkyl derivatives. Aromatics of petroleum are represented with benzene, its derivatives and polycyclic aromatic compounds. Heteroatomic compounds include resin-asphaltene substances [7].

Thus, oil pollution common feature is high variation in the contaminant composition in each case and its complex content unlike most other anthropogenic pollutants.

Petroleum Degrading Microorganisms

A lot of the experimental evidence for petroleum microbiology is a result of the pioneering work of Claude ZoBell. Beginning in the 1930s and extending through the late 1970s, ZoBell's research established that bacteria are important in a number of petroleum related processes [8].

Nowadays it is known, that hydrocarbons in the environment can be decomposed mainly by bacteria, algae, yeast and fungi [9, 10]. Despite the fact that these organisms in terrestrial and aquatic ecosystems are ubiquitous, number of heterotrophic microorganisms that can utilize hydrocarbons is very

variable: from 6% to 82% of soil fungi, from 0.13 to 50% of soil bacteria, from 0.003 to 100% of marine bacteria [11]. Some microorganisms can metabolize only a limited number of hydrocarbon substrates. A set of different microorganisms with all possible enzymatic pathways can more efficiently break down a complex mixture of hydrocarbons in soil, fresh and sea water than single microorganism can. Thus complete mineralization of substrate can be achieved [12].

Bacteria that utilize gaseous hydrocarbons, particularly propane, are representatives of the genera *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*. Microorganisms that can use butane as the unique source of carbon and energy are of the *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas* spp. [13].

Strains capable to utilize polycyclic aromatic hydrocarbons are *Beijerinckia* sp., *Pseudomonas* spp. (*P. paucimobilis*, *P. fluorescens*, *P. putida*), *Alcaligenes denitrificans* WW1, *Mycobacterium* spp. (e.g. *M. flavescens*), *Rhodococcus* spp. (e.g. *R. rhodnii*), *Athrobacter* sp., *Aeromonas* sp., sea *Cyanobacteria*, *Streptomyces flavovirens*, *Synechococcus* sp. [14, 15].

Fungi *Penicillium* and *Polisporum* can grow on nutrient agar medium with crude oil heavy fractions. *Penicillium* and *Mortierella* sp. can be used for conversion of crude oil high molecular fractions [16].

The most important bacteria in hydrocarbons biodegradation in soils and sea water are *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia* and *Pseudomonas* spp. Among sea water yeasts and fungi that decompose hydrocarbons the most significant are *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* spp., species obtained from soils are *Trichoderma* and *Mortierella* ones [17–22].

B. subtilis was proved to be a better hydrocarbon degrader than other isolates [22]. In another study, strains were isolated from petroleum polluted soil and identified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Bacillus firmus*, *Bacillus alvei*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus sydowii* and *Rhizopus* sp., and they removed 79%, 80%, 68%, 86%, 81% and 67% of total petroleum hydrocarbon correspondently. Genera *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Nocardiodes* and *Pseudomonas* were used in combination and give a degradation rate of 67% after only 12 days of treatment [23]. It has been proved that the mixed consortium effectiveness was significantly superior to that obtained by individual strains [12, 24–28].

Petroleum Products Aliphatic Component Microbial Degradation

Various classes' hydrocarbons decomposition mechanisms are essentially different. This fact results in individual spectrum of hydrocarbons consumption for different microorganisms. n-Alkanes, isoalkanes, naphthenes, polycyclic aromatic hydrocarbons and adjacent heteroaromatic hydrocarbons have specific metabolic pathways [29].

Aliphatic hydrocarbons are demonstrative example of organic substances that are biodegradable. Alkanes are the easiest to be ruined, alkenes and alkynes are following [30]. The components consisting of straight chains degrade easier than those with branched chains [31]. Biodegradation of straight chain alkanes occurs through β -oxidation. Oxygen binds to the end of the hydrocarbon chain during this process leading to the formation of carboxyl group (Fig. 1).

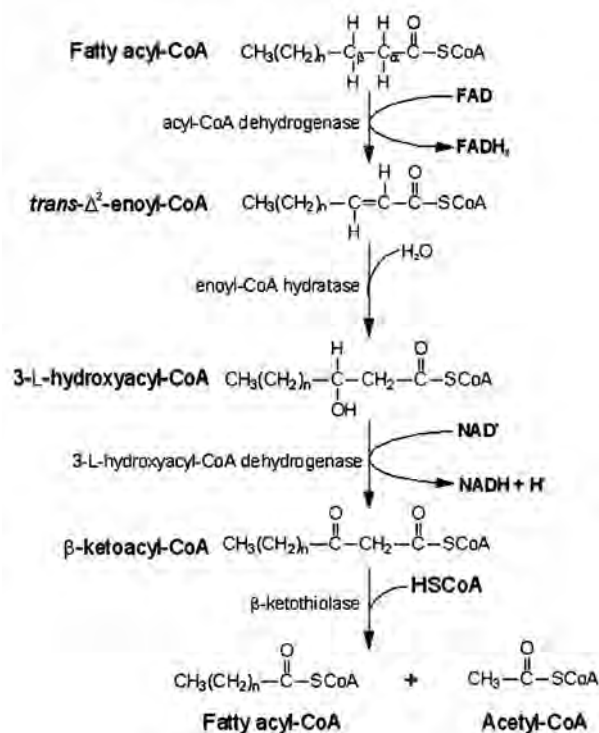


Fig. 1. β -Oxidation of hydrocarbons [32]

Two carbon compound (acetyl) splits off from fatty acid formed. This process is repeated as many times as necessary for the splitting of the whole molecule. β -Oxidation stops when it reaches branched position in the hydrocarbon molecule.

Alkanes biodegradation is the best for components, which have 10 carbon atoms in the chain. Shorter structures have tendency to show high toxicity to many organisms. Very

short alkanes (methane, ethane, propane and butane) are present as gases and can be used as primary substrates or degradation cometabolites [33].

Rhodococcus spp. absorb n-alkanes through passive diffusion by solubilization them in thick lipophilic cell wall. In contrast, *Pseudomonas* spp. solubilize n-alkanes in the environment [34]. An increase of cytochromes group, as well as the high content of ATP, increased cellular respiration, increased number of flavins is characteristic for microorganisms growing on media with n-alkanes. The number of mitochondria increases and endoplasmic reticulum development is enhanced in eukaryotes [29].

Natural isoalkanes with saturated isoprenoid structure are oxidized through citronellol pathway. Initially, the terminal CH₃ groups are oxidized to COOH groups, then C₂ or C₃ fragments are evolved through consecutive reactions; acetoacetate and acetyl-CoA are formed (Fig. 2). Some *Rhodococcus* strains that can grow on isoprenoid hydrocarbons are known [35].

Petroleum Products Aromatic Component Microbial Degradation

Aromatic hydrocarbons can be degraded during aerobic and anaerobic biological processes [30, 37]. Oxygen binds to the benzene ring. This eventually leads to the formation of catechol, that is characteristic for aerobic degradation. Catechol molecule is then broken up in ortho- or meta- position. Final products of this process are used in cell anabolic pathways [12].

In such aromatic compounds as benzoates and phenols, benzene ring double bonds are initially reduced by hydrogen adding to the molecule, then the ring is splitted of and modified, and saturated fatty acids or dicarboxylic acids are formed [38]. Phenol can also be degraded by binding carboxyl groups to the ring with subsequent reducing to cyclohexanone and splitting of the ring. Benzene is mono aromatic compound; it degrades extremely slowly under anaerobic conditions [30].

Many bacteria strains are capable of heteroaromatic hydrocarbon compounds degradation (mainly sulfur compounds) [39].

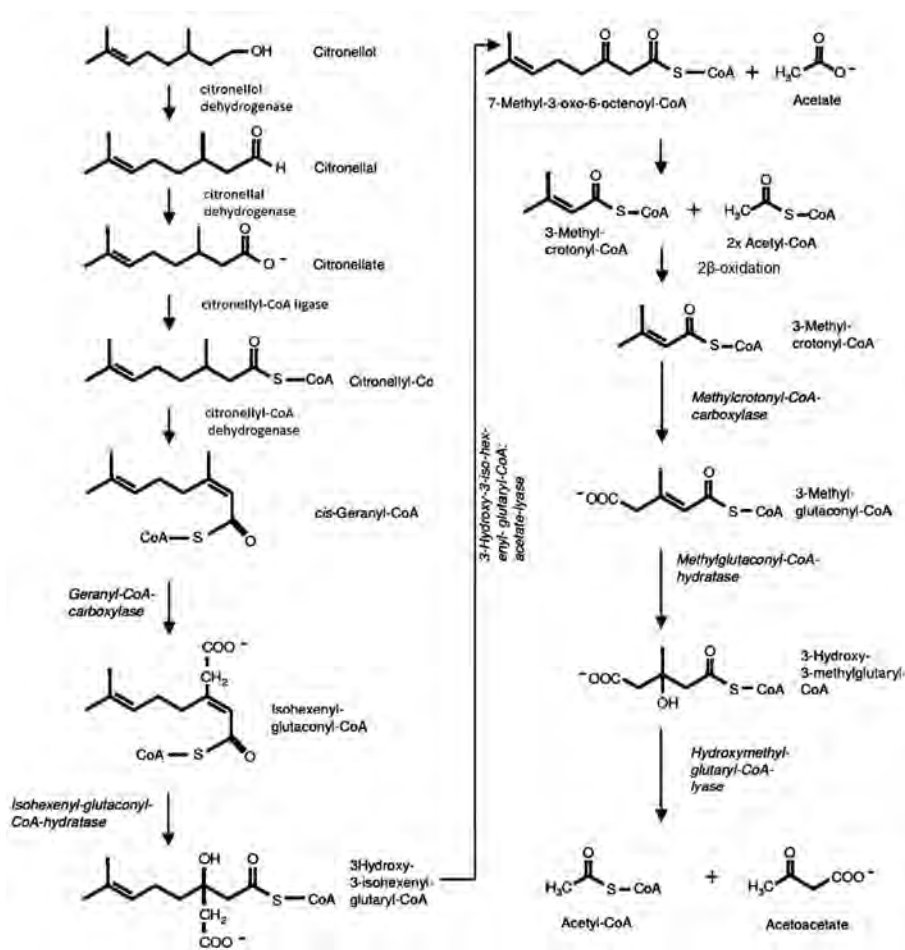


Fig. 2. Citronellol pathway [36]

Aromatic hydrocarbons with heteroatoms biodegradation is often accompanied by denitrification, sulfate reduction or methane production in anaerobic conditions. Benzene and toluene anaerobic transformation is accompanied with methane production. This process can be characterized as enzymatic one. There are partial oxidation and partial reduction of the substrate with methane and carbon dioxide formation as end products. In addition, trivalent ferrum and manganese oxides may be alternative electron acceptors in appropriate anoxic conditions [40].

One methyl group in the aromatic hydrocarbon fundamentally changes the process of primary oxidation and further metabolism of compounds. Either aromatic ring or radical is oxidized. Many microorganisms need energy co-substrates to transform complex hydrocarbons. Hydrocarbon decomposition is often accelerated in their presence [34, 41].

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) consist of two or more aromatic rings. Compounds' resistance to microbial degradation increases with an increase of ring number. PAHs can be subjected to aerobic and anaerobic biodegradation.

Aerobic decomposition is more common for the destruction of PAHs with two or three rings (naphthalene, anthracene, phenanthrene) [42]. Degradation of PAHs begins when hydrogen reduces double bonds in a ring or when water oxygen binds to the aromatic ring similarly to compounds that consist of one aromatic ring. Oxygen binds directly to one of the rings, which then splits, as in the case of benzene and its derivatives. This process is repeated as many times as necessary for the whole molecule splitting. In addition to aerobic bacterial biodegradation some fungi and algae have the ability to decompose PAHs. *Phanerocheate chrysosporium* produces lignin-specific enzymes that are to destruction PAHs having from two to five ring [43]. Microbial association combined metabolic action is very important for degradation of compounds with benzene rings large number.

Biodegradation of highly-condensed PAHs with large molecular masses is very slow, therefore requires a long time to complete cleavage. It is known that half lifetime of these compounds is 6 months or more during biological pathways [44]. Microorganisms capable of decomposing PAHs with cycles' number up to seven are known [45].

Solid hydrocarbons transport efficient mechanism in the cell is important for intensive growth in addition to the presence of bac-

terial enzymes that catalyze PAHs oxidation. Surfactants usage increases PAHs solubility and promotes their further biodegradation [42].

Influence of Hydrocarbons on Microbial Organisms

Possibility of microbial growth on hydrocarbon medium is provided by combination of two factors: biochemical complementarity of organism and resistance to hydrocarbon toxic action. It is obvious these two factors should be optimal. Considering polycomponent character of petroleum pollution, microorganism (association of microorganisms) should be able to grow on most components of pollutant and be resistant to their toxic action for complete mineralization of oil products [29].

Oil at low concentrations has a stimulating effect for soil biota because it is an energy substrate for a large group of microorganisms. Significant petroleum soil pollution, which occurs at emergency spills, is accompanied by acute toxic oil effects on organisms [46]. Microorganisms' reaction to the effect of any toxic substance depends on the toxic agent nature, its concentration, contact time, perceiving system properties, state and other properties of the organisms exposed. The toxic effect of oil is shown through the transformation of microorganisms' environment by physical, chemical, agronomic and other characteristics of contaminated soils [46, 47].

Light oil fractions partially inhibit heterotrophic microorganisms but act also as a substrate for hydrocarbon degrading microorganisms. Heavier fractions are less toxic to microorganisms, but they are not actively metabolized [47].

Petroleum hydrocarbons are characterized by strong antibacterial effect and can cause cell lysis. However, some bacteria show a high resistance to these substances. Toxicity of hydrocarbons is mainly determined by their ability to damage the membrane of microorganisms [48]. The interaction of oil hydrocarbons with cell membranes occurs at the level of lipid-lipid and lipid-protein interactions. The thickness of a phospholipid bilayer, its fluidity, asymmetric distribution of membrane components, activity of enzymes and proteins transport in the membrane are changed as a result. These changes, in turn, lead to membrane barrier properties disruption, protons and other intracellular ions passive flux increasing across membranes. All of this leads to a decrease cell viability [48, 49].

Various cell structures damage is observed during contact with the hydrocarbons.

Cytoplasmic membrane integrity interruption, cell wall and membranes damage of the *Pseudomonas* genus bacteria occur, accompanying with myeloid-like structures formation in the disruption place and nucleoid condensation in the central part of the cells. Finally, the cell wall losses rigidity, that leads to cell lysis [50].

Hydrocarbons toxic effect may also be caused by intermediates. Negative impact on hydrocarbon degrading microorganisms' development. Butyric acid has is an intermediate product of hydrocarbons and carbohydrates metabolism. It does not lead to the bacteria death, but has an inhibiting effect on their dissimilative activity and acts as growth inhibitor [46]. Acetate, as well as butyric acid, is a factor that has significant influence on active microflora development. Unlike butyric acid, acetate increased concentration accelerates the development of the microflora, and its deficiency can lead to microbial population anabiosis [35].

Hydrocarbon various classes metabolism leads to a huge number of different intermediates, accumulation of these substances leads to cell growth inhibition in the case of incomplete oxidation.

Hydrocarbons degrading bacteria have developed special mechanisms of resistance to hydrocarbons in evolution process that are expressed in the metabolism peculiarities and cell structure. These features include ultrastructural cell displacement (inclusions of different density formation, cytoplasm fragmentation, membrane unit enhanced development, an overgrowth of the cell wall), capsules formation, metabolic activity changing.

The special changes in cell structure organization are increased content of fatty acids in the cell wall, synthesis of specific lipids, intracellular inclusions of various purposes formation [29].

Rhodococcus, *Arthrobacter* and *Acinetobacter* genera transform hydrocarbons excess into neutral lipids — triglycerides and waxes that serve as an extra carbon source for energy supply, whereas *Pseudomonas* don't form the extra lipids [34].

50% of *Rhodococcus* and *Arthrobacter* general species contain wax in smaller contents than triglycerides. Lipophilic cell wall formation provides solubilization and passive transport of the hydrophobic substrate into the cell [34, 41]. Thus, hydrocarbons transfer into the lipids may serve as a mechanism for toxic effect, fall-offing, a way of extra carbon and energy accumulation and contribute to the hydrocarbons controlled transport into the cell.

Changing the fatty acid composition provides resistance to hydrocarbons. For example, unsaturated fatty acids with odd number of carbon atoms are typical for representatives of the *Rhodococcus* genus. The prevalence of these acids is characteristic for microorganisms living at low temperatures. At the same time the cell wall is a hydrocarbon acceptor. This allows microorganisms to grow actively on hydrocarbons [34, 41].

Representatives of *Arthrobacter*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* genera have trehalose containing phospholipids which are synthesized in response to the n-alkanes addition to the medium for hydrocarbons mobilization and complete degradation. They contribute to the membrane stabilization in extreme conditions. Trehalose also can be part of surfactants. Emulsifiers are synthesized by some strains of slimy *Rhodococcus*, especially *Rhodococcus rubber* [34, 51]. Thus, the synthesis of hydrocarbons emulsifiers and concomitant substances can be either a way of cells protection from exposure to liquid hydrocarbons or a factor necessary for successful hydrocarbons degradation, as well as perform other protective functions.

One of the key mechanisms for the suppression of the hydrocarbons toxic effect is hydrocarbons oxidizing enzymes synthesis. The same mechanism provides the cell with carbon and energy for biosynthetic processes [29].

Biotechnologically Important Properties of Petroleum Degrading Microorganisms

High specificity of microorganisms' enzymes causes strains specialization to certain hydrocarbons, so it is necessary to make a search of strains capable to degrade wide range of petroleum pollutants. Lots of methods to assess the characteristics of hydrocarbon degrading communities are used. For example, isolation of microorganisms from contaminated environment on different media. This allows to estimate bacteria of different physiological groups and to obtain pure cultures, among which we can select the promising hydrocarbon degrading strains.

To determine the number of different microorganisms colony-forming units, the method of serial dilution with following seeding and counting colonies of microorganisms on plates with nutrient agar is used. This approach has been used for long and is now almost a standard. Subculturing on dense nutrient medium (potato agar and nutrient agar) is used to obtain pure cultures of hydrocarbon

oxidizing microorganisms from media with the hydrocarbons [52]. Use of limiting dilutions in liquid Chapeck's medium with hydrocarbons (diesel fuel) and in medium with glucose as the unique source of carbon and energy allows to set the number of degrading microorganisms and to obtain microorganisms of this group pure culture [53]. One of the methods for the selection of hydrocarbon degrading microorganisms may be usage of the modified Raymond's medium. In the same time the method of serial dilutions helps to establish the fact of a successful introduction of degrading microorganism [54].

Alternative ways to search for microorganisms utilizing oils and their components were recently developed. The activity of each strain can be assessed visually by the formation of clearing zones when grown on porous oils impregnating mineral carrier.

It has sense to pay attention to nocardioform actinomycetes for selection a group of microorganisms among which it is supposed to find strains for bacterial preparations. One of the advantages of *Actinobacteria* is the absence of pathogenic species. Most of them belong to a group of saprophytic microorganisms. This fact has important practical value for creating safe commercial bacterial preparations. The choice of this group of microorganisms at an early stage of the selection by using simple methods avoids working with pathogenic bacteria [29].

Microorganisms of this group are able to adapt to multiple stress factors simultaneously (e.g. high salinity of medium, extreme values of acidity, low concentration of nutrient substrates). These capabilities are due to the peculiarities of the actinobacteria physiology [34].

A strain supposed for creation of the bacterial preparation often must have several properties simultaneously (e.g. to be oil destructor and biosorbent). Many representatives of the *Rhodococcus* genus (Fig. 3) have destructive, emulsifying and sorbing activity relative to hydrocarbons combined in one strain [55].

To create bacterial preparations intended for cleaning petroleum pollutions the search and selection of bacteria oil degrading strains



Fig. 3. A micrograph image of *Rhodococcus* sp. [56]

are conducted with the help of certain criteria. Strains should possess biodegradability of crude oil, fuel oil, light oil (kerosene, diesel fuel), growth at high and low temperatures, at high medium salinity and extreme values of acidity. The main peculiarity and disadvantage of such approach is specialized study of specific strains relative to certain petroleum products [29]. Strain that is effective for one oil type biodegradation may be inefficient relative to other petroleum products. Thus, it is necessary to specify the hydrocarbon orientation of the strain, when creating a universal preparation.

One of the urgent tasks is the bioremediation of complex contaminants such as oil pollution followed by heavy metals co-contamination [57]. Therefore, strains of bacteria used for the detoxification of oil pollutants, should be stable with respect to heavy metals.

Since the hydrocarbons are not soluble in water, one of the important properties of strains capable to utilize hydrophobic substrates is their ability to synthesize bioemulsifiers [58].

A problem of environmental pollution by oil and petroleum products is very serious today. The common feature of oil pollution is high variation in contaminant composition in each case and its complex content unlike most other anthropogenic pollutants. The one of the promising directions of petroleum contamination elimination is microbial degradation.

Hydrocarbons in the environment can be decomposed mainly by bacteria, algae, yeast and fungi. Microorganisms can metabolize only a limited number of hydrocarbon substrates. A set of different microorganisms with all the possible enzymatic pathways can more efficiently break down a complex mixture of hydrocarbons than single microorganisms can.

Decomposition mechanisms of hydrocarbon various classes differ significantly. There is specialization of metabolic pathways for n-alkanes, isoalkanes, naphthenes, aromatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbon and the adjacent heteroaromatic compounds.

Hydrocarbon presence in medium causes corresponding response in microorganisms' metabolism. Petroleum products generally have toxic action and microorganisms develop the resistance mechanisms. PAHs have the most toxic impact and are the most resistant to biodegradation.

It is necessary to make a search of strains capable to degrade wide range of petroleum pollutants considering such their properties as stability, resistance to different toxic effects, ability to synthesize bioemulsifiers, etc. The nocardioform actinobacteria are considered to be a promising group of microorganisms used for the detoxification of oil pollution.

REFERENCES

1. *Батлук В. А.* Основи екології. — К.: Знання, 2007. — 519 с.
2. *BP Statistical Review of World Energy 2011.* — London: BP p.l.c., 2011. — 46 p.
3. *Reis J. C.* Environmental Control in Petroleum Engineering. — Houston: Gulf Publishing Company, 1996. — 287 p.
4. *Prasad M. S., Kumari K.* Toxicity of Crude Oil to the Survival of the Fresh Water Fish *Puntius sophore* (HAM.) // *Clean.* — 2006. — V. 15, I. 1. — P. 29–36.
5. *Parkash S.* Petroleum Fuels Manufacturing Handbook: including Specialty Products and Sustainable Manufacturing Techniques. — NY: McGraw-Hill Professional, 2009. — 464 p.
6. *Speight J. G.* Handbook of Petroleum Analysis. — New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. — 455 p.
7. *Hune N. J.* Nontechnical guide to petroleum geology, exploration, drilling, and production. — Oklahoma: Penn Well Corporation, 2001. — 598 p.
8. *ZoBell C. E.* Action of microorganisms on hydrocarbons // *Bact. Rev.* — 1946. — V. 10. — P. 1–49.
9. *Elshafie A., AlKindi A. Y., Al-Busaidi S. et al.* Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman // *Mar. Pollut. Bull.* — 2007. — V. 54. — P. 1692–1096.
10. *Fallgren P. H., Jin S.* Biodegradation of petroleum compounds in soil by a solid-phase circulating bioreactor with poultry manure amendments // *J. Environ. Sci. Health A Tox Hazard Subst Environ. Eng.* — 2008. — V. 43, N 2. — P. 125–131.
11. *Філяк О., Сибірний А., Юрим М.* Біодеградація нафтопродуктів у навколишньому природному середовищі // *Вісн. Львів. ун-ту. Серія біологічна.* — 2008. — Вип. 47. — С. 89–95.
12. *Prince R. C., Parkerton T. F., Lee C.* The primary aerobic biodegradation of gasoline hydrocarbons // *Environ. Sci. Technol.* — 2007. — V. 41, N 9. — P. 3316–3321.
13. *Куликова А. К.* Микроорганизмы, ассимилирующие газообразные углеводороды (C₂-C₄) (Обзор) // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1995. — Т. 31, № 2. — С. 155–167.
14. *Павленко М. І., Сорока Я. М., Гвоздяк П. І., Кухар В. П.* Біодеструкція поліциклічних ароматичних вуглеводнів // *Катализ и нефтехимия.* — 2007. — № 15. — С. 46–62.
15. *Рустемов С. А., Головлева Л. А., Алиева Р. М., Баскунов Б. П.* Новый путь окисления стирола культурой *Pseudomonas putida* // *Микробиология.* — 1992. — Т. 61, Вып. 1. — С. 5–10.
16. *Шевкопляс В. Н., Бойко М. И.* Конверсия тяжелых фракций сырой нефти микромицетами родов *Mortierella* (Соем.), *Penicillium* (Link ex Fr.), ее анализ методиками ИК- и Н-ЯМР спектроскопии. // *Пробл. екол. охор. прир. техноген. рег.* — 2009. — № 1 (9). — С. 221–229.
17. *Austin B., Calomiris J. J., Walker J. D., Colwell R. R.* Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1977. — V. 34. — P. 60–68.
18. *Antic M. P., Jovancicevic B. S., Ilic M. et al.* Petroleum pollutant degradation by surface water microorganisms // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* — 2006. — V. 13, N 5. — P. 320–327.
19. *Fallgren P. H., Jin S.* Biodegradation of petroleum compounds in soil by a solid-phase circulating bioreactor with poultry manure amendments // *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* — 2008. — V. 43, N 2. — P. 125–131.
20. *Wang J., Zhang Z. Z., Su Y. M. et al.* Phytoremediation of petroleum polluted soil // *Petroleum Sci.* — 2008. — V. 5(2). — P. 167–171.
21. *Joo H. S., Ndegwa P. M., Shoda M., Phae C. G.* Bioremediation of oil-contaminated soil using *Candida catenulata* and food waste // *Environ. Pollut.* — 2008. — V. 156, N 3. — P. 891–896.
22. *Nwaogu L. A., Onyeze G. O. C., Nwabueze R.* Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis* // *Afr. J. Biotechnol.* — 2008. — V. 7, N 12. — P. 1939–1943.
23. *Cervantes-Gonzalez E., Rojas-Avelizapa L. I., Cruz-Camarillo R. et al.* Isolation and identification by 16S rDNA partial sequencing of hydrocarbon-chitinolytic bacteria involved in hydrocarbon removal process // *Progr. Environ. Sci. Technol.* — 2007. — V. 1. — P. 1143–1149.
24. *Gallego J. L. R., Garcia-Martinez M. J., Llamas J. F. et al.* Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia // *Biodegradation.* — 2007. — V. 18, N 3. — P. 269–281.
25. *Boszczyk-Maleszak H., Zabost A., Wolicka D., Kaciszczenko J.* Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values // *Pol. J. Microbiol.* — 2006. — V. 55, N 1. — P. 69–73.
26. *Diaz-Ramirez I. J., Escalante-Espinosa E., Favela-Torres E. et al.* Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE // *Int. Biodeter. Biodegr.* — 2008. — V. 62, N 1. — P. 21–30.
27. *Малиновська І. М., Зінов'єва Н. А.* Вплив забруднення сірого лісового ґрунту нафтопродуктами на його фітотоксичні властивості та стан мікробіоценозу // *Зб. наук. праць Ін-ту землеробства.* — 2010. — Вип. 1–2. — С. 61–69.
28. *Малиновська І. М., Зінов'єва Н. А.* Дегградація нафтопродуктів аборигенними мікробними угрупованнями сірого лісового ґрунту // *Вісн. Харк. нац. агр. ун-ту.* — 2011. — Вип. 2 (23). — С. 105–112.

29. Мельников Д. А. Распределение признаков биодegradации углеводов и оценка технологически важных свойств нефтеокисляющих бактерий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23. — Краснодар, 2005. — 131 с.
30. Osuji L. C., Ozioma A. Environmental degradation of polluting aromatic and aliphatic hydrocarbons: a case study // Chem. Biodivers. — 2007. — V. 4. — P. 424–430.
31. Матвеева Е. Л., Васильченко О. А., Демянко Д. А. Микробиологическое поражение авиационных топлив // Системы озброєння і військова техніка. — 2011. — № 2 (26). — С. 152–156.
32. Nelson D. L., Cox M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition. — New York: W. H. Freeman and Company, 2005. — 1100 p.
33. Schwarz J. R., Walker J. D., Colwell R. R. Deep-sea bacteria: growth and utilization of n-hexadecane at in situ temperature and pressure // Can. J. Microbiol. — 1975. — V. 21. — P. 682–687.
34. Коронелли Т. В., Нестерова Е. Д. Экологическая стратегия бактерий, использующих гидрофобный субстрат // Микробиология. — 1990. — Т. 59, № 6. — С. 993–997.
35. Милехина Е. И., Борзенков И. С., Звягинцева И. А. и др. Эколого-физиологические особенности аэробных эубактерий из нефтяных месторождений Татарстана // Там же. — 1998. — Т. 67, № 2. — С. 208–214.
36. Binger D., Turnbull M. Citronellol Pathway Map // University of Minnesota. — 2011 / http://umbbd.msi.umn.edu/cit/cit_map.html
37. Haggblom M. M., Youngster L. K., Somsamak P., Richnow H. H. Anaerobic biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) and related fuel oxygenates // Adv. Appl. Microbiol. — 2007. — V. 62. — P. 1–20.
38. Takahata Y., Kasai Y., Hoaki T., Watanabe K. Rapid intrinsic biodegradation of benzene, toluene, and xylenes at the boundary of a gasoline-contaminated plume under natural attenuation // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V. 73, N 3. — P. 713–722.
39. Oldfield C., Wood N. T., Gilbert S. Desulphurisation of benzotiphenene nad dibenzotiphenene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus*, and related Taxa // Antonie van Leeuwenhoek. — 1998. — V. 4. — P. 119–132.
40. Burland S., Edwards E. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction // Appl. Environ. Microbiol. — 1999. — V. 65. — P. 529–533.
41. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) // Прикл. биохим. микробиол. — 1996. — Т. 32, № 6. — С. 579–585.
42. Cerniglia C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons // Biodegradation. — 1992. — V. 3. — P. 351–368.
43. Van Hamme J. D., Singh A., Ward O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology // Microbiol. Mol. Boil. Rev. — 2003. — V. 67, N 4. — P. 503–549.
44. Kanaly R. A., Harayama S. Biodegradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria // J. Bacteriol. — 2000. — V. 182. — P. 2059–2067.
45. Gramss G., Voigt K., Kirsche B. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils // Biodegradation. — 1999. — V. 10. — P. 51–62.
46. Гузев В. С., Волде М. И., Куличевская И. С., Лысак Л. В. Влияние масляной кислоты на физиологическую активность углеводородокисляющих родококков // Микробиология. — 2001. — Т. 70, № 3. — С. 313–320.
47. Головченко А. В., Полянская Л. М. Влияние нефти на численность, биомассу и жизнеспособность грибов в верховых торфяниках // Там же. — 2001. — Т. 70, № 1. — С. 111–117.
48. Sikkema J., De Bont J. A. M., Poolman B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons // Microbiol. Rev. — 1995. — V. 59, N 2. — P. 201–222.
49. Фомченков В. М., Холоденко В. П., Ирхина И. А., Петрунина Т. А. Влияние загрязнения водной среды нефтью и нефтепродуктами на барьерные свойства цитоплазматических мембран бактериальных клеток // Микробиология. — 1998. — Т. 67, № 3. — С. 333–337.
50. Сузина Н. Е., Ставская С. С., Фихте Б. А. Изменения в ультраструктурной организации клеток *Pseudomonas aeruginosa* под действием додецилсульфата натрия // Там же. — 1988. — Т. 57, № 2. — С. 255–257.
51. Рычкова М. И. Влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов на процессы десорбции и деградации нефтяных углеводов в почве: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 11.05.07. — Пермь, 2007. — 26 с.
52. Никитина Е. В., Якушева О. И., Зарипов С. А. и др. Особенности распределения и физиологического состояния микроорганизмов нефтешлама — отхода нефтехимического производства // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 5. — С. 699–706.
53. Назина Т. Н., Турова Т. П., Полтараус Т. П. и др. Физиологическое и филогенетическое разнообразие термофильных спорообразующих углеводородокисляющих бактерий из нефтяных пластов // Там же. — 2000. — Т. 69, № 1. — С. 113–119.
54. Куличевская И. С., Гузев В. С., Паников Н. С. Популяционная динамика углеводородокисляющих дрожжей, интродуцированных в нефтезагрязненную почву // Там же. — 1995. — Т. 64, № 5. — С. 668–673.
55. Irvine V. A., Kulakov L. A., Larkin M. J. The diversity of extradiol dioxygenase (edo)

- genes in cresol degrading rhodococci from a creosote-contaminated site that express a wide range of degradative abilities // Antonie van Leeuwenhoek. — 2000. — V. 78. — P. 341–352.
56. *Boutin C.* Researchers close in on natural solution to PCB contamination // http://www.innovations-report.com/html/reports/environment_sciences/report-14206.html
57. *Groudeva V. I., Groudev S. N., Daycheva A. S.* Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals // *Int. J. Min. Process.* — 2001. — V. 62. — P. 293–299.
58. *Kitamoto D., Ikegami T., Suzuki G. T.* Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma (Candida antarctica)* // *Biotech. Lett.* — 2001. — V. 23. — P. 1709–1714.

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ БІОДЕГРАДАЦІЇ ВУГЛЕВОДНІВ

*О. А. Васильченко
О. Р. Алієва
О. Л. Матвеева
А. М. Салата*

Національний авіаційний університет,
Інститут екологічної безпеки, Київ

E-mail: vasilchenko@nau.edu.ua

В огляді наведено характеристику нинішньої ситуації забруднення нафтою, його наслідків та базового складу нафти. Розглянуто біодеградацію вуглеводнів, основні штами-нафтодеструктори та можливість подальшого практичного застосування отриманих даних. Подано загальну характеристику біодеградації нафтових вуглеводнів, а також описано метаболізм мікробного розкладання нафтопродуктів різних категорій із зазначенням біохімічних шляхів деградації. Досліджено біотехнологічно важливі властивості мікроорганізмів-нафтодеструкторів, зокрема промислового значення. Велику увагу приділено біологічним та екологічним чинникам, що впливають на ступінь і швидкість біодеградації вуглеводнів. Установлено, що розкладання нафтопродуктів консорціумами мікроорганізмів відбувається швидше та повніше, ніж окремими штамми. Проаналізовано вплив присутності вуглеводнів у середовищі на метаболізм мікроорганізмів як на біохімічному, так і цитологічному рівні. Описано основні методи резистентності до токсичної дії нафтопродуктів. Виявлено, що одним з найважливіших серед них є зміщення метаболічних процесів у бік синтезу поверхнево-активних речовин.

Ключові слова: вуглеводні, нафтове забруднення, біодеградація, мікроорганізми.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОДЕГРАДАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОВ

*О. А. Васильченко
О. Р. Алиева
Е. Л. Матвеева
А. М. Салата*

Национальный авиационный университет,
Институт экологической безопасности, Киев

E-mail: vasilchenko@nau.edu.ua

В обзоре дана характеристика нынешнего нефтяного загрязнения, его последствий, а также базового состава нефти. Рассмотрены биодegradация углеводородов, основные штаммы-нефтедеструкторы и возможность дальнейшего практического применения полученных данных. Представлена общая характеристика биодegradации углеводородов нефти, а также описан метаболізм микробного разложения нефтепродуктов различных категорий с указанием биохимических путей деградации. Исследованы биотехнологически важные свойства микроорганизмов-нефтедеструкторов, в том числе промышленного значения. Большое внимание уделено биологическим и экологическим факторам, влияющим на степень и скорость биодegradации углеводородов в промышленных масштабах. Установлено, что разложение нефтепродуктов консорциумами микроорганизмов происходит быстрее и в большей степени, чем отдельными штаммами. Проанализировано влияние присутствия углеводородов в среде на метаболізм микроорганизмов как на биохимическом, так и цитологическом уровне. Описаны основные методы резистентности к токсическому действию нефтепродуктов. Выведено, что одним из самых важных среди них является смещение метаболіческих процессов в сторону синтеза поверхностно-активных веществ.

Ключевые слова: углеводороды, нефтяное загрязнение, биодegradация, микроорганизмы.

БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ БАКТЕРІЙ РОДУ *RHODOCOCCLUS* ТА ЇХ МЕТАБОЛІТІВ

Т. П. ПИРОГ, М. О. ШУЛЯКОВА, Т. А. ШЕВЧУК, А. П. СОФІЛКАНИЧ

Національний університет харчових технологій, Київ

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Отримано 12.09.2011

Власні експериментальні результати авторів та дані літератури демонструють великий біотехнологічний потенціал бактерій роду *Rhodococcus* як деструкторів ароматичних, гетероциклічних і аліфатичних ксенобіотичних сполук (нафтаден, ксилол, толуол, етилбензен, індол, нітрофенол, трихлоретилен, вуглеводні нафти тощо), а також як продуцентів практично цінних метаболітів (поверхнево-активні речовини, антибіотики, екзополісахариди, ензими). Поверхнево-активні речовини (ПАР) є вкрай важливими продуктами мікробного синтезу, оскільки мають такі суттєві переваги перед синтетичними аналогами, як біодеградабельність, стійкість у широкому діапазоні температур, рН, а також можуть бути синтезовані з відходів інших виробництв. Розглянуто використання метаболітів родококків у природоохоронних технологіях, медицині, сільському господарстві та участь представників роду *Rhodococcus* у процесах біотрансформації для одержання ароматизаторів (карвон, гераніол), біодизеля, бутираміду, акрилової кислоти тощо.

Підсумовано власні експериментальні дані щодо інтенсифікації синтезу і практичного застосування ПАР *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. Встановлено, що за присутності як клітин, так і позаклітинних метаболітів штаму IMB Ac-5017 з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями ступінь деструкції нафти у воді і ґрунті досягав 80–93% через 30 діб. Показано, що ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 притаманна антимікробна дія щодо низки мікроорганізмів, у тому числі й фітопатогенних бактерій. У разі обробки (1–2 год) препаратами ПАР суспензії досліджуваних тест-культур спостерігали зниження кількості життєздатних клітин на 74–97%.

Ключові слова: бактерії роду *Rhodococcus*, деструкція ксенобіотиків, біотрансформація, поверхнево-активні речовини, полісахариди, ензими.

Ринковий інтерес до представників роду *Rhodococcus* зумовлений унікальними особливостями метаболізму цих бактерій, зокрема здатністю до розкладу багатьох ксенобіотиків та їх перетворення на менш токсичні сполуки [1–18]. Можливості використання катаболічного різноманіття родококків у природоохоронних технологіях розглянуто в огляді [16].

Великі геноми родококків, їх універсальні катаболічні шляхи, широка субстратна специфічність метаболічних систем, здатність до споживання та перетворення гідрофобних сполук, стійкість до несприятливих умов, наявність удосконалених інструментів генно-інженерної модифікації роблять їх ідеальними мікроорганізмами для використання у процесах біотрансформації і біодеградації багатьох органічних сполук у промислових масштабах [12].

Використання представників роду *Rhodococcus* у процесах біодеградації ксенобіотиків

Хімічна, фармацевтична, сільськогосподарська, нафтопереробна та інші галузі сучасного виробництва є постійними постачальниками ксенобіотичних сполук у довкілля, що призводить до накопичення шкідливих речовин у природі. Біоремедіація — це технології використання живих організмів з метою розкладу забруднювальних речовин та перетворення їх на двоокис вуглецю і воду або менш токсичні сполуки. Такі технології зазвичай економічніші, ніж термічні та фізико-хімічні способи детоксикації, зокрема спалювання. Біоремедіація довкілля охоплює два процеси: біоаугментацію (інтродукція мікроорганізмів-деструкторів у забруднені території) та біостимуляцію

(активація природної автохтонної мікрофлори) [19, 20].

Розкладання ароматичних та гетероциклічних сполук. Серед представників роду *Rhodococcus* виявлено багато видів і штамів, здатних до деградації таких органічних сполук, як нафтаген, ксилол, толуен, етилбензен, дибензофуран, біфеніл, стирен, катехол, флуорен, індол, нітрофенол та ін. [1, 4, 5, 7–10, 13, 16–18, 21–23].

Так, виділений нещодавно штам *Rhodococcus jialingiae* dj1-6-2 здатен використовувати як єдине джерело вуглецю та азоту карбендазим — речовину, що її широко застосовують як фунгіцид, якому притаманний мутагенний та тератогенний ефект навіть за низьких концентрацій [17]. *R. jialingiae* dj1-6-2 може розкласти до 94% карбендазиму (100 мг/л) упродовж 60 год.

Уперше серед представників роду *Rhodococcus* було виявлено штам, ідентифікований як *Rhodococcus ruber* Chol-4, що використовує як джерело вуглецевого живлення широкий спектр стероїдних сполук, серед яких — холестерол, тестостерон, андростерон та прогестерон [5].

Нафтаген — одна з найпоширеніших ксенобіотичних сполук. Здатність до його катаболізму притаманна грамнегативним бактеріям *Pseudomonas putida* G7 і NCIB9816-4, *Ralstonia* sp. U2 та грампозитивним — *Rhodococcus opacus* R7 і *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 [4]. Останній розкладає нафтаген через саліцилову та гентизинову кислоти. При цьому гени, що кодують ці перетворення, не об'єднані в оперон. Порівняння генів, відповідальних за метаболізм нафтагену, в *R. opacus* R7 та *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 показало високий ступінь гомології, але різну їх організацію.

Rhodococcus sp. DK17 як єдине джерело вуглецю та енергії може використовувати *o*-ксилол, бензен, алкібензени, фенол, фталати та інші ароматичні сполуки, при цьому розклад алкілбензенів ініціюється *o*-ксилолдіоксигеназою, що складається з редуктази, ферредоксинової складової та [2Fe-2S]-оксигеназного компонента [9]. Індан — біциклічна органічна сполука, що складається з одного ароматичного та одного циклопентанового кільця. *Rhodococcus* sp. DK17 може рости на рідкому мінеральному середовищі, використовуючи індан як джерело вуглецевого живлення [10]. Структурна подібність індану та *o*-ксилолу дала підстави припустити, що ензими, які каталізують перетворення *o*-ксилолу, задіяні також у метаболізмі індану. Для перевірки

цього припущення мутантний штам *Rhodococcus* sp. DK180, не спроможний катаболізувати *o*-ксилол, вирощували на середовищі з інданом. Відсутність росту штаму DK180 на інданвмісному середовищі підтвердила висунуте авторами припущення. У ході дослідження було також запропоновано шлях розкладу індану *Rhodococcus* sp. DK17, що починається з його ароматичного окиснення до 4,5-індадіолу з наступним розривом ароматичного кільця у метаболоженні під дією метилкатехол-2,3-діоксигенази [10]. Також відомо, що змішана культура *Pseudomonas* sp. NBM21 та *Rhodococcus* sp. ВТО62 у разі вирощування у біофільтрі здатна до розкладу суміші *o*-, *m*- та *p*-ксилолу зі швидкістю 180 г/м³/год при 20 °С та 100 г/м³/год при 10 °С, що значно перевищує зафіксовані раніше значення — 60–78 г/м³/год [9].

Фенол та подібні йому ароматичні сполуки є забруднювальними речовинами, що надходять у довкілля переважно з промисловими відходами. *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 здатен використовувати фенол як єдине джерело вуглецю та енергії, одночасно видаляючи формальдегід, що зазвичай також присутній у фенолвмісних стічних водах промислових підприємств [21]. Фенолгідроксилаза, що каталізує перетворення фенолу на катехол у *R. erythropolis* UPV-1, являє собою двокомпонентну флавінзалежну монооксигеназу. Її ензиматична активність пов'язана з двома окремими протеїнами, що кодуються близько розташованими генами *pheA1* та *pheA2*. Ген *pheA1* кодує протеїн з 542 амінокислот (флавінзалежна монооксигеназа), тоді як ген *pheA2* — зі 189 амінокислот (флавінредуктаза). Ці амінокислотні послідовності практично ідентичні послідовностям фенолгідроксилазних компонентів *R. erythropolis* CCM2595 і мають високий ступінь подібності з *Nocardia farcinica* IFM 10152 та *R. jostii* RHA1 [21].

Інтерес до штаму *Rhodococcus* sp. RHA1, виділеного із забрудненого гексахлорциклогексаном ґрунту, зумовлений його здатністю до ефективної деградації поліхлорованих біфенілів (ПХБ) — досить поширеного й особливо стійкого класу забруднювальних речовин [8, 13, 16, 18]. *Rhodococcus* sp. RHA1 є першим представником роду, геном якого було повністю секвеновано. Встановлено, що генетичний матеріал (9,7 Мбіт) штаму RHA1 складається з хромосоми невідомої топології та трьох великих лінійних плазмід: pRHL1 (1,100 kb), pRHL2 (450 kb) і pRHL3 (330 kb). Більшість генів,

відповідальних за деградацію ПХБ, розташовані на двох найбільших плазмідах — pRHL1 та pRHL2 [16, 18]. Третя, найменша плазміда pRHL3 містить близько 300 генів, об'єднаних у три кластери. Один з катаболічних кластерів кодує гени, відповідальні за деградацію лімонену, що було підтверджено ростом штаму RHA1 на середовищах із лімоненом, карвоном або карвеолом як джерелом вуглецю. Окрім того, плазміда pRHL3 також містить ділянку, що кодує стійкість клітини до важких металів, і три гени цитохрому P450 [18]. Серед генів хромосоми *Rhodococcus* sp. RHA1 виявлено кластер генів, що кодує ензими розкладу фенолоцтової кислоти. Цей шлях досить повно досліджено у грамнегативних бактерій, тимчасом як дані щодо особливостей його функціонування у грампозитивних — майже відсутні. На прикладі цього штаму та інших подібних можна зробити висновок, що метаболічна різноманітність бактерій роду *Rhodococcus* пов'язана з наявністю великих лінійних плазмід та функціональних гомологів ензимів [16].

Афлатоксини — надзвичайно токсичні, мутагенні та потенційно канцерогенні вторинні метаболіти (мікотоксини), синтезовані грибами *Aspergillus flavus* і *Aspergillus parasiticus* [1]. Наявність їх у продуктах харчування та зерні створює серйозні економічні та медичні проблеми в усьому світі. Афлатоксини є похідними дифуранокумарину і дещо структурно схожі з вищезгаданими ароматичними ксенобіотиками (зокрема, ПХБ), тому можуть бути розкладені аналогічними шляхами. Встановлено здатність безклітинних екстрактів *R. erythropolis* до ефективною деградації афлатоксину В₁ (АФВ₁): значне зменшення вмісту АФВ₁ спостерігалось вже через 2 год, а через 72 год реестрували лише 33,2% від початково-го вмісту токсину.

Rhodococcus rhodochrous VKM B-2469 здатен повністю розкласти 12–25 мг/л флуорену упродовж 14 днів та кометаболізувати 50–100 мг/л упродовж 2–5 днів за наявності сахарози як косубстрату [22]. Низька розчинність флуорену — велика проблема у процесі його біорозкладу, що призводить до низької біодоступності цієї сполуки як субстрату. У природі більшість мікроорганізмів, які можуть метаболізувати флуорен, продукують поверхнево-активні речовини для підвищення його біодоступності та кращого проникнення в клітину. Однак для вдосконалення процесу біоконверсії поліциклічних ароматичних вуглеводнів мож-

ливе і застосування синтетичних сурфактантів. У разі *R. rhodochrous* VKM B-2469 внесення Tween 60 у концентрації 1% (об'ємна частка) супроводжувалося інтенсифікацією метаболізму флуорену, зниженням його токсичності та підтримки росту штаму завдяки використанню сурфактанту як додаткового джерела вуглецю [22].

Оксиди сірки, що утворюються в процесі згоряння палива, призводять до кислотних дощів та забруднення повітря. Тому на сучасному етапі нафту піддають процесу гідродесульфуризації з використанням металевих катализаторів за присутності водню під надзвичайно високою температурою і тиском [11]. У результаті такої обробки можна вилучити різні типи сполук сірки, хоча деякі гетероциклічні сірковмісні сполуки такому видаленню не піддаються. До таких речовин належать дибензотіофен (ДБТ) та його похідні, попередній розклад яких дасть змогу досягти більшого ступеня десульфуризації. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є біодесульфуризація за допомогою ДБТ-десульфуризуючих мікроорганізмів після стадії фізико-хімічної гідродесульфуризації. Із цією метою було ізольовано деякі види мезофільних та термофільних бактерій, здатних метаболізувати дибензотіофен: *Rhodococcus* sp. IGTS8, *R. erythropolis* D-1, *R. erythropolis* H-2, *R. erythropolis* KA2-5-1, *Paenibacillus* sp. A11-2, *Bacillus subtilis* WU-S2B та *Mycobacterium phlei* WU-F1 [3, 11]. Окрім симетричних похідних ДБТ, у дизельному паливі після гідродесульфуризації виявлено й асиметричні сірковмісні органічні сполуки, такі як нафтотіофен, бензотіофен та його похідні. Здатність окиснювати бензотіофен через сульфурспецифічні шляхи притаманна, наприклад, *Gordonia* sp. 213E, *Rhodococcus* sp. T09, *Paenibacillus* sp. A11-2 [3, 11, 16]. Селекціонований штам *Rhodococcus* sp. WU-K2R розкладає 80% нафтотіофену (0,27 мМ) упродовж 5 діб, що дає змогу розглядати цей штам як потенційно можливий біокатализатор процесів десульфуризації [11].

Новий бактеріальний штам, ідентифікований як *R. aetherivorans* IAR1, синтезує полі-(3-гідроксибутират-3-гідроксивалеріат), використовуючи толуол як єдине джерело енергії [23]. Цей полімер характеризується гнучкістю та міцністю на рівні зі звичайними пластмасами, але його виробництво зазвичай потребує внесення дорогих попередників як вторинного джерела вуглецю. Використання толуолвмісних відходів як сировини для синтезу полімеру сприятиме

подальшому зниженню виробничих витрат поряд з ефективним використанням відходів [23].

Бензотіазоли належать до великої родини синтетичних гетероциклічних сполук і використовуються в різних галузях промисловості, наприклад, у виробництві шин як каталізатори процесів вулканізації, як лікарські засоби для лікування латерального аміотрофічного склерозу та хіміотерапії ракових захворювань, як пестициди (біоциди), а також у виробництві азобарвників [2]. Із промислових стічних вод було виділено штам *R. rhodochrous* OBT18, здатний розкласти похідні бензотіазолу, у тому числі бензотіазол, 2-гідроксибензотіазол, 2-амінобензотіазол (АБТ) і меркаптобензотіазол [2]. Для підвищення ефективності розкладу бензотіазолу запропоновано поєднання фотота/або біодеградації за присутності комплексу FeНТА (нітрилотриацетат), який є фотоіндуктором. За наявності FeНТА, навіть без світла, суттєво збільшувалася швидкість біодеградації АБТ (до 99% за 25 год) [2]. Подальші дослідження показали наявність у *R. rhodochrous* OBT18 асоційованих із клітинами поверхнево-активних гліколіпідів. Синтез ПАВ, очевидно, сприяє біотрансформації гідрофобних похідних бензотіазолу.

Серед сполук, що потрапляють у довкілля в результаті антропогенної діяльності, важливе місце посідають лікарські засоби, які також відомі своєю стійкістю до біодеградації [7]. Для посилення біологічного розпаду деяких фармацевтичних препаратів використовують явище кометаболізму, додаючи в середовище легкодоступне джерело вуглецю. Так, внесення глюкози дало змогу вилучити 15% карбамазепіну, 14% сульфаметіозолу або 20% сульфаметоксазолу штамом *R. rhodochrous* ATCC 13808 [7].

Біодеградація аліфатичних ксенобіотичних речовин. Забруднення ґрунту й ґрунтової води хлорвмісними розчинниками, особливо трихлоретиленом (ТХЕ) стає важливою екологічною проблемою через токсичність і стійкість до розкладу [15]. За аеробних умов біологічний розпад ТХЕ відбувається переважно в результаті кометаболізму з метаном, аміаком, пропаном, фенолом, толуолом або кумолом як ростовим субстратом. Здатність до окиснення толуолу виявлено в багатьох бактерій, проте його використання як ростового субстрату для кометаболізму ТХЕ стримується високою токсичністю. Тому необхідні альтернативні способи індукції відповідних ензимів у таких бактерій. Попередньо було показано

можливість інтенсифікації біорозкладу поліхлорованих дифенілів кількома видами бактерій за допомогою рослинних ефірних олій [15]. Чотири компоненти ефірних олій (кумол, карвон, лимонен і пінен) перевірено на здатність індукувати деградацію ТХЕ у *R. gordoniae* P3 та *R. erythropolis* BD2. Найбільш ефективним виявився кумол, але використання цієї речовини обмежено через її потенційну токсичність. Такі результати стимулювали пошук нових можливих індукторів серед рослинних ефірних олій (кмину, лимону, лемонграсу, м'яти і сосни). Для досліджень було обрано штам *Rhodococcus* sp. L4, здатний до деградації ТХЕ під час росту на толуолі. За наявності у середовищі олії лимону і лемонграсу клітини штаму за 8 год інкубації здатні до деградації ТХЕ на рівні $20 \pm 6\%$ і $27 \pm 8\%$ відповідно, що нижче, ніж у разі використання толуолу як індуктора ($57 \pm 5\%$) [15]. Здатність клітин до деградації ТХЕ збільшилася до $36 \pm 6\%$ у разі внесення ефірної олії кмину [15].

N-нітрозодиметиламін (НДМА) є сильною канцерогенною речовиною, що потрапляє у довкілля разом із промисловими стічними водами та у питну воду як побічний продукт після дезінфекції хлораміном та іншими дезінфікувальними засобами [6]. У деяких бактерій виявлено монооксигенази із широкою субстратною специфічністю, здатні розкласти НДМА у процесі кометаболізму — пропанотрофи *Rhodococcus* sp. RHA1 і *Rhodococcus ruber* ENV425, а також *Mycobacterium vaccae* JOB5, *Pseudomonas mendocina* KR1 і метанотроф *Methylosinus trichosporium* OV3b [6]. У *R. ruber* ENV425 встановлено специфічний шлях розкладу НДМА, дещо подібний до денітрозуючого шляху у ссавців, який каталізується P-450 ізозимами. Так, кінцевими продуктами такого розкладу є закис азоту, нітрит, нітрат, формальдегід, форміат та метиламін. *R. ruber* ENV425 здатен до зниження концентрації НДМА у середовищі з 8,3 мкг/л до 2 нг/л під час росту на пропані як основному субстраті [6].

У ході інших досліджень проаналізовано здатність нативної мікрофлори із середземноморської піщаної берегової лінії на північному узбережжі Сицилії до біодеградації нафтопродуктів, де реальні аварійні розливи відбулися за 18 місяців до відбору проб [14]. Домінуючими деструкторами вуглеводнів виявились представники родів *Rhodococcus*, *Gordonia* і *Nocardia*. Усі ізоляти були здатні розкласти аліфатичні компоненти забруднювачів і жоден з них не асимілював ароматичні сполуки. Ці конкретні актинобак-

терії-деструктори *n*-алканів є перспективними для відновлення піщаних ґрунтів узбережжя Середземного моря, оскільки використання вже акліматизованих автохтонних мікроорганізмів завжди ефективніше, ніж інтродукованих деструкторів [14].

Встановлено, що *R. erythropolis* DCL14 здатен до деградації вуглеводнів (C₅–C₁₆) в інтервалі температур 15–28 °С за присутності високих концентрацій хлориду натрію (до 2,5%) [24].

Узагальнені дані щодо деструкції токсичних ксенобіотичних сполук бактеріями роду *Rhodococcus* наведено в табл. 1.

Використання представників роду *Rhodococcus* у процесах біотрансформації

Мікроорганізми можуть брати участь у реакціях трансформації (зміна окремих ділянок у молекулах органічних речовин), перетворюючи ті чи інші сполуки на нові продукти. Умови перебігу цих реакцій м'які, і в багатьох випадках мікробіологічним трансформаціям віддають перевагу перед хімічними. Можливе також використання біологічних процесів у випадках, де прямий хімічний синтез молекул нездійснений або неефективний. На сучасному етапі біотрансформації становлять інтерес у промисловому виробництві з погляду отримання продуктів

з відновної, дешевої органічної рослинної сировини [12, 25].

З ґрунту, де росте хміль, методом накопичувальних культур було виділено штам *R. erythropolis* MLT1, що використовує β-мірцен як єдине джерело вуглецю [25]. Після інкубації бактерій у середовищі з 7,4 мМ β-мірцену визначено основний продукт біотрансформації — гераніол. Цей монотерпеновий спирт широко застосовують у парфумерії, для ароматизації мила та мийних засобів, виробництва інших ароматизованих сполук. Основним способом його промислового отримання є хімічний синтез з β-пінену і лише незначну частину одержують із природної сировини.

Ще один ароматизатор — R(–)-карвон — також можна одержувати біотрансформацією (–)-транс-карвеолу [26]. Ефірні олії, що містять багато карвону, використовують у харчовій промисловості, ароматерапії, вони входять до складу освіжувачів повітря тощо. *R. erythropolis* DCL14 здатен перетворювати (–)-транс-карвеол на R(–)-карвон [87]. Встановлено, що продуктивність утворення карвону в однофазному ферментері об'ємом 3 л становила 31 мг/л·год [26]. Гетерофазне культивування штаму DCL14 за присутності силіконової олії дало змогу підвищити вихід карвону в 2,5 раза [27].

R. oracus В-4, ізольований як стійкий до органічних розчинників мікроорганізм, здатен

Таблиця 1. Деструкція ксенобіотиків бактеріями — представниками роду *Rhodococcus*

Штам	Ксенобіотична сполука	Концентрація	Ступінь деструкції	Література
<i>R. jialingiae</i> djl-6-2	Карбендазим	100 мг/л	94% (60 год)	[17]
Змішана культура <i>Pseudomonas</i> sp. NBM21 та <i>Rhodococcus</i> sp. BTO62	Суміш <i>o</i> -, <i>m</i> - та <i>n</i> -ксилолу	Біофільтр	180 г/м ³ /год	[9]
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	Суміш поліхлорованих біфенілів	10 мг/мл	80–100% (72 год)	[13]
<i>R. erythropolis</i> DSM 14303	Афлатоксин В ₁	1,75‰	66,8% (72 год)	[1]
<i>R. rhodochrous</i> VKM В-2469	Флуорен	1 мМ	100% (24 год)	[22]
<i>Rhodococcus</i> sp. WU-K2R	Нафтотіофен	0,27 мМ	80% (120 год)	[11]
<i>R. aetherivorans</i> IAR1	Толуол	10 мл/л	100% (48 діб)	[23]
<i>R. rhodochrous</i> OBT18	2-амінобензотіазол	0,5 мМ	99% (25 год)	[2]
<i>R. rhodochrous</i> ATCC 13808	Карбамазепін	9,5‰	15% (28 діб)	[7]
	Сульфаметіозол	43,4‰	14% (12 діб)	
	Сульфаметоксазол	31,6‰	20% (36 діб)	
<i>Rhodococcus</i> sp. L4	Трихлоретилен	80 мМ	36% (8 год)	[15]
<i>R. ruber</i> ENV425	N-нітрозодиметиламін	8,3 мг/л	76% (18 год)	[6]
<i>R. erythropolis</i> DCL14	Мазут	2–32 мл/л	100% (9 міс.)	[24]

використовувати як гідрофільні, так і гідрофобні субстрати [28]. Встановлено, що цей штам може утворювати індиго з індолу та *o*-крезол з толуолу за одночасного споживання глюкози й олеїнової кислоти. Так, за 12 год *R. oracus* В-4 утворював індиго і *o*-крезол (0,217 і 2,12 мг/мл відповідно). Можливість отримання цих речовин за допомогою простих біологічних перетворень є потенційно важливою з практичного погляду, оскільки на сучасному етапі їх одержують складним хімічним синтезом.

Бактерію, що розкладає нікотин, використовуючи його як єдине джерело вуглецю й азоту, було ізольовано та ідентифіковано як *Rhodococcus* sp. Y22 [29]. Нікотин (1,0 г/л) був метаболізований цим штамом упродовж 52 год при 28 °С та рН 7,0. Встановлено, що клітини *Rhodococcus* sp. Y22 здатні розкласти нікотин як із розчинів, так і з тютюнового листа. Це робить *Rhodococcus* sp. Y22 можливим біологічним агентом для розкладу нікотину під час оброблення листа тютюну у процесі промислового виробництва тютюнових виробів [29].

Біодизель, моноалкілефіри довголанцюгових жирних кислот з коротколанцюговими спиртами, синтезовані з триацилгліцеридів (ТАГ), можуть бути одержані з відновлювальних джерел (рослинної біомаси). Бактерії родів *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* здатні накопичувати ТАГ за ліміту азоту [30]. Встановлення можливості синтезу ТАГ за високих концентрацій глюкози є важливою передумовою для одержання цих сполук з целюлозо- та крохмалевмісної сировини. Показано, що в процесі росту *R. oracus* PD630 на мелясі вміст ТАГ у клітинах досягає 52% [31]. Такі дані свідчать, що цей штам можна вирощувати на дешевих джерелах вуглецю, отриманих із сільськогосподарських культур, для виробництва біодизельного палива.

Акрилову кислоту застосовують у виробництві акрилових ефірів (метилакрилат, етилакрилат, бутилакрилат і 2-етилгексилакрилат), використовуваних для одержання промислових покриттів, клеїв, паперу, текстильних виробів, смол, флокулянтів тощо [32]. Поточний промисловий попит на акрилову кислоту задовольняється хімічним синтезом, який базується на каталітичному окисненні пропілену через акролеїн в одну або дві стадії. Біотехнологічні та біокаталітичні процеси є економічнішими і безпечнішими. Із забрудненого нафтою зразку ґрунту було ізольовано штам, ідентифікований як *Rhodococcus ruber* AKSH-84, здатний здійснювати біотрансформацію акрилонітрилу в акрилову кислоту [32]. Порівняно з іншими джерелами вуглецю у разі росту на гліцеролі (10 г/л) спостерігали високу нітрилазну активність, що забезпечувала біоконверсію акрилонітрилу в акрилову кислоту. Молекулярна маса очищеного ензиму становила майже 41 кДа, що близько до молекулярної маси нітрилази *R. rhodochrous* K22 [33]. Нітрилази *R. ruber* AKSH-84 притаманна широка субстратна специфічність і здатність гідролізувати різні нітрили (аліфатичні моно- і динітрили, ароматичні, гетероциклічні) у концентрації 100 мМ. Якщо для інтактних клітин ефективність біоконверсії становила 63% (за концентрації акрилової кислоти 126 мМ) через 120 хв, то за використання очищеної нітрилази — 92% за концентрації акрилової кислоти 183 мМ через 30 хв (рис. 1) [32]. Ці дослідження показують, що біотрансформація акрилонітрилу в акрилову кислоту за допомогою нового штаму *R. ruber* AKSH-84 може бути використана в «зеленому» біосинтезі акрилової кислоти [32].

Найкращий приклад промислового використання нітрилгідратази *R. rhodococcus* J1 — виробництво акриламідів з акрилоні-

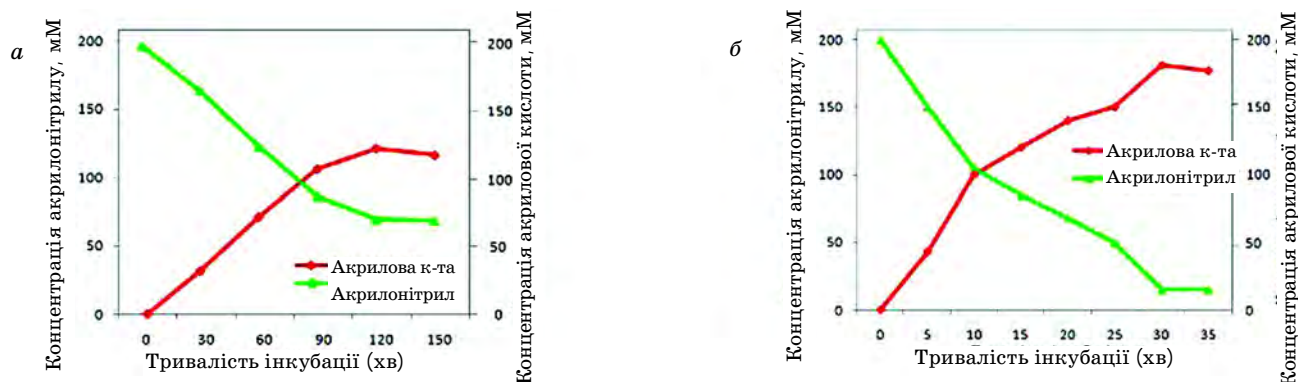


Рис. 1. Біотрансформація акрилонітрилу в акрилову кислоту:

а — інтактними клітинами, б — за допомогою очищеної нітрилази *Rhodococcus ruber* AKSH-84 [32]

рилу, що на цей час сягає 30 тис. т/рік [3]. Високоактивну нітрилгідратазу, виділену зі штаму *R. ruber* gt1, іммобілізували на немодифікованих оксидах алюмінію і вуглецевмісних сорбентах, що супроводжувалося підвищенням у кілька разів її термостабільності [34].

Бутирамід — важлива хімічна речовина, що набула застосування для синтезу гідроксамових кислот і регулювання реологічних характеристик систем під дією електричного поля. Нітрилгідратаза *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 каталізує перетворення бутиронітрилу в бутирамід [35]. Вихід бутираміду становив 597 г за таких умов: культивування у ферментері об'ємом 1 л упродовж 6 год при температурі 10 °С, концентрація бутиронітрилу 60% (об'ємна частка) [36]. У ході подальшої роботи штаму *R. rhodochrous* PA-34 було піддано дії хімічного мутагену *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину. Отриманий мутантний штам характеризувався синтезом нітрилгідратази із вдвічі вищою активністю [35]. Такі результати відкривають нові можливості для інтенсифікації процесів біотрансформації, що відбуваються під дією цього ензиму.

Оскільки робота над дослідженням і вивченням шляхів метаболізму, генів і їх послідовностей, структури специфічних ензимів та їхньої дії триває, можливі й інші галузі та напрями використання бактерій роду *Rhodococcus*.

Практичне використання метаболітів, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*

До метаболітів, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*, що набули практичного застосування у сучасних технологіях, належать поверхнево-активні речовини, екзополісахариди, антибіотики і сполуки з антимікробними властивостями та ензими.

Антибіотики та антибіотичні сполуки. З культуральної рідини штаму *Rhodococcus jostii* K01-B0171 на хроматографічних колонках було виділено й очищено два антимікобактеріальні пептиди, названі ларіатин А і ларіатин В [37]. Ці речовини пригнічували ріст *Mycobacterium smegmatis* за концентрації 3,13 і 6,25 мкг/мл відповідно. Крім того, ларіатин А інгібував ріст *Mycobacterium tuberculosis* за концентрації 0,39 мкг/мл [37].

Інший антибіотик, аурацин RE, було ізольовано з культуральної рідини *R. erythropolis* JCM 6824 [38]. За хімічною приро-

дою аурацин RE подібний до аурацину С — антибіотика, синтезованого *Stigmatella aurantiaca* [39]. Однак порівняно з аурацином С, RE притаманна ширша та сильніша антибактеріальна дія на грампозитивні бактерії [38].

Rhodococcus fascians — відомий фітопатоген, що вражає як покритонасінні, так і голонасінні рослини [40–43]. У лабораторних умовах культивування цих бактерій синтезу антибіотиків не спостерігали, доки їх не помістили в умови жорсткої конкуренції, вирощуючи спільно зі *Streptomyces padanus* [44]. Синтезовані за таких умов речовини, названі родострептоміцинами, належать до того самого класу аміноглікозидів, що й стрептоміцин. Уже перші ж тести показали, що родострептоміцини ефективно знищують пов'язані з гастритом і виразкою шлунка бактерії *Helicobacter pylori* й не інактивуються в умовах підвищеної кислотності (наприклад, за присутності шлункового соку).

Екзополісахариди. Відомо, що бактеріям роду *Rhodococcus* притаманна здатність до синтезу екзополісахаридів (ЕПС) [45–47]. Так, бензентолерантний штам *Rhodococcus* sp. 33 може утворювати значну кількість позаклітинного полісахариду, який було названо «33 EPS». Він сприяє підвищенню стійкості клітин продуцента до бензину, особливо на початкових етапах взаємодії з токсичною сполукою. Встановлено, що цей ЕПС складається з D-галактози, D-глюкози, D-манози, D-глюкуронової кислоти та пірвіноградної кислоти у молярному співвідношенні 1:1:1:1:1 [46].

R. rhodochrous S-2 синтезує позаклітинний полісахарид масою в кілька мільйонів дальтон, що складається з D-глюкози, D-галактози, D-манози, D-глюкуронової кислоти у молярному співвідношенні 1:1:1:1 [47]. У його структурі було також виявлено 0,8% (масова частка) октадеканової та 2,7% (масова частка) гексадеканової кислот. Показано, що за присутності цього ЕПС дикі штами родококків, не здатні засвоювати вуглеводні нафти, набувають такої здатності. Подальші дослідження показали, що додавання ЕПС штаму S-2 до забрудненої нафтою морської води підвищувало деградацію поліароматичних вуглеводнів нафти, супроводжувалося емульгуванням нафти і збільшенням кількості морських бактерій, що розкладають поліароматичні вуглеводні [45].

Ензими. Мікробні холестериноксидази каталізують окиснення й ізомеризацію холестеролу. Інтерес до цих ензимів полягає передусім у можливості використання їх

для визначення холестеролу в біологічних зразках, харчових продуктах, а також у біоконверсії багатьох β -гідроксистероїдів у органічні розчинники [48]. *R. erythropolis* ATCC 25544 синтезує асоційовану з клітинами (55%) та позаклітинну (45%) холестеролоксидазу, *Rhodococcus* sp. 501 — позаклітинну холестеролоксидазу за умов росту на середовищі з холестеролом як єдиним джерелом вуглецю [49].

Бактерії роду *Rhodococcus* також синтезують ще один практично цінний ензим — кокаїнестеразу (КокЕ), яку останнім часом розглядають як потенційний терапевтичний агент для лікування передозування та кокаїнової залежності [50, 51]. КокЕ безпосередньо розкладає кокаїн у неактивні продукти, тимчасом як традиційні підходи вимагають блокади кокаїну на безлічі моноамінних транспортерів та іонних каналів. Повноцінності нативної форми КокЕ перешкоджає його інактивація при 37 °С. У ході селективної роботи було отримано мутантний штам, що продукує термостабільну форму цього ензиму Cose-1169K/G173Q [50]. Кінетичні дослідження *in vitro* показують, що період напіврозпаду Cose-1169K/G173Q становить 2,9 доби при 37 °С, що в 340 раз більше, ніж для нативної форми. Отже, головні перешкоди для клінічного застосування КокЕ полягають у його термонестабільності, швидкій деградації циркулюючими протеазами і потенційній імуногенності. Для розв'язання цих проблем було вирішено модифікувати ензим приєднанням поліетиленгліколю (ПЕГ). Отримані дані свідчать, що така модифікація сприяє захисту КокЕ від теплової деградації та дії протеаз. Окрім того, попередні результати *in vivo* доводять, що ПЕГ-форма КокЕ, як і нативна КокЕ, змогла захистити тварин від спричинених кокаїном отруйних ефектів [51].

Поверхнево-активні речовини. Представники роду *Rhodococcus* є відомими продуцентами поверхнево-активних та емульгуювальних речовин, яким притаманний значний практичний потенціал.

Перші статті, у яких були описані представники роду *Rhodococcus* як продуценти речовин із поверхнево-активними властивостями, з'явилися у 70–80-х роках ХХ ст. [52–54]. Відтоді було проведено значну теоретичну та практичну роботу з дослідження ПАР-синтезувальної здатності цих бактерій. Так, було визначено, що за хімічною природою синтезовані родококами поверхнево-активні речовини є трегалозоміколатами, встановлено закономірності їх синтезу, ме-

ханізми дії та роль для клітин [55–59]. Бактерії роду *Rhodococcus* розглядають як продуценти практично цінних речовин з емульгуювальними та поверхнево-активними властивостями в узагальнюючих оглядах [55, 57].

Деякі ПАР, синтезовані родококами, є навіть ефективнішими за синтетичні або взагалі не мають синтетичних аналогів [58, 59].

Однак якісний склад ПАР різних видів та штамів відрізняється. Зокрема, у *R. erythropolis* 51T7 ПАР — трегалозотетрафір, що складається із шести компонентів: одного великого та п'яти менших, при цьому гідрофобна складова містить від 9 до 11 атомів вуглецю [60]. ПАР, утворені *R. fascians* A-3, — це рапнорівні гліколіпіди [61]. *R. erythropolis* 3C-9 утворює 2 типи ПАР: вільні жирні кислоти та гліколіпіди [62]. Виявлено щонайменше 12 видів вільних жирних кислот C_9 – C_{22} та 2 види гліколіпідів: гліколіпіди та трегалозоліпіди, які, окрім вуглеводної складової, також відрізняються кількістю ненасичених жирних кислот та довжиною їхніх ланцюгів, що входять до складу ліпідної складової ПАР [62]. *R. ruber* продукує ПАР, основними компонентами яких є вільні жирні кислоти [63]. *R. fascians* DSM 20669 синтезує типові для родококів поверхнево-активні трегалозоліпіди [64].

Водночас у складі ПАР *Rhodococcus* sp. TW53 не було виявлено трегалозоліпідів [65]. У результаті екстракції цього комплексу ПАР сумішшю хлороформ/метанол/вода та подальшого хроматографічного аналізу основну його складову було визначено як ліпопептид, а отже, TW53 є першим відомим представником бактерій роду *Rhodococcus*, що його синтезує. Було запропоновано назву — родофактин. Визначення ліпофільної фракції показало, що ліпопептид містить принаймні шість жирних кислот з довжиною ланцюга C_{14} – C_{19} , серед яких насичені кислоти становлять 81,44%, а пальмітинова кислота — більшу частину (58,62% від загальної кількості). Гідрофільний фрагмент ліпопептиду складається з п'яти видів амінокислот: Ala-Ile-Asp-Met-Pro. Мінімальне значення поверхневого натягу очищеного родофактину становило 30,7 мН/м [65].

Rhodococcus wratislaviensis BN38 синтезує ПАР за присутності лімітуючих концентрацій азоту і лише на гідрофобних субстратах, використовуючи *n*-алкани — від *n*-октану до *n*-гептадекану [66]. Аналіз показав, що за хімічною природою утворені ПАР являють собою 2,3,4,2'-трегалозотетра-

ефір, в якому вуглецеві атоми у положеннях 2, 3 і 4 етерифіковані залишками октанової кислоти, а молекулярна маса становить 876 г/моль. Виявлено також слідові кількості іншого 2,3,4,2'-тетраефіру трегалози з молекулярною масою 849 г/моль. Поверхневий натяг води поступово знижувався зі збільшенням концентрації ПАР від 72 мН/м до 24,4 мН/м і за концентрації від 5 мг/л ККМ залишався постійним [66].

Субстрат, використовуваний продуцентом як джерело вуглецю, певною мірою впливає на структуру і властивості ПАР. Зокрема, ріст *R. erythropolis* АТСС 4277 на гліцеролі призводить до вивільнення в культуральну рідину речовин з поверхнево-активними властивостями, зазвичай зв'язаними з клітинною стінкою [67].

Rhodococcus sp. ТА6 було виділено із забрудненого нафтою іранського ґрунту [68]. Штам синтезує позаклітинний комплекс поверхнево-активних речовин із моногліцеридів, дигліцеридів, гліколіпідів та міколової кислоти. Подальші дослідження показали, що ПАР, утворені ТА6, виявляють емульгвальну специфічність щодо довгоголанцієвих вуглеводнів, здатні утворювати стабільні емульсії з різних вуглеводнів — від пентану до легкого моторного мастила [68].

У наших попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту і води було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [69]. Штам зареєстровано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за номером ІМВ Ас-5017.

Встановлено здатність штаму *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгвальними властивостями під час росту на гідрофільних (глюкоза, етанол) та гідрофобних (рідкі парафіни, гексадекан) субстратах [70–72]. Порівняно з відомими продуцентами ПАР штам має такі переваги: синтезує ПАР на середовищі з низьким вмістом солей (3 г/л), не потребує факторів росту, характеризується високим виходом ПАР від субстрату (до 70%).

Показано, що *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР, які за хімічною природою є комплексом гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів зі сполуками полісахаридно-протеїнової природи [70, 71]. Гліколіпіди представлені трегалозомоно- і диміколатами, фосфоліпіди — фосфатидилгліцеролом, фосфатидилетаноламіном, дифосфатидилгліцеролом, нейтральні ліпіди — цетиловим спиртом,

пальмітиною кислотою, метиловим ефіром *n*-пентадеканової кислоти, тригліцеридами, міколовими кислотами та ін.

Встановлено можливість інтенсифікації синтезу ПАР оптимізацією умов культивування продуцентів як у колбах, так і в лабораторному ферментері [70–73], внесенням у середовище з етанолом чи гексадеканом С₄-дикарбонових кислот (попередників глюконеогенезу) і цитрату (регулятора синтезу ліпідів) [74–77], модифікацією середовища на основі дослідження особливостей метаболізму гексадекану в штаму ІМВ Ас-5017 (зниження в середовищі культивування вмісту інгібіторів і підвищення активаторів ключових ферментів біосинтезу ПАР) [78].

Так, визначення оптимальних умов культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на етанолі (концентрація субстрату 2%, концентрація КNO₃ — 1,5 г/л, тривалість культивування — 168 год) дало змогу утричі підвищити синтез ПАР [70]. Максимальний синтез ПАР під час культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на гексадекані в колбах на качалці спостерігався за таких умов: концентрація гексадекану 2%, співвідношення С/Н = 49:1, джерело азоту NaNO₃, наявність у середовищі іонів заліза, коефіцієнт масообміну 0,14 г O₂/л год, тривалість культивування 168 год [71].

Встановлено, що катіони калію є інгібіторами алкангідроксилази і НАДФ⁺-залежної альдегіддегідрогенази, а катіони натрію — активаторами цих ферментів у штаму ІМВ Ас-5017 [78]. Зниження в середовищі культивування концентрації катіонів калію до 1 мМ, підвищення вмісту катіонів натрію до 35 мМ, внесення 36 мкмоль/л іонів заліза (II), необхідного для функціонування алкангідроксилази, супроводжувалося збільшенням активності ферментів метаболізму *n*-гексадекану, а також підвищенням у 4 рази кількості синтезованих ПАР [78].

Необхідним етапом розроблення технології мікробного синтезу є масштабування процесу на ферментаційному обладнанні. Культивування продуцента у ферментері дає змогу також дослідити вплив на біосинтез таких важливих параметрів, як аерація, швидкість перемішування, режим внесення субстрату, рН та ін., що суттєво підвищує ефективність технології.

Незважаючи на велику кількість публікацій, присвячених дослідженням мікробних ПАР [55, 57, 79–82], відомості про масштабування технологій їх біосинтезу чи особливості утворення цих продуктів мікробного синтезу у процесі культивування

мікроорганізмів-продуцентів у лабораторних біореакторах нечисленні [55, 67, 83–86]. Перші такі повідомлення з'явилися наприкінці 70-х — у середині 80-х років ХХ ст. і стосувалися масштабування процесів біосинтезу поверхнево-активних трегалозоліпідів [52] і рамноліпідів [87, 88]. Пізніше відомості про культивування у біореакторах бактерій роду *Rhodococcus* — продуцентів ПАР було підсумовано в огляді [55]. Проте зазначимо, що дотепер у літературі є дуже мало даних про біосинтез ПАР родококами у біореакторах. Можливо, однією з причин цього є той факт, що ПАР-синтезувальна здатність представників роду *Rhodococcus* дещо нижча, ніж продуцентів інших поверхнево-активних гліколіпідів (рамно-, софоро-, манозоеритритоліпідів). Окрім того, неоліком родококів як продуцентів ПАР є повільний ріст і, як наслідок, висока тривалість процесу біосинтезу цільового продукту. Так, під час культивування *R. erythropolis* ATCC 4277 упродовж 51 год у ферментері об'ємом 1,5 л на середовищі з гліцеролом (15 г/л) кількість синтезованих ПАР становила лише 1,7 г/л [67]. У разі використання як джерела вуглецю *n*-алканів (20 г/л) кількість ПАР, утворюваних *R. erythropolis* DSM 43215 у біореакторі (50 л) на 36-ту–38-му год росту, досягала 2 г/л [52], а під час культивування цього самого штаму у ферментері об'ємом 20 л упродовж 160 год на середовищі, що містило 100 г/л *n*-алканів, — 32 г/л [55]. Штам *R. erythropolis* SD-74 через 240 год вирощування у біореакторі об'ємом 5 л синтезував з 80 г/л *n*-гексадекану до 40 г/л ПАР [55]. У більшості випадків високої концентрації ПАР було досягнуто під час синтезу цих сполук іммобілізованими клітинами бактерій роду *Rhodococcus* чи клітинами, які перебували у стані спокою.

Нещодавно з'явилося повідомлення про штам *Rhodococcus* sp. Moj-3449, який харак-

теризувався високою швидкістю росту (до 0,2 год⁻¹) на середовищах з 180 г/л алканів чи сирової нафти [89]. Проте в цій роботі відсутня інформація про здатність штаму Moj-3449 до синтезу ПАР.

Наші дослідження щодо утворення ПАР у процесі періодичного культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у ферментері АК-210 на середовищі з *n*-гексадеканом показали, що максимальні показники синтезу ПАР (концентрація позаклітинних ПАР 7,2 г/л, індекс емульгування культуральної рідини 50%, вихід ПАР від субстрату 50%) спостерігалися за концентрації розчиненого кисню 60–70% від насичення повітрям, рН 8,0, поетапної подачі субстрату порціями по 0,3–0,4% кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4% (об'ємна частка) та використанні 10% инокуляту, вирощеного до середини експоненційної фази на середовищі з 1,0% *n*-гексадекану [73]. Реалізація процесу біосинтезу ПАР на ферментаційному обладнанні дала змогу підвищити у 2 рази кількість синтезованих ПАР і скоротити у 3,5 раза тривалість культивування продуцента порівняно з вирощуванням у колбах на качалці [73].

У табл. 2 наведено порівняльні показники синтезу ПАР штаммом ІМВ Ас-5017 та іншими представниками роду *Rhodococcus* під час культивування в біореакторах на середовищах з *n*-алканами. Як свідчать наведені дані, селекціонований нами штам *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 не поступається, а за деякими показниками перевищує відомі продуценти. Так, у процесі вирощування штаму ІМВ Ас-5017 у біореакторі (у встановлених оптимальних умовах) синтезуються переважно позаклітинні ПАР, тимчасом як для інших родококів у літературі (табл. 2) наводиться концентрація сумарних поверхнево-активних речовин (як асоційованих із клітинами, так і позаклітинних).

Таблиця 2. Порівняльні показники синтезу ПАР під час культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та інших представників роду *Rhodococcus* у біореакторах

Штам, література	Джерело вуглецю, концентрація, г/л	Біомаса, г/л	ПАР			Тривалість процесу, год
			г/л	вихід, % (від субстрату)	г / г біомаси	
DSM 43215 [52]	C ₁₂ –C ₁₈ – <i>n</i> -алкани; 20,0	19,0	2,0	10	0,11	38
DSM 43215 [55]	C ₁₀ – <i>n</i> -алкани; 100,0	8,0	32,0	32	4,0	160
SD-74 [55]	<i>n</i> -гексадекан; 80,0	12,0	40,0	50	3,3	240
ІМВ Ас-5017 [73]	<i>n</i> -гексадекан; 14,4	1,7	7,2	50	4,2	48

Подальші наші дослідження показали можливість інтенсифікації синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності у середовищі з етанолом цитрату (регулятор синтезу ліпідів) і фумарату (попередник глюконеогенезу) [74, 75, 77]. Збільшення на 40–100% показників синтезу ПАР за умови внесення цитрату (0,1%) і фумарату (0,2%) на початку стаціонарної фази росту продуцента зумовлено активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення в 1,4–1,5 і 3,4–3,6 рази активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази, відповідно, а також зниження в 1,5–1,6 рази активності ізоцитратдегідрогенази [74, 75].

Підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за умови внесення у середовище з *n*-гексадеканом фумарату і цитрату спричинено інтенсифікацією синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів, про що свідчило збільшення у 3–5 раз активності фосфоенолпіруватсинтетази і трегалозофосфатсинтази порівняно з вирощуванням штаму на *n*-гексадекані [78].

Практичне використання ПАР родококів. У класичних методах мікробної інтенсифікації нафтовидобутку мікроорганізми синтезують полімери і поверхнево-активні речовини, які знижують поверхневий натяг між фазами нафта–грунт, що сприяє вилученню нафти [90]. Такі мікроорганізми мають бути стійкими до суворих екологічних умов нафтородовищ, у тому числі й до високої температури, тиску, солоності й низької аерації [90]. Тому перспективнішим є застосування у процесах нафтовидобутку мікробних ПАР замість живих мікроорганізмів [68].

ПАР бактерій роду *Rhodococcus* можна ефективно використовувати у природоохоронних технологіях, зокрема, для очищення ґрунту та води від нафти [3, 20, 56, 58, 59]. Доведено, що внесення ПАР родококів у ґрунт призводить не тільки до підвищення ступеня біодеградації нафти, а й до суттєвого збільшення популяцій бактерій, які беруть участь в окисненні сирої нафти. Під дією поверхнево-активних речовин бактерій роду *Rhodococcus* також починається розкладання ароматичних та аліфатичних вуглеводнів і на 20–25% прискорюється процес біологічного очищення [20].

У наших дослідженнях [69] показано можливість очищення води, забрудненої нафтою (100–200 мг/л), іммобілізованими на керамзиті клітинами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Ступінь очищення води від нафти за швидкості подачі води 0,68 л/хв, аерації

0,1 л/л за хв та періодичному додаванні 0,01% діамонійфосфату становив 99,5–99,8%. Встановлено, що за присутності у накопичувальній культурі нафтоокиснювальних бактерій штаму *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 і екзогенних ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27, ефективність розкладання сирої нафти (2%) досягала 93–94% [91]. Ступінь деструкції нафти (2,6 г/л) у воді за присутності суспензії клітин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 становила 92% через 50 діб [92].

Наступні наші дослідження показали перспективність використання ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у природоохоронних біотехнологіях для очищення довкілля від нафти. Так, через 30 діб (рис. 2) ступінь деградації нафти (2,6 г/л) у воді за присутності 5% (об'ємна частка) препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини або її супернатанта становив 80–93%.

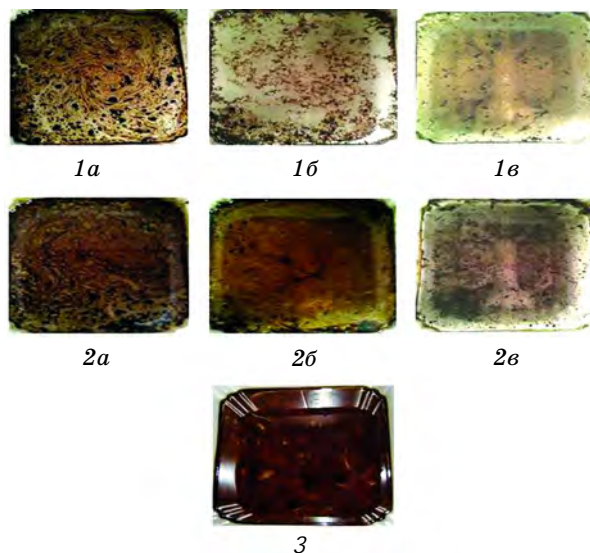


Рис. 2. Деструкція нафти різними препаратами поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017:

1 — нативна культуральна рідина;
2 — супернатант культуральної рідини;
3 — контроль (без обробки).

Тривалість експозиції: а — 1 доба, б — 12 діб, в — 30 діб

Інтенсифікація деструкції нафти зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.

Через 30 діб ступінь деградації нафти (21,4 г/кг ґрунту) за присутності препаратів ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (100–300 мл/кг ґрунту) у вигляді постферментаційної культуральної рідини становив

46–86% (табл. 3). За присутності ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у вигляді нативної культуральної рідини (30 мл) відмивання піску від нафти (0,1 мл нафти/1 г піску) становив 100%.

ПАР *Rhodococcus* sp. ТА6 [68], виявилися стабільними за високої солоності (10% NaCl), підвищених температур (стабільність властивостей навіть після автоклавування при 120 °С упродовж 15 хв) і в широкому діапазоні рН (4,0–10,0). Препарати ПАР у вигляді культуральної рідини здатні видаляти до 70% нафти із забрудненого піску. Ці дані вказують на потенційну цінність ПАР ТА6 для інтенсифікації процесів нафтовидобутку, особливо у родовищах з екстремальними умовами [68].

Таблиця 3. Вплив препаратів ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на ефективність очищення ґрунту від нафти

Препарати ПАР	Концентрація препаратів ПАР, мл/кг ґрунту	Концентрація залишкової нафти в пробі, г	Ступінь деструкції нафти, %
Культуральна рідина	100	7,0±0,012	67,3±2,3
	200	5,7±0,023	73,4±2,7
	300	2,9±0,019	86,4±2,0
Супернатант	100	11,6±0,026	45,8±2,1
	200	10,4±0,015	51,4±2,2
	300	9,3±0,021	56,5±2,7
Контроль	0	21,4±0,015	0

Синтезовані родококами трегалозоліпіди розглядають і як терапевтичні агенти [93, 94]. Гліколіпідний комплекс, синтезований *Rhodococcus ruber*, нетоксичний і не спричиняє відчутного ефекту на проліферативну активність лейкоцитів периферичної крові [94]. У фракції моноцитів ПАР активізує утворення ІЛ-1бета і фактора некрозу пухлин-альфа, не впливаючи на утворення ІЛ-6. У моноклеарній фракції гліколіпід не впливав на продукцію цих цитокінів. Ці результати вказують на перспективи подальших досліджень імуномодуючої та антипухлинної дії препарату ПАР. Гліколіпідний комплекс *Rhodococcus ruber* IEGM 231 стимулює синтез ІЛ-12, ІЛ-18 та активних форм кисню клітинами вродженого імунітету [93]. При цьому ПАР неістотно впливав на утворення ІЛ-10 моноцитами та моноклеарними клітинами

Перші повідомлення про антивірусні властивості мікробних ПАР родококів з'явилися ще наприкінці 80-х років ХХ ст.

[53, 54]. Так, ПАР *R. erythropolis* виявляли антивірусну дію щодо простого вірусу герпесу 1 (HSV-1) та вірусу грипу.

Наші дослідження [95–97] показали, що, що препарати ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (0,61–2,1 мг/мл) у вигляді супернатанта культуральної рідини виявляють антимікробну дію щодо ряду мікроорганізмів (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3). Не виявлено інгібуючого впливу препаратів ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на клітини *S. cerevisiae* ОБ-3 і *Escherichia coli* ІЕМ-1 та антифунгальної дії ПАР щодо *Aspergillus niger* Р-3 і *Fusarium culmorum* Т-7.

Виживання мікробних клітин залежало від концентрації ПАР у препаратах, тривалості експозиції, а також фізіологічного стану тест-культур. Через 2 год оброблення досліджуваними препаратами ПАР спостерігали загибель 97% клітин *B. subtilis* БТ-2, 85% — *C. tropicalis* ПБТ-5 і 74% — *C. albicans* Д-6 [95].

У наших подальших експериментах було встановлено, що ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 посилюють антимікробну дію олії чайного дерева на певні мікроорганізми (*C. albicans*, *A. niger*, *S. aureus*) завдяки власним як антимікробним, так і емульгувальним властивостям [96, 97]. Показано, що за одночасного внесення у суспензію досліджуваних тест-культур (10⁴–10⁵ клітин/мл) емульсії на основі олії чайного дерева (12,5 мкл/мл) і ПАР (0,43 мг/мл) кількість живих клітин через 15 хв експозиції була на 0,7–66% нижчою, ніж у разі оброблення суспензії мікроорганізмів препаратами олії без поверхнево-активних речовин.

Зазначимо, що поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 виявляли антимікробну дію щодо ряду фітопатогенних бактерій — *Pseudomonas syringae* 8511, *Pseudomonas corrugata* 9070, *Pectobacterium carotovorum* 8289, *Xantomonas vesicatoria* 7790 (рис. 3). Експерименти показали, що зі збільшенням тривалості експозиції з 1 до 2 год виживання *X. vesicatoria* 7790 і *P. syringae* 8511 за присутності препаратів ПАР штаму ІМВ Ас-5017 (0,8 мг/мл) становило всього 11–12%.

Наведені дані дають змогу розглядати ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 як перспективні для використання не тільки у медицині, а й у сільському господарстві для пригнічення фітопатогенних бактерій.

Ринковий інтерес до бактерій роду *Rhodococcus* зумовлений їхніми широкими метаболічними можливостями і здатністю до синтезу низки практично цінних мета-

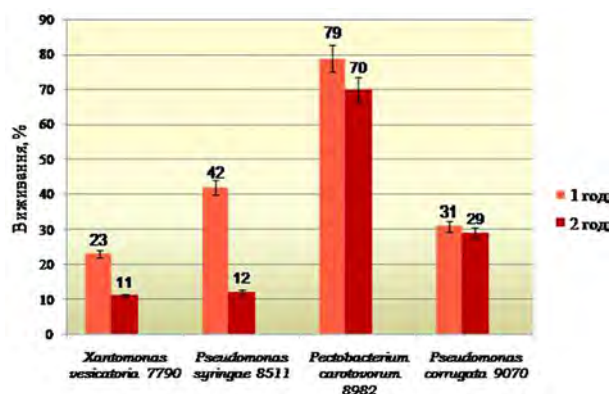


Рис. 3. Антимікробна дія ПАР *R. erythropolis* IMB As-5017 на деякі фітопатогенні бактерії

болітів: поверхнево-активних та емульгуювальних речовин, флокулянтів, полімерів, антибіотиків, ензимів тощо.

Дані літератури свідчать про величезний потенціал цих бактерій як деструкторів ароматичних, гетероциклічних та аліфатичних

ЛІТЕРАТУРА

1. Alberts J. F., Engelbrecht Y., Steyn P. S. et al. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures // Int. J. Food Microbiol. — 2006. — V. 109, N 1–2. — P. 121–126.
2. Choro C., Charmantray F., Besse-Hoggan P. et al. 2-Aminobenzothiazole degradation by free and Ca-alginate immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* // Chemosphere. — 2009. — V. 75, N 1. — P. 121–128.
3. De Carvalho C. C., da Fonseca M. M. The remarkable *Rhodococcus erythropolis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2005. — V. 67, N 6. — P. 715–726.
4. Di Gennaro P., Terreni P., Masi G. et al. Identification and characterization of genes involved in naphthalene degradation in *Rhodococcus opacus* R7 // Ibid. — 2010. — V. 87, N 1. — P. 297–308.
5. Fernandez de Las Heras L., Garcia Fernandez E., Maria Navarro Llorens J. et al. Morphological, physiological, and molecular characterization of a newly isolated steroid-degrading actinomycete, identified as *Rhodococcus ruber* strain Chol-4 // Curr. Microbiol. — 2009. — V. 59, N 5. — P. 548–553.
6. Fournier D., Hawari J., Halasz A. et al. Aerobic biodegradation of N-nitrosodimethylamine by the propanotroph *Rhodococcus ruber* ENV425 // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — V. 75, N 15. — P. 5088–5093.
7. Gauthier H., Yargeau V., Cooper D. G. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism // Sci. Total. Environ. — 2010. — V. 408, N 7. — P. 1701–1706.

ксенобіотиків — нафталену, ксилолу, толуену, флуорену, ізопрену, індолу, фенолу, вуглеводнів нафти тощо.

Економічно привабливими також є представники роду *Rhodococcus*, здатні здійснювати біотрансформації — процеси біологічного перетворення сполук, що становлять інтерес у промисловому виробництві продуктів з відновлювальної дешевої рослинної сировини. Так, перспективними є штами родококків, використовувані для одержання ароматизаторів карвону та гераніолу, а також нікотинредуючі штами. Застосовуючи біоконверсію різноманітних субстратів представниками цього роду, можна істотно здешевити та полегшити отримання біодизеля, бутираміду, акрилової кислоти.

Метаболіти бактерій роду *Rhodococcus* можуть бути ефективними у природоохоронних технологіях (ПАР, полісахариди), медицині (ензими, антибіотики, ПАР), промисловості (ензими, ПАР) тощо.

8. Goncalves E. R., Hara H., Miyazawa D. et al. W. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — V. 72, N 9. — P. 6183–6193.
9. Kim D., Choi K. Y., Yoo M. et al. Benzylic and aryl hydroxylations of m-xylene by o-xylene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain DK17 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 86, N 6. — P. 1841–1847.
10. Kim D., Lee C. H., Choi J. N. et al. Aromatic hydroxylation of indan by o-xylene-degrading *Rhodococcus* sp. strain DK17 // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — V. 76, N 1. — P. 375–377.
11. Kirimura K., Furuya T., Sato R. et al. Biodesulfurization of naphthothiophene and benzothiophene through selective cleavage of carbon-sulfur bonds by *Rhodococcus* sp. strain WU-K2R // Ibid. — 2002. — V. 68, N 8. — P. 3867–3872.
12. Martinkova L., Uhnakova B., Patek M. et al. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // Environ. Int. — 2009. — V. 35, N 1. — P. 162–177.
13. Navarro-Llorens J. M., Patrauchan M. A., Stewart G. R. et al. Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds // J. Bacteriol. — 2005. — V. 187, N 13. — P. 4497–4504.
14. Quatrini P., Scaglione G., De Pasquale C. et al. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline // J. Appl. Microbiol. — 2008. — V. 104, N 1. — P. 251–259.
15. Suttinun O., Muller R., Luepromchai E. Trichloroethylene cometabolic degradation by *Rhodococcus* sp. L4 induced with plant essen-

- tial oils // Biodegradation. — 2009. — V. 20, N 2. — P. 281–291.
16. Van der Geize R., Dijkhuizen L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications // Curr. Opin. Microbiol. — 2004. — V. 7, N 3. — P. 255–261.
 17. Wang Z., Wang Y., Gong F. et al. Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2 // Chemosphere. — 2010. — V. 81, N 5. — P. 639–644.
 18. Warren R., Hsiao W. W., Kudo H. et al. Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated-biphenyl-degrading *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // J. Bacteriol. — 2004. — V. 186, N 22. — P. 7783–7795.
 19. Robles-Gonzalez I. V., Fava F., Poggi-Varaldo H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments // Microb. Cell Fact. — 2008. — V. 7:5. doi: 10.1186/1475-2859-7-5.
 20. Seo J.-S., Keum Y.-S., Li Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2009. — V. 6, N 1. — P. 278–309.
 21. Saa L., Jaureguibeitia A., Largo E. et al. Cloning, purification and characterization of two components of phenol hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 86, N 1. — P. 201–211.
 22. Kolomytseva M. P., Randazzo D., Baskunov B. P. et al. Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by *Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469 // Bioresour. Technol. — 2009. — V. 100, N 2. — P. 839–844.
 23. Hori K., Kobayashi A., Ikeda H., Unno H. *Rhodococcus aetherivorans* IAR1, a new bacterial strain synthesizing poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from toluene // J. Biosci. Bioeng. — 2009. — V. 107, N 2. — P. 145–150.
 24. De Carvalho C. C., da Fonseca M. M. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 // FEMS Microbiol. Ecol. — 2005. — V. 51, N 3. — P. 389–399.
 25. Thompson M. L., Marriott R., Dowle A., Grogan G. Biotransformation of β -myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 85, N 3. — P. 721–730.
 26. Morrish J. L., Daugulis A. J. Inhibitory effects of substrate and product on the carvone biotransformation activity of *Rhodococcus erythropolis* // Biotechnol. Lett. — 2008. — V. 30, N 7. — P. 1245–1250.
 27. Morrish J. L., Brennan E. T., Dry H. C., Daugulis A. J. Enhanced bioproduction of carvone in a two-liquid-phase partitioning bioreactor with a highly hydrophobic biocatalyst // Biotechnol. Bioeng. — 2008. — V. 101, N 4. — P. 768–775.
 28. Honda K., Yamashita S., Nakagawa H. et al. Stabilization of water-in-oil emulsion by *Rhodococcus opacus* B-4 and its application to biotransformation // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 78, N 5. — P. 767–773.
 29. Gong X. W., Yang J. K., Duan Y. Q. et al. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing // Res. Microbiol. — 2009. — V. 160, N 3. — P. 200–204.
 30. Kurosawa K., Boccazzi P., de Almeida N. M., Sinskey A. J. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production // J. Biotechnol. — 2010. — V. 147, N 3–4. — P. 212–218.
 31. Voss I., Steinbuchel A. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — V. 55, N 5. — P. 547–555.
 32. Kamal A., Kumar M. S., Kumar C. G., Shaik T. Bioconversion of acrylonitrile to acrylic acid by *Rhodococcus ruber* strain AKSH-84 // J. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — V. 21, N 1. — P. 37–42.
 33. Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H. Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue // Biochemistry. — 1992. — V. 31, N 37. — P. 9000–9007.
 34. Максимова Ю. Г., Демаков В. А., Максимов А. Ю. и др. Каталитические свойства нитрилгидратазы, иммобилизованной на оксидах алюминия и углеродсодержащих адсорбентах // Прикл. биохим. микробиол. — 2010. — Т. 46, № 4. — С. 416–421.
 35. Pratush A., Seth A., Bhalla T. C. Generation of mutant of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 through chemical mutagenesis for hyperproduction of nitrile hydratase // Acta Microbiol. Immunol. Hung. — 2010. — V. 57, N 2. — P. 135–146.
 36. Raj J., Seth A., Prasad S., Bhalla T. C. Bioconversion of butyronitrile to butyramide using whole cells of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 74, N 3. — P. 535–539.
 37. Iwatsuki M., Uchida R., Takakusagi Y. et al. Lariatins, novel anti-mycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171 // J. Antibiot. (Tokyo). — 2007. — V. 60, N 6. — P. 357–363.
 38. Kitagawa W., Tamura T. A quinoline antibiotic from *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824 // Ibid. — 2008. — V. 61, N 11. — P. 680–682.
 39. Kunze B., Hofle G., Reichenbach H. The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties // Ibid. — 1987. — V. 40, N 3. — P. 258–265.
 40. Cornelis K., Maes T., Jaziri M. et al. Virulence genes of the phytopathogen *Rhodococcus fascians* show specific spatial and temporal expression patterns during plant infection // Mol. Plant Microbe Interact. — 2002. — V. 15, N 4. — P. 398–403.
 41. De O'Manes C. L., Beeckman T., Ritsema T. et al. Phenotypic alterations in *Arabidopsis thaliana* plants caused by *Rhodococcus fascians* infection // J. Plant Res. — 2004. — V. 117, N 2. — P. 139–145.
 42. Depuydt S., De Veylder L., Holsters M., Vereecke D. Eternal youth, the fate of developing *Arabidopsis* leaves upon *Rhodococcus fascians* infection // Plant Physiol. — 2009. — V. 149, N 3. — P. 1387–1398.

43. Forizs L., Lestrade S., Mol A. et al. Metabolic shift in the phytopathogen *Rhodococcus fascians* in response to cell-free extract of infected tobacco plant tissues // *Curr. Microbiol.* — 2009. — V. 58, N 5. — P. 483–487.
44. Kurosawa K., Ghiviriga I., Sambandan T. G. et al. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians* // *J. Am. Chem. Soc.* — 2008. — V. 130, N 4. — P. 1126–1127.
45. Iwabuchi N., Sunairi M., Urai M. et al. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — V. 68, N 5. — P. 2337–2343.
46. Urai M., Aizawa T., Anzai H. et al. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzene tolerant bacterium, *Rhodococcus* sp. 33 // *Carbohydr. Res.* — 2006. — V. 341, N 5. — P. 616–623.
47. Urai M., Anzai H., Ogihara J. et al. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2 // *Ibid.* — 2006. — V. 341, N 6. — P. 766–775.
48. Sojo M. M., Bru R. R., Garcia-Carmona F. F. *Rhodococcus erythropolis* ATCC 25544 as a suitable source of cholesterol oxidase: cell-linked and extracellular enzyme synthesis, purification and concentration // *BMC Biotechnology.* — 2002. — V. 2:3. (<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/3>).
49. Lashkarian H., Raheb J., Shahzamani K. et al. Extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp.: isolation and molecular characterization // *Iran Biomed. J.* — 2010. — V. 14, N 1–2. — P. 49–57.
50. Brim R. L., Nance M. R., Youngstrom D. W. et al. A thermally stable form of bacterial cocaine esterase: a potential therapeutic agent for treatment of cocaine abuse // *Mol. Pharmacol.* — 2010. — V. 77, N 4. — P. 593–600.
51. Park J. B., Kwon Y. M., Lee T. Y. et al. PEGylation of bacterial cocaine esterase for protection against protease digestion and immunogenicity // *J. Control Release.* — 2010. — V. 142, N 2. — P. 174–179.
52. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // *J. Gen. Microbiol.* — 1979. — V. 115, N 2. — P. 491–503.
53. Uchida Y., Misawa S., Nakahara T., Tabuchi T. Factors affecting the production of succinoyl trehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on n-alkanes // *Agric. Biol. Chem.* — 1989. — V. 53, N 3. — P. 765–769.
54. Uchida Y., Tsuchiya R., Chino M. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // *Ibid.* — 1989. — V. 53, N 3. — P. 757–763.
55. Lang S., Philp J. C. Surface-active lipids in rhodococci // *Antonie Van Leeuwenhoek.* — 1998. — V. 74, N 1. — P. 59–70.
56. Ron E. Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2002. — V. 13, N 3. — P. 249–252.
57. Rosenberg E., Ron E. Z. High and low molecular mass microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — V. 52, N 2. — P. 154–162.
58. Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S. Potential applications of microbial surfactants // *Ibid.* — 2000. — V. 53, N 5. — P. 495–508.
59. Desai J. D., Banat J. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Rev.* — 1997. — V. 61, N 1. — P. 47–67.
60. Marques A. M., Pinazo A., Farfan M. et al. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 // *Chem. Phys. Lipids.* — 2009. — V. 158, N 2. — P. 110–117.
61. Gesheva V., Stackebrandt E., Vasileva-Tonkova E. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica // *Curr. Microbiol.* — 2010. — V. 61, N 2. — P. 112–117.
62. Peng F., Liu Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants // *J. Appl. Microbiol.* — 2007. — V. 102, N 6. — P. 1603–1611.
63. Philp J. C., Kuyukina M. S., Ivshina I. B. et al. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — V. 59, N 2–3. — P. 318–324.
64. Yakimov M. M., Giuliano L., Bruni V. et al. Characterization of antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers // *New Microbiol.* — 1999. — V. 22, N 3. — P. 249–256.
65. Peng F., Wang Y., Sun F. et al. A novel lipopeptide produced by a pacific ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53 // *J. Appl. Microbiol.* — 2008. — V. 105, N 3. — P. 698–705.
66. Tuleva B., Christova N., Cohen R. et al. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // *Ibid.* — 2008. — V. 104, N 6. — P. 1703–1710.
67. Ciapina E. M., Melo W. C., Santa Anna L. M. et al. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2006. — V. 131, N 1–3. — P. 880–886.
68. Shavandi M., Mohebbi G., Haddadi A. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6 // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* — 2011. — V. 82, N 2. — P. 477–482.
69. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Грегирчак Н. Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41, № 1. — С. 58–63.
70. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Карпенко Е. И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофоб-

- ных субстратах // Там же. — 2004. — Т. 40, №5. — С. 544–550.
71. Пирог Т. П., Волошина И. Н., Игнатенко С. В., Вильданова-Марцишин Р. И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Биотехнология. — 2005. — № 6. — С. 27–36.
 72. Пирог Т. П., Игнатенко С. В., Тарасенко Д. О. Вплив якості посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 4. — С. 9–17.
 73. Пирог Т. П., Игнатенко С. В. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Прикл. биохим. микробиол. — 2011. — Т. 47, № 4. — С. 436–442.
 74. Пирог Т. П., Корж Ю. В., Шевчук Т. А., Тарасенко Д. О. Роль екзогенних попередників в утворенні поверхнево-активних речовин під час культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 6. — С. 11–18.
 75. Пирог Т. П., Корж Ю. В., Шевчук Т. А., Тарасенко Д. А. Особенности C₂-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. — 2008. — Т. 77, № 6. — С. 749–757.
 76. Пирог Т. П., Игнатенко С. В. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 29–38.
 77. Пирог Т. П., Тарасенко Д. А. Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. — 2008. — № 3. — С. 48–55.
 78. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Клименко Ю. А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане // Прикл. биохим. микробиол. — 2010. — Т. 46, № 6. — С. 651–658.
 79. Kuyukina M. S., Ivchina I. B., Philp J. C. et al. Recovery of *Rhodococcus erythropolis* biosurfactants using methyl-tertiary butyl ether (MTBE) extraction // J. Microbiol. Methods. — 2001. — V. 46, N 2. — P. 149–156.
 80. Mukherjee S., Das P., Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. // Trends in Biotechnology. — 2006. — V. 24, N 11. — P. 509–515.
 81. Singh A., Van Hamme J. D., Ward O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. — 2007. — V. 25, N 1. — P. 99–121.
 82. Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. — 2006. — V. 57, N 4. — P. 609–618.
 83. Adamczak M., Bednarski W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica* // Biotechnol. Lett. — 2000. — V. 22, N 1. — P. 313–316.
 84. Rau U., Nguyen L. A., Roeper H. et al. Downstream processing of mannosylerythritol lipids produced by *Pseudozyma aphidis* // Eur. J. Lipid. Sci. Technol. — 2005. — V. 107, N 2. — P. 373–380.
 85. Chen S. Y., Wei Y. H., Chang J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 76, N 1. — P. 67–74.
 86. Barros F. F. C., Ponezi A. N., Pastore G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 35, N 9. — P. 1071–1078.
 87. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source // Appl. Environ. Microbiol. — 1984. — V. 48, N 2. — P. 302–305.
 88. Reiling H. E., Thanel-Wyss U., Guerra-Santos L. H. et al. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* // Ibid. — 1986. — V. 51, N 5. — P. 985–989.
 89. Binazadeh M., Karimi L. A., Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449 // Enzyme Microb. Technol. — 2009. — V. 45, N 1. — P. 195–202.
 90. Youssef N., Simpson D. R., Duncan K. E. et al. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — V. 73, № 4. — P. 1239–1247.
 91. Карпенко Е. В., Вильданова-Марцишин Р. И., Щеглова Н. С. и др. Перспектива использования бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ для деградации нефтяных загрязнений // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 175–179.
 92. Морозова А. П. Дослідження здатності поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 до активації деструкції нафти у воді // Харчова промисловість. — 2008. — № 7. — С. 36–39.
 93. Chereshnev V. A., Gein S. V., Baeva T. A. et al. Modulation of cytokine secretion and oxidative metabolism of innate immune effectors by *Rhodococcus* biosurfactant // Bull. Exp. Biol. Med. — 2010. — V. 149, N 6. — P. 734–738.
 94. Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Gein S. V. et al. In vitro immunomodulating activity of biosurfactant glycolipid complex from *Rhodococcus ruber* // Ibid. — 2007. — V. 144, N 3. — P. 326–330.
 95. Пирог Т. П., Конон А. Д., Софілканіч А. П., Скочко А. Б. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Мікробіол. журн. — 2011. — Т. 73, № 3. — С. 14–20.
 96. Пирог Т. П., Конон А. Д., Скочко А. Б. Використання микробних поверхнево-активних речовин у біології та медицині // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 2. — С. 24–38.
 97. Конон А. Д., Пирог Т. П. Поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, їх вплив на антимікробні властивості ефірної олії чайного дерева // Харчова та переробна промисловість. — 2010. — №3 (367). — С. 25–27.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS* И ИХ МЕТАБОЛИТОВ

Т. П. Пирог
М. А. Шулякова
Т. А. Шевчук
А. П. Софилканич

Национальный университет
пищевых технологий, Киев

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Собственные экспериментальные результаты авторов и данные литературы демонстрируют большой биотехнологический потенциал бактерий рода *Rhodococcus* как деструкторов ароматических, гетероциклических и алифатических ксенобиотических соединений (нафтаден, ксилол, толуол, этилбензен, индол, нитрофенол, трихлорэтилен, углеводороды нефти и др.), а также как продуцентов практически ценных метаболитов (поверхностно-активные вещества, антибиотики, экзополисахариды, энзимы). Поверхностно-активные вещества (ПАВ) являются чрезвычайно важными продуктами микробного синтеза, поскольку имеют такие существенные преимущества перед синтетическими аналогами, как биodeградебельность, устойчивость в широком диапазоне температур, рН, а также могут быть синтезированы из отходов других производств. Рассматривается использование метаболитов родококков в природоохранных технологиях, медицине, сельском хозяйстве, а также участие представителей рода *Rhodococcus* в процессах биотрансформации для получения ароматизаторов (карвон, гераниол), биодизеля, бутирамида, акриловой кислоты и др.

Обобщены собственные экспериментальные данные по интенсификации синтеза и практическому применению ПАВ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017. Установлено, что в присутствии как клеток, так и внеклеточных метаболитов штамма ИМВ Ас-5017 с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами степень деструкции нефти в воде и почве достигала 80–93% на 30-е сутки. Показано, что ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 характеризуются антимикробным действием по отношению к ряду микроорганизмов, в том числе и фитопатогенным бактериям. При обработке (1–2 ч) препаратами ПАВ суспензии исследуемых тест-культур наблюдали снижение количества жизнеспособных клеток на 74–97%.

Ключевые слова: бактерии рода *Rhodococcus*, деструкция ксенобиотиков, биотрансформация, поверхностно-активные вещества, полисахариды, энзимы.

BIOTECHNOLOGICAL POTENCIAL OF BACTERIA OF *RHODOCOCCUS* STRAIN AND THEIR METABOLITES

T. P. Pirog
M. O. Shulyakova
T. A. Shevchuk
A. P. Sofylkanich

National University of Food Technologies, Kyiv

E-mail: tapirog@nuft.edu.ua

The literature and own experimental data, concerning biotechnological potential of bacteria of *Rhodococcus* strain as destructors of aromatic, heterocyclic and aliphatic xenobiotic compounds (naphtalet, xylol, toluene, ethylbenzene, indole, nitrophenolium, trichloroethylene, hydrocarbons of oil, etc.), and also as producers of valuable metabolites (surfactants, antibiotics, exopolysaccharides, enzymes) are given. Surface-active substances (surfactants) are essential products of microbial synthesis, as these have significant advantages over synthetic analogs as biodegradability, stability over a wide range of temperature, pH, and can be produced from the wastes of other industries. The use of *Rhodococcus* metabolites in environmental protection technologies, medicine, agriculture, and also participation of *Rhodococcus* strain in biotransformation processes for production of flou-ver (carvon, geraniol), biodiesel, butiramide, acrylic acid, etc. is discussed.

The own experimental data concerning the intensification of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 surfactant synthesis and practical application are summarized. It was determined that the oil destruction degree in water and soil reached 80–93% on the 30th day in the presence of cells of strain IMV Ac-5017, as well as exocellular metabolites with surface-active and emulsifying properties. It was shown that surfactant of *R. erythropolis* IMV Ac-5017 inherent the antimicrobial activity against the number of microorganisms, including phytopathogenic bacteria. The reduction of quantity of living cells by 74–97% was observed after treatment (1–2 h) of suspension of test-cultures with surfactant preparations.

Key words: bacteria of *Rhodococcus* strain, destruction of xenobiotics, biotransformation, surfactants, polysaccharides, enzymes.

ПІЛОТНІ ФЕРМЕНТЕРИ ЄМНІСНОГО ТИПУ

Ю. І. СИДОРОВ

Національний університет «Львівська політехніка»

E-mail: sydorowy@rambler.ru

Отримано 27.09.2011

Подано доступну інформацію про сучасну пілотну ферментаційну апаратуру в стерильному варіанті виконання від провідних світових фірм (Bioengineering AG, B. Braun Biotech, Sartorius BBI Systems, Biotron, Solaris biotechnology, Luxun International Group), а також російської фірми «Биотехника», що її використовують для масштабування процесів культивування мікроорганізмів, рослинних і тваринних клітин. Особливу увагу приділено інноваційним газовихровим біореакторам, які мають низку переваг порівняно з традиційними ферментерами з механічними перемішувальними пристроями.

Ключові слова: пілотний ферментер, біореактор.

Пілотні ферментери (біореактори) використовують на стадії дослідно-технологічної роботи (ДТР) для відпрацювання біотехнологій для переходу на стадію серійного промислового випуску комерційної продукції (англ. *pilot* — дослідний, експериментальний). Робочі об'єми пілотних ферментерів — від 5 до 1 000 л. Іноді таких об'ємів достатньо для випуску серійної продукції, зокрема для одержання фармацевтичних субстанцій, тому ці ферментери можна віднести і до біореакторів промислового (індустріального) класу.

Російсько- і україномовна література, що присвячена промисловій ферментаційній апаратурі або містить відповідні розділи, є достатньо численною [1–15], однак випуск її датований, в основному, другою половиною ХХ ст. Відомості щодо сучасного обладнання, зокрема пілотних ферментерів, практично відсутні. Тому подання інформації в цьому аспекті є актуальним завданням.

Пілотні ферментери випускають багато фірм, провідними з яких вважають Bioengineering AG (Швейцарія), B. Braun Biotech (США), Sartorius BBI Systems (Німеччина), Schwarte Logistic GmbH (Німеччина), Biotron (Південна Корея), ДІ ЗАТ «Биотехника» (Росія), Solaris Biotechnology (Італія), Luxun International Group (Китай, Гонконг). Пілотні ферментери виробляють також ВО «Зерномаш», Гіпромедпром та ВНДІПрБ (Росія), однак вони не відповідають сучасним вимогам якості за GMP, проте в разі потреби їх можна використовувати для одержання препаратів немедичного призначення [14].

Пілотні ферментери Bioengineering AG

Laboratory Pilot Fermenter LP351

Пілотний ферментер *Laboratory Pilot Fermenter LP351* (об'єм 42, 50 або 75 л) застосовують як для масштабування, так й у виробничих процесах (рис. 1).

Модульна конструкція установки у поєднанні з широким набором аксесуарів уможливує проведення різноманітних біотехнологічних процесів із прокаріотами, евкаріотами, мікрогрибами, водоростями, рослинними і тваринними клітинами.

Устаткування повністю відповідає як національним, так і cGMP/FDA-нормам (у тому числі IQ- і OQ-документації).

Загальні технічні характеристики: максимальна робоча температура +150 °С, потужність двигунів 2,2 і 3 кВт, максимальна швидкість обертання перемішувального пристрою — 750 хв⁻¹. Максимальні габарити 800×800×1430. Детальніші технічні відомості можна знайти на сайті www.lavallab.com/fermenter-bioreactor/?pilot-fermenter.htm

Мішалки обертаються за допомогою пасового приводу, що дозволяє зменшити висоту ферментера і легко відділити мотор від ємності. Вал виймається зверху, а підшипник з подвійними торцевими ущільнювачами легко відділяється від корпусу. Передачу зусилля від мотора на вал перемішувального пристрою можна здійснювати і магнітним способом (рис. 2).

Ферментер аерують через фільтр *Autosterile* (Bioengineering). Без складних периферійних конструкцій цей фільтр стерилізується *in situ* разом із ферментером.



Рис. 1. Пілотний ферментер Laboratory Pilot Fermenter LP351

Пілотний ферментер Pilot Fermenter P

Об'єм — від 100 до 1 000 л. Галузі застосування та конструкція ферментера Pilot Fermenter P такі самі, як і для ферментера Laboratory Pilot Fermenter LP351.

На рис. 3 показано зовнішній вигляд Pilot Fermenter P.

Загальні технічні характеристики: максимальна робоча температура +150 °С, потужність двигунів — від 3 до 15 кВт, максимальна швидкість обертання перемішувального пристрою — 1 000 хв⁻¹. Максимальні габарити 1500×1380×2180. Детальніші технічні відомості — на сайті www.fermenter.ru/content/page_54_0.html



Рис. 3. Пілотний ферментер Pilot Fermenter P



З подвійним торцевим ущільненням

З магнітним приводом мішалки

Рис. 2. Способи ущільнення вала перемішувального пристрою пілотного ферментера Laboratory Pilot Fermenter LP351

На рис. 4, 5 показано обидва пілотні ферментери у складі ферментаційних установок.

Спільно із сервісною компанією Rentschler Biotechnologie GmbH, що також має світове визнання, фірма Bioengineering AG зі своїм обладнанням брала участь у створенні восьми незалежних заводів, що відповідають нормам GMP, розташованих на площі 4 500 м². Вони надають підтримку невеликим проектам, а також випускають продукцію у промисловому масштабі, що відповідає вимогам GMP. У 2008 р. виробничі потужності були значно збільшено, зокрема створено нові лінії з культивування клітин.



Рис. 4. Багатоцільова пілотна установка фірми Bioengineering AG для GMP-ферментації в чистій кімнаті (варіант 1)



Рис. 5. Багатоцільова пілотна установка фірми Bioengineering AG для GMP-ферментації в чистій кімнаті (варіант 2)

У цьому контексті слід згадати й менш відому фірму Chemar Alfa-Laval AG, яка також випускає лабораторні й пілотні ферментери традиційного типу, що відзначаються високою якістю, характерною для швейцарської продукції (рис. 6).

Пілотні установки фірм Sartorius Stedim Biotech — B. Braun Biotech

Зазначені фірми випускають ферментаційні системи для виробництва пілотних партій продукту Biostat® D 50/D 100 (з реакторами об'ємом 50 та 100 л) (рис. 7), Biostat® D 300/D 500 (з реакторами об'ємом 300 та 500 л) (рис. 8).

Установки спроектовано за модульною технологією у складі монтажного блоку, реакторів і блоку керування.



Рис. 6. Пілотний ферментер об'ємом 95 л компанії Chemar Alfa-Laval AG



Рис. 7. Пілотна установка Biostat® D 50/D 100

Реактори з кожухом виготовлено з нержавіючої сталі, вони мають спіральний нагрівальний елемент, призначений для ефективного і рівномірного нагрівання. Відношення висоти ємності до її діаметра становить 3:1. Потужні двигуни в комбінації з трьома турбінами забезпечують ефективне змішування і дисперсію газових пухирців з високим ступенем аерації. Стандартне спорядження містить систему стерилізації реактора, до складу якої входять впускні й впускні повітряні фільтри.

Апаратуру постачають із цифровою системою вимірювання та управління параметрами процесу, датчиками температури, рН, рO₂, піни і чотирма вбудованими перистальтичними насосами. Апаратні засоби керування ґрунтуються на системі DFC (цифрове керування ферментером). До складу системи DFC входять підсилювачі сигналів з вимірювальних датчиків і перетворювачі вихідних сигналів. Використання цієї системи дає змогу досягти більш високої надійності роботи системи. Мультифазовий ступінчастий контролер розчиненого кисню, контролер субстрату за декількома опірними точками і температурне блокування з виключенням



Рис. 8. Пілотна установка Biostat® D 300/D 500

нагрівача є додатковими можливостями програмного забезпечення ферментера. Програмне забезпечення було розроблено відповідно до основ GMP.

За допомогою установок можна проводити як безперервні, так і періодичні процеси з подаванням живильного середовища.

На рис. 9 наведено приклади застосування ферментаційної апаратури В. Braun Biotech і Sartorius BBI Systems у складі промислових установок.

Ферментер BIOSTAT® C-DCU і Biostat D-DCU

Пілотні компактні ферментери BIOSTAT® C-DCU, які стерилізують на місці (SIP), мають об'єм від 10 до 30 л і призначені для культивування як мікробних, так і клітин-



А

В



В

Рис. 9. А — автоматизована лінія, що складається з біореакторів об'ємом 120–1 200 л, системи підготовки середовища, системи проточної стерилізації середовища, інактивації культуральної рідини для одержання Human Growth Hormone (гормону росту людини); Б — промислова лінія, що складається з 300-літрового основного ферментера і 20-літрового посівного апарата; В — система для роботи з культурами клітин, що має у складі 900-літровий біореактор; повністю відповідає вимогам GMP і має пакет валідаційних документів

них культур. Цей ферментер (об'єм 30 л) став основою установки BIOSTAT C XFLOW, в якій реалізовано промислову технологію одержання протеїну, що має використання у фармацевтичному виробництві (рис. 10).



Рис. 10. Інтегрована установка BIOSTAT® C X-FLOW у складі ферментаційної системи для одержання рекомбінантного протеїну під час культивування *Pichia pastoris*

BIOSTAT D-DCU — пілотні установки з ємностями від 50 до 500 л. Установки споряджені готовою до експлуатації системою виробничого масштабування та автоматичною системою стерилізації «на місці».

Пілотні ферментери фірми Schwarte Logistic GmbH

Фірма Schwarte Logistic GmbH спеціалізується на випуску ємнісного й апаратного обладнання для молочної, фармакологічної, хімічної та харчової промисловості. Випуск малих інокуляторів і малогабаритних ферментерів — один з видів виробництва в асортименті продуктів цієї фірми (рис. 11, 12).

Ємності не споряджено системами контролю, автоматики тощо. Це можна розглядати як позитив, оскільки такі інокулятори порівняно з продукцією «під ключ» є набагато дешевшими (у 2–3 рази), однак це можливо лише за умови наявності у споживача певного інфраструктурного обладнання.



Рис. 11. Мобільні інокулятори Schwarte Logistic



Рис. 12. Пілотні ферментери фірми Schwarte Logistic GmbH у складі виробничої лінії

Пілотні ферментери НДІ ЗАТ «Биотехника»

Зазначена організація розробляє обладнання для хіміко-фармацевтичної промисловості, для технологічних ліній з виробництва біологічно активних сполук, для реалізації технологій з виробництва продуктів з різноманітної рослинної сировини, ферментаційне обладнання (біореактори лабораторні та пілотні) тощо.

На рис. 13, 14 подано зовнішній вигляд 10-літрових і 100-літрових пілотних ферментерів, а на рис. 15 — зовнішній вигляд технологічних ліній, в яких використано ферментери НДІ ЗАТ «Биотехника».

Російські біореактори, на відміну від західноєвропейських і американських, за формою подібні до звичайних хімічних реакторів, а американо-європейські ферментери мають більш витягнуту, подовжену форму.

Важливою перевагою пілотних ферментерів «Биотехника» для українських дослідників і виробників є достатньо просте вирішення валютної проблеми для придбання обладнання, оскільки Україна є асоційованим членом СНД.



Рис. 13. Пілотний ферментер об'ємом 10 л НДІ ЗАТ «Биотехника»



Рис. 14. Пілотний ферментер об'ємом 100 л НДІ ЗАТ «Биотехника»



Рис. 15. Пілотні ферментери НДІ ЗАТ «Биотехника» у складі технологічних ліній

Пілотні ферментери фірми Biotron

Корейська фірма Biotron є біотехнологічною компанією, що розвивається у світі найдинамічніше. Фірма випускає лабораторні ферментери Value Bio Reactor, BioG-Micom, BioG-M, BioG-M Plus, а також ферментери пілотні Bio Lite і Bio S (рис. 16) та серію промислових ферментерів Bio P.

Повна ємність ферментерів Bio Lite становить від 5 до 40 л, ферментерів Bio S — від 30 до 500 л, промислових ферментерів Bio P — від 2 до 30 м³.

Ферментери прості в обслуговуванні. Стерилізацію можна проводити в автоматичному і ручному режимах, використовуючи внутрішній нагрівач. Можна застосовувати спеціальні опції для культивування рослинних і тваринних клітин (рис. 17).

Пілотні ферментери фірми Solaris biotechnology

Фірма випускає пілотні біореактори серій SB, SBS для вирішення проблем, пов'язаних



Bio S



Bio Lite

Рис. 16. Пілотні ферментери фірми Biotron



Рис. 17. Ферментер Bio S об'ємом 70 л для культивування тваринних клітин у дослідницькому центрі Bangladesh Science House

із масштабуванням процесу від лабораторних стадій до промислових. Контроль здійснюється за всіма параметрами, які потрібні для проведення ферментаційних процесів: рН, концентрації кисню, CO_2 тощо. В апаратах можна проводити як аеробні, так і анаеробні процеси, у періодичному або безперервному режимах. Перемішування можливе за допомогою традиційних механічних мішалок або магнітним способом (рис. 18).



Рис. 18. Пілотні ферментери фірми Solaris biotechnology

Пілотні ферментери фірми Luxun International Group (Китай, Гонконг)

На сьогодні компанія LUXUN є провідним постачальником устаткування для фармацевтичної і косметичної промисловості з Китаю в країни СНД (Росію, Білорусь, Україну, Узбекистан, Казахстан та ін.). В асортимент продукції входить ферментаційна апаратура ємністю від 5 л до 200 м³. Як пілотні ферментери фірма випускає апаратуру традиційного типу з механічними мішалками RTU-MS з повним об'ємом від 5 до 70 л; з магнітним приводом RTU-C (30–200 л); батарею ферментерів RTU-Z (5, 10, 15 л), в якій можна одночасно проводити ферментацію; батарею ферментерів для вирощування рослинних і тваринних клітин RTU-X (10–70 л); комбіновані ферментери серії RTU-MZ з двома різними за ємністю апаратами, що можуть працювати паралельно (10/100, 20/200, 30/300, 50/500, 80/800, 100/1000 л) (рис. 19).

На особливу увагу заслуговує серія ферментерів RTU-Q об'ємом від 100 л до 200 м³, в яких перемішування відбувається за рахунок імпульсної подачі повітря. Ці енергозберігальні біореактори особливо придатні для вирощування рослинних клітин, оскільки цикли ферментації тривають до 2 місяців відповідно за низької швидкості споживання кисню (рис. 20).

Подібний спосіб перемішування застосовували у ферментаційній модульній установці «Пневмолюкс» (Інститут біологічного приладобудування РАН).

Детальніші технічні відомості про ферментери фірми Luxun I. G. можна знайти на сайті <http://lxn.ru/index.php?id=307>.

Газовихрові біореактори

Інноваційні газовихрові біореактори відрізняються принципово новою системою перемішування (ЗАТ «Саяны», Новосибірськ, Росія)

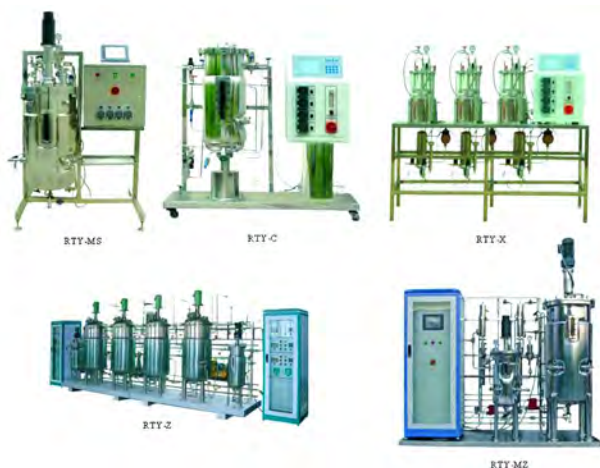


Рис. 19. Пілотні ферментери фірми Luxun I. G.



Рис. 20. Ферментер з інокулятором серії RTY-Q

[16–18]. Концепція газовихрового біореактора — створення структурованого особливим чином повітряного потоку для організації інтенсивного м'якого перемішування різних рідин, у тому числі й особливо в'язких. Він працює за принципом «керованого торнадо». Оскільки апарат не має механічної мішалки, то травмування клітин виключається. На рис. 21 показано схему газовихрового біореактора.

У біореакторі перемішування суспензії бактерійних клітин здійснюють, створюючи в ній квазістаціонарний обертовий рух, що генерується аерувальним газом, який подають в ємність над поверхнею суспензії клітин з одночасним його закручуванням у потік з полем швидкості потенційного вихору на периферії ємності (зона I) і осью протитечією в приосьовій зоні (зона II). При цьому перепад тиску в потоці аерувального газу між периферією і центром вихору підтримують у межах 10–2 000 Па.

Завдяки такому закручуванню аерувального газу за рахунок тертя на межі розділу фаз і різниці тисків між периферією та центром газового вихору забезпечується рух суспензії клітин у вигляді вихрового кільця, що обертається відносно осі ємності з одночасним низхідним рухом рідини на периферії ємності (зона III) і висхідним — у приосьовій зоні (зона IV). Аерувальний газ

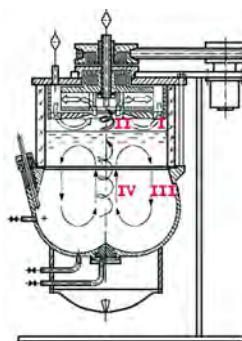


Рис. 21. Схема газовихрового біореактора

взаємодіє з клітинами тільки через вільну поверхню останніх, не змішуючись із суспензією. Унаслідок цього забезпечується інтенсифікація міжфазного масообміну завдяки збільшенню швидкості руху аерувального газу й рівномірному перемішуванню суспензії без застійних зон і піноутворення через руйнівну дію газового вихору на піну.

Газовихровий біореактор дає змогу розпочинати культивування за мінімального заповнення (10–15%) і шляхом безперервного додавання середовища в процесі культивування завершити його за максимального заповнення (90%). Ця властивість апарата дає змогу скоротити, а в деяких випадках виключити лінію біореакторів меншого об'єму для запуску апарата більшого об'єму.

Першим кроком на шляху створення газовихрових біореакторів стало розроблення лабораторного ферментера «Біок» [16]. Уже на цьому етапі було виявлено, що питома потужність на перемішування у 12–16 разів нижча, ніж у біореакторах з мішалкою фірми «Хемап». На сьогодні проведено дослідно-промислові випробування пілотного газовихрового біореактора об'ємом 100 л. Випущено і передано на НВО «Віріон» промисловий газовихровий біореактор ємністю 300 л для виробництва вакцин та інтерферону (рис. 22).

Проте відомі й негативні результати випробувань, зокрема на тому самому НВО «Віріон» та в інших організаціях встановлено, що великі апарати не мають таких значних коефіцієнтів масообміну за киснем, що їх гарантували розробники біореактора.



Рис. 22. Газовихровий біореактор об'ємом 300 л

ЛІТЕРАТУРА

1. *Аткинсон Б.* Биохимические реакторы. — М.: Пищ. пром., 1979. — 280 с.
2. *Андреев А. А., Брызгалов Л. Н.* Производство кормовых дрожжей. — М.: Лесная пром-сть, 1973. — 296 с.
3. *Виестур У. Э., Кузнецов А. М., Савенков В. В.* Системы ферментации. — Рига: Зинатне, 1986. — 174 с.
4. *Виестур У. Э., Шмите И. А., Жилевич А. В.* Биотехнология. Биотехнологические агенты, технология, аппаратура. — Рига: Зинатне, 1987. — 263 с.
5. *Винаров А. Ю., Кафаров В. В., Гордеев Л. С.* и др. Ферментеры колонного типа для микробиологических процессов. — М., 1976. — 49 с.
6. *Гапонов К. П.* Процессы и аппараты микробиологических производств. — М.: Легкая пищ. пром., 1981. — 240 с.
7. *Голгер Л. И., Калуняц К. А.* Модернизированная и новая аппаратура для производства ферментных препаратов. — М., 1970. — 72 с.
8. *Кестельман В. Н., Веселов А. И.* Оборудование для глубинного культивирования микроорганизмов в бродильной и микробиологической промышленности. Обзор. — М., 1970.
9. *Колосков С. П.* Оборудование предприятий ферментной промышленности. — М.: Пищ. пром., 1969. — 383 с.
10. *Колосков В. П., Яровенко В. Л., Стабников В. Н., Устинников Б. А.* Оборудование спиртовых заводов. — М.: Пищ. пром., 1975. — 295 с.
11. *Луканин А. В.* Модернизация промышленного ферментера АДР-900-76 для производства белковой кормовой добавки из растительного сырья // Биотехнология. — 2003. — № 6. — С. 84–88.
12. *Сидоров Ю. И., Влязло Р. Й., Новіков В. П.* Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості. — Львів: Інтелект-Захід, 2008. — 736 с.
13. *Смирнов Н. Н.* Биохимические реакторы. — Л.: Химия, 1987. — 72 с.
14. *Мертвецов Н. П., Рамазанов Ю. А., Репков А. П. и др.* Газовихревые биореакторы «Биок». Использование в современной биотехнологии. — Новосибирск: Наука, 2002. — 118 с.
15. *Кислых В. И., Рамазанов Ю. А., Косюк И. П. и др.* Безградиентные газо-вихревые биореакторы в современной биотехнологии // Интеграл. — 2005. — Т. 22, № 2. — С. 78–89.
16. *Pat. 6632657 US C12M1/04; C12M1/06; C12M3/02; C12M1/04.* Apparatus for cultivating tissue cells and microorganisms in suspension / Kislykh V. I., Ramazanov J. A., Repkov A. P. (all RU). — Filing Date: 03/19/2001; Publication Date: 10/14/2003.

ПИЛОТНЫЕ ФЕРМЕНТЕРЫ
ЕМКОСТНОГО ТИПА

Ю. И. Сидоров

Национальный университет
«Львовская политехника»

E-mail: sydorowy@rambler.ru

Приведена доступная информация о современной пилотной ферментационной аппаратуре в стерильном варианте исполнения от ведущих мировых фирм (Bioengineering AG, B. Braun Biotech, Sartorius BBI Systems, Biotron, Solaris biotechnology, Luxun International Group), а также российской фирмы «Биотехника», которую используют для масштабирования процессов культивирования микроорганизмов, растительных и животных клеток. Особое внимание уделено инновационным газовихревым биореакторам, имеющим ряд преимуществ по сравнению с традиционными ферментерами с механическими перемешивающими устройствами.

Ключевые слова: пилотный ферментер, биореактор.

PILOT FERMENTERS
OF CAPACITY TYPE

Yu. I. Sidorov

«Lviv's Polytechnica» National University

E-mail: sydorowy@rambler.ru

Basic information about modern pilot fermentation apparatus in sterile implementation used for the down-scaling of processes of cultivation of microorganisms, vegetable and animal cells, leading firms with a world fame (Bioengineering AG, B. Braun Biotech, Sartorius BBI Systems, Biotron, Solaris biotechnology, Luxun International Group) and also Russian firms «Biotechnics» is given. Special attention is given to innovative gas-vortical fermenters which have some advantages as compared to traditional ones with mechanical mixing devices.

Key words: pilot fermenter, bioreactor.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

УДК 615.361.018

ФЕНОТИПОВА ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРИ КЛІТИН, ОДЕРЖАНИХ ІЗ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ТКАНИНИ ХОРІОНА

В. А. Шаблій^{1,2}

М. Д. Кучма²

В. М. Кирик³

Л. Л. Лукаш¹

Г. С. Лобінцева²

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²ТОВ «Інститут клітинної терапії»,

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»

E-mail: lukash@imbg.org.ua

Отримано 07.07.2011

У роботі показано можливість отримання культур клітин з кріоконсервованої тканини хоріона з використанням 1,5 М ДМСО. Уперше описано особливості формування культури клітин кріоконсервованої тканини хоріона людини та її імунофенотип. Встановлено характер експресії маркера CD90 в культурах клітин, одержаних з кріоконсервованої тканини хоріона. Зниження рівня експресії маркерів CD90 та CD105 спостерігається одночасно з падінням проліферативної активності та набуттям клітинами багатоядерності. Показано присутність популяції ендотеліальних прогеніторних клітин у культурі клітин хоріона людини на першому пасажі. Виявлено експресію цитокератину в популяціях клітин, одержаних з нативного та кріоконсервованого хоріона.

Ключові слова: хоріон, кріоконсервування, культура клітин, мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини.

Упродовж останніх років плацента є об'єктом інтенсивного вивчення як цінне джерело стовбурових клітин. З хоріона та амніона було виділено мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини (ММСК), які зараз широко використовують у регенеративній медицині. Плацентарний комплекс містить також низку інших мультипотентних клітин (гемопоетичних прогеніторних, епітеліальних мультипотентних тощо), які вже широко вивчають у доклінічних дослідженнях. Плацента відповідає одній з основних вимог до джерела стовбурових клітин, забезпечуючи можливість отримання великої кількості клітин без інвазивних втручань [1].

Розроблення технології кріоконсервування тканини плаценти дасть змогу оцінити джерело мультипотентних клітин на присутність мікробної та вірусної контамінації і планувати процес одержання клітинного препарату відповідно до потреби у його використанні. Запропонований підхід дасть можливість значною мірою знизити витрати, пов'язані із застосуванням мультипотентних клітин у клінічній практиці.

Технологія низькотемпературного кріоконсервування є одним з основних методів, які уможливають стандартизацію технології отримання клітинного продукту відповідно до стандартів GMP, GLP та GTP.

У багатьох роботах було показано можливість виділення ММСК з хоріона людини (плодів першого триместру вагітності). Ці клітини експресували маркери плюрипотентності і мали здатність підтримувати гемопоєз *in vitro* [2, 3].

Однак, попри швидкі темпи розвитку досліджень у зазначеному науковому напрямі, ще й досі не розроблено методологію виділення ММСК з кріоконсервованої тканини плаценти, не описано їхні молекулярно-біологічні властивості, зокрема здатність до мультилінійного диференціювання. Не викликає сумнівів той факт, що пошук оптимальних умов кріоконсервування тканини плаценти та подальше отримання певних пулів стовбурових клітин є вкрай актуальним завданням як для наукових цілей, так і для практичного застосування.

Метою цієї роботи було встановити та порівняти морфологічні й імунофенотипові

характеристики клітин *in vitro*, виділені з нативного та кріоконсервованого хоріона людини.

Матеріали і методи

Метод кріоконсервування тканини хоріона

Для проведення досліджень тканину хоріона було взято з абортівного матеріалу людини 5–12 тижнів гестації, отриманого в результаті добровільного переривання вагітності, за інформованої згоди жінок. Дослідження було схвалено Координаційною радою з трансплантації органів, тканин та клітин МОЗ України. Жінок було обстежено на наявність вірусних та гемічних інфекцій (антитіла проти *Threponema pallidum*, HCV, HIV 1/2, HbsAg).

Тканину хоріона масою 1–3 г промивали в чашках Петрі діаметром 90 мм розчином Хенкса з додаванням 50 од/мл амфотерицину («Синтез»), 100 од/мл пеніциліну («Артеріум»), 50 мкг/мл стрептоміцину («Артеріум»). Тканину переносили в пробірки об'ємом 50 мл, додавали 2–3 мл розчину Хенкса та подрібнювали за допомогою ножиць на фрагменти не більше 3 мм. Фрагментовану тканину переносили в кріоампули і додавали кріопротектори до кінцевої концентрації: 1,5 М пропандіол, 1,5 М ДМСО, 0,7 М ДМСО.

Процес охолодження починали з 20 °С зі швидкістю 1 °С/хв до температури кристалізації, яка коливалася залежно від концентрації кріопротектора від –4 до –6 °С. На такій температурі зразки витримували протягом 10 хв і проводили ініціацію кристалізації. Після замерзання кріоконтейнери охолоджували зі швидкістю 0,3 °С/хв до –35 °С, потім з 5 °С/хв до –50 °С та з 10 °С/хв до –140 °С. За температури –140 °С процес охолодження в заморожувачі зупиняли й переносили матеріал у рідкий азот (–196 °С) на довгострокове зберігання.

Гістологічний метод дослідження тканини плаценти

Фрагменти нативної та кріоконсервованої тканини фіксували забуференим 10%-м розчином параформу і заливали в парафін за стандартним протоколом. Приготовлені зрізи фарбували гематоксиліном та еозином.

Отримання мезенхімальних клітин з тканин кріоконсервованого хоріона

Кріоконсервовану тканину розморожували на водяній бані при температурі

38–40 °С до появи рідкої фази з подальшим відтаванням за кімнатної температури. Вимивання ДМСО з тканини проводили, повільно додаючи розчин Хенкса (Sigma). До тканини додавали розчин нагрітих до 37 °С ензимів: 0,6 од/мл диспази (Gibco), 0,1% колагенази (Serva) у співвідношенні 1:2. Інкубували 10–20 хв при температурі 37 °С. Для зниження активності ензимів додавали феціальну сироватку телят (ФСТ) (Sigma) до кінцевої концентрації 10%. Отриману суспензію клітин піпетували декілька разів і фільтрували її через фільтр із діаметром пор 100 мкм. Одержаний фільтрат центрифугували 5 хв при 300 g. Супернатант відбিরали, а осад клітин ресуспендували в фосфатно-сольовому розчині Дюльбеко (Gibco) кімнатної температури. Життєздатність клітин визначали методом фарбування 0,4%-м розчином трипанового синього (Sigma), як відсоток живих клітин на 200 підрахованих клітин. Кількість клітин у суспензії підраховували в камері Горяєва. Клітини висівали в культуральні флакони для адгезивних клітин *in vitro* з розрахунку 300–400 тис. клітин на 1 см². Середовище для культивування DMEM містило 15% ФСТ (Gibco), 5 мМ HEPES, 2 мМ L-глутаміну (Biomedicals), 50 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну.

Культивування проводили при 37 °С в атмосфері з 5% CO₂ зі зміною середовища кожні 3–4 доби. Пересів здійснювали з досягненням культурою 80–90% конфлюєнсу у співвідношенні 1:3. Для пересіву використовували 0,05%-й розчин трипсину з ЕДТА (Biochrom).

Імуноцитохімічне дослідження

Для проведення імуноцитохімічного аналізу клітини висівали в 4-лункові планшети з площею лунки 1,9 см² (Nunclon™ Δ Surface), фіксували 10%-м розчином забуференого параформу. Ендогенну пероксидазну активність інгібували 0,3%-м розчином H₂O₂ протягом 5 хв. Перед внесенням антитіл фіксовані препарати обробляли 0,1%-м розчином тритона X-100. Для детекції маркерних протеїнів використовували антитіла панцитокератину (Dako, Данія). Візуалізацію імунних комплексів проводили із застосуванням Mouse/Rabbit PolyVue HPR/DAB Detection System (DBS, США).

Протокова цитофлуориметрія

Клітини знімали з культурального пластику 0,05%-м розчином трипсину з ЕДТА. До суспензії клітин додавали FBS (Gibco) до

кінцевої концентрації 10% та центрифугували при 250 g протягом 10 хв. Імунофенотипування суспензії клітин проводили методом протокової цитофлуориметрії з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих із флуорохромами (Becton Dickinson, США) в робочій концентрації 0,5 мкг на 10⁶ клітин: anti-CD34 APC, anti-CD90 FITC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD105 PerCP-Cy 5.5, anti-CD73 PE, anti-CD14 Pacific Blue. Фенотипування здійснювали на лазерному протоковому цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) з програмним забезпеченням FACS Diva 6.1, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 6 параметрів флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів під час багатопараметричного аналізу використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією кількох антитіл без одного з них (fluorescence minus one control).

Статистична обробка даних

Рівень експресії поверхневих маркерів вимірювали у відсотках та статистично обраховували з використанням U-критерію Мауна-Уїтні.

Результати та обговорення

Порівняльний гістологічний аналіз структури тканини хоріона, кріоконсервованої за різних умов

Гістологічний аналіз структури тканини хоріона до кріоконсервування проводили на 39 зразках, із яких для 9 зразків аналізували структуру тканини після кріоконсервування за різних умов. Для кріоконсервування хоріона було використано 0,7 М, 1,5 М ДМСО та 1,5 М 1,2-пропандіол. На рис. 1 (А, Б) наведено структуру нативної тканини хоріона.

У ворсинках хоріона фіксували епітеліальний шар клітин трофобласта та стромальну тканину, пронизану великою кількістю кровоносних судин. Скупчення еритроblastів на різних стадіях диференціювання було відзначено як у судинах, так і в стромі ворсинок. У деяких зонах мав місце контакт еритроblastів з цитотрофобластом.

Гістологічним аналізом тканини хоріона, кріоконсервованого з 0,7 М ДМСО, показано присутність великої кількості ушкоджених еритроblastів у судинах (рис. 1, В) та стромальній тканині хоріона (рис. 1, Г). Також спостерігали поодинокі зони лізису

строми ворсинок (рис. 1, Д). Однак, за повільного відмивання кріопротектора в деяких ворсинках залишалися інтактні еритроblastи, що свідчить про руйнування цих клітин при розморожуванні (рис. 1, Е).

Збільшення концентрації ДМСО до 1,5 М сприяє збереженню еритроblastів у ворсинках хоріона 5–9 тижнів гестації та еритроцитів у зразках 10–12 тижнів гестації (рис. 1, Є). Аналіз тканини, яку кріоконсервували з 1,5 М 1,2-пропандіолу, також показав збереження еритроblastів та еритроцитів відповідно до строку гестації (рис. 1, Ж). Однак слід наголосити, що гістологічний аналіз зразків кріоконсервованого хоріона не дозволяє детектувати накопичення в процесі заморожування мікроушкодження, що унеможлиблює встановлення відмінностей в ефективності збереження структури тканини за експериментальних умов з використанням 1,5 М ДМСО та 1,5 М 1,2-пропандіолу.

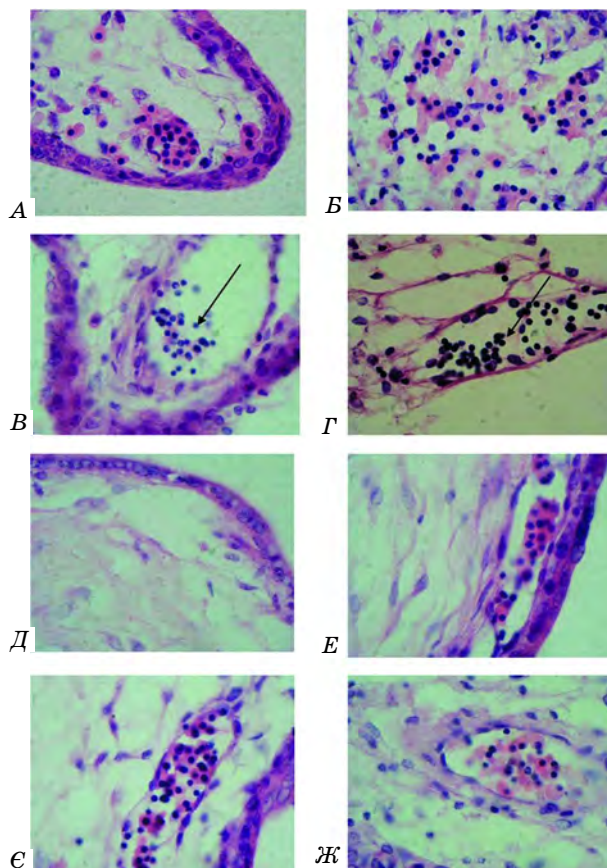


Рис. 1. Мікроструктура нативної (А, Б) і кріоконсервованої з 0,7 М ДМСО (В, Г, Д, Е) та з 1,5 М ДМСО (Є) і PrOH (Ж) тканини хоріона: А, Б, В, Г, Є, Ж — тканина хоріона плода 10-го тижня гестації; Д, Е — тканина хоріона плода 12-го тижня гестації.

Стрілками позначено ядра ушкоджених еритроblastів. Забарвлення гематоксилін-еозином. ×400

Виділення клітин з тканин нативного та кріоконсервованого хоріона

Нами було підібрано оптимальні умови ізолювання клітин з тканини хоріона, замороженої під захистом 1,5 М ДМСО. У разі оброблення тканини ензимами отримували суспензію клітин, життєздатність яких під час фарбування трипановим синім коливалась у межах 42–90% ($n=5$).

Після висіву клітин з нативної та кріоконсервованої плаценти на 5-ту й 9–10-ту доби культивування, відповідно, виростили клони клітин, які за своєю морфологією були схожі на колонії трофобластних стовбурових клітин [4, 5]. У процесі подальшого культивування навколо клонів спостерігали міграцію і ріст фібробластоподібних та епітеліальних клітин (рис. 2, А, В). У разі пересіву культури клітин клональний ріст не відбувався.

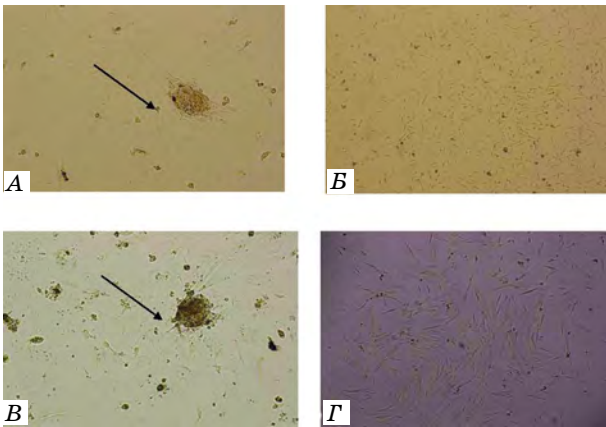


Рис. 2. Культури клітин, отримані з нативної (А, В) та з кріоконсервованої (В, Г) тканини хоріона з 1,5 М ДМСО:

А — 5-та доба росту; В — 9-та доба росту; В — 11-та доба росту; Г — 14-та доба росту. Стрілками позначено колонії клітин хоріона. Світлова мікроскопія. $\times 50$

Утворення моношару клітин, отриманих з нативної тканини, досягалось у середньому на 6-ту добу, для кріоконсервованої тканини — в середньому на 23-тю добу. Під час подальшого культивування швидкість формування конфлюенсу клітинами, що отримані з нативної та кріоконсервованої тканини хоріона, не відрізнялася. Затримка росту в первинній культурі клітин з кріоконсервованої тканини хоріона, можливо, пов'язана з більшою кількістю клітин, що з часом відкріплялися від пластику, зменшуючи щільність прикріплених клітин.

У культурі більшість клітин з нативної та кріоконсервованої тканини на перших па-

сажах були сильно розпластані, мали численні вирости, тимчасом як інші характеризувалися витягнутою веретеноподібною формою (рис. 2, В). У клітинах спостерігали наявність 1 ядра з 1–4 ядерцями.

На 5–8-му пасажах у культурі відбувалося зниження проліферативної активності клітин, збільшення їхніх розмірів, з'являлися багатоядерні клітини з великими відростками (рис. 3).

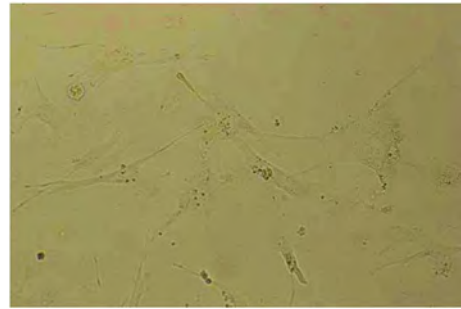


Рис. 3. Культура клітин, отриманих із кріоконсервованої тканини хоріона з 1,5 М ДМСО, 5-й пасаж. Світлова мікроскопія. $\times 100$

Імунофенотиповий та імуноцитохімічний аналіз клітин, виділених з нативної та кріоконсервованої тканини хоріона

Під час імунофенотипування популяції клітин, отриманих з нативного хоріона, з використанням протокової цитофлуорометрії було виявлено високий рівень експресії маркерів CD90, CD73, CD105 та відсутність експресії CD45, CD34, CD14 (рис. 4).

Культура фібробластоподібних клітин кріоконсервованого хоріона також мала імунофенотип $CD90^+CD73^+CD105^+CD45^-CD34^-CD14^-$ (рис. 5).

У деяких клітинах, одержаних із кріоконсервованого хоріона, спостерігали дво-модальний розподіл клітин за маркером CD90 (рис. 6).

Культури клітин з дво-модальним розподілом клітин за маркером CD90 зберігали такий характер експресії протягом чотирьох пасажів (рис. 8). Слід відзначити, що в культур з дво-модальним розподілом відбувається достовірно зростання популяції клітин $CD90^-$ (рис. 7, 8) з 2-го по 4-й пасаж, хоча в деяких із них спостерігали стабільну експресію цього маркера на рівні 75%.

У деяких клітинних популяціях з одно-модальним розподілом клітин за маркером CD90 також відбувається зниження експресії цього маркера під час пасажування (рис. 7, 8).

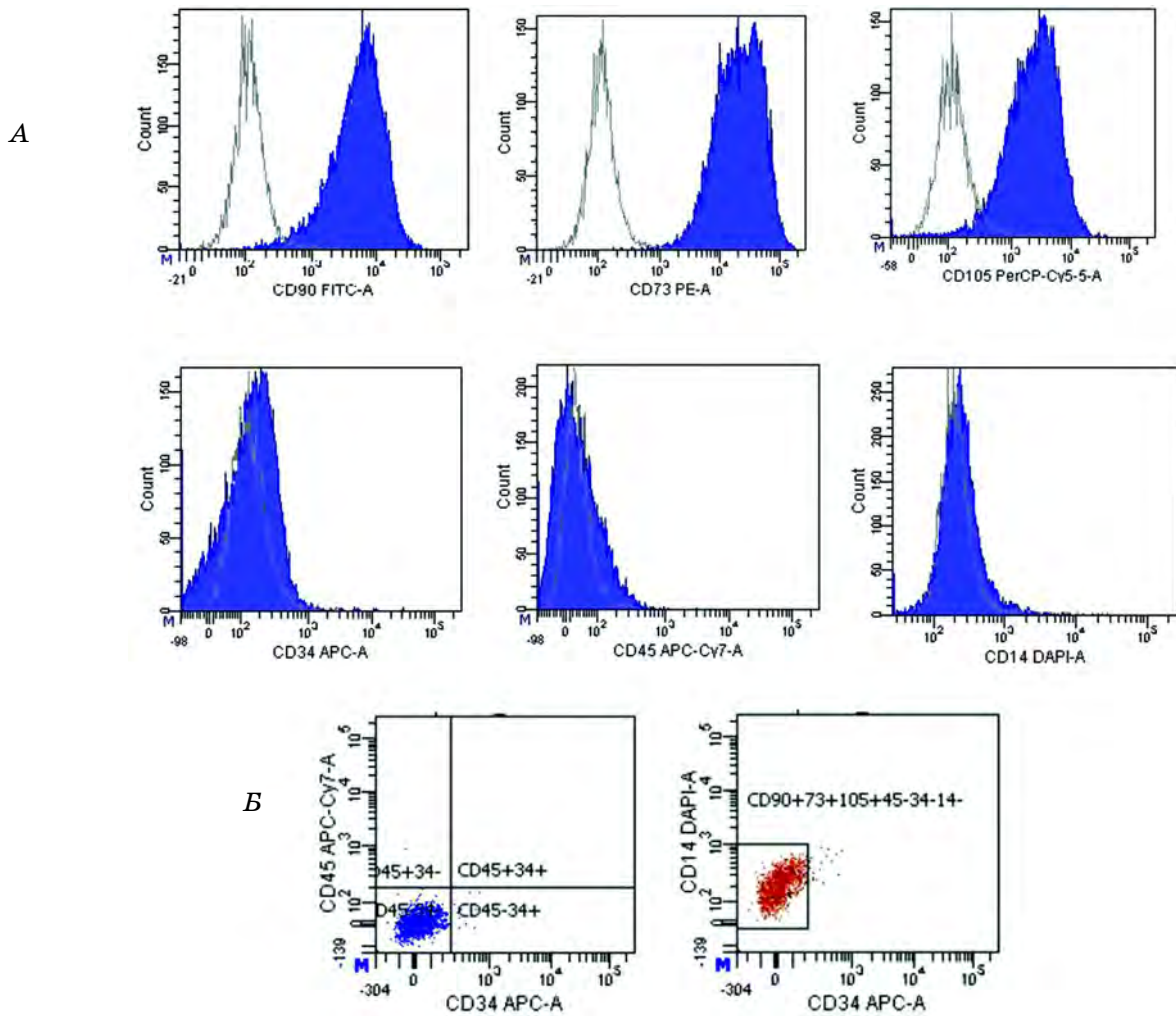


Рис. 4. Гістограми експресії поверхневих маркерів у культурі клітин, отриманій з нативної тканини хоріона (2-й пасаж):

А — рівні експресії CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14 (сірий контур — фоновий рівень флуоресценції);
 Б — двовимірні гістограми популяцій клітин з фенотипом CD90⁺CD73⁺CD105⁺CD34⁻CD45⁻CD14⁻

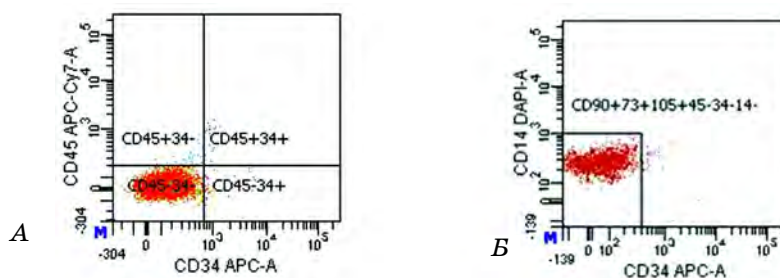


Рис. 5. Гістограми експресії поверхневих маркерів у популяціях клітин, виділених із тканини кріоконсервованого хоріона: показано популяції клітин CD34⁻CD45⁻ (А) та CD90⁺CD73⁺CD105⁺CD34⁻CD45⁻CD14⁻ (Б)

Цей факт було описано також багатьма дослідниками [6–8], які вивчали культуру клітин ММСК, отриману з нативної тканини плаценти людини.

Слід відзначити достовірно меншу експресію CD90 в культурі клітин кріоконсервованого хоріона з двомодальним розподілом порівняно з клітинами, одержани-

ми з нативного хоріона на 2- та 4-му пасажах. Подібну відмінність спостерігали і за порівняння з клітинами з одномодальним розподілом CD90 (отриманими з кріоконсервованої тканини) на 2-му пасажі, хоча з пасажуванням ця різниця зникла внаслідок зниження рівня експресії клітинами цього маркера (рис. 7).

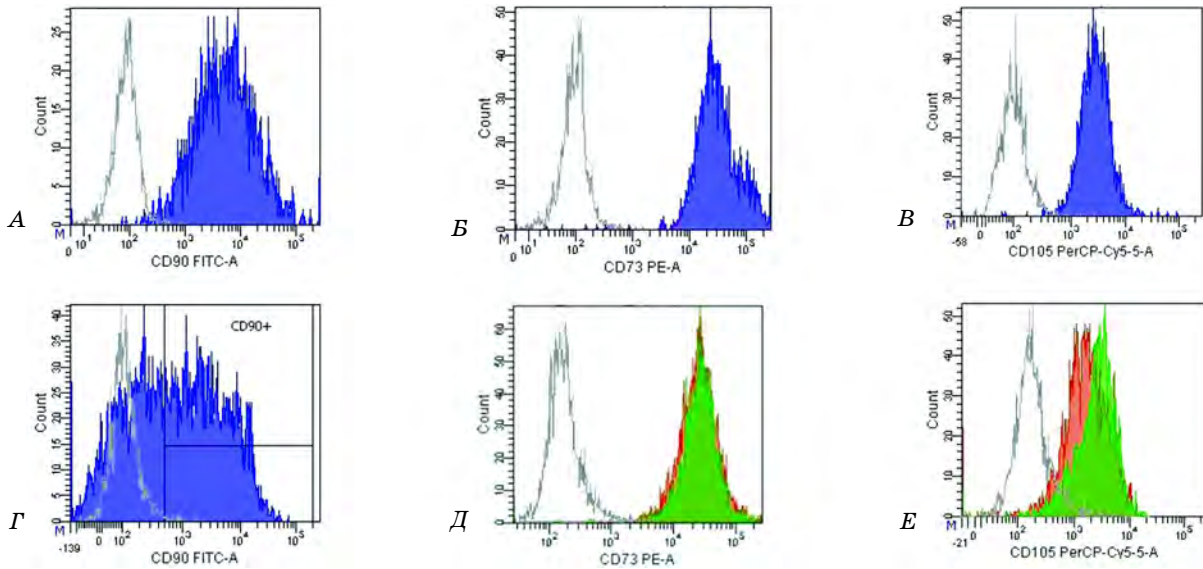


Рис. 6. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105 на клітинах, отриманих з кріоконсервованої тканини хоріона, 2-й пасаж: експресія маркерів CD73 (Б) та CD105 (В) за одномодального розподілу популяцій клітин за маркером CD90 (А); експресія маркерів CD73 (Д) та CD105 (Е) за двомодальним розподілом популяцій клітин за маркером CD90 (Г).

Синій колір — усі клітини; зелений колір — популяція CD 90⁻; червоний — CD 90⁺; сірий контур — фоновий рівень флуоресценції

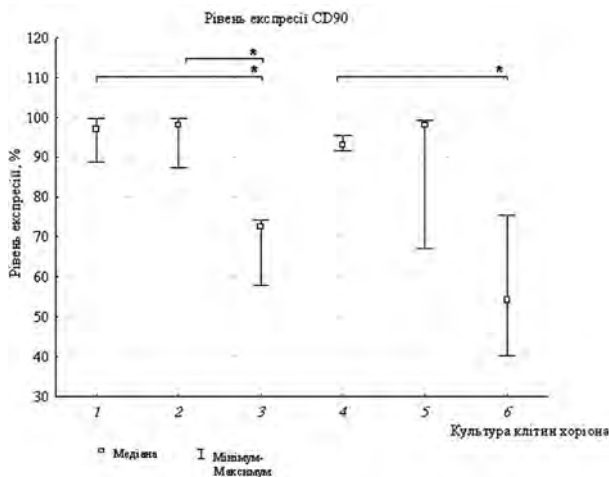


Рис. 7. Рівень експресії маркера CD90 в популяції клітин хоріона:

- 1 — популяція клітин нативного хоріона 2-го пасажу;
- 2 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 2-го пасажу з одномодальним характером розподілу рівня експресії;
- 3 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 2-го пасажу з двомодальним характером розподілу рівня експресії;
- 4 — популяція клітин нативного хоріона 4-го пасажу;
- 5 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з одномодальним характером розподілу рівня експресії;
- 6 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з двомодальним характером розподілу рівня експресії при $n = 3$, $P = 0,05$

Отже, можна стверджувати, що клітини з одномодальним розподілом за маркером CD90, одержані з нативної та кріоконсервованої тканини хоріона, не відрізнялися за характером експресії цього поверхневого маркера на різних пасажах.

Частота отримання культур клітин з двомодальним розподілом клітин за маркером CD90 з кріоконсервованої тканини становила 50% ($n = 6$). Однак відсутність серед культур клітин нативної тканини хоріона такого двомодального розподілу клітин за маркером CD90, можливо, пов'язана з порівняно невеликою кількістю ($n = 3$) проаналізованих культур клітин. Таким чином, вплив кріоконсервування тканини хоріона на особливості експресії CD90 потребує подальших досліджень.

Зважаючи на дискретний характер розподілу клітин за експресією маркера CD90 та зростання популяції CD90⁻ під час пасажування культури клітин, можна припустити наявність різних попередників CD90⁺ та CD90⁻ клітин.

Так, відомо, що з пуповинної крові було виділено клони ММСК, які відрізнялися за морфологією, імунофенотипом та здатністю до диференціювання. Клітини, що мали веретеноподібну морфологію, були позитивними за CD24, CD49, SH2, SH3, SH4 та CD90, тоді як клітини більш розпластані та округлі відрізнялися відсутністю маркера CD90 [9]. Також потрібно відзначити присутність

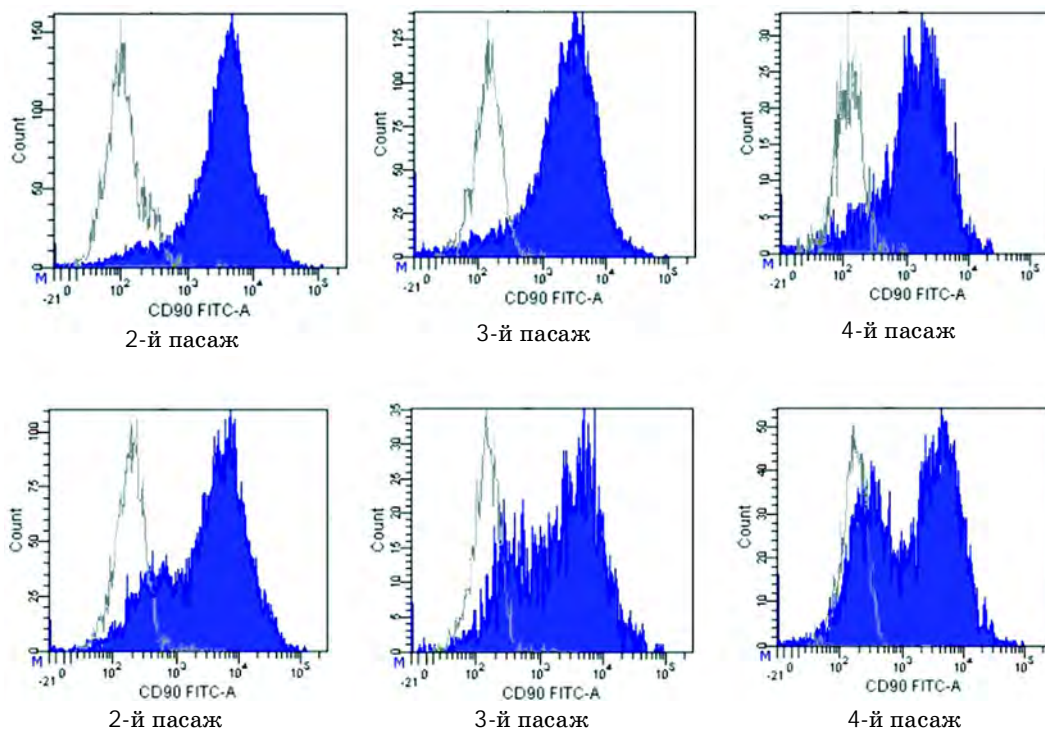


Рис. 8. Гістограми експресії поверхневого маркера CD90 в популяціях клітин, отриманих з кріоконсервованої тканини хоріона:

верхній ряд — популяція з одномодальним розподілом за CD90;
 нижній ряд — популяція з двомодальним розподілом;
 сірий контур — фоновий рівень флюоресценції

двох популяцій фібробластів, отриманих з легенів мишей; клітини CD90⁺ мали веретеноподібну форму, а CD90⁻ — були плоскі та округлі [10]. У деяких роботах показано відсутність маркера CD90 на ММСК, одержаних з амніотичної оболонки [11].

Зниження експресії CD90 в культурах мезенхімальних клітин з амніона та хоріона людини корелювало зі зменшенням імуносупресивної дії на лімфоцити периферичної крові за їх співкультивування [6]. Також було встановлено, що після сепарування ММСК плаценти з експресією маркера CD349 (рецептор Wnt-лігандів) спостерігалось підвищення рівня CD90 [8].

У культурах клітин нативної та кріоконсервованої культури з одно- і двомодальним розподілом за маркером CD90 відсутня відмінність в експресії поверхневих маркерів CD73 та CD105 на 4-му пасажі (рис. 9).

Зростання кількості клітин з низьким рівнем експресії маркерів CD90 та CD105 із пасажуванням культури спостерігалось одночасно зі зниженням проліферативної активності, збільшенням розмірів, появою багатоядерності і кількості виростів клітин.

Імунофенотипування популяцій клітин нативного та кріоконсервованого хоріона на

1-му пасажі шляхом протокової цитофлуориметрії показало присутність мінорної популяції ендотеліальних прогеніторних клітин (рис. 10).

Імуноцитохімічним аналізом культур клітин нами було виявлено експресію цитокератинів (рис. 11). Слід зазначити, що панцитокератинпозитивні ММСК було отримано з пуповини [12], на відміну від ММСК пуповинної крові [13], однак у деяких роботах описано присутність цитокератинів 8 та 18 у культурі адгезивних клітин пуповинної крові, що поряд із відсутністю CD50, CD62L, CD106 дає підставу авторам відокремити їх від ММСК та віднести до особливого типу [14].

У роботі Koskull et al. (2005) було показано, що під час культивування мезенхімальні клітини фетального хоріона, шкіри та легень експресують цитокератини 8, 18 та 19, на відміну від фібробластів шкіри дітей та дорослих [15]. Поодинокі МСК кісткового мозку в культурі експресують цитокератини 18 та 19, які утворюють проміжні філаменти [16].

Високий рівень експресії цитокератинів клітинами, що були виділені з хоріона та зрілої плаценти, можливо, свідчить про особливість плацентарних стромальних клітин у культурі клітин *in vitro*.

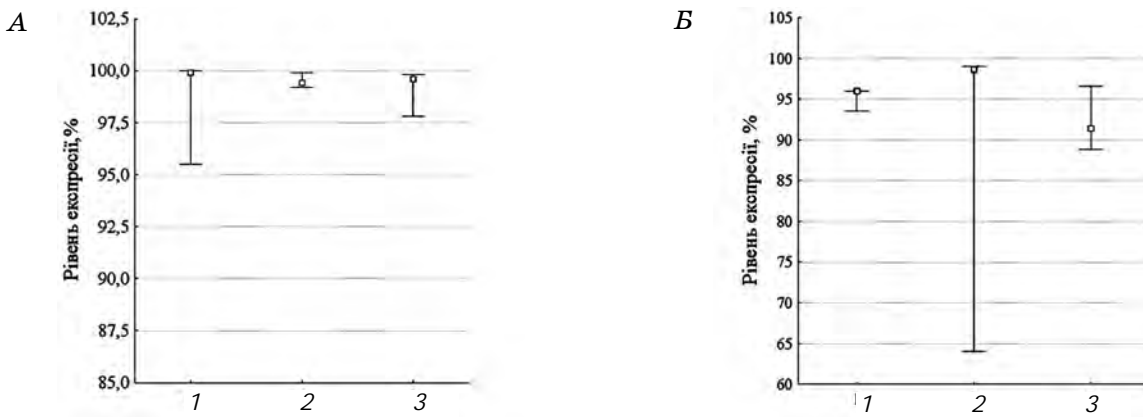


Рис. 9. Рівень експресії поверхневих маркерів у популяціях клітин хоріона: А — CD73, Б — CD105: 1 — популяція клітин нативного хоріона 4-го пасажу; 2 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з одномодальним характером розподілу рівня експресії; 3 — популяція клітин кріоконсервованого хоріона 4-го пасажу з двомодальним характером розподілу рівня експресії ($n = 3, P = 0,05$)

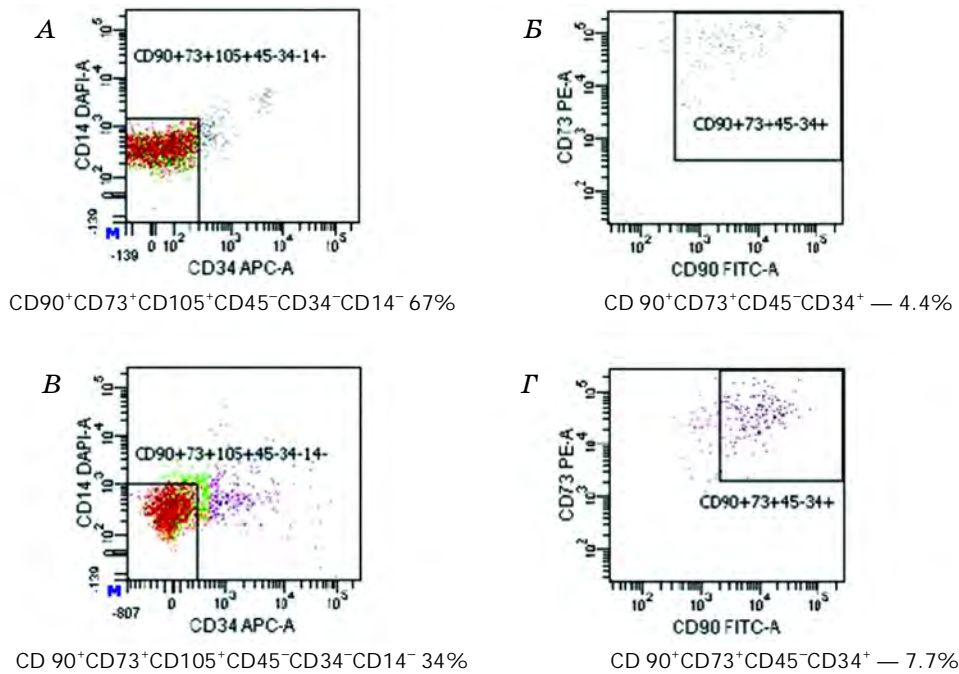


Рис. 10. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14 у популяціях клітин (1-й пасаж), отриманих з нативної (А, Б) та кріоконсервованої (В, Г) тканин хоріона:

А, В — популяція клітин з фенотипом МСК;
 Б, Г — популяція клітин з фенотипом ендотеліальних прогеніторних клітин

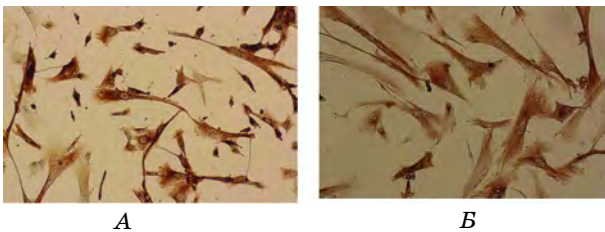


Рис. 11. Клітини, отримані з нативної (А) та кріоконсервованої (Б) тканини хоріона (4-й пасаж): імуноцитохімічне забарвлення на панцитокератин. $\times 400$

Присутність фібробластоподібних клітин з вищеписаним імунофенотипом у популяціях клітин кріоконсервованого хоріона відповідає мультипотентним мезенхімальним стромальним клітинам, оскільки вміст клітин з експресією CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺ перевищує 95% [17].

Отже, нами було підбрано умови кріоконсервування тканини хоріона, виділення та культивування мезенхімальних стромальних клітин хоріона (5–12 тижнів гестації). Виявлено деякі ушкодження тканини хоріона за різних режимів кріоконсервування

і показано особливості росту клітин кріоконсервованого хоріона *in vitro*. Уперше було описано імунофенотип популяції клітин стромы кріоконсервованого хоріона.

Таким чином, порівняльний гістологічний аналіз тканини хоріона до та після кріоконсервування з кріопротекторами показав, що під захистом 1,5 М розчину ДМСО і 1,5 М розчину 1,2-пропандіолу зберігаються еритробласти (у тканині 5–9 тижнів гестації) та еритроцити (у тканині 10–12 тижнів гестації) у судинах та стромальній тканині. Це може свідчити про більшу ефективність застосування цих кріопротекторів у зазначених концентраціях, на відміну від застосування стандартного 0,7 М розчину ДМСО.

Кріоконсервування тканини з використанням 1,5 М ДМСО дає змогу отримати культуру клітин, що за своїм імунофенотипом відповідає ММСК. Культури клітин нативного та кріоконсервованого хоріона з одномодалним розподілом за експресією

CD90 не відрізняються. Встановлено достовірну різницю в рівні експресії маркера CD90 в популяціях клітин нативного та кріоконсервованого хоріона з двомодальним розподілом CD90 на 2- та 4-му пасажах, інших основних поверхневих маркерів ММСК на 2- та 4-му пасажах.

Також показано значно меншу кількість CD90⁺-клітин на 2-му пасажі в популяціях з двомодальним розподілом порівняно з популяціями, що мають одномодалний розподіл, хоча з пасажуванням цей ефект зникає внаслідок зниження рівня експресії клітинами цього маркера в популяціях клітин з одномодалним розподілом. Зниження рівня експресії маркерів CD90 та CD105 спостерігається одночасно з падінням проліферативної активності та набуттям клітинами багатоядерності. Виявлено експресію цитокератину в популяціях клітин, одержаних з нативного та кріоконсервованого хоріона. Походження таких популяцій клітин потребує більш детальних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Mihu C. M., Mihu D., Costin N., Ciuca D. R. et al.* Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord // *Rom. J. Morphol. Embryol.* — 2008. — V. 49, N 4. — P. 441–446.
2. *Parolini O., Alviano F., Bagnara G. P. et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells // *Stem Cells.* — 2008. — V. 26. — P. 300–311.
3. *Robin C., Bollerot K., Mendes S. et al.* Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development // *Cell Stem Cell.* — 2009. — V. 5. — P. 385–395.
4. *Spitalieri P., Cortese G., Pietropolli A. et al.* Identification of Multipotent Cytotrophoblast Cells from Human First Trimester Chorionic Villi // *Cloning and stem cells.* — 2009. — V. 11, N 4. — P. 535 — 556.
5. *Lee et al.* Differentiation of human trophoblast stem cells in mammalian straitum // *Pat. N 7, 892, 534B2.* — 2011.
6. *Campioni D., Rizzo R., Stignani M. et al.* Decreased Positivity for CD90 on Human Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) Is Associated with a Loss of Immunosuppressive Activity by MSCs // *Clin. Cyt.* — 2009. — V. 76B. — P. 225–230.
7. *Hiwase S. D., Dyson P. G., TO L. B., Lewis I. D.* Cotransplantation of Placental Mesenchymal Stromal Cells Enhances Single and Double Cord Blood Engraftment in Nonobese Diabetic / Severe Combined Immune Deficient Mice // *STEM CELLS.* — 2009. — V. 27. — P. 2293–2300.
8. *Tran T. C., Kimura K., Nagano M. et al.* Identification of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Involved in Re-Endothelialization // *J. Cell. Physiol.* — 2010. — V. 226. — P. 224–235.
9. *Chang Y.-J., Tseng C.-P., Hsu L.-F. et al.* Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood // *Cell Biol. Intern.* — 2006. — V. 30. — P. 495–499.
10. *Phipps R. P., Penney D. P., Keng P. et al.* Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MHC // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* — 1989. — V. 1. — P. 65–74.
11. *Hwang J. H., Shim S. S., Seok O. S. et al.* Comparison of Cytokine Expression in Mesenchymal Stem Cells from Human Placenta, Cord Blood, and Bone Marrow // *J. Korean. Med. Sci.* — 2009. — V. 24. — P. 547–554.
12. *Farias V. A., Linares-Fernandez J. L., Penalver J. L. et al.* Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties // *Placenta.* — 2011. — V. 32. — P. 86–95.
13. *Sueblinvong V., Loi R., Eisenhauer P. L. et al.* Derivation of Lung Epithelium from Human Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells // *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* — 2008. — V. 177. — P. 701–711.

14. Kogler G., Sensken S., Airey J. A. et al. A New Human Somatic Stem Cell from Placental Cord Blood with Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential // *J. Exp. Med.* — 2004. — V. 200, N 2. — P. 123–135.
15. Koskull H. V., Virtanen I. Induction of cyto-keratin expression in human mesenchymal cells // *J. Cell. Physiol.* — 2005. — V. 133, N 2. — P. 321–329.
16. Wuchter P., Boda-Heggemann J., Straub B. K. et al. Processus and recessus adhaerentes: giant adherens cell junction systems connect and attract human mesenchymal stem cells // *Cell Tissue Res.* — 2007. — V. 328. — P. 499–514.
17. Dominic M., Blanc K. Le, Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* — 2006. — V. 8, N 4. — P. 315–317.

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ТКАНИ ХОРИОНА

V. A. Шаблій^{1,2}
M. D. Кучма²
B. M. Кирик³
L. L. Лукаш¹
G. S. Лобинцева²

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

²ООО «Институт клеточной терапии»,

³ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»

В работе показана возможность получения культуры клеток из криоконсервированной ткани хориона с использованием 1,5 М ДМСО. Впервые описаны особенности формирования культуры клеток хориона человека и ее иммунофенотип. Установлен характер экспрессии маркера CD90 в культурах клеток, полученных из криоконсервированной ткани хориона. Снижение уровня экспрессии CD90 и CD105 наблюдается одновременно с приобретением клетками многоядерности. Показано присутствие популяции эндотелиальных прогениторных клеток в культуре клеток хориона человека на первом пассаже. Обнаружена экспрессия цитокератина в популяциях клеток, полученных из нативного и криоконсервированного хориона.

Ключевые слова: хорион, криоконсервирование, культура клеток, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

THE PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF CELL CULTURE DERIVED FROM CRYOPRESERVED CHORIONIC TISSUE

V. A. Shablii^{1,2}
M. D. Kuchma²
V. M. Kyryk³
L. L. Lukash¹
G. S. Lobintseva²

¹Institute of molecular biology and genetics of National Academy of Science of Ukraine,

²LLC Institute of Cell Therapy,

³State institute of genetics and regenerative medicine Academy of Medicine of Ukraine

It was shown possibility of cell culture obtaining from cryopreserved chorion tissue using 1.5 M DMSO. For the first time we described features of the cell culture formation from cryopreserved human chorion and its immunophenotype. We described the character of CD90 marker expression in cultures of the cells derived from cryopreserved chorion tissue. Decreasing of expression of the markers CD90 and CD105 was observed together with drop in proliferative activity and acquisition of multinuclearity for the cells. The population of endothelial progenitor cells in cell culture was detected on the first passage. Expression of cytokeratins was found in populations of the cells derived from native and cryopreserved chorion tissue.

Key words: chorion, cryopreservation, cell culture, multipotent mesenchymal stromal cells.

КУЛЬТИВУВАННЯ БАЗИДИОМІЦЕТІВ — АКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНИХ ЕНЗИМІВ. II. ЕНДОГЛЮКАНАЗНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ФІЛЬТРАТІВ БАЗИДИОМІЦЕТІВ СТОСОВНО Na-КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЮЛОЗИ

К. Г. Древаль

Донецький національний університет

E-mail: k.dreval@gmail.com

Отримано 06.10.2011

Проведено підбір умов культивування базидіоміцетів — активних продуцентів целюлаз за факторами рН живильного середовища (градації змінювались від 3 до 9 рН із кроком 1 од) і температури (значення змінювались від 24 °С до 36 °С із кроком 2 °С) з метою збільшення синтезу ними ендоглюканази (КФ 3.2.1.4). Визначали ензиматичну активність стосовно Na-карбоксиметилцелюлози. Встановлено, що оптимальною початковою кислотністю живильного середовища для всіх штамів є рН 7, а температурою культивування — 24 °С для штамів А-Дон-02 *Irpex lacteus*, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, Sh-1 *Stereum hirsutum*, 34 °С для К-1 *Irpex lacteus* та 36 °С для Д-1 *Irpex lacteus*. У результаті підбору умов культивування значення ендоглюканазної активності зросли в 1,59 раза для штаму Sh-1 *Stereum hirsutum*, у 2,51 раза для А-Дон-02 *Irpex lacteus*, у 3,02 раза для К-1 *Irpex lacteus*, у 3,69 раза для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* та у 12,16 раза для штаму Д-1 *Irpex lacteus*. Водночас, у результаті оптимізації умов культивування питома ендоглюканазна активність штаму К-1 *Irpex lacteus* зросла у 3,54 раза, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — у 5,12, Д-1 *Irpex lacteus* — у 7,86 та AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — у 17,98 раза. Штам J-2An *Phellinus pomaceus* не виявив активності ендоглюканази у жодному варіанті досліду. Максимальну ендоглюканазну активність щодо Na-карбоксиметилцелюлози для культур К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* та AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* встановлено на 7-му добу культивування, тимчасом як для культури Sh-1 *S. hirsutum* — на 14-ту добу експерименту.

Ключові слова: базидіоміцети, ендоглюканаза, Na-карбоксиметилцелюлоза, температура культивування, кислотність середовища, оптимізація, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.

Дедалі більшу увагу світова спільнота приділяє пошукові та використанню альтернативних джерел енергії, передусім відновлювальних [1]. Розробка технології отримання паливного етанолу з рослинної біомаси та її широке впровадження у виробництво має важливе економічне значення і може розглядатись як один із чинників забезпечення енергетичної незалежності України [2–5]. Одним із факторів, що стримує промислове впровадження таких технологій у виробництво, є нестача високоактивних продуцентів целюлаз. Нами знайдено штами базидіальних грибів, які можуть бути перспективними об'єктами біотехнології целюлаз [6]; наступним етапом дослідження їхньої фізіологічної здатності до гідролізу целюлози є оптимізація фізико-хімічних умов культивування.

Одним з основних ензимів, що входить до складу целюлазного комплексу, є ендоглюканаза, оскільки вона першою атакує

молекули нативної целюлози [7–9]. Специфічним субстратом, стосовно якого визначають активність саме ендоглюканази у складі целюлазного комплексу, є розчин Na-карбоксиметилцелюлози [7–11].

Метою роботи було визначення оптимальних значень температури та рН живильного середовища для культивування деяких штамів базидіоміцетів — активних продуцентів целюлозолітичних ензимів для підвищення синтезу ендоглюканази та її активності щодо розчину Na-карбоксиметилцелюлози.

Матеріали і методи

Визначали вплив початкової кислотності живильного середовища та температури культивування на здатність базидіоміцетів до синтезу ендоглюканази (КФ 3.2.1.4) у складі целюлозолітичного комплексу. Об'єктами досліджень були 6 штамів вищих

базидіальних грибів, які на попередньому етапі скринінгу [6] відібрано як активні продуценти целюлозолітичних ензимів: К-1, А-Дон-02 та Д-1 *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.; Sh-1 *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.; AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schrot. та J-2An *Phellinus potaceus* (Pers.) Maire.

Для дослідження ендоглюканазної активності штами культивували на рідкому середовищі Чапека такого складу (г/л): NaNO_3 — 2, K_2HPO_4 — 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KCl — 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 [8]. Початкову кислотність живильного середовища доводили до значень від 3 до 9 рН із кроком 1 рН за допомогою 10%-х розчинів HCl або NaOH на аналізаторі іонів АІ-123 (Україна). Культивування проводили протягом 14 діб за температури від 24 до 36 °С з інтервалом 2 °С в термостатах ТС-80 та ТС-80-М2 (Росія). Як єдине джерело вуглецю до середовища додавали фільтрувальний папір Whatman № 1 в кількості 8 г/л.

Ендоглюканазну активність ензимів у складі целюлозолітичного комплексу культуральних фільтратів (КФ) базидіоміцетів визначали стосовно 2%-го розчину Na -карбоксиметилцелюлози (Sigma, Німеччина). Склад реакційних сумішей під час встановлення ензиматичної активності та умови проведення реакцій були у строгій відповідності до рекомендацій IUPAC [9] і загальноприйнятих методик [8, 9]. Обчислюючи результати, за одиницю активності (IU) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкМ редуруючих цукрів протягом 1 хв в умовах досліду (рН = 4,8; t = 40 °С). Питому активність (IU/mg) визначали за відношенням загальної активності культурального фільтрату (IU/ml) до вмісту протеїнів у культуральному фільтраті (mg/ml). Редууючі цукри оцінювали методом Шо-модьї-Нельсона (калібрувальний графік будували за глюкозою) [8, 12]. Вміст протеїну в КФ визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [13].

Усі дослідження проводили у трикратній повторюваності. Статистичну обробку здійснювали методами дисперсійного аналізу, порівняння середніх — методом Дункана [14].

Результати та обговорення

Зміну ендоглюканазної активності щодо розчинів Na -карбоксиметилцелюлози (Na -КМЦ) залежно від різних градацій фізичних та хімічних чинників на 7-му добу культивування подано на рис. 1, а на 14-ту добу — на рис. 2.

Для штаму К-1 *I. lacteus* (рис. 1, а) характерний один значний пік ендоглюканазної

активності, встановлений за культивування при температурі 34 °С та рН 7. Виявлений максимум перевищує значення ендоглюканазної активності, визначене за неоптимізованих умов культивування, у 3,02 раза. Якщо взяти до уваги значення активності цього штаму, вищі за 6 IU/ml, то можна побачити певне розмежування активності КФ до Na -КМЦ у цього штаму: в діапазонах 24–26 °С та 32–36 °С за кислотності живильного середовища у межах 5–7 рН. Можна припустити, що в штаму К-1 *I. lacteus* є 2 форми ендоглюканаз, які відрізняються за своїми фізико-хімічними оптимумами активності. Це узгоджується з даними літератури, які свідчать про існування двох ендоглюканаз — Ег I та Ег II — у целюлозних комплексах більшості організмів [8, 9, 15, 16]. На 14-ту добу культивування ендоглюканазна активність цього штаму була нижчою порівняно зі значеннями, встановленими на 7 добу експерименту (рис. 2, а).

Для штаму А-Дон-02 *I. lacteus* на 7-му добу культивування характерним є певний зсув підвищеної активності ендоглюканаз в зону більш високих значень початкового рН живильного середовища (рис. 1, б). Так само, як і в штаму К-1 *I. lacteus*, у штаму А-Дон-02 *I. lacteus* виявляється певний розподіл підвищеної ендоглюканазної активності: за температури культивування 24 °С, 28–30 °С та 34–36 °С при початковій кислотності живильного середовища 7–8 рН. На 14-ту добу культивування встановлено лише один значний пік активності до гідролізу Na -КМЦ штаму А-Дон-02 *I. lacteus* (рис. 2, б). При цьому максимумами ендоглюканазної активності цього штаму, встановлені на 7-му та 14-ту добу культивування, достовірно між собою не відрізняються. Однак, на 7-му добу культивування максимум активності встановлено за температури культивування 24 °С, а на 14-ту добу — за 32 °С. Це також може вказувати на існування у штаму А-Дон-02 *I. lacteus* кількох форм ендоглюканаз, які розрізняються не лише за фізико-хімічними оптимумами дії, а й за часом їх синтезу. Абсолютне значення максимальної активності КФ до Na -КМЦ штаму А-Дон-02 *I. lacteus* перевищує неоптимізоване значення у 2,51 раза.

Ендоглюканазна активність штаму Д-1 *I. lacteus* на 7-му добу культивування зростала на живильному середовищі з рН 7 при всіх досліджуваних температурах, крім 30 °С та 36 °С, за кислотності живильного середовища 4–7 рН (рис. 1, в). Абсолютне значення максимальної ендоглюканазної активності цього штаму встановлено на 14-ту добу культи-

ування на живильному середовищі з рН 7 за температури 36 °С. Значення, встановлене за цих умов культивування, перевищувало неоптимізоване значення активності ензимів КФ цієї культури у 12,16 раза. На 14-ту добу культивування чітко простежувалось розмежування фізико-хімічного оптимуму ендоглюканазної активності штаму *D-1 I. lacteus*, що також може свідчити про існування кількох форм ендоглюканаз у целюлозолітичному комплексі цієї культури.

Ендоглюканазна активність штаму *Sh-1 S. hirsutum* як на 7-му (рис. 1, з), так і на 14-ту (рис. 2, з) добу культивування була достовірно нижчою за ендоглюканазну активність інших досліджуваних штамів. На 7-му добу культивування чітко встановлено зону оптимуму ендоглюканазної активності цього штаму на живильному середовищі з рН 5–7 та за температури 28–32 °С. На 14-ту добу культивування чітко розмежовуються дві зони підвищеної активності цього штаму до гідролізу Na-КМЦ (рис. 2, з). Максимальну ендоглюканазну активність штаму *Sh-1 S. hirsutum* встановлено за культивування на живильному середовищі з рН 7 та температури 24 °С на 14-ту добу експерименту. Значення максимальної активності КФ цього штаму до Na-КМЦ перевищувало неоптимізоване значення в 1,59 раза.

Для штаму *AnSc-1 D. confragosa* f. *confragosa* на 7-му добу культивування є характерним чітке розмежування зон фізико-хімічних оптимумів ендоглюканазної активності (рис. 1, д), яке втрачається на 14-ту добу експерименту (рис. 2, д). Абсолютне значення максимальної ендоглюканазної активності цього штаму встановлено за температури культивування 32 °С на живильному середовищі з рН 7 на 14-ту добу експерименту, який у 3,69 раза перевищував неоптимізоване значення.

В експерименті за умов дії всіх градацій температури та рН середовища не визначено ендоглюканазної активності КФ штаму *J-2An P. rotaceus*, що показано на рис. 1, е та 2, е. Зважаючи на те, що в умовах експерименту не виявлялось достовірної різниці за вмістом редуруючих цукрів та протеїнів у КФ цього штаму порівняно з контролем (як на 7-му, так і на 14-ту добу), нормальний ріст у культурі на картопляно-глюкозному середовищі, на середовищі Чапека з додаванням глюкози як джерела вуглецю (8 г/л) та накопичення в КФ екзогенних протеїнів у цьому разі, наявність ендоглюканазної активності стосовно Na-КМЦ у штаму *J-2An P. rotaceus* на етапі скринінгу можна розглядати як артефакт, адже дані не відтворено за повторного проведення експерименту.

Паралельно з визначенням загальної ендоглюканазної активності у КФ досліджуваних штамів розраховували питому активність ензимів базидіоміцетів щодо Na-КМЦ. Результати розрахунків наведено на рис. 3

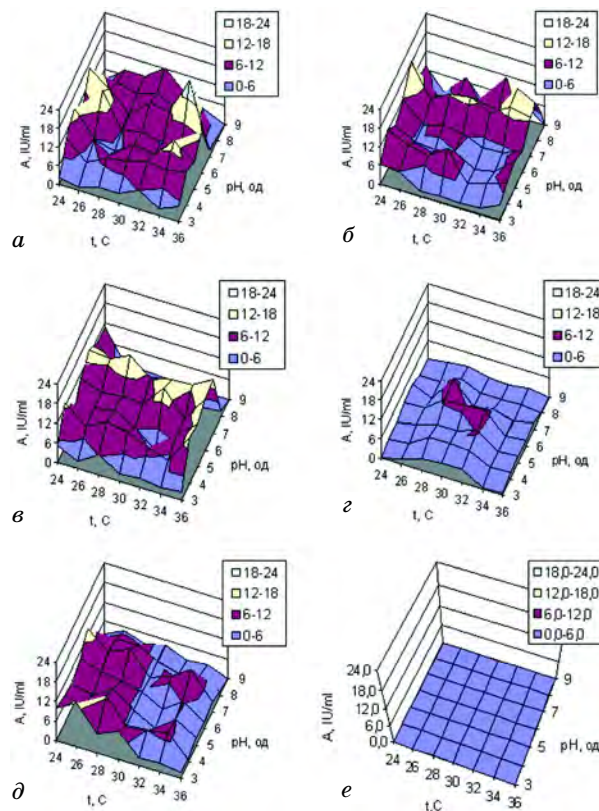


Рис. 1. Ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (з); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту

і 4. Значення питомої ендоглюканазної активності були вищими за значення загальної активності, що вказує на неістотне накопичення протеїнів у КФ досліджуваних штамів. За умов дії різних градацій зазначених факторів питома ендоглюканазна активність штамів змінювалась не аналогічно до загальної ендоглюканазної активності, що свідчить про неоднорідність накопичення протеїнів у КФ базидіоміцетів.

Питома ендоглюканазна активність культури К-1 *I. lacteus* на 7-му добу культивування мала 3 зони підвищеної активності, які знаходились у діапазонах дії температури та рН середовища, близьких до крайніх (рис. 3, а). Максимальне значення питомої активності КФ цього штаму встановлено на живильному середовищі з рН 7 та за температури культивування 34 °С. Оптимізоване значення перевищувало неоптимізовану величи-

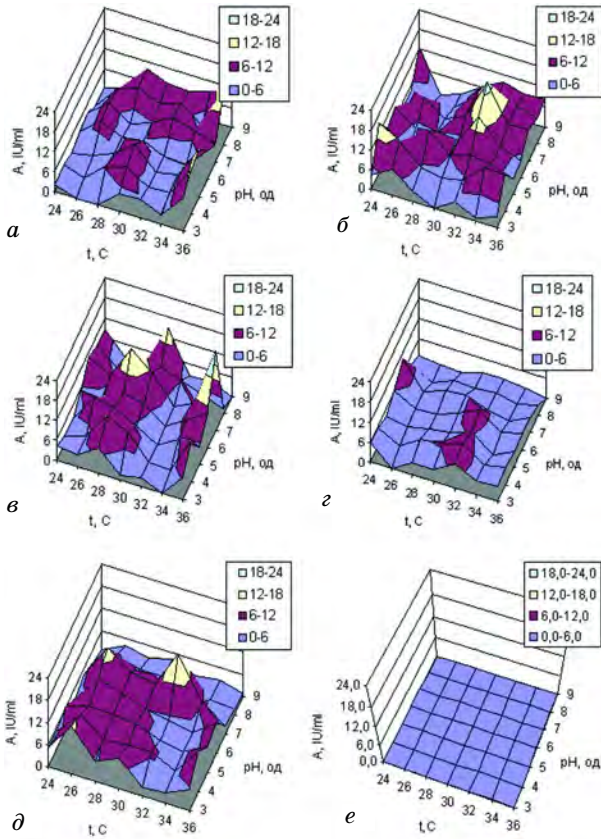


Рис. 2. Ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus pomaceus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

ну питомої активності стосовно Na-КМЦ у 3,54 раза. При цьому максимум активності, встановлений за вказаних умов, достовірно перевищував її значення за умов дії інших градацій рН живильного середовища і температури культивування. На 14-ту добу вирощування питома ендоглюканазна активність КФ культури К-1 *I. lacteus* мала високі значення при температурі 36 °С (рис. 4, а), однак ендоглюканазна активність за цих умов була достовірно нижчою порівняно з максимумом, встановленим на 7-му добу експерименту.

Для штаму А-Дон-02 *I. lacteus* максимум питомої ендоглюканазної активності КФ зафіксовано на 7-му добу культивування на живильному середовищі з рН 7 та за температури 24 °С (рис. 3, б). Високі значення активності також встановлено за культивування на середовищі з рН 9, однак воно достовірно нижче за максимальне. Оптимізоване значення питомої ендоглюканазної активності перевищувало неоптимізовану активність цього штаму в 5,12 раза. На 14-ту добу культивування можна побачити

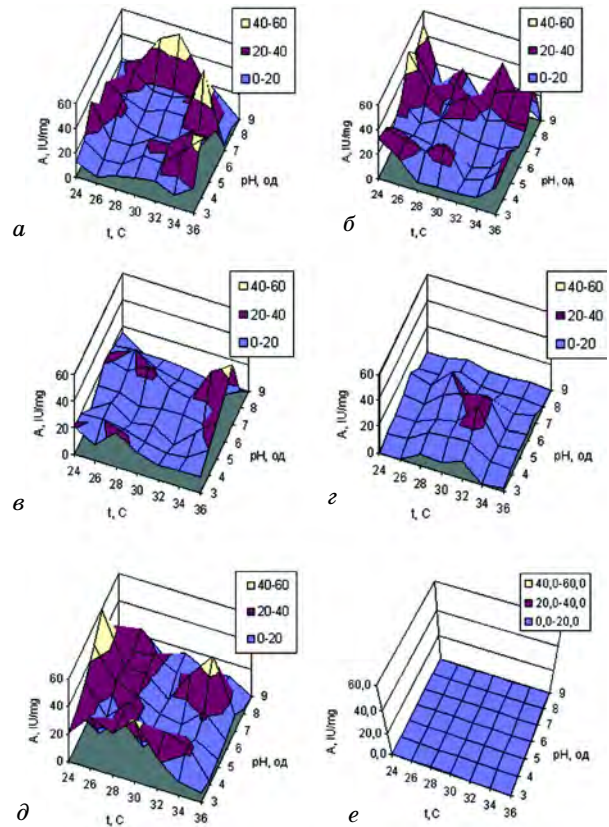


Рис. 3. Питома ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штамів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus pomaceus* (е) залежно від умов культивування на 7-му добу експерименту

певну залежність питомої ендоглюканазної активності штаму А-Дон-02 *I. lacteus* від градацій дії рН та температури (рис. 4, б): підвищені значення активності КФ зафіксовано у крайніх варіантах градацій факторів. Можна припустити, що такі умови є стресовими для організму-продуцента, і як реакція-відповідь підвищується синтез штамом ендоглюканази, яка бере участь у пристосуванні гриба до відповідного чинника.

Як на 7-му (рис. 3, в), так і на 14-ту (рис. 4, в) добу культивування штаму Д-1 *I. lacteus* високу питому ендоглюканазну активність КФ оцінювали за умов дії крайніх градацій рН і температури. Максимальне значення встановлено на 7-му добу культивування на живильному середовищі з рН 7 за температури 36 °С (рис. 3, в). Оптимізоване значення активності ензиму в 7,86 раза перевищувало неоптимізоване.

З рис. 3, г та 4, г видно, що питома ендоглюканазна активність штаму Sh-1 *S. hirsutum* мала дуже вузькі фізико-хімічні оптимуми дії. Максимальне значення активності КФ цього штаму до гідролізу Na-КМЦ встановлено

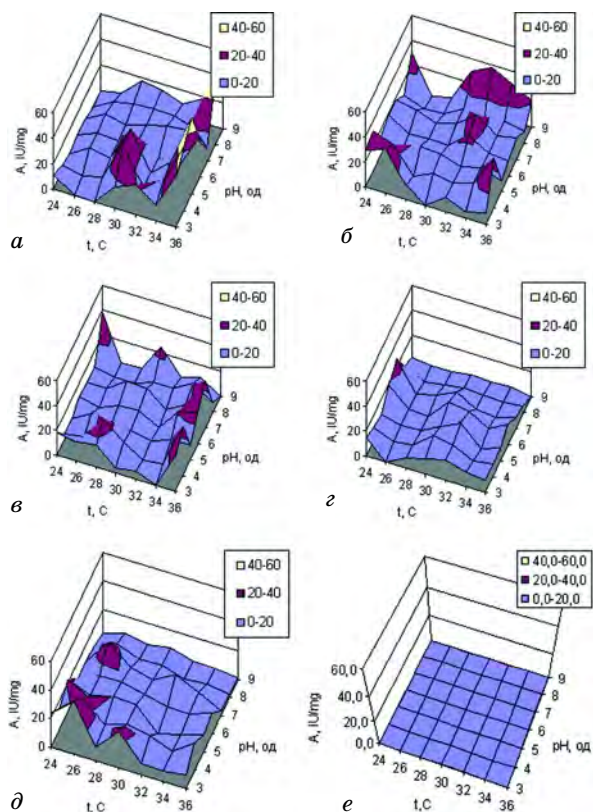


Рис. 4. Питома ендоглюканазна активність культуральних фільтратів штампів К-1, А-Дон-02 і Д-1 *Irpex lacteus* (а, б, в відповідно); Sh-1 *Stereum hirsutum* (г); AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (д) та J-2An *Phellinus rotaceus* (е) залежно від умов культивування на 14-ту добу експерименту

на живильному середовищі з рН 5 за температури 32 °С на 7-му добу культивування та на живильному середовищі з рН 7 за темпе-

ратури 24 °С на 14-ту добу вирощування. При цьому зазначені величини максимальної питомої активності ензиму достовірно між собою не відрізнялись.

Максимум питомої ендоглюканазної активності КФ штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* на 7-му добу встановлено на середовищі з рН 7 за температури 24 °С (рис. 3, д). При цьому значення ендоглюканазної активності штаму AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* в 17,98 раз за перевищувало неоптимізовану величину, визначену на попередньому етапі. Питома активність КФ цього штаму до Na-КМЦ на 14-ту добу культивування була нижчою порівняно з питомою ендоглюканазною активністю КФ на 7-му добу експерименту (рис. 4, д).

Культуральний фільтрат штаму J-2An *P. rotaceus* як на 7-му (рис. 3, е), так і на 14-ту (рис. 4, е) добу вирощування питомої ендоглюканазної активності не виявляв.

Таким чином, у результаті проведеної роботи встановлено оптимальні значення рН живильного середовища і температури культивування для синтезу екзоцелюлаз дослідженими базидіоміцетами. Для отримання найбільшого виходу ендоглюканаз, здатних до гідролізу Na-КМЦ, штами А-Дон-02 *I. lacteus*, Sh-1 *S. hirsutum* та AnSc-1 *D. confragosa* слід культивувати на живильних середовищах з рН 7 за температури 24 °С, штам Д-1 *I. lacteus* — на живильному середовищі з рН 7 за 36 °С, а штам К-1 *I. lacteus* — на живильному середовищі з рН 7 за 34 °С.

Роботу виконано за спонсорської підтримки громадської організації «Развитие» (Росія).

ЛІТЕРАТУРА

1. Кузьмінський С. В., Гвоздик П. І., Голуб Н. В. Біопаливні елементи — проблеми і перспективи розвитку. І. Ферментні паливні елементи // Мікробіол. біотехнол. — 2008. — № 3. — С. 21–31.
2. Сибірний А. Біопаливний етанол з лігноцелюлози (рослинної біомаси): досягнення, проблеми, перспективи // Вісн. НАН України. — 2006. — № 3. — С. 32–48.
3. Кухар В. П. Біоресурси — потенційна сировина для промислового органічного синтезу // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 12–27.
4. Михайлова Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии — Мн.: Бел. наука, 2007 — 407 с.
5. Xing-hua L., Hua-jun Y., Bhaskar R. et al. The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization // Afr. J. Biotechnol. — 2009. — V. 8 (11). — P. 2418–2422.
6. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
7. Ферментные системы высших базидиомицетов / Под ред. Даниляк Н. И., Семичаевский В. Д., Дудченко Л. Г. и др. — К.: Наук. думка, 1989. — 280 с.
8. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология — 1993. — Т. 25. — 152 с.
9. Синицын А. П., Гусаков А. В., Черноглазов В. М. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 224 с.
10. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.
11. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity // Pure & Appl. Chem. — 1987. — V. 59, N 2. — P. 257–268.
12. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars // J. Biol. Chem. — 1944. — V. 153, N 2. — P. 375–379.

13. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
14. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: Навч. посіб. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
15. Комарницкий И. К. Изучение целлюлозолитических ферментов у некоторых дере-

- воразрушающих грибов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — К., 1975. — 28 с.
16. 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.

**ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
БАЗИДИОМИЦЕТОВ — АКТИВНЫХ
ПРОДУЦЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ
ЭНЗИМОВ.**

**II. ЭНДОГЛЮКАНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ
КУЛЬТУРАЛЬНЫХ ФИЛЬТРАТОВ
БАЗИДИОМИЦЕТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ
К Na-CАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЕ**

К. Г. Древалъ

Донецкий национальный университет
E-mail: k.dreval@gmail.com

Проведен подбор условий культивирования базидиомицетов — активных продуцентов целлюлаз по факторам pH питательной среды (градации фактора изменялись от 3 до 9 pH с шагом 1 ед) и температуры (значения изменялись от 24 °C до 36 °C с шагом 2 °C) с целью повышения синтеза ими эндоглюканаз (КФ 3.2.1.4). Энзиматическую активность определяли по отношению к Na-карбоксиметилцеллюлозе. Установлено, что оптимальной начальной кислотностью питательной среды для всех штаммов является pH 7, а температурой культивирования — 24 °C для штаммов А-Дон-02 *Irpex lacteus*, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, Sh-1 *Stereum hirsutum*, 34 °C для К-1 *Irpex lacteus* и 36 °C для Д-1 *Irpex lacteus*. В результате подбора условий культивирования значения эндоглюканазной активности возросли в 1,59 раза для штамма Sh-1 *Stereum hirsutum*, в 2,51 раза для А-Дон-02 *Irpex lacteus*, в 3,02 раза для К-1 *Irpex lacteus*, в 3,69 раза для AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* и в 12,16 раза для Д-1 *Irpex lacteus*. В то же время в результате оптимизации условий культивирования удельная эндоглюканазная активность штамма К-1 *Irpex lacteus* возросла в 3,54 раза, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — в 5,12 раза, Д-1 *Irpex lacteus* — в 7,86 раза и AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — в 17,98 раза. Штамм J-2An *Phellinus pomaceus* не проявил эндоглюканазной активности ни в одном варианте опыта. Максимальная активность эндоглюканаз относительно Na-карбоксиметилцеллюлозы для культур К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* и AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* установлена на 7-е сут культивирования, в то время как для культуры Sh-1 *S. hirsutum* — на 14-е сут эксперимента.

Ключевые слова: базидиомицеты, эндоглюканаза, Na-карбоксиметилцеллюлоза, температура культивирования, кислотность среды, оптимизация, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.

**SELECTION OF CULTIVATION
CONDITIONS FOR BASIDIOMYCETES —
ACTIVE PRODUCERS OF CELLULOLYTIC
ENZYMES.**

**II. ENDOGLUCANASE ACTIVITY
OF CULTURAL LIQUIDS TOWARDS
Na-CARBOXYMETHYLCELLULOSE**

K. G. Dreval

Donetsk National University
E-mail: k.dreval@gmail.com

To increase endoglucanase (EC 3.2.1.4) production, selection of the cultivation conditions of basidiomycetes — active cellulolytic enzymes producers — was conducted along nutrient medium initial acidity (factor was changed between 3 and 9 pH with 1 pH step) and cultivation temperature (factor was changed between 24 and 36 °C with a step of 2 °C). Endoglucanase activity towards Na-carboxymethylcellulose was determined in the selection process. It was determined that optimal initial acidity of the nutrient medium for all strains was 7 pH, and cultivation temperature was 24 °C for the strains А-Дон-02 *Irpex lacteus*, AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, Sh-1 *Stereum hirsutum*, 34 °C for the strain К-1 *Irpex lacteus* and 36 °C for the strain Д-1 *Irpex lacteus*. As the result of optimization, the values of endoglucanase activity increased at 1,59 times for the strain Sh-1 *Stereum hirsutum*, at 2,51 times for the strain А-Дон-02 *Irpex lacteus*, at 3,02 times for the strain К-1 *Irpex lacteus*, at 3,69 times for the the strain AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* and at 12,16 times for the strain Д-1 *Irpex lacteus*. At the same time, as the result of selection of cultivation conditions, specific endoglucanase activity of strain К-1 *Irpex lacteus* was increased at 3,54 times, А-Дон-02 *Irpex lacteus* — at 5,12 times, Д-1 *Irpex lacteus* — at 7,86 times and AnSc-1 *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* — at 17,98 times. Culture J-2An *Phellinus pomaceus* shown absence of endoglucanase activity in any experiment. Maximal endoglucanase activity of enzymes in cultural liquids of strains К-1, А-Дон-02, Д-1 *Irpex lacteus* and AnSc-1 *D. confragosa* f. *confragosa* was established on the 7th day of cultivation, and for strain Sh-1 *S. hirsutum* — on the 14th day of the experiment.

Key words: basidiomycetes, endoglucanase, Na-carboxymethylcellulose, cultivation temperature, acidity of nutrient medium, optimization, *Irpex lacteus*, *Stereum hirsutum*, *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa*, *Phellinus pomaceus*.

КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛА И ПИРОКАТЕХИНА СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ТИРОЗИНАЗОЙ

Ю. А. Шестеренко
О. В. Севастьянов
И. И. Романовская

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

E-mail: romairina@gmail.com

Получено 13.07.2011

Из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы. С использованием электрофореза в нативных условиях обнаружено 17 протеиновых фракций, 12 из которых обладают выраженной фенолоксидазной активностью и составляют 92,5% общего протеина. Методом SDS-электрофореза в ПААГ выявлено 9 протеиновых фракций, основными из которых являются фракции с молекулярной массой 12 и 41–48 кДа.

Изучены кинетические параметры окисления фенола и пирокатехина, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой. Показано, что включение энзима в матрицу существенно не влияет на K_m и V_{\max} окисления пирокатехина, однако при биоконверсии фенола K_m увеличивается в 6,3 раза при заметном снижении V_{\max} . Установлено ингибирование субстратом при изучении окисления пирокатехина, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой, а также фенола в присутствии свободного энзима.

Ключевые слова: тирозиназа, электрофорез, окисление фенолов, кинетические параметры, иммобилизация.

Проблема очистки производственных стоков от растворенных в воде органических веществ, в частности фенолов, является одной из наиболее важных и одновременно труднорешаемых.

В связи с этим значительный интерес представляют альтернативные технологии удаления фенолов с использованием окислительно-восстановительных энзимов благодаря их селективности, высокой степени очистки, образованию малотоксичных продуктов, возможности применения в широком интервале рН, температуры и концентрации поллютантов [1].

Тирозиназа (монофенол, дигидрокси-L-фенилаланин: кислород оксидоредуктаза КФ 1.14.18.1) — медьсодержащий энзим, катализирующий *o*-гидроксилирование монофенольных субстратов до *o*-дифенолов и окисление *o*-дифенольных поллютантов до *o*-хинонов с последующим образованием малотоксичных олигомерных продуктов [2]. Является широко распространенным энзимом, отвечающим за биосинтез меланина и других полифенольных соединений в грибах, животных и растительных организмах [2, 3]. Наиболее активно изучаются тирозиназа грибов *Agaricus bisporus* и микробные энзимы.

Один из основных недостатков применения тирозиназы — высокая стоимость, в связи с чем актуальным является получение частично очищенных ее препаратов. Поскольку протеиново-фракционный состав препаратов энзима в значительной степени зависит от метода выделения, изучение особенностей состава выделенного частично очищенного препарата методом электрофореза вызывает большой интерес.

Для стабилизации и многократного использования тирозиназы перспективно закрепление ее на полимерных носителях [3].

В процессе иммобилизации могут изменяться конформационные особенности тирозиназы, сродство к субстрату, а также ряд других свойств, поэтому определение кинетических параметров функционирования иммобилизованных препаратов можно рассматривать как весьма актуальную задачу [2].

Цель данной работы — выделение частично очищенного препарата тирозиназы грибов *Agaricus bisporus*, исследование его протеиново-фракционного состава и кинетических особенностей окисления фенола, а также пирокатехина, катализируемого свободным и иммобилизованным энзимом.

Матеріали і методи

Частично очищений препарат тирозинази из грибов *Agaricus bisporus* выделяли согласно модифицированному нами методу [4]. В полученном препарате определяли содержание протеина методом Лоури в модификации Хартри [5], содержание меди согласно [6], фенолоксидазную активность — по тирозину [7].

Протеиново-фракционный состав препарата тирозиназы исследовали методом SDS-электрофореза в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ) в системе Лэммли на приборе Helicon (Россия). Окрашивание осуществляли с использованием Кумасси R-250 [8]. Препараты анализировали в пяти повторениях.

Молекулярную массу исследуемых протеинов рассчитывали по калибровочной кривой «относительная электрофоретическая подвижность/Ig молекулярной массы (кДа)», построенной с использованием следующих маркерных протеинов: лизоцим (14,4 кДа), папаин (21 кДа), панкреатическая липаза (35 кДа), овальбумин (40 кДа), бычий сывороточный альбумин (67 кДа).

Нативный электрофорез осуществляли в 10%-м ПААГ по методу Орнстейн и Дэвис [8].

Кинетику реакции окисления фенола и пирокатехина, катализируемую тирозиназой, определяли по начальной скорости накопления промежуточного продукта реакции (*o*-хинона) спектрофотометрически с помощью 3-метил-2-бензотиазолонгидразон-гидрохлорида (МБТГ) [9].

Иммобилизацию выделенного препарата тирозиназы проводили, добавляя 4%-й раствор альгината натрия, содержащий энзим, к 5%-му раствору хлорида кальция [10].

Для изучения кинетических особенностей окисления фенола и пирокатехина, катализируемого иммобилизованной тирозиназой, гранулы биокатализатора растворяли с использованием 20%-го раствора ортофосфорной кислоты с последующим добавлением карбоната натрия (до pH 6,0–6,5) и гексаметафосфата натрия (10%). Лаг-период реакции окисления фенола определяли по зависимости количества образующихся продуктов реакции от времени. Линейную часть кривой экстраполировали до пересечения с осью абсцисс; отсекаемый на оси абсцисс отрезок соответствует лаг-периоду реакции [11].

На основе полученных данных методом Хейнса [12] находили константу Михаэлиса K_m и максимальную скорость реакции $V_{\text{макс}}$. Используя метод Диксона [12], определяли константу ингибирования субстратом k_i , затем вычисляли оптимальную концентрацию

субстрата $S_{\text{опт}}$ и оптимальную скорость реакции $V_{\text{опт}}$. Концентрации фенола и пирокатехина составили $8,75 \cdot 10^{-5}$ – $5,6 \cdot 10^{-3}$ и $4 \cdot 10^{-5}$ – $9,8 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³, соответственно.

Статистическую обработку проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы с выходом по протеину 0,67 мг/г влажной массы грибов, содержанием ионов меди 0,19%, удельной активностью 500 ед/мг протеина в 1 мин. Метод выделения модифицировали добавлением поликапроамида (М.м. 30 кДа), связывающего продукты окисления полифенольных соединений (ингибиторы тирозиназы), что позволило повысить активность препарата в 3 раза [4].

Методом нативного электрофореза в ПААГ выявлено 17 протеиновых фракций, 12 из которых обладают выраженной фенолоксидазной активностью и составляют 92,5% общего протеина. Количество фракций может быть обусловлено наличием изоформ энзима и образованием агрегатов с присутствующими полифенолами или пигментами (табл. 1, рис. 1).

Таблица 1. Фракционный состав и фенолоксидазная активность тирозиназы (нативный электрофорез в ПААГ)

№	R _f	Удельная доля протеиновой фракции в спектре, %	
		По протеину	По фенолоксидазной активности
17	0,10	1,20	–
16	0,14	2,80	–
15	0,17	1,80	–
14	0,21	11,60	10,10
13	0,24	11,60	60,13
12	0,28	30,20	
11	0,30	8,20	
10	0,35	9,10	8,77
9	0,40	7,20	4,23
8	0,45	2,40	3,69
7	0,48	1,70	4,31
6	0,52	1,50	–
5	0,56	9,60	1,98
4	0,61	0,80	3,12
3	0,66	0,10	3,67
2	0,71	0,10	–
1	0,78	0,10	–

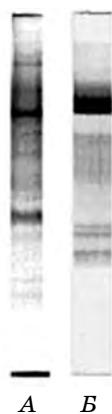


Рис. 1. Электрофореграммы (нативный электрофорез) препарата тирозиназы:
 А — протеиновые фракции;
 Б — фенолоксидазная активность фракций

Исследование протеиново-фракционного состава выделенного препарата тирозиназы методом SDS-электрофореза в ПААГ показало наличие девяти протеиновых фракций (рис. 2). Установлено, что основными являются фракции с молекулярной массой $12 \pm 1,0$ и $41-48 \pm 4,5$ кДа.

Полученные нами данные согласуются с представленными в литературе. Так, M. Schurink et al. [13] методом SDS-электрофореза выявили наличие легкой (L) и тяжелой (H) полипептидных цепей с М.м. $14 \pm 0,5$ и $49 \pm 1,7$ кДа, соответственно. Молекулярная масса нативной тирозиназы, определенная методом гель-фильтрации, составила 127 ± 4 кДа, что дало основание авторам предположить гетеротетрамерную структуру энзима состава (HL)₂.

Рядом других авторов показано, что *in vivo* энзим находится в основном в латент-

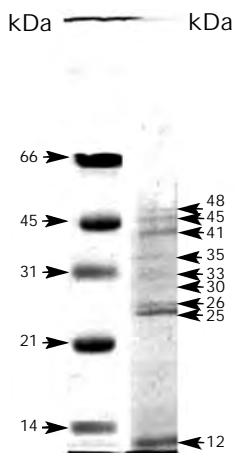


Рис. 2. Протеиновые фракции выделенной из грибов *Agaricus bisporus* тирозиназы, выявленные методом SDS-электрофореза в ПААГ

ной форме. Методом SDS-электрофореза определена его молекулярная масса — 67 кДа. Латентная тирозиназа расщепляется под действием протеаз до промежуточной формы (М.м. 58 кДа) с последующим образованием активного энзима (М.м. 43 кДа) и фрагмента (15 кДа) [14].

Латентная форма тирозиназы нами не выявлена, что может объясняться способом выделения и стадией развития плодовых тел. Однако величина молекулярной массы активной формы и отщепляющегося фрагмента согласуются с полученными нами данными.

Также существует предположение, что L-цепь не является фрагментом тирозиназы: эта фракция может быть представлена смесью лектина и манназы, соосаждающихся в процессе выделения энзима [14].

Нами были обнаружены три минорные фракции с молекулярной массой 30–35 кДа; фракция с М.м. 35 кДа также описана в литературе [15]. Остальные фракции (25–26 кДа), вероятно, представлены балластными протеинами, либо продуктами деградации.

Несмотря на определенный объем известной информации относительно коммерческих препаратов тирозиназы, определение кинетических параметров функционирования выделенных, частично очищенных препаратов энзима является актуальной задачей.

В тирозиназном катализе участвуют два субстрата: молекулярный кислород и фенольное соединение. Известно, что в процессе катализа энзим полностью насыщен кислородом, о чем свидетельствуют значения K_m по кислороду, составляющие для различных фенольных субстратов $0,04-55,6$ мкмоль/дм³ [16], что значительно ниже растворимости кислорода в воде ($1,3$ ммоль/дм³ при 25 °С) [17], поэтому изучение кинетических особенностей катализа осуществляли по фенольному субстрату.

При окислении фенола, катализируемого тирозиназой, было показано наличие лаг-периода, обусловленного тем, что в условиях *in vivo* большая часть энзима существует в мет-форме (85%), не способной связывать молекулярный кислород. Эта форма не катализирует окисление монофенолов, однако обладает высоким сродством к ним и связывает их без протекания реакции, что и приводит к возникновению лаг-периода [2].

Кривая окисления фенола имеет S-образный вид, что согласуется с данными, представленными в [11], величина лаг-периода составила $1,22$ мин (рис. 3).

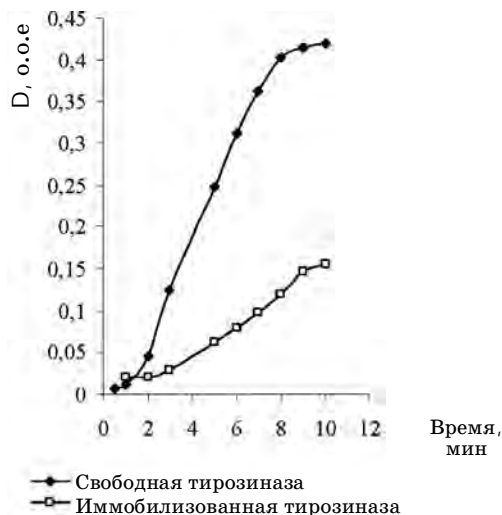


Рис. 3. Зависимость количества образующегося о-хинона от времени в реакции тирозиназного окисления фенола

Полученные значения K_m и V_{\max} представлены в табл. 2. Показано, что величины K_m (0,15 и 0,16 ммоль/дм³ для фенола и пирокатехина) соответствуют данным, представленным в литературе — 0,16–4,0 ммоль/дм³ [18, 19] и 0,15–0,17 ммоль/дм³ [16, 20], соответственно.

Следует отметить, что при окислении пирокатехина максимальная скорость (39,2 мкмоль/мг протеина в 1 мин) значительно выше по сравнению с таковой для фенола (1,69 мкмоль/мг протеина в 1 мин), что обусловлено наличием стадии введения ОН-группы в о-положение молекулы фенола, являющейся

лимитирующей в процессе тирозиназного окисления, тогда как для пирокатехина эта стадия отсутствует [2].

В результате иммобилизации выделенного препарата тирозиназы в гель альгината кальция получен высокоактивный стабильный биокатализатор реакции окисления фенолов многократного использования [10].

Исследование влияния иммобилизации тирозиназы на кинетические параметры показало, что величина лаг-периода окисления фенола, катализируемого иммобилизованным энзимом, увеличилась до 1,83 мин (рис. 3).

Выявлено, что включение тирозиназы в матрицу существенно не влияет на K_m по пирокатехину. Однако K_m по фенолу заметно увеличивается (в 6,3 раза), что, вероятно, обусловлено уменьшением сродства энзима к субстрату в результате конформационных изменений глобулы протеина (табл. 2).

Показано, что V_{\max} окисления фенола, катализируемого иммобилизованным препаратом, снижается в 2,9 раза по сравнению со свободным, в то время как скорость окисления пирокатехина с использованием иммобилизованной тирозиназы уменьшается всего в 1,2 раза.

Полученные результаты подтверждают большую стабильность дифенолазной активности тирозиназы [2].

При изучении окисления пирокатехина, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой, наблюдали ингибирование

Таблица 2. Кинетические параметры окисления пирокатехина и фенола с использованием свободной и иммобилизованной тирозиназы

Энзим	Пирокатехин		Фенол	
	K_m , ммоль/дм ³	V_{\max} , мкмоль/мг протеина в 1 мин	K_m , ммоль/дм ³	V_{\max} , мкмоль/мг протеина в 1 мин
Свободная тирозиназа	0,160	39,2	0,154	1,69
Иммобилизованная тирозиназа	0,182	32,3	0,970	0,592

Таблица 3. Субстратное ингибирование свободной и иммобилизованной тирозиназы

Субстрат	Энзим	K_i , ммоль/дм ³	$S_{\text{опт.}}$, ммоль/дм ³	$V_{\text{опт.}}$, мкмоль/мг протеина в 1 мин
Пирокатехин	Свободная тирозиназа	23,44	1,88	35,90
	Иммобилизованная тирозиназа	108,60	3,33	27,25
Фенол	Свободная тирозиназа	2,0	0,55	1,33
	Иммобилизованная тирозиназа	–	–	–

субстратом: K_i иммобилизованной тирозиназы пирокатехином ($108,6 \text{ ммоль/дм}^3$) увеличилась в 4,6 раза по сравнению со свободным энзимом ($23,44 \text{ ммоль/дм}^3$) (табл. 3). K_i тирозиназы, катализирующей окисление фенола, составила $2,0 \text{ ммоль/дм}^3$; в присутствии иммобилизованного энзима в изученных концентрациях установлено отсутствие ингибирования фенолом. Полученные результаты свидетельствуют о стабилизирующем влиянии включения в альгинат кальция. Рассчитанные значения концентраций фенольных субстратов и скоростей

реакций, учитывающие субстратное ингибирование (табл. 3), позволяют оптимизировать процессы окисления фенола и пирокатехина, катализируемые тирозиназой.

Таким образом, согласно модифицированному методу осуществлено выделение частичного очищенного препарата тирозиназы, изучен его протеиново-фракционный состав, кинетические особенности окисления монофенольного и дифенольного субстратов, катализируемого свободной и иммобилизованной тирозиназой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kameda E., Langone M. A., Coelho M. A. Tyrosinase extract from *Agaricus bisporus* mushroom and its in natural tissue for specific phenol removal // Environm. Technol. — 2006. — V. 11, N 7. — P. 1209–1215.
2. Halouli S., Aster M., Sigoillot I.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological application // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 100. — P. 219–232.
3. Duran N., Rosa M. A., D'Annibale A. et al. Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review // Enz. Microb. Technol. — 2002. — V. 31. — P. 907–931.
4. Романовська І. І., Осійчук О. В., Шестеренко Ю. А., Севастьянов О. В. Ферментативні методи елімінації фенольних поллютантів // Мікроб. біотехнол. — 2008. — № 1(2). — С. 72–78.
5. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — V. 48, N 1. — P. 422–427.
6. Stark G. R., Dawson C. R. Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidases using oxalyldihydrazide // Anal. Chem. — 1958. — V. 30, N 2. — P. 191–194.
7. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Progr. — 2000. — V. 16, N 4. — P. 533–540.
8. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
9. Rodriguez-Lopez J. N., Escribano J., Garcia-Canovas F. A. Continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone // Anal. Biochem. — 1994. — V. 216, N 1. — P. 205–212.
10. Романовская И. И., Шестеренко Ю. А., Севастьянов О. В. и др. Способ элиминации фенола с использованием тирозиназы *Agaricus bisporus*, иммобилизованной в альгинат // Химия и технология воды. — 2010. — Т. 32, № 1. — С. 107–115.
11. Гукасян Г. С. Исследование кинетики окисления монофенолов тирозиназой. Влияние восстановителей // Биохимия. — 2002. — Т. 67, № 2. — С. 332–336.
12. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1990. — 348 с.
13. Schurink M., van Berkel W. J., Wichers H. J. et al. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity // Peptides. — 2007. — V. 28, N 3. — P. 485–495.
14. Flurkey W. H., Inlow K. Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi // J. Inorg. Biochem. — 2008. — V. 102, N 12. — P. 2160–2170.
15. Espin J. C., Wichers H. J. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecylsulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform // J. Agr. Food. Chem. — 1999. — V. 47, N 9. — P. 3518–3525.
16. Munoz-Munoz J. L., Garcia-Molina F., Garcia-Ruiz P. A. et al. Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism // Biochem. J. — 2008. — V. 416, N 3. — P. 431–440.
17. Rodriguez-Lopez J. N., Ros J. R., Varon R. et al. Oxygen Michaelis constants for tyrosinase // Ibid. — 1993. — V. 293. — P. 859–866.
18. Sharina A. H., Lee Y. H., Musa A. Effects of gold nanoparticles on the response of phenol biosensor containing photo curable membrane with tyrosinase // Sensors. — 2008. — V. 8, N. 10. — P. 6407–6416.
19. Gu B. X., Xu C. X., Zhu G. P. et al. Tyrosinase immobilization on ZnO nanorods for phenol detection // J. Phys. Chem. — 2009. — V. 113, N 1. — P. 377–381.
20. JiuHong Y., Huangxian J. Pure organic phase phenol biosensor based on tyrosinase entrapped in a vapor deposited titania sol-gel membrane // Electroanalysis. — 2004. — V. 16, N 16. — P. 1305–1310.

**КІНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ
ОКИСНЕННЯ ФЕНОЛУ І ПІРОКАТЕХІНУ
ВІЛЬНОЮ ТА ІММОБІЛІЗОВАНОЮ
ТИРОЗИНАЗОЮ**

Ю. А. Шестеренко

О. В. Севастьянов

І. І. Романовська

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

E-mail: romairina@gmail.com

Із грибів *Agaricus bisporus* виділено частково очищений препарат тирозинази. Із використанням електрофорезу за нативних умов знайдено 17 протеїнових фракцій, 12 з яких мають виражену фенолоксидазну активність і становлять 92,5% загального протеїну. Методом SDS-електрофорезу в ПААГ виявлено 9 протеїнових фракцій, основними з яких є фракції з молекулярною масою 12 і 41–48 кДа.

Вивчено кінетичні параметри окиснення фенолу і пірокатехіну, що каталізується вільною й іммобілізованою тирозиназою. Показано, що включення ензиму в матрицю істотно не впливає на K_m і V_{\max} окиснення пірокатехіну, однак під час біоконверсії фенолу K_m збільшується в 6,3 раза за помітного зниження V_{\max} . Встановлено інгібування субстратом у процесі вивчення окиснення пірокатехіну, що каталізується вільною й іммобілізованою тирозиназою, та фенолу в присутності вільного ензиму.

Ключові слова: тирозиназа, електрофорез, окиснення фенолів, кінетичні параметри, іммобілізація.

**PHENOL AND PYROCATECHIN
OXIDATION CATALYZED BY FREE
AND IMMOBILIZED TYROSINASE**

Yu. A. Shesterenko

O. V. Sevastyanov

I. I. Romanovskaya

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

E-mail: romairina@gmail.com

According to modified method, partially purified tyrosinase preparation from *Agaricus bisporus* mushroom was isolated. Using the native electrophoresis, 17 protein fractions were found, 12 of which demonstrated well-marked phenoloxidase activity, accounting for 92.5% of total protein. By the SDS-PAGE method, 9 protein fractions were revealed; the main of them were fractions with molecular masses of 12 and 41–48 kDa.

The kinetic parameters of phenol and catechol oxidation catalyzed by free and immobilized tyrosinase were studied. It was shown that absence of enzyme entrapment in matrix significantly influences on K_m and V_{\max} of catechol oxidation, but at phenol bioconversion the K_m increased 6.3-fold along with appreciable decreasing of V_{\max} . During the investigation of catechol oxidation, catalyzed by free and immobilized tyrosinase, as well as phenol by free enzyme, the substrate inhibition was revealed.

Key words: tyrosinase, electrophoresis, phenol oxidation, kinetic parameters, immobilization.

АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ Й ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ ЛАКТО- ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СТАФІЛОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ

В. В. Мокрозуб
Л. М. Лазаренко
Л. П. Бабенко
Л. М. Шинкаренко
М. Я. Співак

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

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

Отримано 08.09.2011

Визначено антибактеріальні й імуномодулювальні властивості штамів *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281*, *Lactobacillus casei* IMB B-7280*, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279*, *Bifidobacterium longum* VK1 та *Bifidobacterium bifidum* VK2 на моделі експериментальної стафілокової інфекції у мишей. Встановлено, що під впливом цих штамів суттєво зменшувалась кількість колоній *Staphylococcus aureus*, які висівали з нирок інфікованих мишей. Водночас після введення інфікованим стафілококом мишам окремих пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій спостерігали підвищення імунорегуляторного індексу CD_4/CD_8 , а також кількості CD_{19}^+ - та CD_{25}^+ -клітин у селезінці. Штами *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281, *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279, *Bifidobacterium bifidum* VK2 і *Bifidobacterium longum* VK1 є перспективними для створення пробіотиків, ефективних проти стафілокової інфекції, та для корекції імунітету.

Ключові слова: імунітет, інтерферон, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus*, миші.

Створення групи новітніх біотехнологічних препаратів — імунобіотиків — на основі попередньо відібраних і охарактеризованих представників нормальної мікрофлори людини, зокрема штамів лакто- та біфідобактерій, є важливою проблемою сучасної біотехнології, адже сфери застосування цих препаратів значно розширюються, і пробіотичну терапію дедалі частіше ставлять на противагу антимікробній [1, 2]. На сьогодні доведено високу терапевтичну ефективність пробіотиків при інфекційних, аутоімунних, алергічних захворюваннях, злоякісних новоутвореннях, імунодефіцитних станах тощо [3]. Слід зазначити, що пробіотичну терапію широко використовують під час лікування пацієнтів з «найпоширенішими» інфекційними захворюваннями, які часто спровоковані агресивними умовно-патогенними коменсальними мікроорганізмами, у тому числі стафілококами, а також супроводжуються розвитком імунодефіцитних станів [4].

Для того щоб пробіотик був ефективним, бактеріям, які входять до його складу, має бути притаманний певний спектр біологічної активності. Насамперед, вони мають бути адаптовані до умов мікробіоценозу, виявляти антагоністичну дію щодо широкого спектра патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, мати антитоксичні, антиоксидантні, антимутогенні властивості, а також здатність балансувати імунну відповідь організму за різних форм імунодефіциту тощо [3]. У зв'язку з цим для виявлення оптимальних пробіотичних штамів цільового призначення доцільним є проведення комплексних досліджень їхньої біологічної дії.

Раніше нами було виділено з біологічного матеріалу й охарактеризовано штами лакто- і біфідобактерій: *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMB B-7281, *Bifidobacterium longum* VK1 та *B. bifidum* VK2. Ці штами мали високу антагоністичну активність стосовно патогенних бактерій та

* — Штами знаходяться в депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

адгезивні властивості до епітеліоцитів, а на моделі інтактних мишей ефективно індукували продукцію ендогенного інтерферону (ІФН) й активували клітини фагоцитарної системи, не впливаючи на продукцію прозапального цитокіну — фактора некрозу пухлин- α [5–9].

У зв'язку з вищенаведеним метою роботи було визначення антибактеріальних та імунomodулювальних властивостей штамів *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 і *B. bifidum* VK2 на експериментальній моделі стафілококової інфекції у мишей дослідженням їхнього впливу на персистенцію стафілокока, а також на показники клітинного і гуморального імунітету за зміною фенотипового складу лімфоцитів селезінки.

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження проведено на мишах лінії BALB/c (18–20 г), самицях віком 6–8 тижнів, отриманих із розплідника Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Усі дослідження проводили з урахуванням норм Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей, від 20.09.1985, та Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [10].

Стафілококову інфекцію моделювали внутрішньочеревним уведенням мишам добової культури *S. aureus* штам 8325-4 (наданий проф. Зуєвою В. С., Інститут епідеміології і мікробіології ім. Н. Ф. Гамалеї, Російська Федерація) у дозі $1 \cdot 10^9$ кл. на тварину. Цей штам має плазмиду стійкості до гентаміцину, внаслідок чого його можна було відділити від інших штамів стафілококів, висіваючи на елективне середовище (BAIRD-PARKER-Agar, Мерск, Німеччина) із цим антибіотиком (у концентрації 15 мкг/мл). У інфікованих мишей спостерігали такі клінічні прояви інфекційного процесу: підвищення температури тіла, млявість, зниження апетиту.

Використовували ліофілізовані бактерії *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2. Перед кожним експериментом перевіряли життєздатність пробіотичних бактерій, контролюючи їх ріст на середовищі Man-Rogosa-Sharpe (MRS) при 37 °C упродовж 48 год. Через 24 год після інфікування мишам вводили *per os* суспензію пробіотичних

культур у фізіологічному розчині в дозі $1 \cdot 10^6$ кл. на тварину один раз на добу протягом 7 діб. Штами вводили кожен окремо або в комбінації — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (у рівному співвідношенні). В окрему групу порівняння увійшли інфіковані миші, які не отримували жодної пробіотичної культури, а натомість їм вводили *per os* фізіологічний розчин. Групу контролю становили інтактні миші. Усі експериментальні дослідження проводили у трьох повторях.

На 1-шу, 3-тю, 6-, 9- та 12-ту добу після початку введення пробіотичних культур від декапітованих мишей отримували нирки, аліквоти гомогенатів яких висівали на елективне середовище для стафілококів із гентаміцином з метою виявлення гентаміциностійкого *S. aureus* 8325-4.

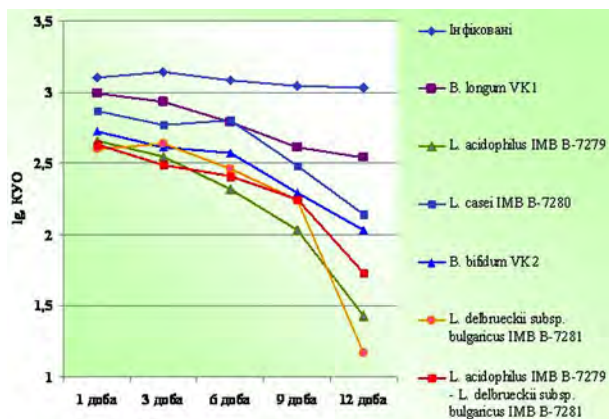
Зміну фенотипового складу лімфоцитів селезінки визначали, досліджуючи поверхневі антигени Т- та В-лімфоцитів, а також активованих CD₂₅⁺-клітин за допомогою методу прямої імуофлюоресценції. У роботі використовували моноклональні антитіла до CD₃⁺, CD₄⁺, CD₈⁺, CD₁₉⁺ та CD₂₅⁺-антигенів лімфоцитів (MACS, Miltenyi Biotec, Німеччина). Підрахунок кількості Т- та В-лімфоцитів, CD₂₅⁺-клітин, а також аналіз результатів проводили на цитофлюориметрі FACStar Plus (Becton-Dickinson, США).

Усі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою комп'ютерної програми Epi Info (версія 6.0) методом варіаційної статистики. Нульову гіпотезу для контрольної та дослідних груп порівняння перевіряли за допомогою непараметричних критеріїв Вілкоксона–Мана–Уїтні (U) і Колмогорова–Смирнова. Відмінності між групами вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 і *B. bifidum* VK2 (окремо) та в комбінації *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 виявляли антистафілококову дію *in vivo* на моделі експериментальної стафілококової інфекції у мишей. Однак антистафілококова ефективність цих штамів була різною. Як видно з даних, наведених на рисунку, з гомогенату нирок інфікованих мишей, які не отримували пробіотичних культур, *S. aureus* 8325-4 висівався у великій кількості протягом усього терміну

спостереження — з 1-ї по 12-ту добу. Після введення інфікованим мишам *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або *B. bifidum* VK2, окремо чи композиції *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 кількість колоній *S. aureus* 8325-4, який висівався з гомогенату нирок, зменшувалась починаючи з 1-ї доби і впродовж наступних 12 діб. Разом з тим під впливом *B. longum* VK1 або *L. casei* IMB B-7280, окремо, на 1-шу добу кількість колоній *S. aureus* 8325-4, що висівався з нирок, зменшувалась неістотно, тому різниця порівняно з показниками для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичні культури, була невірогідною. Із гомогенату нирок інфікованих мишей, яким вводили ці штами окремо, *S. aureus* 8325-4 висівався у значно меншій кількості лише на 3-тю, 6-, 9- та 12-ту добу. Слід зазначити, що на 1-шу, 3-тю, 6- та 9-ту добу антистафілококова дія була ефективнішою у *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або *B. bifidum* VK2, окремо та в композиції *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, ніж у *B. longum* VK1 або *L. casei* IMB B-7280.



Кількість колоній *S. aureus* 8325-4, що їх висівали з гомогенату нирок інфікованих мишей після перорального введення пробіотичних штамів

На 12-ту добу антистафілококова активність окремих пробіотичних культур та композиції може бути оцінена таким чином: *L. acidophilus* IMB B-7279 / *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 > *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 > *B. bifidum* VK2 / *L. casei* IMB B-7280 > *B. longum* VK1. Композиція *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 також продемонстру-

вала високу антистафілококову активність, проте вона вірогідно не відрізнялась від активності у *L. acidophilus* IMB B-7279 або *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, окремо.

Результати проведених нами раніше досліджень [11] стосовно антагоністичної властивості цих пробіотичних культур *in vitro* стосовно *S. aureus* 8325-4, були такі: *L. acidophilus* IMB B-7279 > *B. bifidum* VK2 > *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 > *B. longum* VK1 / *L. casei* IMB B-7280. Отже, *in vivo* деякі штами, зокрема *B. bifidum* VK2, справляли менш ефективну антистафілококову дію, ніж *in vitro*, порівняно з іншими штамами. Імовірно, це можна пояснити тим, що пробіотичні бактерії можуть виявляти різні механізми антистафілококової дії *in vitro* та *in vivo* [3].

Відомо, що антибактеріальна дія пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій *in vivo* опосередковано пов'язана з їхніми імуномодулювальними властивостями. Встановлено [12], що з розвитком ефективної імунної відповіді на стафілокок спостерігається активація як клітинної, так і гуморальної ланок імунітету, оскільки в патогенезі захворювань, спричинених стафілококами, певну роль відіграють як бактеріальні клітини, так і їхні екзотоксини. Тому далі проводили дослідження фенотипового складу селезінки інфікованих стафілококом мишей, які отримували штами лакто- та біфідобактерій.

Одержані нами дані показали, що за стафілококової інфекції кількість CD_3^+ , CD_8^+ , CD_{19}^+ -клітин у селезінці не змінювалась порівняно з показниками контролю протягом усього терміну спостереження (таблиця). Однак на 3-тю добу спостерігали зменшення кількості CD_4^+ -клітин, що призводило до зниження імунорегуляторного індексу CD_4/CD_8 . На 1-шу, 6- та 9-ту добу кількість CD_4^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей та імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 залишались у межах контрольних величин. Кількість CD_{25}^+ -клітин підвищувалась на 1-шу добу, але в інші терміни зменшувалась до рівня контролю.

Фенотиповий склад лімфоцитів селезінки змінювався під впливом пробіотичних культур. Так, спостерігалось незначне підвищення кількості CD_3^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей, які отримували *B. longum* VK1 на 9-ту добу, *L. acidophilus* IMB B-7279 або *L. casei* IMB B-7280 окремо — на 1-шу добу, *B. bifidum* VK2 — на 6-ту добу, або композицію *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 — на 6-ту добу, проте різниця стосовно показників для інфікованих мишей, які

не отримували пробіотичні штами, та в контролі була невірною. Встановлено, що порівняно з показниками для інфікованих мишей, які не одержували пробіотичні штами, кількість CD_4^+ -клітин на 3-тю добу підвищувалась лише під впливом композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279. Разом з тим кількість CD_4^+ -клітин була нижчою, ніж у контролі (інтактні миші), у селезінці інфікованих мишей, які отримували *B. longum* VK1 на 3-тю та 6-ту добу, або *B. bifidum* VK2 — на 3-тю, або *L. acidophilus* IMB B-7279 — на 9-ту добу, або *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — на 6-ту добу.

Кількість CD_8^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей зменшувалась під впливом *B. longum* VK1 на 1-шу добу, *L. acidophilus* IMB B-7279 або *L. casei* IMB B-7280, або *B. bifidum* VK2 — на 3-тю добу стосовно показників для інфікованих мишей, які не одержували пробіотичні штами, та в контролі. Протягом усього терміну кількість цих клітин зберігалась на рівні контролю в селезінці інфікованих мишей, які отримували *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або композицію *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279.

Фенотиповий склад лімфоцитів селезінки інфікованих мишей, які отримували пробіотичні бактерії

Групи мишей/ термін спостереження		Відносна кількість клітин, %					CD_4/CD_8 , ум. од.
		CD_3^+	CD_4^+	CD_8^+	CD_{19}^+	CD_{25}^+	
Інтактні	—	56,3±3,4	41,5±2,3	26,3±2,3	8,8±3,4	9,1±1,2	1,60±0,13
Інфіковані	1-ша доба	57,8±2,3	42,2±3,4	24,8±3,3	6,7±1,3	12,1±2,3*	1,70±0,11
	3-тя доба	56,2±0,9	36,0±1,4*	25,9±2,3	11,5±1,3	9,2±1,3	1,39±0,09*
	6-та доба	55,2±3,5	40,6±2,3	25,4±2,4	5,2±1,4	6,4±1,4	1,60±0,10
	9-та доба	57,4±2,5	43,0±2,3	23,0±1,4	9,5±1,4	9,0±2,3	1,87±0,14
Отримували: <i>B. longum</i> VK1	1-ша доба	52,3±4,5	40,9±2,4	18,6±1,4*	13,1±1,3 •	8,5±1,2	2,20±0,19*
	3-тя доба	54,1±5,4	33,5±1,4*	21,3±2,5	5,8±1,2 •	5,7±2,3	1,57±0,17
	6-та доба	51,8±1,4	32,7±1,5*	20,5±2,3	13,9±0,9 •	11,3±2,3	1,60±0,16
	9-та доба	64,6±2,6	42,2±2,4	24,6±2,3	7,5±1,4	9,7±2,3	1,72±0,15
<i>L. acidophilus</i> IMB B-7279	1-ша доба	63,1±3,5	40,4±3,4	25,6±3,3	11,3±2,4 •	7,0±1,4	1,58±0,16
	3-тя доба	53,4±4,4	37,2±2,3	18,1±2,4*	11,4±1,3	10,2±2,4	2,06±0,20 •
	6-та доба	52,4±5,4	37,5±1,4	26,0±3,4	10,6±2,4 •	9,2±3,4	1,44±0,19
	9-та доба	51,3±3,4	35,8±1,4*	22,5±2,3	11,3±2,3	10,0±2,3	1,59±0,11
<i>L. casei</i> IMB B-7280	1-ша доба	64,9±4,6	43,1±2,3	24,5±1,4	9,4±1,3	9,9±2,3	1,76±0,20
	3-тя доба	58,7±5,3	38,5±3,3	19,6±1,5*	7,6±1,4	7,7±3,4	1,96±0,16 •
	6-та доба	58,5±4,5	41,7±3,5	23,4±2,4	7,8±2,4	7,3±1,4	1,78±0,20
	9-та доба	62,7±5,5	42,4±2,5	26,1±2,3	11,2±1,3	6,7±1,3	1,62±0,16
<i>B. bifidum</i> VK2	1-ша доба	61,0±3,4	38,5±3,4	22,2±1,4	11,9±1,4 •	15,6±1,3*	1,73±0,16
	3-тя доба	52,0±4,4	35,6±2,3*	17,1±2,3*	6,5±2,2	14,5±1,3*	2,08±0,21 •
	6-та доба	64,3±1,6	39,5±2,4	26,1±2,3	13,2±2,4 •	14,4±2,4*	1,51±0,13
	9-та доба	55,9±3,5	36,5±3,4	25,5±2,3	11,9±1,3	9,1±2,4	1,43±0,14 •
<i>L. delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i> IMB B-7281	1-ша доба	58,9±4,5	36,8±3,5	23,0±1,4	10,3±1,3 •	16,2±2,3*	1,60±0,16
	3-тя доба	60,6±4,4	37,8±2,5	22,3±3,4	9,8±2,4	5,4±3,3	1,70±0,14
	6-та доба	52,5±3,4	34,5±1,4*	21,7±2,3	11,4±2,4 •	12,9±1,3*	1,59±0,14
	9-та доба	58,3±4,6	43,3±1,4	22,4±2,3	14,6±3,4 •	10,1±2,4	1,93±0,16
<i>L. delbrueckii subsp.</i> <i>bulgaricus</i> IMB B-7281 — <i>L. acidophilus</i> IMB B-7279	1-ша доба	59,3±3,5	41,6±1,5	22,8±1,4	10,2±2,3 •	10,0±2,3	1,82±0,15
	3-тя доба	62,2±4,4	40,9±1,2 •	20,0±2,4	7,8±3,4	6,0±1,3	2,07±0,13 •
	6-та доба	57,0±2,5	37,6±3,4	22,4±3,4	12,9±1,3 •	15,7±2,3*	1,59±0,12
	9-та доба	59,5±3,6	40,6±2,3	27,4±1,3	13,0±2,3	14,9±3,4*	1,48±0,15

Примітка: * — $P < 0,05$ стосовно показників для інтактних мишей; • — $P < 0,05$ стосовно показників для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичні культури.

Імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 на 3-тю добу підвищувався після введення інфікованим мишам *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280, *B. bifidum* VK2 окремо (через зменшення кількості CD_8^+ -клітин) або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (через підвищення кількості CD_4^+ -клітин) порівняно з показниками для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичних культур. Під впливом *B. longum* VK1 імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 підвищувався на 1-шу добу (унаслідок зменшення кількості CD_8^+ -клітин) стосовно як показників для інфікованих мишей, які не отримували пробіотичних культур, так і контролю.

Кількість CD_{19}^+ -В-лімфоцитів у селезінці інфікованих мишей, які отримували пробіотичні культури, не змінювалась порівняно з показниками контролю. Однак на 1-шу та 6-ту добу кількість цих клітин підвищувалась після введення інфікованим мишам *B. longum* VK1, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, кожний окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 порівняно з інфікованими мишами, які не отримували пробіотичні культури.

Звертає на себе увагу те, що під впливом *B. bifidum* VK2 (на 1-шу, 3-тю та 6-ту добу), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 (на 1-шу і 6-ту добу), а також композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (на 6- та 9-ту добу) у селезінці інфікованих мишей суттєво зростала кількість CD_{25}^+ -клітин. Це може свідчити про активацію Т-, В-лімфоцитів чи макрофагів або підвищення експресії на поверхні клітини рецепторів інтерлейкіну-2 — цитокіну Th1-клітин, який спрямовує розвиток імунної відповіді за клітинним типом. Під впливом інших пробіотичних культур кількість CD_{25}^+ -клітин у селезінці інфікованих мишей зберігалася на рівні контролю. Отже, зростання імунорегуляторного індексу CD_4/CD_8 , а також кількості у селезінці CD_{19}^+ - і CD_{25}^+ -клітин після введення інфікованим стафілококом мишам окремих пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій, які досліджували, у різні терміни спостереження опосередковано може свідчити про активацію як клітинної, так і гуморальної ланок імунітету.

Таким чином, встановлено, що штамми *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2, та-

кож композиція *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 на моделі експериментальної стафілококової інфекції у мишей виявляли антибактеріальну й імунотулювальну дію. Усі штами продемонстрували антистафілококову ефективність *in vivo*, однак найефективнішою вона була у *L. acidophilus* IMB B-7279 та *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, кожен штам окремо. Слід зазначити, що *L. acidophilus* IMB B-7279 мав високу антагоністичну активність щодо *S. aureus* 8325-4 *in vitro* [11], а штам *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — виявився активатором фагоцитів [7], активність яких внаслідок перебігу стафілококової інфекції порушувалась [13]. Однак введення мишам композиції *L. acidophilus* IMB B-7279 — *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 не призвело до очікуваного поліпшення антистафілококової дії цієї композиції порівняно з монокультурами. Показано, що багато різних штамів лакто- та біфідобактерій пригнічували ріст *S. aureus*, зокрема, *L. acidophilus* EP317/402 [14], *L. acidophilus* CL1285(®) і *L. casei* LBC80R [15]; *L. plantarum* 8P-A3, *L. casei* DN-114001, *L. reuteri* [16], *B. longum* Z4, *B. bifidum* Г1 [17] та деякі інші штами *Bifidobacterium* [18]. Здійснюється пошук інших штамів молочнокислих бактерій, які б мали високу ефективність проти стафілококів і виявляли здатність до балансування імунної відповіді, порушеної внаслідок перебігу патологічного процесу. Водночас завжди має бути пробіотичний препарат вибору, оскільки в різних хворих один і той самий штам або штами у складі композицій можуть по-різному адаптуватись до умов мікробіоценозу, що буде визначати їхню ефективність.

Одержані дані свідчать, що після введення інфікованим стафілококом мишам пробіотичних штамів лакто- та біфідобактерій, які ми досліджували, спостерігалася зміна деяких показників, що характеризують стан клітинного й гуморального імунітету. Зауважимо, що ці штами на моделі експериментальної стафілококової інфекції у мишей справляли різну імунотулювальну дію. Так, на 3-тю добу підвищувався до рівня контролю імунорегуляторний індекс CD_4/CD_8 під впливом *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280, *B. bifidum* VK2 окремо або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 порівняно з інфікованими мишами, які не отримували пробіотичні культури. Втім, зростання цього показника відбувалося за

рахунок підвищення у селезінці кількості CD₄⁺-клітин лише після введення інфікованим стафілококом мишам композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279. Водночас кількість CD₄⁺-клітин у різні терміни спостереження виявилась нижчою, ніж у контролі (інтактні миші), у селезінці інфікованих мишей, які отримували *B. longum* VK1, *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 або *L. acidophilus* IMB B-7279, окремо. Під впливом *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. casei* IMB B-7280, *B. bifidum* VK2, *B. longum* VK1, окремо, імунорегуляторний індекс CD₄/CD₈ підвищувався за рахунок зменшення кількості CD₈⁺-клітин у селезінці інфікованих мишей. Про активацію гуморальної ланки імунітету опосередковано свідчило підвищення у селезінці кількості CD₁₉⁺-В-лімфоцитів у різні терміни спостереження після введення інфікованим мишам *B. longum* VK1, *L. acidophilus* IMB B-7279, *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279. Під впливом *B. bifidum* VK2 (на 1-шу, 3-тю та 6-ту добу), *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 (на 1-шу та 6-ту добу), а також композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 (на 6- та 9-ту добу) у селезінці інфікованих стафілококом мишей підвищувалась кількість клітин, які експресували антиген CD₂₅⁺. Інші штами пробіотичних бактерій, які ми вивчали, не впливали на кількість CD₂₅⁺-клітин у селезінці інфікованих мишей. Аналізуючи отримані дані, можна зробити припущення, що на моделі експериментальної стафілококової інфекції ефективніший імунomodulatory вплив на показники клітинного та гуморального імунітету мала композиція *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279, оскільки під її впливом підвищувалась на 3-тю добу кількість CD₄⁺-Т-лімфоцитів, що призвело як до зростання величини імунорегуляторного індексу CD₄/CD₈, так і CD₁₉⁺- та CD₂₅⁺-клітин (у різні терміни спостереження).

Підвищення кількості Т- та В-лімфоцитів, а також їхньої проліферативної активності та продукування ними низки імунорегуляторних цитокінів, зокрема Th1- та Th2-типу, спостерігалось під впливом багатьох інших штамів лакто- та біфідобактерій при різних патологічних процесах [19–23]. Характер впливу на активність Т- та В-лімфоцитів і спектр цитокінів відрізнялись у різних

штамів молочнокислих бактерій, а результати окремих досліджень показали, що дія залежала від дози. Результати проведених нами досліджень і дані літературних джерел свідчать, що імунomodulatory властивості окремих культур лакто- та біфідобактерій суттєво відрізняються між собою, це є їх індивідуальною характеристикою. Тому, створюючи препарати на основі лакто- та біфідобактерій з підвищеним рівнем імунomodulatory активності — імунобіотики — доцільно забезпечити виконання всіх умов максимальної реалізації закладеного в цих бактеріях біологічного потенціалу.

Отримані нами дані підтверджують вимоги Європейського регуляторного законодавства в галузі пробіотиків щодо необхідності проведення всебічних досліджень біологічної активності як окремих пробіотичних культур, так і їх поєднань при створенні пробіотичних препаратів на основі монокультур лакто- та/або біфідобактерій чи їх різних комбінацій.

Отже, пробіотичні штами *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2 мали антагоністичні властивості стосовно стафілокока *in vivo*, про що свідчило прискорення елімінації *Staphylococcus aureus* 8325-4 з нирок інфікованих мишей.

Імунomodulatory властивості пробіотичних штамів *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2, окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279 на моделі експериментальної стафілококової інфекції у мишей підтверджувало підвищення в різні терміни спостереження величини імунорегуляторного індексу CD₄/CD₈, кількості в селезінці CD₄⁺-клітин (під впливом композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279), CD₁₉⁺-В-лімфоцитів, а також CD₂₅⁺-клітин (під впливом *B. bifidum* VK2, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, окремо, або композиції *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281 — *L. acidophilus* IMB B-7279).

Пробіотичні штами *L. casei* IMB B-7280, *L. acidophilus* IMB B-7279, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *B. longum* VK1 та *B. bifidum* VK2 є перспективними для створення імунобіотиків, ефективних щодо *Staphylococcus aureus*, а також для корекції показників імунореактивності організму, порушених унаслідок перебігу інфекційно-запальних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Кругликов В. Д., Цураева Р. И., Рыжков И. В. и др.* Возможность приживления *Lactobacillus acidophilus* в кишечнике белых мышей на фоне бактериальной терапии // Журн. микробиол. — 1997. — № 1. — С. 67–69.
2. *Банникова Л. А., Королева Н. С., Семенихина В. Ф.* Микробиологические основы молочного производства. — М.: Агропромиздат, 1987. — 400 с: ил.
3. *Широбоков В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С.* Микробная экология человека. — К.: ООО «Червона Рута-Турс», 2010. — 340 с.
4. *Шендеров Б. А.* Значение колонизационной резистентности в патогенезе инфекционных заболеваний / Иммунология инфекционного процесса. Под ред. В.И. Покровского и др. — М.: Медицина, 1994. — 246 с.
5. *Spivak M. Ya., Pidgorsky V. S., Lazarenko L. M. et al.* *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* influence on the indices of immune influence on the indices of immune response of the organism showed on experimental model // Microbiology @ Biotechnology. — 2009. — N 1(5). — P. 39–46.
6. *Старовойтова С. А., Лазаренко Л. Н., Авдеева Л. В. и др.* Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, перспективных для создания пробиотиков // Наук. вісник Ужгород. ун-ту (Сер. Біол.). — 2009. — Т. 26. — С. 216–219.
7. Пат. № 93133. Штам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* ІМВ В-7281 — активатор фагоцитов / Співак М. Я., Шинкаренко Л. М., Підгорський В. С. та ін. — Заявл. 11.07.2010; Опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1.
8. Пат. № 93132. Штам *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7279 — індуктор ендогенного інтерферону І типу / Співак М. Я., Підгорський В. С., Шинкаренко Л. М. та ін. — Заявл. 11.07.2010; Опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1.
9. Пат. № 93133. Штам *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280 — індуктор «пізнього» інтерферону та активатор макрофагів / Співак М. Я., Шинкаренко Л. М., Підгорський В. С. та ін. — Заявл. 11.07.2010; Опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1.
10. *Резніков О. Г.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. — 2001. — № 1. — С. 5–7.
11. *Старовойтова С. А., Лазаренко Л. Н., Авдеева Л. В. и др.* Поиск штаммов бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, перспективных для создания пробиотиков // Наук. вісник Ужгород. ун-ту (Сер. Біол.). — 2009. — Т. 26. — С. 216–219.
12. *Белобородов В. Б., Митрохин С. Д.* Стафилококковые инфекции / Инф. антибакт. тер. — 2003. — Т. 5, № 1. — С. 28–35.
13. *Спивак Н. Я., Лазаренко Л. Н., Михайленко О. Н.* Интерферон и система мононуклеарных фагоцитов. — К.: Фитосоцицентр. — 2002. — 164 с.
14. *Старовойтова С. А.* Розробка композиції поліштамового пробиотиків на основі бактерій роду *Lactobacillus*: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2008. — 21 с.
15. *Karska-Wysocki B, Bazo M, Smoragiewicz W.* Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Microbiol Res. — 2010. — V. 165 (8). — P. 674–686.
16. *Ермоленко Е. И., Исаков В. А., Ждан-Пушкина С. X.* Количественная характеристика антагонистической активности лактобацилл // Микробиол. журн. — 2004. — № 5. — С. 94–98.
17. *Коршунов В. М., Уртаева З. А., Смянов В. В. и др.* Изучение антагонистической активности бифидобактерий *in vitro* и *in vivo* с использованием гнотобиологической технологии // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 1999. — № 5. — С. 72–77.
18. *Lahtinen S. J., Jalonen L., Ouwehand A. C., Salminen S. J.* Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus* // Int. J. Food Microbiol. — 2007. — V. 117(1). — P. 125–128.
19. *D'Arienzo R., Maurano F., Luongo D. et al.* Adjuvant effect of *Lactobacillus casei* in a mouse model of gluten sensitivity // Immunol. Lett. — 2008. — V. 119(1–2). — P. 78–83.
20. *Ko E. J., Goh J. S., Lee B. J. et al.* *Bifidobacterium bifidum* exhibits a lipopolysaccharide-like mitogenic activity for murine B lymphocyte. // J. Dairy Sci. — 1999. — V. 82(9). — P. 1869–1876.
21. *Mane J., Pedrosa E., Loren V. et al.* A mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 enhances systemic immunity in elderly subjects: A dose-response, double-blind, placebo-controlled, randomized pilot trial // Nutr. Hosp. — 2011. — V. 26(1). — P. 228–235.
22. *Walsh M. C., Gardiner G. E., Hart O. M. et al.* Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. // FEMS Microbiol. Ecol. — 2008. — V. 64(2). — P. 317–327.
23. *Yasui H., Ohwaki M.* Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*. // J. Dairy Sci. — 1991. — V. 74(4). — P. 1187–1195.

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ
И ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА
ШТАММОВ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ**

*В. В. Мокрозуб
Л. Н. Лазаренко
Л. П. Бабенко
Л. Н. Шинкаренко
Н. Я. Спивак*

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

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

Определены антибактериальные и иммуномодулирующие свойства штаммов *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279, *Bifidobacterium longum* VK1 и *Bifidobacterium bifidum* VK2 на модели экспериментальной стафилококковой инфекции у мышей. Установлено, что под влиянием этих штаммов существенно уменьшалось количество колоний *Staphylococcus aureus*, которые высевались из почек инфицированных мышей. Вместе с тем после введения инфицированным стафилококком мышам отдельных пробиотических штаммов лакто- и бифидобактерий наблюдалось повышение иммунорегуляторного индекса CD₄/CD₈, а также количества CD₁₉⁺- и CD₂₅⁺-клеток в селезенке. Штаммы *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMB B-7281, *Lactobacillus casei* IMB B-7280, *Lactobacillus acidophilus* IMB B-7279, *Bifidobacterium bifidum* VK2 и *Bifidobacterium longum* VK1 являются перспективными для создания пробиотиков, эффективных против стафилококковой инфекции, и для коррекции иммунитета.

Ключевые слова: иммунитет, интерферон, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus*, мыши.

**ANTIBACTERIAL
AND IMMUNOMODULATING PROPERTIES
OF LACTO- AND BIFIDOBACTERIA
STRAINS AT EXPERIMENTAL
STAPHYLOCOCCAL INFECTION**

*V. V. Mokrozub
L. M. Lazarenko
L. P. Babenko
L. M. Shinkarenko
M. Ya. Spivak*

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

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

Antibacterial and immunomodulating properties of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMV B-7281, *Lactobacillus casei* IMV B-7280, *Lactobacillus acidophilus* B-7279 IMV, *Bifidobacterium longum* VK1 and *Bifidobacterium bifidum* VK2 strains were determined at the experimental model of staphylococcal infection of mice. It was established that under the influence of these strains it was significantly reduced the number of *Staphylococcus aureus* colonies, which were seeded out from kidneys of infected mice. At the same time after introduction by mice with staphylococcal infection of separate probiotic strains of lacto- and bifidobacteria it was observed increasing of the CD₄/CD₈ immunoregulatory index, and also the number of CD₁₉⁺- and CD₂₅⁺-cells in spleen. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* IMV B-7281, *Lactobacillus casei* IMV B-7280, *Lactobacillus acidophilus* B-7279 IMV, *Bifidobacterium bifidum* VK2 and *Bifidobacterium longum* VK1 strains found to be perspective for probiotics creation, that could be effective against staphylococcal infection and for the immunity correction.

Key words: immunity, interferon, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Staphylococcus aureus*, mice.

СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ, ЗАМОРОЖЕННЫХ В КОМБИНИРОВАННОЙ СРЕДЕ С ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ И ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ

В. В. Рамазанов
Т. И. Дейнеко
Е. Л. Воловельская
В. А. Коптелов
В. А. Бондаренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Получено 27.05.2011

Исследовали осмотические, антиоксидантные и морфологические характеристики эритроцитов, замороженных в жидком азоте ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) в среде, содержащей полиэтиленгликоль-1500, или в комбинированной среде с полиэтиленгликолем-1500 и диметилсульфоксидом. При замораживании в среде, содержащей полиэтиленгликоль-1500, отмечается значительная степень повреждения эритроцитов (55–60%), потеря клетками глутатиона при отмывании криоконсерванта и повышение проницаемости оставшейся части клеток для ионов H^+ . В то же время не выявлено существенного увеличения концентрации малонового диальдегида и значительного изменения показателей активности глутатионзависимых энзимов (глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы) при замораживании в двух указанных средах. При дополнительном включении в среду диметилсульфоксида степень повреждения эритроцитов во время замораживания снижается (7–9%) с сохранением осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта. Полученные результаты позволяют предположить, что сохранение осмотических и морфологических свойств эритроцитов, замороженных в комбинированной среде с полиэтиленгликолем-1500 и диметилсульфоксидом, обеспечивается проникновением последнего в клетки и ослаблением гипертонического стресса, обусловленного концентрированием NaCl и ПЭГ-1500 при замораживании.

Ключевые слова: эритроциты, осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства, замораживание, комбинированный криоконсервант.

Окисление гемоглобина в метгемоглобин происходит с образованием супероксидного радикала при последующей его нейтрализации супероксиддисмутазой с образованием пероксида водорода, утилизация которого осуществляется каталазой и глутатионпероксидазой [1]. Недостаток глутатиона в эритроцитах приводит к снижению активности глутатионпероксидазы, повышению концентрации пероксида водорода, образованию гидропероксидов жирных кислот и повреждению мембран [1, 2]. Некоторые исследователи предполагают, что рост осмотической хрупкости эритроцитов после замораживания и хранения при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ определяется индукцией пероксидного окисления липидов (ПОЛ) мембран вследствие окисления гемоглобина в метгемоглобин [3]. При этом с увеличением срока хранения образцов от 1 до 6 мес отмечается корреляция

между ростом концентрации малонового диальдегида (МДА) и повышением осмотической хрупкости эритроцитов [3].

Эритроциты, замороженные в среде без криопротектора, в значительной степени повреждены, а оставшаяся часть клеток (1–2%) морфологически представлена сфероцитами и сфероэхиноцитами с миелоноподобными структурами, от которых отделяются везикулы. Включение в среду замораживания декстрана обеспечивает предотвращение везикуляции и заметного гемолиза эритроцитов, при этом оставшиеся клетки морфологически представлены в основном дискоцитами с невысоким содержанием эхиноцитов [4]. Однако такие морфологические показатели характерны для клеток, которые не отмывались от декстрана после замораживания. Эритроциты, замороженные в среде с декстраном (30%) или гли-

церолом (35%) и отмытые от криоконсерванта изотоническим раствором NaCl (0,9%), являются осмотически хрупкими по сравнению с интактными клетками [4]. Использование глицерола в высокой концентрации требует специальных подходов для его отмывания с использованием ряда гипертонических растворов с целью сохранения осмотических свойств эритроцитов [5].

Криоконсервирование эритроцитов с полимерными непроницающими криопротекторами может исключать процедуру их отмывания, однако после трансфузии клеток с такими криопротекторами выявляются лейкоцитоз, повышение концентрации гемоглобина и билирубина в плазме, а также отмечается задержка выведения криопротекторов из организма [6]. Для устранения таких проблем необходимо снизить концентрацию полимерных криопротекторов или отмывать их перед трансфузией [7]. Однако эритроциты, замороженные с полимерными криопротекторами, осмотически неустойчивы [4, 6].

В связи с вышеизложенным возникает задача разработки криоконсервантов, которые будут не только обеспечивать сохранение осмотических свойств эритроцитов при замораживании, но и упрощать их отмывание от криоконсерванта после размораживания.

Известно, что если среда, в которой находятся эритроциты, содержит не более 6% глицерола, то последующее перенесение клеток в изотонический раствор NaCl не вызывает нарушения осмотической устойчивости клеток [8]. Эти данные указывают на то, что криоконсервант должен содержать невысокую концентрацию проникающего криопротектора, для того чтобы при отмывании эритроцитов изотоническим раствором NaCl получить осмотически нормальные клетки. Для диметилсульфоксида (ДМСО) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД) такая концентрация может быть выше, поскольку их проницаемость для мембран эритроцитов на порядок выше, чем у глицерола [9]. Использование комбинированного криоконсерванта, содержащего поливинилпирролидон (15%) и ДМСО (25%), позволяет упростить способ отмывания эритроцитов после замораживания и отмывать их только двумя циклами вместо четырех, используемых после замораживания-оттаивания эритроцитов в среде с глицеролом [10].

Установлено, что сочетание в криоконсерванте декстрана или ПЭГ-1500 с ДМСО (15%) приводит к устранению так называемого эффекта «упаковки» [11] — проявление

более высокой степени повреждения эритроцитов при замораживании-оттаивании с высоким гематокритом по сравнению с низким [12]. При быстром замораживании-оттаивании эффект «упаковки» определяется в основном приростом постгипертонического стресса на клетки при размораживании [13]. В связи с этим устранение эффекта «упаковки» служит показателем ослабления действия постгипертонического стресса и, следовательно, размороженные эритроциты могут быть более осмотически устойчивыми при процедуре отмывания криоконсерванта, что даст возможность упростить способ их отмывания, исключив гипертонические растворения эритроцитов существенно зависит от температуры среды для ресуспендирования: при 35–37 °С клетки проявляют наибольшую устойчивость к данному повреждающему фактору [14].

Таким образом, для отмывания эритроцитов после размораживания одним изотоническим раствором NaCl без использования гипертонических растворов криоконсервант должен содержать невысокие концентрации проникающих криопротекторов. При этом отмывание необходимо производить при 35–37 °С, а защитная среда должна устранять один из основных факторов повреждения эритроцитов при замораживании с высоким гематокритом — эффект «упаковки», с тем чтобы ослабить повреждающее действие постгипертонического стресса при размораживании.

Цель работы — определить осмотические, антиоксидантные и морфологические свойства эритроцитов, отмытых изотоническим раствором NaCl после замораживания в комбинированной среде с ПЭГ-1500 и ДМСО.

Материалы и методы

В работе использовали NaCl (х. ч.), полиэтиленгликоль с молекулярной массой 1500 (ПЭГ-1500) производства Merck (Германия), диметилсульфоксид (ДМСО) производства Sigma (США). Среды замораживания готовили на изотоническом растворе NaCl (0,9%). Криоконсерванты содержали ПЭГ-1500 (20%) или ПЭГ-1500 (20%) в комбинации с ДМСО (15%).

Эритроциты человека получали из крови 2-й группы от доноров мужского пола после четырехкратного отмывания их изотоническим раствором NaCl. Металлические контейнеры объемом 10 мл с образцами эритроцитов в средах замораживания с гематокритом

40% инкубировали 30 мин при 25 °С, затем погружали в жидкий азот (–196 °С) на 30 мин либо на 35 месяцев. Замороженные образцы эритроцитов размораживали на водяной бане при 40 °С в течение 3 мин. Затем к 1 мл размороженной клеточной суспензии при перемешивании медленно добавляли 9 мл теплого (37 °С) изотонического раствора NaCl в течение не менее 30 с (скорость добавления — не более 0,3 мл/с). Суспензию центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 5 мин и удаляли надосадочную жидкость. Процедуру разведения и центрифугирования повторяли еще один раз. После этого эритроциты трижды отмывали теплым (37 °С) изотоническим раствором NaCl, не учитывая при этом скорость разведения осадка эритроцитов.

Осмотический гемолиз эритроцитов исследовали в среде, содержащей 10 ммоль/л трис-буфера (рН 7,4) и NaCl с различной концентрацией (0,09–0,9%). Клетки в среде объемом 1 мл с гематокритом 0,6% инкубировали в течение 15 мин при 25 °С, далее центрифугировали при 3 000 об/мин 3 мин с последующим измерением степени гемолиза в надосадочной жидкости.

Степень гемолиза эритроцитов вычисляли после спектрофотометрического определения количества гемоглобина, измеряя поглощение в супернатанте образцов при длине волны 543 нм [15]:

$$\text{степень гемолиза (\%)} = [A_1/A_2] \times 100\%,$$

где A_1 — поглощение супернатанта экспериментального образца;

A_2 — поглощение при полном гемолизе контрольного образца.

Проницаемость эритроцитов для ионов H^+ исследовали в изотонической сульфатной среде в термостатируемой (37 °С) ячейке с рН-электродом [16].

Содержание глутатиона в эритроцитах определяли спектрофотометрически с использованием дитиобиснитробензойной кислоты при длине волны 412 нм [17].

Определение МДА производили спектрофотометрически при длине волны 535 нм, используя тиобарбитуровую кислоту согласно методу [18].

Активность глутатионпероксидазы оценивали по методу [19] с использованием дитиобиснитробензойной кислоты, активность глутатионредуктазы — с применением метода [20].

Морфологию эритроцитов до и после замораживания изучали с помощью светового микроскопа. В суспензию эритроцитов с гематокритом 1,7% вносили альбумин в концентрации 1%, взвесь перемешивали и через 2 мин тестировали изменение морфологии. Альбумин является стабилизатором дискоидных форм эритроцитов (нормоцитов) в крови [21], поэтому по степени их трансформации в дискоциты можно судить об обратимости структурных нарушений в мембранах замороженных клеток.

Статистические расчеты производили на основе результатов, полученных на эритроцитах от пяти доноров. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка. Для определения статистической достоверности результатов использовали непараметрический метод Манна–Уитни при $P < 0,05$ [22].

Результаты и обсуждение

Замораживание эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 приводит к значительному повреждению клеток — 55 и 60% до и после хранения, соответственно, а также к повышению проницаемости оставшейся части эритроцитов для ионов H^+ по сравнению с интактными клетками (табл. 1).

Включение в среду замораживания ДМСО способствует существенному снижению степени повреждения эритроцитов, при этом показатели проницаемости мембран для ионов H^+ достоверно не превышают аналогичные величины для интактных клеток (табл. 1).

Таблица 1. Степень повреждения и проницаемость мембран для ионов H^+ в эритроцитах, отмывтых после замораживания в жидком азоте в среде с ПЭГ-1500 (20%) в комбинации с ДМСО (15%)

Состав среды замораживания	Гемолиз эритроцитов после отмывания криоконсерванта (%)		Проницаемость оставшейся части эритроцитов для ионов H^+ ($P \cdot 10^8$ м/с)	
	Без хранения	35 месяцев хранения	Без хранения	35 месяцев хранения
ПЭГ-1500	55,0 \pm 3,8	60,0 \pm 3,2	2,33 \pm 0,31*	2,35 \pm 0,29*
ПЭГ-1500 + ДМСО	7,0 \pm 1,8	9,0 \pm 1,6	1,82 \pm 0,29	1,87 \pm 0,33
Проницаемость интактных эритроцитов для ионов H^+			1,49 \pm 0,18	

* — $P < 0,05$ по сравнению с интактными эритроцитами.

Результаты исследования осмотического гемолиза замороженных эритроцитов представлены на рис. 1. В солевой среде с концентрацией NaCl 0,45–0,9% отмечается снижение осмотической устойчивости эритроцитов, замороженных в среде с ПЭГ-1500 (по сравнению с интактными клетками), в то время как при концентрации соли 0,09–0,4% происходит повышение осмотической устойчивости (рис. 1, кривая 3). При сочетании в среде замораживания ПЭГ-1500 и ДМСО кривая осмотического гемолиза замороженных эритроцитов несущественно отличается от таковой для интактных клеток, что указывает на сохранение осмотической хрупкости замороженных эритроцитов (рис. 1, кривая 2).

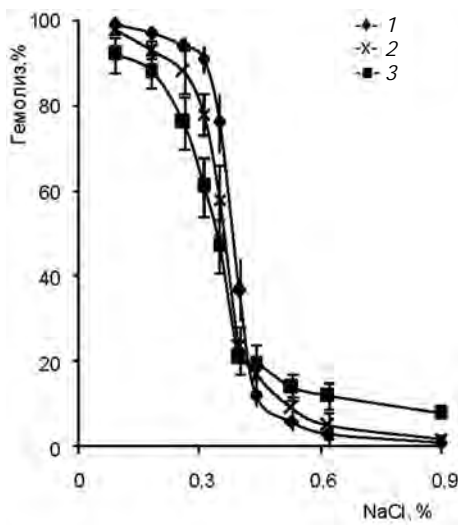


Рис. 1. Зависимость гемолиза от концентрации NaCl для эритроцитов, отмывтых после замораживания и хранения в жидком азоте в различных средах:

1 — интактные клетки; 2 — среда, содержащая 20% ПЭГ-1500 и 15% ДМСО; 3 — среда, содержащая 20% ПЭГ-1500

Предполагается, что рост осмотической устойчивости эритроцитов в интервале показателей концентрации NaCl 0,09–0,4%, которые были заморожены в среде с ПЭГ-1500, связан с нарастанием градиента концентрации этого полимера на мембранах клеток во время охлаждения. При этом включение в среду замораживания ДМСО и поступление его в клетки способствует ослаблению осмотического стресса при замораживании, который индуцируется концентрированием непроницающего полимерного криопротектора [23].

Полученные результаты исследования проницаемости эритроцитов для ионов H^+ (табл. 1) и осмотического гемолиза (рис. 1) указывают на то, что комбинация в среде замораживания ПЭГ-1500 и ДМСО обеспечивает сохранение удельно-осмотических свойств замороженных клеток.

Показатели содержания МДА и глутатиона в замороженных и хранившихся в жидком азоте эритроцитах свидетельствуют о том, что в клетках, не отмывтых от криоконсерванта, определяется несколько большая концентрация МДА, чем в отмывтых эритроцитах (табл. 2), однако эти изменения не достоверны. В то же время не отмечается значительного роста МДА после хранения эритроцитов, замороженных в среде с ПЭГ-1500 или в среде с ПЭГ-1500 и ДМСО.

В эритроцитах после замораживания и хранения в среде, содержащей ПЭГ-1500, после отмывания криоконсерванта существенно уменьшается концентрация глутатиона. Включение в среду замораживания дополнительно ДМСО не приводит к значительному уменьшению глутатиона в эритроцитах после отмывания криоконсерванта (табл. 2). Это указывает на меньшую потерю барьерной функции мембран для глутатиона при замораживании эритроцитов в комбинированном криоконсерванте с ПЭГ-1500 и ДМСО.

Таблица 2. Содержание МДА и восстановленного глутатиона в эритроцитах после замораживания и хранения в жидком азоте в средах с ПЭГ-1500 (20%) и ДМСО (15%)

Условия эксперимента		МДА (мкмоль/г Hb)		Глутатион (мкмоль/г Hb)	
Среды замораживания	Образцы эритроцитов	Без хранения	35 месяцев хранения	Без хранения	35 месяцев хранения
ПЭГ-1500	С криоконсервантом	1,15±0,18	1,35±0,21	9,5±1,7	8,3±1,3
	После отмывания криоконсерванта	1,02±0,16	1,21±0,19	5,1±0,81*	4,0±0,7*
ПЭГ-1500 + ДМСО	С криоконсервантом	1,17±0,19	1,32±0,23	10,0±1,8	9,9±1,6
	После отмывания криоконсерванта	1,04±0,15	1,08±0,17	9,1±1,2	8,1±1,4
Для интактных эритроцитов		0,98±0,13		10,5±1,6	

Активность глутатионзависимых энзимов после замораживания и хранения эритроцитов в жидком азоте существенно не изменялась (табл. 3).

На рис. 2 приведены микрофотографии эритроцитов, отмытых изотоническим раствором NaCl. Интактные клетки представлены (1) стоматоцитами (70–87%) и эхиноцитами (13–30%), а в присутствии альбумина (2) эритроциты преобразуются в дискоциты (нормоциты). Эритроциты, отмытые после замораживания и хранения с ПЭГ-1500, являются сфероцитами (3), присутствие альбумина в среде приводит к изменению формы клеток и они становятся эхиноцитами (4).

После замораживания и хранения в комбинированном криоконсерванте, содержащем ПЭГ-1500 и ДМСО, эритроциты представлены эхиноцитами и сфероэхиноцитами (5), однако присутствие в среде альбумина вызывает изменение формы клеток (6), и они становятся в основном дискоцитами (65–68%) с меньшим количеством содержания стоматоцитов (17–22%) и эхиноцитов (15%). Это свидетельствует о том, что эритроциты, замороженные в комбинированном криоконсерванте, смогут восстанавливать свою функциональную полноценность после попадания в кровяное русло.

Таким образом, замораживание и хранение эритроцитов в жидком азоте в среде, содержащей ПЭГ-1500, приводит к значительному повреждению эритроцитов и ухудшению осмотических и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта, однако достоверного накопления МДА в мембранах и изменения активности глутатионзависимых энзимов не происходит. Включение в состав среды проникающего криопротектора ДМСО приводит к незначительной степени повреждения эритроцитов и сохранению осмотических, антиоксидантных и морфологических свойств оставшейся части клеток после отмывания криоконсерванта.

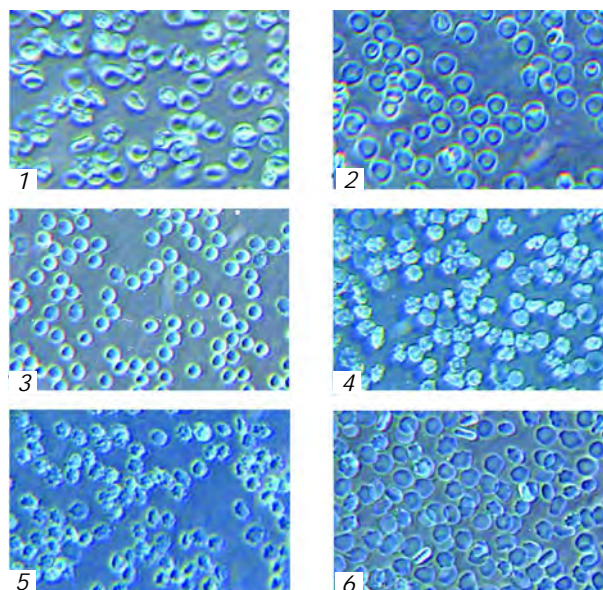


Рис. 2. Морфология эритроцитов в среде, содержащей 0,9% NaCl:

1, 3, 5 — без альбумина; 2, 4, 6 — при наличии альбумина (1%); 1, 2 — интактные клетки; 3, 4 — после замораживания и хранения в жидком азоте в среде, содержащей ПЭГ-1500; 5, 6 — после замораживания и хранения в жидком азоте в среде, содержащей ПЭГ-1500 и ДМСО

Восстановление метгемоглобина в гемоглобин обеспечивается энзимом метгемоглобинредуктазой с образованием супероксидного радикала, при нейтрализации которого образуется пероксид водорода. Из-за недостатка в эритроцитах глутатиона снижается активность глутатионпероксидазы, что способствует образованию гидропероксидов жирных кислот и повреждению мембран [1, 2]. Данные литературы указывают на существование взаимосвязи между реакциями ПОЛ и реакциями, поддерживающими гемоглобин в восстановленной форме.

Согласно этим данным, в клетках после замораживания изменяется равновесие между реакциями ПОЛ и антиоксидантными свойствами эритроцитов [3, 24]. При этом в мембранах клеток накапливается конечный продукт ПОЛ — МДА. Степень

Таблица 3. Активность энзимов глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в эритроцитах после замораживания и хранения в жидком азоте в среде с ПЭГ-1500 (20%) и ДМСО (15%)

Среды замораживания	Глутатионпероксидаза (мкмоль глутатиона/мин · г Hb-1)		Глутатионредуктаза (мкмоль НАДФН2/мин · г Hb-1)	
	Без хранения	35 месяцев хранения	Без хранения	35 месяцев хранения
ПЭГ-1500	145,6±20,2	142,3±23,0	12,4±2,1	11,8±1,9
ПЭГ-1500 + ДМСО	148,5±27,0	145,4±19,5	12,7±2,0	12,2±1,8
Для интактных эритроцитов	155,8±22,4		14,6±2,3	

увеличения концентрации МДА определяет скорость замораживания и оттаивания. Чем ниже скорость охлаждения и оттаивания, тем выше уровень образования МДА в замороженных клетках. Наименьший прирост количества МДА наблюдается в быстро замороженных и быстро оттаявших клетках [24]. Кроме того, в быстро замороженных в жидком азоте эритроцитах в среде, содержащей гидроксипропилированный крахмал (ГЭК), при последующем хранении их в течение 1–6 мес при -80°C также выявлено повышение концентрации МДА [3]. С увеличением срока хранения эритроцитов от 1 до 6 мес отмечалось повышение их осмотической хрупкости. На основе таких результатов авторы пришли к заключению, что активация ПОЛ, приводящая к росту осмотической хрупкости эритроцитов, инициируется супероксидным радикалом, формирование которого индуцируется окислением гемоглобина в метгемоглобин при замораживании и хранении эритроцитов [3].

Результаты нашей работы указывают на отсутствие достоверного накопления МДА в мембранах эритроцитов после их замораживания и хранения в жидком азоте независимо от состава среды, а уменьшение концентрации восстановленного глутатиона в клетках связано с потерей барьерной функции мембран при отмывании криоконсерванта (табл. 2). Следует отметить, что эритроциты, замороженные в среде с ПЭГ-1500, имеют существенные отклонения осмотических показателей от таковых интактных клеток (табл. 1, рис. 1). Однако при хранении в замороженном состоянии в них не выявлено повышения концентрации МДА и существенного изменения активности глутатионпревращающих энзимов (табл. 2, 3). Установлено, что нарушение осмотических свойств замороженных эритроцитов не зависит от их антиоксидантных свойств, а определяется повреждениями, которые происходят непосредственно при замораживании-оттаивании. Замораживание и хранение эритроцитов в комбинированной среде, содержащей ПЭГ-1500 и ДМСО, приводит к незначительному повреждению клеток и сохранению их осмотических (табл. 1, рис. 1) и морфологических свойств (рис. 2). Это свидетельствует об эффективности использованной комбинированной среды при замораживании эритроцитов.

Согласно данным литературы, среда, содержащая ПЭГ и ДМСО, является эффективным криоконсервантом для многих клеток, включая таковые костного мозга [25], гемопоэтические клетки кордовой крови

[26] и поджелудочной железы человека [27]. В данном случае использование комбинированного криоконсерванта исключает программное замораживание и позволяет замораживать клетки без контроля скорости охлаждения. Вероятно, это связано с тем, что при замораживании в таком комбинированном криоконсерванте снижается степень переохлаждения клеточных образцов, что уменьшает вероятность образования внутриклеточных кристаллов льда [25].

Выявлено, что при замораживании-оттаивании эритроцитов сочетание в криоконсерванте декстрана или ПЭГ-1500 с ДМСО приводит к устранению эффекта «упаковки» и, соответственно, к ослаблению постгипертонического воздействия [11]. Устранение этого эффекта при замораживании в среде с глицеролом обеспечивает сохранение осмотической хрупкости эритроцитов [28]. Таким образом, криопротекторную эффективность комбинированной среды, содержащей ПЭГ-1500 и ДМСО, можно объяснить устранением эффекта «упаковки». Существует предположение, что увеличение степени повреждения эритроцитов, связанное с эффектом «упаковки», определяется механическими воздействиями кристаллов льда и увеличением концентрации раствора при замораживании [29], а также осмотическими воздействиями при размораживании вследствие плавления внеклеточных и внутриклеточных кристаллов льда [30]. В условиях быстрого замораживания и быстрого оттаивания (в нашей работе использовали именно такой подход) увеличение степени гемолиза в эффекте «упаковки» определяется постгипертоническим стрессом на конечной стадии быстрого размораживания из-за разведения внешней среды водой вследствие таяния льда, значительная часть которого была образована из внутриклеточной воды [13].

При замораживании криозащитные компоненты подвергаются концентрированию и оказывают не только протекторное, но и повреждающее действие. В этом контексте целесообразно проанализировать данные литературы.

Криозащитное действие полимерных непроникающих криопротекторов обусловлено их способностью обеспечивать сохранение репарационных свойств мембран, при этом размороженные клетки не теряют способности восстанавливать свой катионный баланс. Кроме того, защитное действие полимеров связано со структурированием воды и поддержанием ее в жидком состоянии при низких температурах в ходе замораживания

(до $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$) [31]. Однако наряду с положительными эффектами полимеры, концентрируясь в ходе замораживания, способствуют нарастанию гипертоического градиента и повреждению клеточных мембран [31]. Криозащитное действие проникающих криопротекторов связано с проникновением их в клетки и уменьшением степени дегидратации клеток, при этом происходит замедление гиперконцентрирования. Вместе с тем уменьшение степени дегидратации клеток приводит к возрастанию вероятности формирования внутриклеточных кристаллов льда [31]. Таким образом, как у непроникающих, так и у проникающих криопротекторов существуют сопутствующие отрицательные свойства в цикле замораживания-оттаивания клеточных суспензий, которые, исходя из вышеизложенного, можно ослабить, комбинируя в среде замораживания два вида криопротекторов. Включение проникающего криопротектора в среду с непроникающим криопротектором и поступление его в клетки может привести к уменьшению степени их дегидратации и, соответственно, к ослаблению гипертоического стресса в ходе замораживания, обусловленного концентрированием непроникающего криопротектора. Уменьшение интенсивности гипертоического стресса создает условия для ослабления влияния осмотических механизмов повреждения при размораживании, что связано с флуктуационным входом и выходом воды в клетках при медленном размораживании [30] либо с постгипертоическим стрессом на конечном этапе быстрого оттаивания [13]. Приведенные данные указывают на вероятный механизм эффективности

комбинированных криоконсервантов, содержащих непроникающие и проникающие криопротекторы, вследствие которого устраняется эффект «упаковки».

Таким образом, замораживание эритроцитов в среде с ПЭГ-1500 приводит к значительному повреждению клеток и существенному изменению осмотических и морфологических свойств оставшейся части эритроцитов после отмывания криоконсерванта. В то же время не выявлено достоверных изменений концентрации МДА и активности глутатион-метаболизирующих ферментов после длительного хранения эритроцитов в замороженном состоянии. Сочетание в криоконсерванте ПЭГ-1500 и ДМСО обеспечивает эффективные криозащитные свойства комбинированного состава, что снижает действие повреждающих факторов при замораживании-оттаивании и обеспечивает упрощение отмывания эритроцитов после размораживания изотоническим раствором NaCl без использования гипертоических сред. При этом эритроциты сохраняют осмотические, антиоксидантные и морфологические показатели, определенные для контроля. На основе полученных результатов с учетом данных литературы можно предположить, что криозащитная эффективность использованного комбинированного состава связана с поступлением в клетки ДМСО и, вследствие этого, ослаблением гипертоического стресса, обусловленного концентрированием непроникающих компонентов среды при замораживании, что обеспечивает сохранение устойчивости клеток к постгипертоическому стрессу при размораживании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pawlak W., Kedziora J., Zolynski K. et al. Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defense and lipid peroxidation in erythrocytes // *J. Gravit. Physiol.* — 1998. — V. 5, N 1. — P. 163–164.
2. Throm M. J., Stevens M. D., Hansen C. Benzocaine-induced methemoglobinemia in two patients: interdisciplinary collaboration, management, and near misses // *Pharmacotherapy.* — 2007. — V. 27, N 8. — P. 1206–1214.
3. Langer R., Herold T., Henrich H. A. Lipid peroxidation and hemolysis in HES cryopreserved erythrocytes // *Beitr Inf. Transf.* — 1996. — V. 33. — P. 111–116.
4. Pellerin-Mendes C., Million L., Marchand-Arvier M. et al. In vitro study of the protective effect of trehalose and dextran during freezing of human red blood cells in liquid nitrogen // *Cryobiology.* — 1997. — V. 35, N 2. — P. 173–186.
5. Аграненко В. А., Федорова Л. И. Замороженная кровь и ее клиническое применение. — М.: Медицина, 1983. — 96 с.
6. Sputtek A., Singbartl G., Langer R. et al. Cryopreservation of erythrocytes using hydroxyethyl starch: in vivo results of an autologous retransfusion model in humans // *Beitr Inf. Transf.* — 1994. — V. 32. — P. 44–47.
7. Wagner C. T., Martowicz M. L., Livesey S. A., Connor J. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation // *Cryobiology.* — 2002. — V. 45, N 2. — P. 153–166.
8. Михнович Е. П., Рождественская М. А., Нельский Г. Т. Криоконсервация эритроци-

- тов при -196°C с проникающими и непроникающими веществами / Акт. вопр. криобиол. криомед. — К.: Наук. думка, 1974. — С. 161–164.
9. *Паніна Ю. Є.* Фізико-математична теорія гіпотонічного гемолізу еритроцитів людини: Автореф. дис. ... канд. фіз.-мат. наук.: 03.00.19. / Ін-т. пробл. криобіол. криомед., 1999. — 17 с.
 10. *Терехов Н. Т., Петров М. М., Буденная М. П., Тимченко Н. В.* Долгосрочное хранение эритроцитов методом замораживания при умеренно низких (-60°C – -40°C) температурах / Метод. рекомендации. — К., 1986. — 15 с.
 11. *Рамазанов В. В., Бондаренко В. А.* Проявление и устранение эффекта «упаковки» в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами // Пробл. криобиол. — 2009. — Т. 19, № 3 — С. 312–323.
 12. *Pegg D. E., Diaper M. P.* The paking effect in erythrocyte freezing // *Cryo Letters*. — 1983. — V. 4, N 2. — P. 129–136.
 13. *Levin R. L.* The limiting effects of heat and mass transfer on the osmotic behavior of cells during freezing and thawing // *Cryobiology*. — 1982. — V. 19, N 6. — P. 669.
 14. *Woolgar A. E., Morris C. J.* Some combined effects of hypertonic solutions and changes in temperature on posthypertonic haemolysis of human red blood cells // *Ibid.* — 1973. — V. 10. — P. 82–86.
 15. *Mazur P., Miller R. H.* Survival of frozen-thawed human red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose // *Ibid.* — 1976. — V. 13, N 5. — P. 523–536.
 16. *Рамазанов В. В., Забродский Р. Ф., Найдюк Я. Ю., Бондаренко В. А.* Функционирование системы транспорта ионов H^+ при модификации мембран эритроцитов в условиях, моделирующих условия замораживания // *Вісн. пробл. біол. мед.* — 2010. — Вип. 3 — С. 186–192.
 17. *Beutler E.* Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. — New York.: Grune&Stratton, 1975. — 160 p.
 18. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 270 с.
 19. *Разыграев А. В., Арутюнян А. В.* Определение глутатионпероксидазной активности в сыворотке крови человека с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислоты) // *Клин. лаб. диагност.* — 2006. — № 6. — С. 13–16.
 20. *Юсупова Л. Б.* О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // *Лаб. дело.* — 1989. — № 4. — С. 19–21.
 21. *Hoffman J. F.* On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells // *Blood Cells*. — 1987. — V. 12, N 3. — P. 565–588.
 22. *Ашмарин И. П., Васильев И. П., Амбросов В. А.* Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. — Л.: Из-во Ленингр. ун-та, 1975. — 76 с.
 23. *Рамазанов В. В., Бондаренко В. А.* Осмотические свойства эритроцитов, замороженных в средах с непроникающими и проникающими криопротекторами // *Пробл. криобиол.* — 2010. — Т. 20, № 1 — С. 47–58.
 24. *Актуальные проблемы криобиологии /* Ред: Пушкарь Н. С., Белоус А. М. — К.: Наук. думка, 1981. — 608 с.
 25. *Luo K. G., Wu G., Q. Wang Q. et al.* Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells // *Cryobiology*. — 1994. — V. 31, N 4. — P. 349–354.
 26. *Liu K. Y., Dong W. C., Wang Y. L. et al.* Study on non-programmed process using dimethyl sulfoxide and hydroxyethyl starch as cryoprotectants in cryopreservation of cord blood hematopoietic cells // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. — 2004. — V. 12, N 5. — P. 670–673.
 27. *Maruyama M., Kenmochi T., Sakamoto K. et al.* Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants // *Transplant Proc.* — 2004. — V. 36, N 4. — P. 1133–1134.
 28. *Wagner C. T., Burnett M. B., Livesey S. A., Connor J.* Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation // *Cryobiology*. — 2000. — V. 41, N 3. — P. 178–194.
 29. *Mazur P., Cole K. W.* Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes // *Ibid.* — 1985. — V. 22, N 6. — P. 509–336.
 30. *Farrant J., Walter C. A., Lee H., McGann L. E.* Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing // *Ibid.* — 1977. — V. 14, N 3. — P. 273–286.
 31. *Bakhach J.* The cryopreservation of composite tissues. Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues // *Organogenesis*. — 2009. — V. 5, N 3. — P. 119–126.

**ВЛАСТИВОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ,
ЗАМОРОЖЕНИХ В КОМБІНОВАНОМУ
СЕРЕДОВИЩІ З ПОЛІЕТИЛЕНГЛІКОЛЕМ
І ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИДОМ**

*У. У. Рамазанов
Т. І. Дейнеко
Е. Л. Воловельська
У. А. Коптелов
В. А. Бондаренко*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Досліджували осмотичні, антиоксидантні й морфологічні характеристики еритроцитів, заморожених в рідкому азоті ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) в середовищі, що містить поліетиленгліколь-1500, або в комбінованому середовищі з поліетиленгліколем ПЕГ-1500 і диметилсульфоксидом. При заморожуванні в середовищі, що містить поліетиленгліколь-1500, відзначається значний ступінь ушкодження еритроцитів (55–60%), втрата клітинами глутатіону під час відмивання кріоконсерванту і підвищення проникності частини клітин, що залишилася, для іонів H^+ . Водночас не виявлено істотного збільшення концентрації малонового діальдегіду і значної зміни показників активності глутатіонзалежних ензимів (глутатіонредуктази і глутатіонпероксидази) при заморожуванні в двох зазначених середовищах. У разі додаткового включення в середовище диметилсульфоксиду ступінь ушкодження еритроцитів при заморожуванні знижується (7–9%) зі збереженням осмотичних, антиоксидантних і морфологічних властивостей частини клітин, що залишилася, після відмивання кріоконсерванту. Отримані результати дозволяють припустити, що збереження осмотичних і морфологічних властивостей еритроцитів, заморожених у комбінованому середовищі з поліетиленгліколем-1500 і диметилсульфоксидом, забезпечується проникненням останнього в клітини і ослабленням гіпертонічного стресу, зумовленого концентруванням NaCl та ПЕГ-150 при заморожуванні.

Ключові слова: еритроцити, осмотичні, антиоксидантні і морфологічні властивості, заморожування, комбінований кріоконсервант.

**PROPERTIES OF ERYTHROCYTES
FROZEN IN COMBINED MEDIUM
WITH POLYETHYLENE GLYCOL
AND DIMETHYLSULFOXIDE**

*V. V. Ramazanov
T. I. Dejneko
E. L. Volovelskaya
V. A. Koptelov
V. A. Bondarenko*

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

E-mail: ramazanov.viktor@mail.ru

Osmotic, antioxidative and morphological characteristics of erythrocytes frozen in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) in a medium containing polyethylene glycol –1500 or in combined medium with polyethylene glycol-1500 and dimethylsulfoxide were studied. During freezing in medium containing polyethylene glycol –1500, significant rate of erythrocytes damage (55–60%), glutathione loss by the cells during cryopreservative washing-out and penetration increasing of rest of cells for H^+ ions were reported.

At the same time no significant increasing of malonic dialdehyde concentration and valuable change of indices of glutathione-metabolized enzymes activity (glutathione reductase and glutathione peroxidase) during freezing in two indicated media were found out. At additional introduction of DMSO into medium, damage rate of erythrocytes during freezing decrease significantly (7–9%) keeping the sufficient osmotic, antioxidative and morphological properties of the remained part of cells after cryopreservative washing-out.

The findings enable to suggest that osmotic and morphological properties retention of erythrocytes being frozen in combined medium with polyethylene glycol-1500 and dimethylsulfoxide were provided by penetration of the latter into the cells and weakening of hypertonic stress, stimulated by NaCl and polyethylene glycol-1500 concentration during freezing.

Key words: erythrocytes, osmotic, antioxidative and morphological properties, freezing, combined cryopreservative.

УДК . 577.151:579.864.1

ОЦІНЮВАННЯ АВТОІМУННОГО ТА ДНК-УШКОДЖУВАЛЬНОГО ВПЛИВУ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА

В. І. Бобик¹
Л. М. Капустян¹
Л. М. Морозова¹
П. В. Погрібний³
С. М. Дибкова²
Л. С. Рєзніченко²
Т. Г. Грузіна²
З. Р. Ульберг²
В. Ф. Коваленко⁴
Л. Л. Сидорик¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ

²Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка
НАН України, Київ

³Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ

⁴ДУ «Інститут медицини праці» НАМН України, Київ

E-mail: tgruzina@mail.ru

Отримано 30.09.2011

Методом хімічної конденсації синтезовано водні дисперсії наночастинок золота середніх розмірів — 7, 17 та 57 нм. Шляхом визначення титру автоантитілу проти дефенсину (mBD-2), шапероніну Hsp60 та серцевого міозину (Myo) досліджено характер автоімунної відповіді організму експериментальних тварин, індукованої інтраперитонеальним введенням наночастинок золота.

В експериментах *in vitro* та *in vivo* виявлено ДНК-ушкоджувальну дію наночастинок золота розміром 7 та 17 нм і відсутність такої під впливом наночастинок розміром 57 нм.

За показниками індукції автоімунної відповіді організму та ДНК-ушкоджувального впливу на тканини лабораторних тварин наночастинками золота різного розміру зроблено висновок, що частинки розміром 57 нм є найбільш перспективними для застосування у технологіях створення засобів діагностики і терапії патологій серцево-судинної системи.

Ключові слова: наночастинки золота, автоантитіла, дефенсин, шаперонін Hsp60, міозин, імунна відповідь, ДНК-ушкоджувальна дія.

З огляду на бурхливий розвиток наномедицини проблема застосування наночастинок металів як субстанцій нових високоефективних засобів діагностичної та цільової терапії є досить актуальною.

Найбільш перспективними у цьому сенсі є наночастинки золота (GNP). Так, показано високу ефективність використання їх як контрастних агентів у магнітно-резонансній та рентгенівській комп'ютерній томографії [1, 2], фототермальній терапії онкологічних захворювань [3, 4], а також як векторів цільового доставлення лікарських препаратів, передусім протипухлинних [5–7].

Меншою мірою це торкнулося діагностики та терапії серцево-судинних захворювань, серед яких серцева недостатність вважається однією з найважливіших проблем. Проте активні дослідження, здійснювані у цьому напрямі, свідчать про значні перспективи використання наночастинок золота у кардіології [8–10].

Враховуючи вищезазначене, дослідження біологічної дії, зокрема вивчення автоімунного потенціалу та можливості кардіотропного або кардіотоксичного впливу GNP, є надзвичайно важливим і необхідним для біобезпечного застосування їх у кардіології.

Метою роботи було оцінити автоімунний та ДНК-ушкоджувальний вплив наночастинок золота різного розміру для визначення перспектив їх застосування у кардіології.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на мишах-самцях лінії Balb/C віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Усі тварини віком 2–2,5 міс мали масу 18–23 г. Дослідження на тваринах виконували згідно з правилами, прийнятими Етичним комітетом ІМБіГ НАНУ. У роботі використовували синтезовані в Інституті біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН

України препарати сферичних наночастинок золота середнього розміру 7, 17 та 57 нм (GNP-1, GNP-2 і GNP-3, відповідно). Розмір та форму наночастинок визначали методами трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1230, JEOL, Японія) та лазерно-кореляційної спектроскопії (Zetasizer-3, Malvern Instruments Ltd, Великобританія).

Препарати наночастинок вводили інтраперитонеально в 0,5 мл фізіологічного розчину згідно з протоколом індукції міокардитоподібної патології [11]. Титр антитіл проти протеїнів серцевого міозину інтактних мишей (Myo), як загальноприйнятого маркера розвитку міокардиту, антистресового протеїну Hsp60 і дефенсину мишей (mBD-2) у сироватці крові підслідних тварин визначали на 14-ту, 28-му і 40-ву добу з моменту останнього введення препаратів наночастинок золота за допомогою твердофазного імуноензимного аналізу (ELISA) з модифікаціями [12]. Контролем слугували миші того самого віку, яким вводили тільки фізіологічний розчин (контроль на стрес).

Антигени (нативний міозин із серця інтактних мишей лінії Balb/c, рекомбінантний молекулярний шаперон/шаперонін Hsp60 і рекомбінантний бета-дефенсин мишей mBD-2) отримували згідно з методиками [13, 14] відповідно.

Застосовували такі модифікації методу ELISA. Антиген (10 мкг/мл) упродовж ночі інкубували в лунках полістирольного 96-лункового планшета при 4 °С. У контрольні лунки вносили розчин BSA (10 мкг/мл). Для запобігання неспецифічному зв'язуванню протеїнів сироватки крові з адсорбованим протеїном та пластиком використовували розчин PBS з 0,1%-м твін-20 (PBS-т). Сироватки крові експериментальних мишей вносили у лунки планшета з адсорбованим антигеном (у двох повторях) та інкубували протягом 1,5 год при 37 °С та 18 год при 4 °С. Зв'язування специфічних автоантитіл з відповідним антигеном детектували за допомогою вторинних антитіл кроля проти IgG миші, мічених пероксидазою хрому (Promega, США). Для візуалізації результатів реакції використовували субстрат для пероксидази хрому АВТС (Sigma, США) у концентрації 0,5 мкг/мл у 50 мМ цитратного буфера, рН 5,0 з 0,05%-м концентрованим пероксидом водню, оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 405 нм на спектрофотометрі Multiscan (Titertek, Великобританія). Визначали середнє значення оптичної густини двох повторів кожної сироватки (за умови, якщо відмінність між повторами не переви-

щувала 15%). Антитілопозитивною вважали сироватку, оптична густина якої у розведенні 1:100 перевищувала середнє значення оптичної густини сироваток інтактних мишей (за того самого розведення) на два стандартних відхилення ($m+2sd$). Усі досліджувані сироватки було перевірено на наявність специфічних автоантитіл одночасно.

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою пакета програм STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001, США). Результати подано у вигляді середніх значень (m) із вказівкою на стандартне відхилення (sd). Для порівняння середніх значень досліджуваних груп використовували U-критерій Манна-Уїтні (Mann-Whitney U-test).

ДНК-ушкоджувальну дію препаратів наночастинок визначали *in vitro* з використанням культури тестових екаріотичних клітин яєчника китайського хом'яка лінії СНО-К1 та *in vivo* на 14-ту добу з моменту введення препаратів підслідним тваринам, як описано в [15, 16]. Позитивним контролем слугували клітини СНО-К1, оброблені N-нітрозометилсечовиною в концентрації 1 мМ протягом 24 год. Як негативний контроль використовували клітини СНО-К1 у розчині ДМСО.

ДНК-ушкоджувальний вплив наночастинок золота *in vivo* визначали на органах клітинах, виділених із печінки, нирок, селезінки, головного мозку, серця та легенів експериментальних тварин згідно з [16, 17].

Мікроскопію мікропрепаратів здійснювали за допомогою флуоресцентного мікроскопа (ЛЮМАМ Р8, Росія) з використанням фільтра збудження 490 нм, дихроїчного дзеркала 510, відтинаючого фільтра 530 нм. Збільшення — $\times 200-400$. На кожен мікропрепарат аналізували не менш ніж 100 «ДНК-комет» без накладень «хвостів». В аналізі не враховували апоптичні клітини, які виявлялися на мікропрепаратах у вигляді «ДНК-комет» з широким дифузним «хвостом» і практично відсутньою «головою», — так звані «їжачки».

Аналіз «ДНК-комет» проводили як візуально, так і шляхом комп'ютерної обробки цифрових зображень за допомогою програми COMET-CASP. При цьому визначали такі параметри «комет»: індекс «ДНК-комет» ($I_{\text{ДНК}}$), «довжина хвоста», «% ДНК у хвості», «момент хвоста».

Здійснюючи візуальний аналіз, «ДНК-комети» розподіляли на п'ять умовних типів із відповідним для кожного числовим значенням від 0 до 4. Ступінь ушкодження ДНК при цьому виражали як індекс «ДНК-ко-

мет» ($I_{\text{ДНК}}$), який обчислювали за формулою:

$$I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

де $n_0 - n_4$ — число «ДНК-комет» кожного типу, Σ — сума «ДНК-комет».

Статистичну обробку результатів проводили за кожною експериментальною точкою, порівнюючи показники ушкодження ДНК в дослідних та контрольних групах. Критерієм позитивного результату слугував статистично достовірний відтворюваний ефект.

Результати та обговорення

Наночастинки золота здатні до активної взаємодії з моторними протеїнами [18], інтенсифікації процесу трансформації енергії [19] та прояву шапероноподібної дії [20]. Тому застосування наночастинок золота у діагностиці й терапії патологій різного ґенезу, в тому числі серцево-судинної системи, потребує докладного вивчення молекулярних механізмів їхнього впливу на організм.

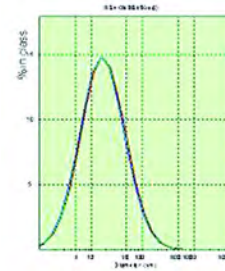
Розуміння цих процесів, особливо залежності їх від природи, способу синтезу, розміру та інших фізико-хімічних характеристик наночастинок, не тільки відкриває можливості для всебічного оцінювання потенційних ризиків застосування наноматеріалів, але й дає змогу створювати принципово нові унікальні технології спрямованого впливу на патологічні процеси на молекулярному рівні.

Препарати наночастинок золота середніх розмірів 7, 17 та 57 нм, використані для досліджень, були синтезовані методом хімічної конденсації. На відміну від багатьох фізичних методів, цей спосіб синтезу дозволяє отримувати монодисперсні за розміром біосумісні препарати наночастинок золота у водному розчині. На рис. 1 наведено дані лазерно-кореляційної спектрометрії та трансмісійної електронної мікроскопії для наночастинок золота середнього розміру 17 нм.

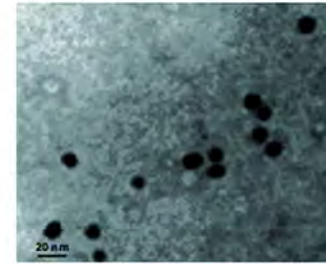
З метою визначення перспектив використання синтезованих наночастинок золота у розробленні засобів діагностики і терапії патологій серцево-судинної системи оцінювали характер їхнього впливу на організм модельних тварин за змінами у сироватці крові рівня автоантитіл проти дефенсину, антистресового протеїну (шапероніну) Hsp60 та серцевого міозину, а також за показниками ДНК-ушкоджувальної дії на клітини потенційних органів-мішеней.

Так, отримані дані засвідчили, що титр антитіл проти дефенсину мишей mBD-2 в си-

Stat.	Angle	KCQr	Clave	Fdy	Fit	Time
1	90.0	141.2	173	1.000	0.00134E	1447.30
2	90.0	143.1	168.9	1.000	0.00137E	1415.96
3	90.0	146.7	172	1.000	0.000945	1415.51
Average		143.1	171	1.000		
std.		1.7	2.2	0.000		



А



Б

Рис. 1. Розподіл за гідродинамічним діаметром (А) та електронно-мікроскопічне зображення (Б) наночастинок золота середнього розміру 17 нм

роватці крові піддослідних тварин, визначений на 14-ту, 28-му і 40-ву добу після останнього введення препаратів наночастинок золота, не змінювався під впливом наночастинок золота середнього розміру 7 та 17 нм (рис. 2, криві mBD-2-GNP-1 та mBD-2-GNP-2, відповідно), порівняно з контрольними значеннями.

Незначне підвищення титру антитіл до дефенсину спостерігалось на 28-му добу після останнього введення препарату лише під впливом наночастинок середнього розміру 57 нм (крива mBD-2-GNP-3).

Визначення рівня автоантитіл проти антистресового протеїну Hsp60 виявило типовий характер імунної відповіді під впливом наночастинок золота розміром 7 нм (рис. 3, крива Hsp60-GNP-1).

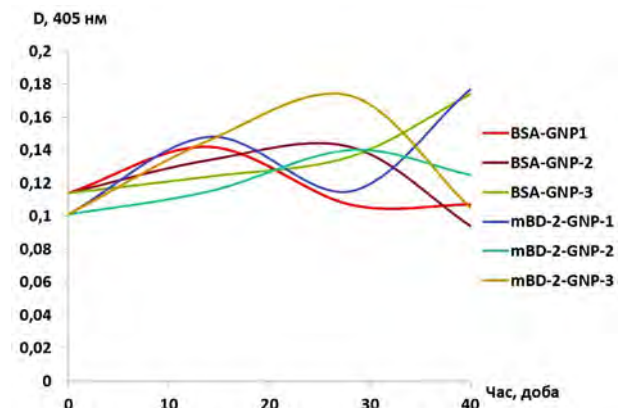


Рис. 2. Рівень автоантитіл проти дефенсину (mBD-2), визначений у сироватці крові мишей після введення препаратів наночастинок золота середнього розміру 7 нм (mBD-2-GNP-1), 17 нм (mBD-2-GNP-2) та 57 нм (mBD-2-GNP-3).

Як контрольний антиген використовували бічачий сироватковий альбумін (BSA-GNP-1, BSA-GNP-2, BSA-GNP-3)

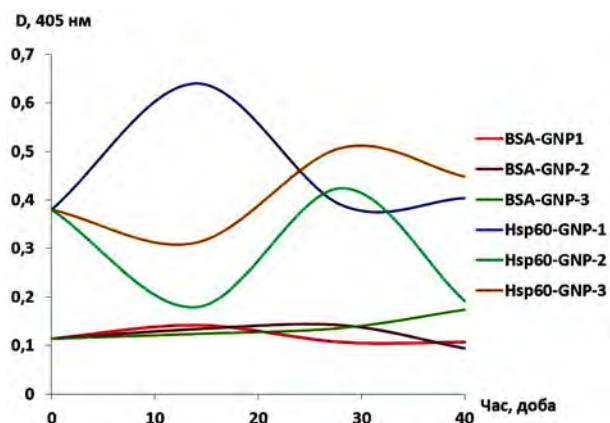


Рис. 3. Рівень автоантитіл проти Hsp60, визначений у сироватці крові мишей після введення препаратів наночастинок золота середнього розміру 7 нм (Hsp60-GNP-1), 17 нм (Hsp60-GNP-2) та 57 нм (Hsp60-GNP-3). Як контрольний антиген використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA-GNP-1, BSA-GNP-2, BSA-GNP-3)

Під впливом наночастинок розміром 17 нм спостерігалось зменшення титру автоантитіл проти Hsp60 на 14-ту добу майже до рівня контролю з подальшим підвищенням до початкового рівня на 28-му добу експерименту та зменшенням на 40-ву добу знову до рівня контрольної реакції на BSA (рис. 3, крива Hsp60-GNP-2).

Найбільш виражені зміни з часом у титрі автоантитіл проти Hsp60 фіксували за дії наночастинок середнього розміру 57 нм (рис. 3, крива Hsp60-GNP-3). Лаг-фаза утворення досліджуваних автоантитіл під впливом наночастинок цього розміру становила 14 діб, після чого кількість антитіл досягала максимуму на 28-му добу і залишалась майже на цьому рівні на 40-ву добу після останнього введення препарату наночастинок.

Титр автоантитіл проти серцевого міозину під впливом наночастинок золота середнього розміру 7 нм (рис. 4, крива Myo-GNP-1), як і в разі характеру зміни рівня автоантитіл проти антистресового протеїну Hsp60 (рис. 3, крива Hsp60-GNP-1), характеризувався типовою кривою імунної відповіді.

Проте, на відміну від рівня антитіл до Hsp60, максимальну кількість анти-Myo-автоантитіл реєстрували у сироватці крові на 28-му добу після останнього введення препарату наночастинок GNP-1.

Під впливом наночастинок розміром 17 нм (препарат GNP-2) вміст анти-Myo-автоантитіл на 40-ву добу після останнього введення наночастинок знижувався до рівня контрольних значень (рис. 4, крива Myo-GNP-2).

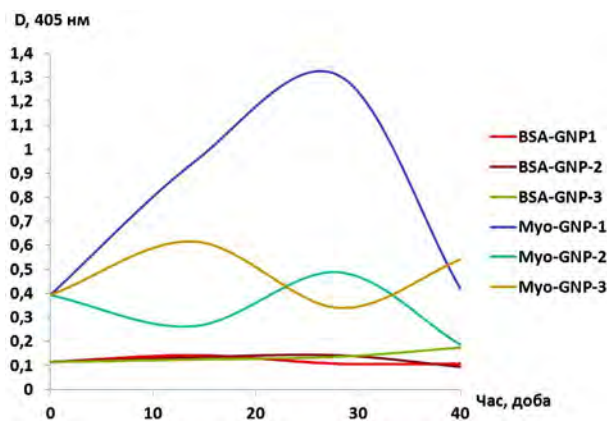


Рис. 4. Рівень автоантитіл до серцевого міозину (Myo), визначений у сироватці крові мишей після введення препаратів наночастинок золота середнього розміру 7 нм (Myo-GNP-1), 17 нм (Myo-GNP-2) та 57 нм (Myo-GNP-3). Як контрольний антиген використовували бичачий сироватковий альбумін (BSA-GNP-1, BSA-GNP-2, BSA-GNP-3)

Продукція анти-Myo-автоантитіл під впливом наночастинок розміром 57 нм характеризувалась двома фазами, які за характером імунної відповіді схожі з картиною первинного та вторинного імунного відгуку (рис. 4, крива Myo-GNP-3). Другу фазу підвищення продукції рівня анти-Myo-автоантитіл можна пов'язати з індукцією і прогресією автоімунної відповіді у піддослідних тварин, імунізованих препаратом наночастинок середнього розміру 57 нм (GNP-3).

Таким чином, імунізація піддослідних тварин наночастинок золота розміром 7 та 17 нм призводила до типової імунної відповіді. Наприкінці експерименту рівень досліджених автоантитіл досягав рівня вихідних або контрольних величин. Унаслідок впливу наночастинок золота середнього розміру 57 нм спостерігалось підвищення рівня продукування автоантитіл проти антистресового протеїну Hsp60 та серцевого міозину поряд із відсутністю виражених змін титру автоантитіл проти дефенсину протягом усього експерименту.

Дослідження ДНК-ушкоджувального впливу наночастинок золота середніх розмірів 7, 17 та 57 нм, виконані методом лужного гель-електрофорезу ізольованих евкаріотичних клітин *in vitro*, продемонстрували таке.

У зразках евкаріотичних клітин лінії СНО-К1, оброблених наночастинок золота дискретних розмірів 7 та 17 нм, було зафіксовано первинні ушкодження ДНК. На рис. 5 подано електрофоретичні зображення типу «ДНК-комет», що характеризують первинні ушкодження ДНК під впливом вищезгаданих наночастинок.

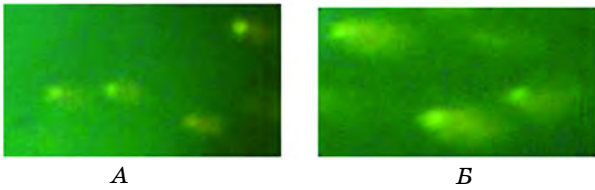


Рис. 5. Електрофоретичні зображення («ДНК-комети») ушкодженої ДНК евкаріотичних клітин лінії СНО-К1 унаслідок впливу наночастинок золота розміром ~7 нм (А) та ~17 нм (Б)

Виходячи з даних табл. 1, показники ушкодження ДНК евкаріотичних клітин СНО-К1 («індекс ДНК-комет», $I_{\text{ДК}}$) під впливом вивчених наночастинок золота розміром 7 та 17 нм сягають значень, близьких до $I_{\text{ДК}}$ позитивного контролю.

Дослідження *in vitro* ДНК-ушкоджувального впливу наночастинок золота розміром 57 нм показали відсутність такої властивості у цих наночастинок, оскільки в зразках евкаріотичних клітин лінії СНО-К1 первинних ушкоджень ДНК не фіксували. На рис. 6 наведено електрофоретичне зображення неушкодженої ДНК клітин лінії СНО-К1 під впливом наночастинок розміром 57 нм. Індекс ДНК-комет при цьому сягав значень $I_{\text{ДК}}$ негативного контролю.

Аналізуючи вищенаведені експериментальні дані щодо ДНК-ушкоджувального впливу наночастинок золота стосовно евкаріотичних клітин лінії СНО-К1, можна зробити висновок про наявність залежності такої дії

Таблиця 1. Оцінювання ДНК-ушкоджувального впливу наночастинок золота *in vitro*

Зразки евкаріотичних клітин	Індекс ДНК-комет ($I_{\text{ДК}}$)
Негативний контроль	$0,02 \pm 0,001$
Позитивний контроль	$3,9 \pm 0,05$
Оброблені наночастинками золота ~ 7 нм	$2,3 \pm 0,02$
Оброблені наночастинками золота ~ 17 нм	$2,2 \pm 0,06$
Оброблені наночастинками золота ~ 57 нм	$0,02 \pm 0,001$

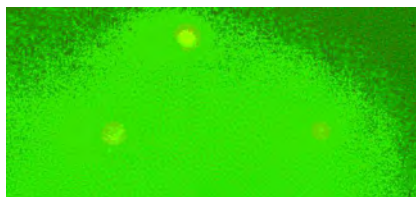


Рис. 6. Електрофоретична картина неушкодженої ДНК евкаріотичних клітин лінії СНО-К1 наночастинками золота розміром 57 нм

від їхнього розміру. Так, експериментами *in vitro* продемонстровано наявність ДНК-ушкоджувальних властивостей наночастинок золота розміром 7 та 17 нм та відсутність їх для наночастинок золота розміром 57 нм. ДНК-ушкоджувальна дія наночастинок золота розміром 7 та 17 нм ймовірно зумовлена їхньою здатністю проникати через пори ядерної мембрани і спричиняти первинні ушкодження ДНК у вигляді однострижкових розривів.

ДНК-ушкоджувальний вплив наночастинок золота середніх розмірів 7, 17 та 57 нм було досліджено методом лужного гель-електрофорезу і в експериментах *in vivo* на ізольованих клітинах органів-мішеней лабораторних мишей. При цьому показано, що наночастинок золота розміром 57 нм, за умов їх інтраперитонеального введення, не виявляли ДНК-ушкоджувальної дії на клітини головного мозку, легень, нирок, печінки, селезінки та серця. Так, показники ушкоджень ДНК « $I_{\text{ДК}}$ » перебували на рівні аналогічних показників негативного контролю (табл. 2). При цьому електрофоретичні зображення типу «ДНК-комет» були відсутні.

Щодо ДНК-ушкоджувального впливу наночастинок золота середнього розміру 7 нм слід зазначити, що показники ушкоджень ДНК в головному мозку, легенях, нирках та печінці були в 2–6 разів вищі за аналогічні показники в клітинах органів мишей контрольної групи. $I_{\text{ДК}}$ клітин серця мишей, яким вводили наночастинок золота 7 нм, був на рівні негативного контролю, а $I_{\text{ДК}}$ клітин селезінки такої дослідної групи перевищував $I_{\text{ДК}}$ контрольної групи в 9 разів. Таким чином, наночастинок золота розміром 7 нм виявляли ДНК-ушкоджувальні властивості *in vivo*.

Під впливом наночастинок розміром 17 нм у клітинах головного мозку, легень, нирок та печінки тварин дослідної групи показники ушкоджень ДНК перевищували значення показників контрольної групи в 6, 5, 9 та 4 рази відповідно (табл. 2). $I_{\text{ДК}}$ клітин серця тварин, яким вводили наночастинок золота розміром 17 нм, перевищував $I_{\text{ДК}}$ контрольної групи в 25 разів, а $I_{\text{ДК}}$ клітин селезінки — у 85 разів. Таким чином, наночастинок золота 17 нм виявляли виражену ДНК-ушкоджувальну дію *in vivo*.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що за дослідженими показниками автоімунного та ДНК-ушкоджувального впливу серед вивчених наночастинок золота, отриманих методом хімічної конденсації, наночастинок розміром 57 нм є найбільш перспективними для застосування у технологіях створення засобів діагностики і терапії патологій серцево-судинної системи.

Таблиця 2. Оцінювання ДНК-ушкоджувального впливу наночастинок золота *in vivo*

Групи тварин	Показник ДНК-ушкоджувальної дії в органах мишей (І _{ДК})					
	головний мозок	легені	нирки	селезінка	серце	печінка
Перша (уведено наночастинки золота ~7 нм)	0,011±0,005	0,034±0,006	0,045±0,005	0,132±0,01	0,050±0,001	0,015±0,004
Друга (уведено наночастинки золота ~17 нм)	0,030±0,001	0,025±0,001	0,115±0,01	1,275±0,5	0,125±0,02	0,024±0,001
Третя (уведено наночастинки золота ~57 нм)	0,007±0,001	0,005±0,007	0,017±0,004	0,020±0,002	0,005±0,005	0,007±0,006
Контрольна (без уведення наночастинок золота)	0,005±0,001	0,005±0,001	0,015±0,005	0,015±0,005	0,005±0,001	0,005±0,001

Виявлені особливості характеру імунної відповіді організму на присутність наночастинок золота різного розміру свідчать про необхідність подальших досліджень молекулярних механізмів їх впливу.

Автори висловлюють вдячність співробітникам Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Ка-

вецького НАН України к.б.н. Солдаткіній М. О. та к.б.н. Журавель О. К. за наданий препарат мишачого бета-дефенсину mBD-2.

Роботу виконано за фінансової підтримки Цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій».

ЛІТЕРАТУРА

- Hainfeld J. F., Slatkin D. N., Focella T. M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent // *Br. J. Radiol.* — 2006. — N 79. — P. 248–253.
- Xu C., Tung G. A., Sun S. Size- and concentration effect of gold nanoparticles on X-ray attenuation as measured on computed tomography // *Chem. Mater.* — 2008. — V. 20, N 13. — P. 4167–4169.
- Letfullin R. R., Joenathan C., George T. F. Laser-induced explosion of gold nanoparticles: potential role for nanophotothermolysis of cancer // *Nanomedicine.* — 2006. — V. 1, N 4. — P. 473–480.
- Pissuwan D., Valenzuela S. M., Cortie M. B. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles // *Trends Biotechnol.* — 2006. — V. 24, N 2. — P. 62–67.
- Paciotti G. F., Myer L., Weinreich D. Colloidal gold: novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery // *Drug Deliv.* — 2004. — V. 11, N 3. — P. 169–183.
- Fu W., Shenoy D., Li J. Hetero-bifunctional poly(ethylene glycol) modified gold nanoparticles as an intracellular tracking and delivery agent // *NSTI-Nanotech.* — 2005. — V. 1. — P. 324–327.
- Cai W., Gao T., Hong H. Application of gold nanoparticles in cancer nanotechnology // *J. Nanotech. Sci. Appl.* — 2008. — N 1. — P. 17–32.
- Weakley S. M., Wang X., Mu H. Ginkgolide A-gold nanoparticles inhibit vascular smooth muscle proliferation and migration *in vitro* and reduce neointimal hyperplasia in a mouse model // *J. Surgical Research.* — 2011. — doi:10.1016/j.jss.2011.03.018.
- Guo Z. R., Gu C. R., Fan X. Fabrication of anti-human cardiac troponin I immunogold nanorods for sensing acute myocardial damage // *Nanoscale Res. Lett.* — 2009. — N 4. — P. 1428–1433.
- Cormode D. P., Roessl E., Thran A. Atherosclerotic Plaque Composition: Analysis with Multicolor CT and Targeted Gold Nanoparticles // *Radiology.* — 2010. — N 256. — P. 774–782.
- Smith S. C., Allen P. M. Myosin-induced Acute Myocarditis is a T-Cell-Mediated Disease // *J. Immunol.* — 1991. — V. 147, N 7. — P. 2141–2147.
- Terminck T., Bleux C., Gregoin J. Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies // *Ibid.* — 1990. — V. 144. — P. 1504–1511.
- Капустян Л. Н., Киямова Р. Г., Гришкова В. С. и др. Получение рекомбинантного GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60 // *Биополимери та клітина.* — 2006 — Т. 22, № 2. — С. 17–120.
- Margossian S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain 2 and its influence on ATP hydrolysis // *J. Biol. Chem.* — 1985. — V. 260. — P. 13747–13754.
- Methods in Molecular Biology. In Situ Detection of DNA Damage. Methods and protocols* / Edit. by V. Didenko. — Humana Press, 2002. — 279 p.
- Методичні рекомендації «Оцінка біобезпеки наноматеріалів органічної та неорганічної природи методом визначення генотоксичного впливу лужним гель-електрофорезом ізолюваних еукаріотичних клітин», затвер-

- джені Державним науково-контрольним інститутом біотехнології і штамів мікроорганізмів Міністерства аграрної політики України та Державним комітетом ветеринарної медицини України (Постанова № 661 від 14.05.2009 та Постанова № 1 від 23–24 грудня 2009 р.).
17. Пат. на корисну модель МПК (2009) G01N33/00 G01N33/48. Спосіб оцінки генотоксичних властивостей наноматеріалів / С. М. Дибкова, О. В. Годовський, М. Є. Романько, Т. Г. Грузина, З. Р. Ульберг, В. О. Ушкалов, А. М. Головка. — Заявл. 10.09.2009; Опубл. 25.03.2010, Бюл. № 6. — 4 с.
18. Kaur H., Chaudhary A., Kaur I. et al. Transportation of drug–gold nanocomposites by actinomyosin motor system // J. Nanopart. Res. — 2011. — V. 13. — P. 2295–2303.
19. Ульберг З. Р., Грузина Т. Г., Дибкова С. М., Резніченко Л. С. Біобезпечні наночастинки металів в наномедицині та нанобіотехнології // Вісн. пробл. біол. мед. — 2010. — № 4. — С. 72–77.
20. Fei L., Perrett S. Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis // Int. J. Mol. Sci. — 2009. — V. 10. — P. 646–655.

ОЦЕНКА АУТОИММУННОГО И ДНК-ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

В. И. Бобик¹, Л. Н. Капустян¹, Л. М. Морозова¹,
П. В. Погребной², С. Н. Дыбкова²,
Л. С. Резниченко², Т. Г. Грузина²,
З. Р. Ульберг², В. Ф. Коваленко⁴, Л. Л. Сидорик¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Институт биокolloидной химии
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

³Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
НАН Украины, Киев

⁴ГУ «Институт медицины труда»
НАМН Украины, Киев

E-mail: tguzina@mail.ru

Методом химической конденсации синтезированы водные дисперсии наночастиц золота средних размеров 7, 17 и 57 нм. Путем определения титра аутоантител против дефенсина (mBD-2), шаперонина Hsp60 и сердечного миозина (Myo) исследован характер аутоиммунного ответа организма экспериментальных животных, индуцированного интраперитонеальным введением наночастиц золота. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* выявлено повреждение ДНК наночастицами золота размером 7 и 17 нм и отсутствие ДНК-повреждающего действия под влиянием наночастиц размером 57 нм.

На основании показателей аутоиммунного ответа организма и ДНК-повреждающего влияния на ткани лабораторных животных наночастиц золота разного размера сделан вывод, что частицы размером 57 нм являются наиболее перспективными для использования в технологиях создания средств диагностики и терапии патологий сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: наночастицы золота, аутоантитела, дефенсин, шаперонин Hsp60, миозин, иммунный ответ, повреждение ДНК.

ESTIMATION OF AUTOIMMUNE AND DNA-DAMAGE INFLUENCE OF GOLD NANOPARTICLES

V. I. Bobyk¹, L. M. Kapustyan¹, L. M. Morozova¹,
P. V. Pogribny², S. M. Dybkova²,
L. S. Rieznichenko², T. G. Gruzina², Z. R. Ulberg²,
V. P. Kovalenko⁴, L. L. Sydoryk¹

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

²Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

³Kavetsky Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

⁴SO «Institute of Medicine of Work»
of National Academy of Medical Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: tguzina@mail.ru

Water dispersions of gold nanoparticles with average sizes 7, 17 and 57 nm have been synthesized by the method of chemical condensation. The character of autoimmune response of model animals' organisms induced by intraperitoneal injection of the gold nanoparticles has been studied via the determination of autoantibodies titre against defensin (mBD-2), chaperonin Hsp60 and heart myosin (Myo).

The DNA-damage action of gold nanoparticles with average sizes 7 and 17 nm as well as absence of one under the influence of 57 nm nanoparticles have been revealed *in vitro* and *in vivo*.

On the basis of the parameters of organism autoimmune response and DNA-damage influence on tissues of the laboratory animals with gold nanoparticles of different size it was made a conclusion that 57 nm particles were the most perspective for using in technologies of cardio-vascular pathologies diagnostic and treatment preparations creation.

Key words: gold nanoparticles, autoantibodies, defensin, chaperonin Hsp60, myosin, immune response, DNA-damage action.

Нові методи генної терапії дозволяють виправляти мутації у стовбурових клітинах пацієнта

Групі вчених, очолюваній дослідниками з Інституту Сенджера (Sanger Institute) і Кембриджського університету (University of Cambridge), вперше вдалося скоректувати генну мутацію в стовбурових клітинах пацієнта. Мішенню експериментів була мутація, відповідальна за розвиток цирозу печінки і емфіземи легенів. Застосовуючи новітні методи, дослідники скоректували певну послідовність генома пацієнта, видалили всю екзогенну ДНК і продемонстрували, що «відремонтований» ген працює нормально. Цей результат реально наближає нас до персоналізованої терапії.

Результати серії експериментів опубліковано в журналі *Nature*.

У своїй роботі дослідники використовували індуковані плюрипотентні стовбурові клітини людини (hiPSCs), оскільки одного разу перепрограмовані в чашці Петрі ці клітини можуть бути трансформовані в клітини широкого спектра тканин. Як вважають учені, стовбурові клітини пацієнта зі скоректованим генним дефектом, повернені потім в його організм, можуть виправити ефекти мутації, що спричинила певне захворювання. Аби зробити цю можливість реальністю, необхідні ефективні методи вбудовування ДНК, коректування потрібного гена, видалення всієї чужорідної інформації та верифікації здійснених змін.

У цьому дослідженні вчені зосередили свою увагу на мутації в гені альфа¹-антитрипсину, що є активним у печінці, де він відповідає за вироблення протеїну, який захищає від розвитку надмірно вираженого запалення. У людей з мутантним альфа¹-антитрипсином цей протеїн не може належним чином виділятися з печінки, де він, ніби опиняючись у пастці, призводить, зрештою, до цирозу цього органа і, як наслідок, до емфіземи легенів. Це — широко розповсюджене спадкове захворювання печінки і легенів, що діагностується приблизно в одного з 2 000 людей північноєвропейського походження.

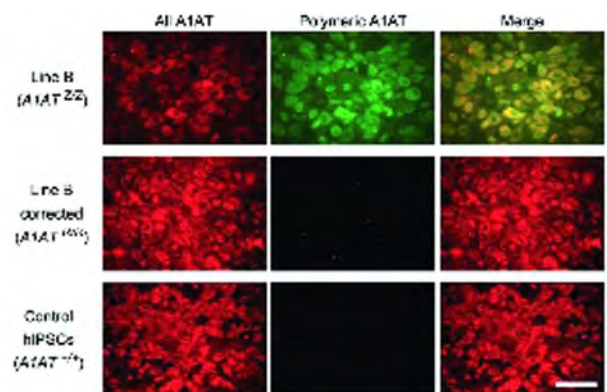
Грунтуючись на попередньому дослідженні, проведеному в Кембриджському університеті, яке показало, що перепрограмуванням стовбурових клітин можна трансформувати клітини шкіри в клітини печінки, учені успішно скоректували послідовність

гена альфа¹-антитрипсину в клітинах стабільної лінії, що містить цю мутацію. Використовуючи «молекулярні ножиці» для розрізання генома точно в потрібному місці, вони вбудували правильний варіант гена за допомогою носія ДНК, так званого piggyBac. Послідовність piggyBac було згодом видалено зі стовбурових клітин, що дало змогу отримати гепатоцити без будь-яких залишкових слідів ушкодження ДНК на місці корекції.

Згодом учені довели активність правильної копії гена в отриманих ними клітинах печінки, продемонструвавши присутність нормального протеїну альфа¹-антитрипсину як *in vitro*, так і в експериментах на мишах.

«Ми розробили нові системи таргетингу генів та інтегрували всі компоненти для ефективного коректування дефектів клітин пацієнта», — зазначив професор Алан Бредлі (Allan Bradley), почесний директор Інституту Сенджера. «Наші методи не залишають жодних слідів маніпулювання генетичною інформацією за винятком коректування одного потрібного нам гена. Це лише перші кроки, однак, якщо цю технологію буде застосовано на практиці, вона принесе велику користь пацієнтам».

«Цим дослідженням зроблено перший крок до персоналізованої клітинної терапії генетичних захворювань печінки», — пояснює д-р Людовік Вальє (Ludovic Vallier), старший науковий співробітник Медичної дослідницької ради (Medical Research Council, MRC) і провідний дослідник Центру



Імунофлуоресценція показує відсутність полімерного протеїну A1at у гепатоцитоподібних клітинах, отриманих зі скоректованих iPSCs. Показано всі форми A1at (ліва панель) і неправильно згорнутий полімерний A1at (середня панель). (Фото: sanger.ac.uk)

біології стовбурових клітин та регенеративної медицини і відділення хірургії MRC Кембриджського університету, який вивчає біологію плюрипотентних стовбурових клітин людини. «До клінічного застосування цієї технології нам потрібно подолати ще безліч перешкод, але тепер у нас є інструменти, необхідні для просування до цієї важливої мети», — додав д-р Вальє.

Досліджуючи стовбурові клітини, вчені виявили, що їхні геноми зазвичай містять мутації, причина виникнення яких залишається невідомою. Проте за допомогою новітніх технологій секвенування їм вдалося знайти клітини з мінімальною кількістю мутацій, генетичні наслідки яких вони могли вивчити. Дослідники дійшли висновку, що для безпечного застосування розробленої ними технології необхідний ретельний скринінг стовбурових клітин.

На завершальному етапі проекту вчені взяли клітини безпосередньо у пацієнта з дефіцитом альфа1-антитрипсину і скоректували цю мутацію точно так, як і в клітинах стійкої лінії. Скоректовані клітини виробляли нормальний протеїн альфа1-антитрипсин.

«Оскільки на сьогодні не існує методів лікування цього захворювання, окрім трансплантації печінки, і враховуючи збільшення об'єму засобів на національну програму із трансплантації печінки унаслідок різкого збільшення частоти захворювань, терміново здійснюється пошук альтернативних методів лікування генетичних та інших захворювань цього органа», — зазначив Девід Ломас (David Lomas), професор біології дихання Кембриджського університету, який працює над вирішенням проблеми дефіциту альфа1-антитрипсину протягом 20 років. «Наше дослідження — найважливіший крок до розроблення методів лікування, що поліпшують стан пацієнтів і здатні врятувати життя людей з такими захворюваннями».

Джерело:

<http://www.lifesciencetoday.ru/index.php/vesti-iz-laboratoriy/540-new-gene-therapy-methods-correct-mutation-in-stem-cells-of-a-patient>

Ліки, що гальмують вікові зміни в клітинах мозку

У журналі *Neuroscience* з'явилося повідомлення про дослідження лікарських препаратів, що впливають на рівень вмісту важливих протеїнів у головному мозку і гальмують вікові зміни в його клітинах, які були проведено на тваринах. Очікується,

що отримані результати сприятимуть розробленню нових лікарських засобів, які поліпшуватимуть когнітивні функції у літніх людей.

Вікове згасання пам'яті асоційовано з поступовим погіршенням структури і функціонування синапсів (зон контакту між клітинами мозку), відповідальних за навчання і запам'ятовування, за які відповідає гіпокамп. Результати нещодавніх досліджень показали, що певною мірою сприяє цьому ацетилювання ядерних протеїнів гістонів — хімічний процес, що регулює експресію генів. Зокрема, воно впливає на здатність клітин головного мозку змінювати структуру і міцність з'єднання синапсів, що забезпечують зберігання інформації, тобто на процес, відомий як синаптична пластичність, що є клітинною ознакою пам'яті.

У дослідженні, що проводиться під керівництвом д-ра Цуй-Вей Це (Cui-Wei Xie) з Каліфорнійського університету у Лос-Анджелесі, було виявлено, що порівняно з молодими щурами для гіпокампу старих щурів був характерний менший вміст нейротрофічного фактора головного мозку BDNF — протеїну, який сприяє синаптичній пластичності, та нижчі рівні ацетилювання гістонів гена BDNF. Дія на гіпокамп старих тварин препаратом, що підсилює ацетилювання гістонів, сприяла відновленню вироблення BDNF і підняла синаптичну пластичність до рівня, характерного для молодих тварин. Учені вважають, що ці дані пояснюють, чому синапси стають менш ефективними і більш уразливими в процесі старіння, і можуть допомогти в розробленні нових лікарських засобів для запобігання когнітивному старінню і пов'язаних із ним нейродегенеративних захворювань, таких, зокрема, як хвороба Альцгеймера.

Дослідники також виявили, що оброблення гіпокампу старих тварин різними лікарськими препаратами, які активують рецептор BDNF, також усувала дефіцит синаптичної пластичності у старих щурів. Враховуючи, що ацетилювання гістонів відіграє важливу роль у тканинах всього організму, ці висновки можна вважати потенційним підходом до лікування вікових порушень пізнавальної функції без втручання в інші біохімічні процеси. На думку Гарі Лінч (Gary Lynch) із Каліфорнійського університету, порушення в регуляції генів, що відбуваються впродовж усього життя, позбавляють мозок ключового фактора росту і призводять до ушкодження механізму підтримки пам'яті, розумового процесу

і життєздатності нейронів. Ця інформація може допомогти в розробленні нових препаратів для відновлення згасаючої пізнавальної функції та гальмування вікових змін у клітинах мозку.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2011/12/111207113552.htm>

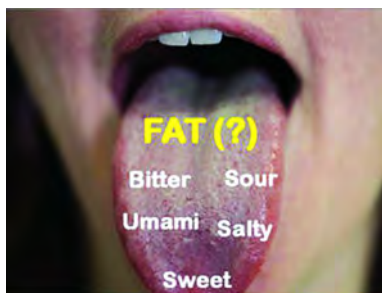
Смакові рецептори відповідають за пристрасть до жирної їжі: ідентифіковано рецептор для розпізнавання жиру у людини

Чому ми так любимо жирну їжу? За це відповідальні наші смакові рецептори. На думку дослідників з Медичної школи в Сент-Луїсі Вашингтонського університету, завдяки їм наш язик розпізнає жир і віднаходить у ньому відчуття задоволення. Вчені виявили, що зміни в певному гені можуть зробити людей більш-менш чутливими до смаку жиру.

Уперше знайдено рецептор людини, що має різну чутливість до смаку жиру, і висловлено припущення, що деякі люди можуть бути більш чутливими до наявності його в харчових продуктах. Результати цих досліджень опубліковано в онлайнвій версії журналу *Lipid Research*.

Дослідники встановили, що люди з певним варіантом гена CD36 набагато більше чутливі до наявності жиру в їжі порівняно з іншими.

Професор Нада А. Ебамрад (Nada A. Abumrad), яка вивчає питання ожиріння, вважає, що завданням учених є виявлення механізмів сприйняття людьми жиру в їжі, адже це впливає на вибір споживаних нами продуктів, а отже й на кількість жиру. Резуль-



Учені дійшли згоди в тому, що язик людини може відчувати п'ять різних смаків, але їхні думки розійшлися стосовно того, що наші смакові рецептори можуть їх виявити.

Проведені на цей час дослідження показали, що язик може розпізнавати смак жиру, і що зміни в певному гені можуть зробити людей більш або менш чутливими до смаку жиру в харчових продуктах

татом дослідження стало з'ясування однієї з можливих причин індивідуальної мінливості цієї функції. Можливо, як було нещодавно показано, в міру споживання людьми більшої кількості жиру, вони стають менш чутливими до нього, а відтак їм потрібно ще більше його споживати для отримання такого самого задоволення. Завданням вчених — з'ясувати, чи впливає здатність людей виявляти жир у харчових продуктах на споживання ними жирів, що зрештою неминуче призводить до ожиріння.

Люди, у яких виробляється більша кількість протеїну CD36, можуть легко виявити присутність жиру. З'ясувалося, що люди з найбільшою кількістю CD36 були у вісім разів чутливішими до наявності жиру порівняно з тими, у яких протеїну вироблялося приблизно на 50% менше.

Дослідники вивчили 21 людину з індексом маси тіла (ІМТ) 30 або вище, що свідчить про ожиріння. В одних досліджуваних був такий варіант гена, який сприяє виробленню більшої кількості CD36, у інших — набагато меншої. А в деяких — цей показник був проміжним.

Учасникам експерименту було запропоновано спробувати три чашки з розчином. В одній містилася невелика кількість жирного масла. Вміст двох інших за структурою був схожий на масло, але насправді не містив жиру. Учасникам експерименту пропонували вибрати чашку з жиром.

Автор цього проекту професор медицини М. Яніна Пепіно (M. Yanina Pepino) пояснила, що метою експерименту було з'ясування порогу, за якого люди могли визначити наявність жиру в розчині. Оскільки відчуття смаку жиру є досить суб'єктивним, тому й було зроблено спробу об'єктивно виміряти низькі концентрації жирів і виявити різницю, за якої виключалася можливість для учасників експерименту визначити жир за виглядом або запахом.

Жир є важливим компонентом дієти. Як людина, так і тварина, як правило, віддають перевагу їжі з високим вмістом жирів, тобто висококалорійним продуктам. Учені вважали, що люди визначали продукти з високим вмістом жирів в основному за текстурою. Однак проведене дослідження показало, що наявність жиру може змінити здатність нашого язика сприймати їжу, на зразок того, як відбувається розпізнавання на смак протеїнових речовин, поряд із солодким, кислим, гірким, солоним і гострим.

Після відкриття впливу CD36 подальші дослідження було спрямовано на визначення

ролі відповідних генів у щурів і мишей. Учені з'ясували, що генетично модифіковані тварини, які не мають працездатного гена CD36, не віддавали перевагу жирній їжі. Окрім того, тварини, у яких не міг вироблятися протеїн CD36, були ледве здатні перетравлювати жири.

Приблизно у 20% людей є ген CD36, пов'язаний з виробленням значно меншої кількості протеїну CD36. Це, у свою чергу, може означати, що вони менш чутливі до наявності жиру в їжі.

Професор Нада А. Ебамрад вперше ідентифікувала CD36 як протеїн, що полегшує засвоєння жирних кислот. На її думку, глибше розуміння того, як протеїн функціонує у людей, може мати важливе значення в боротьбі з ожирінням.

Люди з ожирінням більш схильні до ризику розвитку серцево-судинних захворювань, інсульту, цукрового діабету 2-го типу, деяких видів раку, артриту та інших проблем. Випадки ожиріння різко зросли за останні 30 років, оскільки значно більше людей почали вести малорухливий спосіб життя, водночас в їхній раціон дедалі більше входили гамбургери, картопля фрі, смажена курка та інші жирні продукти.

Раціон харчування може вплинути на чутливість тварин до жирів, а також на кількість CD36, що синтезується. З'ясувавши роль раціону тварин з високим вмістом жирів, що може призвести до зменшення вироблення CD36, можна було б, у свою чергу, зробити і людину менш чутливою до жирів. Виходячи з отриманих у цьому дослідженні результатів, є підстави припустити, що у людей з ожирінням може бути синтезовано меншу кількість протеїну CD36. Тому видається логічним припущення, що кількість синтезованого протеїну можна було б змінити як генетично, так і скоректувавши раціон.

У раціон людини жир входить переважно у формі тригліцеридів, які складаються з жирних кислот, зв'язаних із гліцеролом. У тестових випробуваннях дослідження проводили з двома типами жирів. У одних чашках були вільні жирні кислоти, а в інших — тригліцериди.

Після проведення дослідження на тваринах стало очевидно, що CD36 активується жирними кислотами, а не тригліцеридами. Проте людина мала змогу спробувати і те й інше. Пепіно вважає, що, ймовірно, тут відіграє роль активність ензиму ліпази в слині, що руйнує тригліцериди, звільняючи жирні кислоти, а жир залишається в роті.

Щури, наприклад, можуть синтезувати ліпазу слини, а ліпаза швидко почне пере-

травлювати тригліцериди і перетворювати їх на жирні кислоти. У людини ж роль ліпази не настільки виражена. У проведених експериментах люди могли виявляти жир незалежно від того, чи це тригліцериди, чи жирні кислоти.

На основі проведених експериментів на тваринах учені дійшли висновку, що на інтенсивність синтезу CD36 впливають не тільки успадковані гени, а й раціон живлення: багата на жири їжа знижує чутливість до них язика.

Та коли дослідники додали до раціону орлістат, особи, які брали участь у цьому дослідженні, ще споживали жирні кислоти, але були менш здатними виявляти тригліцериди. Орлістат інгібує ліпазу в порожній рота, шлунку і кишечника, і його часто призначають людям з ожирінням, аби запобігти споживанню ними жиру в харчових продуктах. Орлістат викликає зміну смакових відчуттів і може вплинути на переваги людини в їжі.

Джерело:
<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/01/120112134336.htm>

Генна терапія для лікування поширеної форми сліпоти

Дослідники Університету Флориди розробили новий метод генної терапії для лікування поширених форм сліпоти, якою вражаються як діти, так і дорослі. Метод полягає в заміні ушкодженого гена в оці нормальною робочою копією, яка постачає протеїн, необхідний для функціонування світлочутливих клітин в оці.

Результати дослідження опубліковано в он-лайн в Працях Національної академії наук США (*Proceedings of the National Academy of Sciences*).

Перш ніж випробувати метод генної терапії на людях, слід здійснити декілька складних і дорогих етапів досліджень, але вже зараз зрозуміло, що пройшовши цей шлях, можна очікувати на великі досягнення в офтальмології.

Один зі співавторів цього дослідження Уільям Таусвірс (William W. Hauswirth), професор офтальмолог Університету Флориди, наголосив, що якби незрячий або людина, яка слабо бачить, могли б читати, вільно рухатися чи вести машину, то їхнє життя відразу ж кардинально змінилося б. Відтворення відсутнього гена є однією з кінцевих стадій лікування хвороб очей та відновлення важливих зорових функцій.

Дослідники поставили перед собою завдання: вирішити проблему пігментної дегенерації

сітківки, пов'язаної з X-хромосою — спадкового захворювання, що є однією з основних причин розвитку сліпоти, яка передається від матерів-носіїв до синів. Дівчата мають схильність до цього захворювання, але не втрачають зір, як це спостерігається у хлопчиків. У США близько 100 000 людей мають форму пігментної дистрофії сітківки — захворювання, що характеризується початковою втратою периферичного зору і нічного бачення, що зрештою переходить у тунельний зір, тобто в сліпоту. У деяких випадках втрата зору збігається з появою темних ділянок на зазвичай оранжевого кольору сітківці.

Учені Університету Флориди нещодавно закінчили перше клінічне дослідження методу генної терапії, спрямованої на повернення зору пацієнтам з природженим амаврозом Вебера. Це захворювання, що супроводжується ушкодженням внутрішньої оболонки ока, діагностують приблизно у 5% пацієнтів із пігментною дегенерацією сітківки.

Професор нейробиології Університету Каліфорнії Джон Г. Фланнері (John G. Flanery) називає це дослідження великим кроком уперед, який показав, що генна терапія є безпечною і може підтримувати людей упродовж багатьох років. Він вважає, що потенціал цього дослідження величезний, оскільки воно спрямоване на лікування саме тієї форми захворювання, яка вражає багатьох людей.

Форма пігментної дегенерації сітківки, пов'язана з X-хромосою, що розглядається в новому дослідженні, є найбільш поширеною дегенерацією світлочутливих клітин — фоторецепторів. Це захворювання виникає в ранньому віці, тому, хоча постраждали діти часто народжуються зрячими, згодом вони поступово втрачають зір.

Співавтор цього дослідження, професор Університету Флориди Альфред Льовін (Alfred S. Lewin), повідомив, що такі діти часто сліпнуть на другому 10-літті життя. Дослідники Університету Флориди і Університету штату Пенсільванія виконали технічно складне завдання вбудовування робочої копії ушкодженого гена у вірус, що слугував носієм для транспортування його у відповідну частину ока. Вони також клонували генетичний «перемикач», який має включити ген, як тільки той опиниться у відповідному місці, і таким чином він зможе розпочати виробляти протеїн, необхідний для функціонування ушкоджених клітин ока.

Після успішних лабораторних випробувань дослідники застосували розроблений

підхід на тваринах, у яких пігментна дистрофія сітківки, пов'язана з X-хромосою, трапляється в природі. Уведені гени потрапляли тільки в потрібне місце в організмі. Це дослідження показало, як могла б працювати генна терапія стосовно організму людини.

Учені планують провести повторне, детальніше і триваліше дослідження і розробити безпечну для людини версію вірусного вектора. Це дасть змогу проводити клінічні випробування на людях для відновлення зору.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/01/120123163412.htm>

Учені вперше в історії виростили частину серця зі стовбурових клітин

Британські вчені вперше в історії виростили частину серця, використавши як «будівельний матеріал» стовбурові клітини. За словами д-ра Мегді Якуба, британського кардіолога, який керував дослідженням, приблизно через три роки лікарі всього світу зможуть використовувати в операціях із трансплантації штучно вирощені компоненти серця.

Лікарі з британського госпіталю Хеафілд змогли виростити природну тканину, яка працювала точнісінько як серцеві клапани, відповідальні за кровотік в організмі людей. На це дослідження вчені витратили майже 10 років. У зазначеному проекті беруть участь фізики, фармакологи, лікарі та мікробіологи.

Фахівці вважають, що це досягнення є важливим кроком на шляху штучного вирощування людських органів.

Як відомо, стовбурові клітини є видом незрілих клітин живих організмів, кожна з яких здатна диференціюватися. Унікальність цих клітин полягає в тому, що з них можна виростити будь-яку іншу тканину організму. Досі вчені вирощували зі стовбурових клітин хрящі, сухожилля та міхури, які є менш складними порівняно із серцевим клапаном. У майбутньому, як прогнозують фахівці, стовбурові клітини використовуватимуть для відновлення ушкоджених або втрачених органів. Д-р Мегді повідомив, що на сьогодні його команда працює над складнішим завданням — вирощуванням зі стовбурових клітин повноцінного серця. «Це дуже складний процес, проте він у принципі можливий. Думаю, що на цей проект у нас може піти ще 10 років», — зазначив він.

Лікарі розповіли, що для вирощування клітин серцевого клапана вони використували стовбурові клітини, узяті з кісткового мозку. Сам же процес росту клітин відбувався на штучних протеїнових тканинах, розміщених у лабораторних ємностях. У результаті після закінчення експерименту було сформовано серцеві клапани діаметром 3 см.

Учені вважають, що в разі якщо клапани виростити зі стовбурових клітин пацієнта, якому вони мали б бути пересажені, процес відторгнення практично виключений, і пацієнтові навіть не довелося б призначати жодних ліків. Проте на практиці це майже неможливо, оскільки банки стовбурових клітин на сьогодні вкрай малі, і тому фахівці розпочали вирощувати серцеві клапани, які були б універсальними, тобто з більшою чи меншою мірою ймовірності підходили широкому загалу пацієнтів, які мають у них потребу.

На думку британських фахівців, варто було б якнайшвидше випробувати такі клапани в практичних ситуаціях, адже якщо вони виявляться функціональними, це відкриє шлях до масштабніших генерацій органів і тканин зі стовбурових клітин.

Джерело:

<http://www.cybersecurity.ru/prognoz/142807.html>

Нанотехнології допоможуть прискорити процес тестування ліків

Оцінка ефективності нових лікарських препаратів проходитиме швидше завдяки новому методу з використанням квантових точок, розробленому вченими з Університету Центральної Флориди (University of Central Florida, США). Тестування деяких препаратів може тривати десятиліття або навіть довше, проте професор Свadeshмукул Сантра (Swadeshmukul Santra) і його команда створили електронний квантовий прилад (Qdots) — зонд, який починає «світитися» з наближенням препарату до ракових клітин.

Результати цього дослідження опубліковані в онлайн-версії журналу *Biomaterials*.

Метод ґрунтується на використанні мікроскопа, за допомогою якого можна побачити зону, в яку було доставлено препарат, і визначити його кількість, оскільки під впливом спеціального освітлення або в разі застосування магнітно-резонансних методів дослідження зонд випромінює червоне світло.

За необхідності проведення тривалих випробувань препарату зображення можна отримувати знов і знов без втрати оптичного або

магнітно-резонансного сигналу. Учені зможуть вимірювати розмір пухлини і кількість ракових клітин, які «спалахують» порівняно з первісною необробленою пухлинною тканиною.

За допомогою цього методу можна визначити, чи справляє препарат лікувальну дію в сайтах-мішенях. Метод значно простіший порівняно із застосуванням на цей час процесом видалення ракових пухлинних тканин і визначення їхньої маси через певні регулярні проміжки часу для з'ясування ефективності препарату на тваринах.

Учені, які працюють у галузі оцінювання ефективності протипухлинних препаратів, протягом багатьох років вивчали можливість застосування цього методу. І ось нарешті вдалося випробувати його на живій клітині, а не тільки *in vitro*.

За словами керівника Центру нанотехнологій при Університеті Центральної Флориди (UCF's NanoScience Technology Center) Сьюдіптала Сіла (Sudiptal Seal), результати, отримані науковою групою Сантра, мають велике наукове значення. Він назвав їх проривом у галузі дослідження Qdot і додав, що цей новий діагностичний метод, поза сумнівом, вплине на дослідження в галузі наномедицини.

Сантра і його група для створення зонда застосовували напівпровідниковий Qdot. Завдяки невеликому розміру і кристалічній структурі Qdot під час збудження демонструє унікальні оптичні й електронні властивості, що ідеально відповідають потребі отримання постійного й чіткого зображення під впливом специфічного освітлення.

Для цих досліджень використовували наночастинки супермагнетика оксиду заліза, доповнені сателітами CDS: Mn / ZNS Qdots, що несуть протипухлинний агент — інгібітор STAT3. Оптичний сигнал Qdots включається за взаємодії зонда з клітинами пухлини.

Сантра вважає, що розроблений його групою метод незабаром може бути застосований для тестування лікарських препаратів, зокрема використовуваних для лікування злоякісних новоутворень.

Джерело:

<http://nanotechweb.org/cws/article/journnews/48214>

Обнадійливі результати, отримані за допомогою трансплантації стовбурових клітин у разі черепно-мозкової травми

У журналі *Neurosurgery* з'явилося повідомлення про результати досліджень, проведених на щурах з ушкодженим мозком,

які показали, що стовбурові клітини, введені через сонну артерію, потрапляли безпосередньо в мозок, де вони значною мірою поліпшували функціональне відновлення.

Метод прямої ін'єкції в сонну артерію разом з тією або іншою формою оптичних зображень *in vivo* для відстежування стовбурових клітин після трансплантації може бути частиною нових підходів до трансплантації стовбурових клітин за черепно-мозкової травми (ЧМТ) у людей. Керує цим дослідженням д-р Тошійя Осанаї (Toshiya Osanai) з Університету Хоккайдо.

Передова технологія оброблення зображень дає змогу дослідникам простежити за стовбуровими клітинами

Дослідники оцінили нову «внутрішньо-артеріальну» техніку трансплантації стовбурових клітин у щурів. Протягом семи днів після ЧМТ індуковані стовбурові клітини, отримані з кісткового мозку щурів, вводили в сонну артерію. Мета дослідження полягала в тому, щоб доставити стовбурові клітини безпосередньо в мозок, виключаючи їх потрапляння в загальний кровотік.

Перед ін'єкцією стовбурові клітини були помічені так званими квантовими точками, що є наночастинками з біосумісного флуоресціюючого напівпровідникового матеріалу. Ці квантові мітки випромінюють світло в ближній інфрачервоній ділянці набагато більшої довжини хвилі та проникають через кістки і шкіру. Це дозволило дослідникам неінвазивно контролювати стовбурові клітини протягом чотирьох тижнів після трансплантації.

Використовуючи цю методику формування оптичного зображення в природних умовах, д-р Осанаї та його колеги змогли побачити, що введені стовбурові клітини дійсно відразу проникали безпосередньо в мозок, не потрапляючи при цьому в загальний кровотік. Протягом трьох годин стовбурові клітини починали мігрувати з найменших кровоносних судин мозку (капілярів) в ділянку черепно-мозкової травми.

Після чотирьох тижнів у щурів, яким були введені стовбурові клітини, спостерігалося істотне відновлення рухової функції, тимчасом як стан тварин контрольної групи не поліпшувався. Аналіз тканини мозку щурів експериментальної групи підтвердив, що введені стовбурові клітини диференціювалися в різні типи клітин мозку і брали участь у процесі відновлення ушкоджених тканин.

Подальший прогрес клітинної терапії для лікування черепно-мозкової травми у людей

З часом введення стовбурових клітин стане важливим методом лікування хворих з черепно-мозковими травмами та інсультом. Стовбурові клітини кісткового мозку, як і клітини, використовувані в новому дослідженні, є перспективним джерелом донорських клітин. Проте залишається ще багато питань щодо оптимальних термінів, дози і способу доставлення стовбурових клітин.

Фахівці вважають, що з часом введення стовбурових клітин стане важливим методом лікування пацієнтів з травматичними ушкодженнями головного мозку та інсультами. Потенційним джерелом терапевтичних клітин є кістковий мозок.

У нових експериментах на тваринах трансплантацію стовбурових клітин проводили через тиждень після ЧМТ — «клінічно значущий» час, оскільки для цього потрібно принаймні стільки часу, щоб його було достатньо для створення стовбурових клітин з кісткового мозку. Введення стовбурових клітин в сонну артерію — порівняно проста процедура, яка доставляє клітини безпосередньо в мозок.

Зазначений спосіб побудови зображення може бути корисним для контролю наслідків трансплантації стовбурових клітин в організмі людини. Однак, відстежування долі стовбурових клітин у людей значно складніше, ніж у випадку з тваринами, оскільки кістки черепа і шкіра голови у них набагато товщі, ніж у щурів. Учені вважають, що можна проводити *in vivo* подальші дослідження оптичного зображення в клінічних умовах.

Джерело:

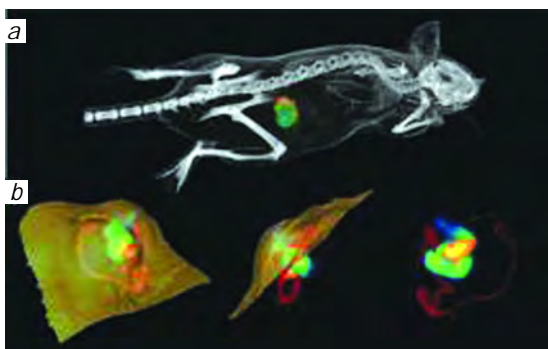
<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/02/120201104516.htm>

Бактерії ефективно виявляють пухлини у мишей шляхом їх візуалізації

Створено метод, що дає змогу з високою точністю визначити місцезоналення і межі пухлини за допомогою люмінесціюючих бактерій.

Уперше було показано, що біолюмінесцентні бактерії, для яких мішенню є пухлина, давали точну картину 3D-зображення пухлин у мишей, що надалі могло використовуватися для цільового доставлення ліків при онкологічних захворюваннях.

Особливі пробіотичні бактерії, на кшталт виявлених у багатьох йогуртах, вводили внутрішньовенно мишам, що мають пухлини, після чого дослідники отримували біо-



Сканограма живої миші (з використанням комбінації 3-вимірної біоломінесценції і комп'ютерної томографії) для виявлення місцезнаходження як бактерії, так і пухлини (а). Внизу (б) — 3 різні види обертального руху, збільшення пухлини; показано точне місцеположення живих бактерій (рожевий/жовтий колір) у пухлині (зелений/синій) і основній частині кровопостачання пухлини (червоний).

Зображення: PLoS ONE, DOI: 10.1371/journal.pone.0030940

люмінесцентні зображення всього тіла. За допомогою 3D-зображення було одержано інформацію щодо кількості та місцезнаходження бактерій, точно визначено місцеположення їх у пухлині й отримано повнішу інформацію про взаємодію бактерій з пухлиною. Дотепер такі світні бактерії застосовували у двовимірних системах візуалізації, але від плоскої картинки не можна отримати повну інформацію про розподіл бактерій усередині організму.

На думку авторів, роботою яких керував Марк Тенгней (Mark Tangney) з Університетського коледжу Кірка в Ірландії, це було справжнє відкриття, оскільки досі вчені використовували люмінесценцію для апроксимації положення тест-мікроорганізму в організмі, що уможливило подальше проведення експериментів з використанням різних методів для визначення точного місцеположення новоутворень. Проведене дослідження показує, що можна використовувати бактерії, які містили б діагностичні або терапевтичні агенти, спеціально для цілеспрямованого лікування онкологічної хвороби.

Джерело:

<http://medicalxpress.com/news/2012-01-bacteria-effectively-tumors-enabling-tumor.html>

Нова протипухлинна вакцина

Дослідницька група під керівництвом професора Кінгстона Мілса (Kingston Mills) з Триніті-коледжу в Дубліні розробила новий метод лікування онкологічних захворювань, заснований на дії імунної відповіді на

злюкисні пухлини. Розробку було запатентовано, і на даному етапі вчені планують створити вакцину для клінічного застосування з метою лікування цих захворювань.

Минулого року було видано ліцензію на використання першої протипухлинної вакцини SIPULEUCEL-T (Provenge™) для лікування хворих раком простати, не чутливих до гормонотерапії. На жаль, ця вакцина тільки незначною мірою поліпшує стан пацієнтів і подовжує їхнє життя в середньому на 4,1 місяця. Вакцини для профілактики інфекційних захворювань вельми ефективні для генерації імунної відповіді, що запобігає зараженню бактеріями або вірусами. Імунна система також може захистити нас від розвитку злюкисних новоутворень, і теоретично ця вакцина має бути ефективною в їх лікуванні. Проте на практиці виявилось, що, на відміну від інфекційних захворювань, пухлини, утворені зі здорових клітин людини, а не з чужорідних молекул або антигенів, здатні викликати імунну відповідь. Однак пухлини продукують молекули, що пригнічують ефективність імунної системи. Вони створюють регуляторні клітини, що пригнічують імунну відповідь, яка потенційно може позбавити організм від пухлин.

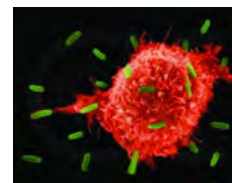


Фото: Trinity College Dublin

Наукова група професора Мілса розробила нову вакцину та імунотерапевтичний підхід, який може подолати ці перешкоди, що є потенціалом для істотного поліпшення існуючих технологій.

Нова терапія ґрунтується на комбінації молекул, які управляють імунною системою для контролю регуляторних сайтів, одночасно підвищуючи захисні функції білих кров'яних клітин, так званих Т-кілерів, що здатні розпізнавати і знищувати пухлинні клітини. Новий метод вакцинації виявився ефективним на доклінічній стадії досліджень під час лікування низки онкологічних захворювань на модельних організмах — мишах.

Результати цього дослідження опубліковано в онлайнній версії *Cancer Research*, провідного журналу Американської асоціації досліджень раку.

Джерело:

http://insciences.org/article.php?article_id=10618

Як еволюціонують віруси, стаючи в повному розумінні смертельно небезпечними

Дослідники з Державного університету Мічигану (MSU) продемонстрували, наскільки швидко може еволюціонувати новий вірус, зазнавши небезпечної мутації і спричинюючи летальне захворювання (фото). Результати дослідження опубліковано в журналі *Science*.

Учені вперше показали, як еволюціонували фаги лямбда, заражаючи клітини хазяїна з набуттям чотирьох мутацій. Ці віруси інфікують бактерії, зокрема бактерії кишкової палички *E. coli*. Один з учасників експерименту Джастін Майєр (Justin Meyer) наголосив, що фаги лямбда не становлять небезпеки для людини, однак результати цього дослідження показали, як можуть еволюціонувати віруси з набуттям нових і потенційно летальних властивостей.



Фото: Michigan State University/Jeremy Polk/NSF

Спочатку дослідники були здивовані, побачивши, як фаг лямбда, еволюціонуючи, набуває цих нових властивостей, здатності атакувати клітину хазяїна і швидко проникати в неї за допомогою специфічних рецепторів. З повторенням експерименту все відбувалося так само.

Нещодавно група американських і голландських учених створила новий, смертельно небезпечний штамп пташиного грипу. Хоча цьому вірусові потрібно всього 5 нових мутацій для здатності заражати людину, маловірогідно, що він зможе відразу отримати всі необхідні мутації природним шляхом. Проте за умови створення сприятливих умов вірус зможе набутися всіх необхідних мутацій саме таким чином.

Джерело:

<http://www.sciencedaily.com/releases/2012/01/120126224526.htm>

Створено нову методику репарації ушкодженої РНК

Учені з Дослідницького інституту Скріппса (The Scripps Research Institute), шт. Флориди, США, виявили сполуки, які можуть допомогти

репарації специфічного типу дефектів у молекулах генетичного матеріалу РНК. Новий підхід дасть змогу пришвидшити розроблення терапевтичних методів лікування різних небезпечних захворювань, таких як хвороба Хантінгтона, спіноцеребральна атаксія та хвороба Кеннеді.

Результатом цього дослідження, опублікованого 17 січня 2012 року в он-лайнному випуску журналу *ACS Chemical Biology*, є метод визначення сполуки, здатної до репарації, зокрема РНК, що несе структурний блок, названий «експансією триплетних повторів». Ця серія з трьох нуклеотидів, що повторюється багаторазово в генетичному коді уражених індивідумів, асоційована з розвитком різноманітних неврологічних і нервово-м'язових патологій.

Керівник дослідження Метью Дісней (Matthew Disney) з інституту Скріппса повідомив, що протягом тривалого часу вважали, що токсичні властивості мав тільки протеїн. Проте нещодавно була показана токсичність як протеїну, так і молекули РНК. Відкриття невеликої молекули, яка зв'язується з РНК і нейтралізує її токсичність, не тільки ще раз демонструє, що РНК притаманні токсичні властивості, але й відкриває нові можливості для розроблення терапевтичних методів лікування хворих, адже за цього підходу вдалося чітко показати, що невеликі молекули можуть усунути цей тип дефекту молекули РНК.

У своєму дослідженні вчені використовували молекулу під назвою 4', 6-діамідино-2-феніліндол (DAPI) як хімічний і структурний шаблон для пошуку схожих, але активніших сполук, що інгібують токсичний триплетний повтор CAG. Одна з таких сполук у подальшому виявилась ефективною для нейтралізації токсичності РНК в культурі клітин, отриманих від пацієнтів, продемонструвавши цим самим оздоровлення на ранній стадії захворювання.

Дісней пояснив, що токсичні РНК негативно впливають на інші протеїни, які відіграють важливу роль у процесі оброблення РНК, що також робить свій внесок у розвиток різних захворювань. Виявлена нова сполука зв'язує токсичні РНК, інгібуючи зв'язування протеїну й нейтралізуючи його токсичність. Оскільки розроблення лікарських препаратів, мішенню яких є РНК — украй складне завдання, результати цих досліджень можуть сприяти розробці і використанню препаратів для репарації ушкоджених РНК, що спричинюють цілу низку інших РНК-опосередкованих захворювань.

Дослідження в цьому напрямі тривають.

Джерело:

<http://www.alphagalileo.org/Organisations/ViewItem.aspx?OrganisationId=8456&ItemId=116120&CultureCode=en>

Репарація неправильно спарених основ ДНК відбувається тільки під час короткотривалих сигналів

В еукаріотів — організмів, до яких належить і людина, ключовим механізмом, що забезпечує виживаність, є здатність певних протеїнів швидко і якісно виправляти генетичні помилки, що виникають у процесі реплікації ДНК під час утворення нових клітин.

У статті, опублікованій в журналі *Science*, учені з Інституту онкології Людвіга (Ludwig Institute for Cancer Research) і Медичної школи при Каліфорнійському університеті в Сан-Дієго (University of California, San Diego School of Medicine), шт. Каліфорнія, США, відкрили механізм, за допомогою якого ці протеїни виконують свої функції, пов'язані з процесом, що його названо репарацією неправильно спарених основ ДНК (MMR).

На думку Людвіга, одним з основних питань стосовно MMR є те, яким саме чином протеїни MMR визначають «неправильний» нуклеотид в ДНК. Наприклад, якщо гуанін (G) утворює «неправильну» пару з тиміном (T), то помилковим є G чи T? Помилковий вибір нуклеотида призведе до мутації, а не до виправлення помилки.

Використовуючи як модельний організм *Saccharomyces cerevisiae* або пекарські дріжджі, дослідники під керівництвом професора Річарда Д. Колоднера (Richard D. Kolodner) з Інституту Людвіга виявили, що новореплікована ДНК створює тимчасовий сигнал, який виникає через 10–15 хв після реплікації і допомагає ідентифікувати його як новий, а отже, потенційний об'єкт для MMR.

Фактичний сигнал не було ідентифіковано, але дослідники вважають, що в одноланцюговій ДНК або деяких протеїнах, пов'язаних з реплікацією, є якісь сигнальні ніки (точки). На цей час учені працюють над тим, аби визначити точне положення цього сигналу.

Отримані результати у поєднанні з раніше опублікованими даними про першу візуалізацію MMR у живій клітині дають змогу точніше пояснити, як еукаріоти усувають помилки реплікації ДНК, що може призвести до дефектів і розвитку онкологічних захворювань.

Як ці організми ідентифікують новосинтезований ланцюжок ДНК, їй досі ще не з'ясовано. Утім, отримані результати суттєво змінили уявлення вчених про те, як працює механізм MMR.

Джерело:

<http://breakingnews24hrs.net/health/dna-mismatch-repair-happens-only-during-a-brief-window-of-opportunity/>

Епігенетика: поворотний пункт в нашому розумінні спадковості

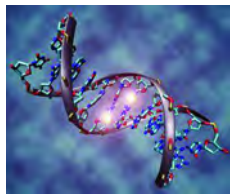
У статті, опублікованій в журналі *Nature*, генетики зі Стенфордського університету Анна Бруне (Anne Brunet) і її колеги описали серію експериментів, які показали, що нематоди, вирощені в однакових умовах, мали абсолютно різну тривалість життя. Деякі особини були виключно довгоживучими, причому їхні нащадки навіть через три покоління також були довгоживучими. Очевидно, що тривалість життя передавалася спадково. Та все ж черв'яки, як коротко-, так і довгоживучі, були генетично ідентичними.

Отримані результати стосовно того, що успадковані відмінності неможливо пояснити видозмінами, які відбуваються в самих генах, знаходять дедалі більше підтверджень, частково тому, що вчені тепер уже знають: гени — не єдині об'єкти спадковості. У них є помічники. На перший погляд видається, що немає нічого незвичайного: це — метил-, ацетил- і фосфорильні групи, що прикріплюються до асоційованих з ДНК протеїнів, а іноді навіть до самої ДНК, і поводяться, у кращому разі, як дармоїди. Їхня форма далека від витонченості завитків ДНК, що формує гени, і швидкоплинна, стираючись у певному сенсі, на відміну від генів, які передаються з покоління в покоління впродовж мільйонів років. Та все ж вони непомітно виявляють свою дію, модифікуючи ДНК і контролюючи гени, впливаючи тим самим на хаос нуклеїнових основ і амінокислот. І саме із цієї причини багато вчених вважають, що відкриття цих об'єктів наприкінці ХХ ст. стало переломним моментом у нашому розумінні спадковості, як, можливо, однієї з найбільших революцій у сучасній біології — виникнення епігенетики.

Епігенетика і стан хроматину

У лабораторії Бруне досить серйозно ставляться до епігенетичної спадковості. У журналі *Nature* вперше було описано це явище стосовно довголіття, що передається з покоління в покоління. Це велике досягнення стало можливим під час проведення досліджень, спрямованих на розуміння ролі хроматину в успадкуванні тривалості життя.

Хроматин — компактно упаковані волокна ДНК — існує або в конденсованому, або в релаксованому стані. Припускають, що хроматин переходить у конденсовану форму, щоб полегшити розділення хромосом для розподілу їх серед дочірніх клітин. Проте сегменти волокна можуть зберігати цю форму і тоді, коли поділ клітини не



Молекула ДНК, метильована на обох нитках на центральному цитозині
(фото: Крістоф Бік, Інститут інформатики Макса Планка. Зображення використовується з дозволу автора)

відбувається, унаслідок чого гени, що опинилися в цих сегментах, фіксуються в неактивному стані. З другого боку, інші фрагменти волокна розпрямляються і відкриваються, полегшуючи регуляторним протеїнам доступ до ДНК і активуючи гени.

Деякі епігенетичні модифікації, такі як приєднання метильних груп до гістонових протеїнів, що виконують роль бобін, на які намотується ДНК для ущільнення хроматину, відповідальні за підтримку волокна у відкритому стані. Проте модифікації є динамічними. Наприклад, у процесі розвитку хімічні групи прикріплюються до гістонів або ДНК і відриваються від них у певному порядку, їх постійно змінюваний «танець» сприяє виконанню важливих функцій, зокрема створення профілів експресії генів для різних типів тканин та інгібування батьківського гена. Це явище відоме як імпринтинг.

Протягом життя організму модифікації також можуть накопичуватися. Оскільки деякі з них здатні змінити ДНК, що передається наступним поколінням (у яйцеклітині і сперматозоїдів) і, можливо, не роблять позитивного впливу, вони стираються під час репродукції, і хроматин повертається у первісний стан. Проте цей механізм не завжди спрацьовує, тому деякі модифікації залишаються непоміченими. Таким чином, зміни хроматину в батьківській ДНК, які не були перепрограмовані, передаються наступному поколінню.

Епігенетична спадковість тривалості життя у нематод

З'являється дедалі більше доказів того, що епігенетичні модифікації у багатьох видів є трансгенераційними (успадкоковуються через декілька поколінь). Як приклади можна навести колір шерсті ссавців, очей у дрозофіли, симетрію у квітів і, зрештою, тривалість життя у *C. elegans*. Ці результати надзвичайно цікаві, водночас вони ставлять гострі питання про, здавалося б, універсальний характер епігенетики.

Проте робота із розшифрування епігенетичних змін та їхніх наслідків є досить складною. Щоб виявити роль метилування в довголітті нематод, Брюне і його колеги почали оцінювати тривалість життя *C. elegans*, позбавлених одного з трьох генів — *ash-2*, *wdr-5*, *set-2*. Раніше було встановлено, що зниження або відсутність

експресії зазначених генів подовжувало тривалість життя цього виду. Потім нематоди з генетичними дефектами схрестили з нематодами нормального генетичного складу. При цьому спаровування за Менделем зумовило появу особин як дикого типу (генетично нормальних), так і особин-носіїв генетичних змін. Визначення тривалості життя проводили для кожної із цих груп популяцій і порівнювали дані з тривалістю життя контрольної популяції (нематоди дикого типу від батьків дикого типу). Одержані результати показали, що нематоди дикого типу генетично ідентичні особинам з групи контролю, але схрещені з мутантами-батьками, жили на 20–30 відсотків довше.



Різниця в забарвленні цих двох генетично ідентичних мишей зумовлена епігенетичною модифікацією
(фото: Jennifer Cropley, Victor Chang Cardiac Research Institute Image)

Таким чином, генетичні дефекти, хоча й не успадковані, справляли вплив на генетично нормальне потомство, наділяючи його такою самою тривалістю життя, як і в батьків. Група вчених зі Стенфорда дійшла висновку, що ці зміни були пов'язані з метилуванням.

Трансгенераційне успадкування набутих характеристик у людини

Епігенетика дала життя ламаркізмові й раніше знехтуваній ідеї, згідно з якою характеристики, надбані протягом життя індивідуума, є спадковими. Утім, багатьох учених вже надихнула ця ідея. Брюне зазначив, що, очевидно, це — схвалення концепції Ламарка, що реставрується (стосовно певних випадків). Це може змінити наше розуміння спадковості в тому сенсі, що до положень генетики Менделя можна було б додати ще один компонент, можливо другорядний, але реальний.

При цьому також додається ще один рівень значущості умов, важливий для нашого повсякденного життя. Низка чинників навколишнього середовища — від поживних речовин до температури і присутності хімічних речовин, здатних змінити експресію генів, а також тих факторів, яким вдалося проникнути в хроматин зародкової лінії і уникнути пере-

програмування, теоретично можуть бути передані нашим дітям і, можливо, нашим онукам.

І хоча деякі дослідження показали, що трансгенераційна епігенетична спадковість може виникнути у людини, фактично доказів для цього ще недостатньо. Серед найбільш переконливих на сьогодні можна вважати синтетичну сполуку естрогену діетилстильбестрол (DES), який використовували в середині XX століття для запобігання викидням у вагітних жінок. Проте DES значною мірою збільшує ризик появи природжених дефектів. Це також пов'язано з підвищеним ризиком розвитку раку піхви і молочної залози у дочок та підвищеним ризиком розвитку раку яєчників у внук по материнській лінії жінок, що зазнали дії DES під час вагітності. Результати досліджень на мишах показали, що неонатальна дія DES спричинює аномалії в метилуванні генів, залучених у розвиток раку матки. У мишей ці аномалії, як і раніше, передаються через два покоління, що свідчить про існування трансгенераційного ефекту.

З урахуванням мінливого характеру спадкових епігенетичних модифікацій схоже, що попри десятиліття досліджень учені, як і раніше, не можуть вийти за межу розуміння цього явища. Проте перспективи видаються безмежними, навіть з урахуванням того, як успадковані епігенетичні зміни мають зачіпати експресію генів у зародковій лінії, що рідко вдається навіть генетичним мутаціям. Але стрімке зростання поширеності таких захворювань, як ожиріння, діабет і аутизм, не має чіткої генетичної етіології, і в більшості випадків, за словами Брюне, створюється враження, що епігенетика впливає на всі ці комплексні процеси.

Учені продовжують шукати остаточний доказ існування трансгенераційної епігенетичної спадковості у людини, однак вже зараз можна зробити висновок, що наш спосіб життя і те, що ми їмо, п'ємо, чим дихаємо, може безпосередньо вплинути на генетичне здоров'я наших нащадків.

Джерело:

<http://blogs.scientificamerican.com/guest-blog/2012/01/16/epigenetics-a-turning-point-in-our-understanding-of-heredity>

Біотехнологи створили з ДНК біоробота

Британські та японські вчені зібрали мікроскопічний «мотор» з декількох молекул ДНК, який може пересуватись у довільному напрямі, прочитувати нові інструкції та коректувати свій курс відповідно до них.

За останнє десятиліття біотехнологи розробили безліч мініатюрних біопристроїв, що повторюють функції їхніх штучних анало-

гів. Так, існує вже декілька десятків ДНК-комп'ютерів, повноцінний обчислювальний пристрій і дисплей з колоній кишкової палички, — повідомляють *PIA Новини*.

Хіросі Сугіяма з Кіотського університету і його колеги використовували короткі послідовності ДНК для створення пристрою, який можна вважати першим ДНК-роботом. Він здатен пересуватись у просторі згідно з інструкціями, отримуваними в режимі реального часу або зчитуваними зі внутрішньої пам'яті.

Учені об'єднали короткі одноланцюгові послідовності ДНК в єдиний довгий ланцюг, окрему ділянку якого виділено під «пам'ять» пристрою. Такий «мотор» призначено для пересування доріжкою з ланцюжка ДНК — до неї з однаковими проміжками прикріплено короткі «стовпчики», за допомогою яких пристрій пересувається від одного вузла маршруту до іншого.

На цій доріжці є й особливі «стоп-вузли», які блокують подальший шлях мотора. Для продовження подорожі пристрій має зв'язатися з вузлом згідно з однією з інструкцій, закодованих у пам'яті винаходу Сугіяма та його колег. Окрім того, блокування шляху можна зняти вручну за допомогою розчину молекул, ідентичних інструкціям, записаним у пам'яті робота.

Пам'ять пристрою або зовнішні молекули з'єднуються з довгою молекулою ДНК на вершині стоп-вузла, яка заважає рухові мотора. Це перетворює їх на мішень для рестриктази — спеціального ензиму, що «відрізує» утворений подвійний ланцюжок біля її основи і звільняє шлях для руху мотора.

Для перевірки роботи свого винаходу біотехнологи зібрали близько сотні тестових доріжок з чотирма кінцевими пунктами з декількох десятків звичайних вузлів і шести «блокпостів». Кожен стовпчик і стоп-вузел були мічені за допомогою світного протеїну, який припиняв випромінювати світло в тому разі, коли до цієї ділянки шляху було прикріплено мотор. Виявилось, що роботи із заздалегідь записаною програмою досить успішно справлялися із завданням — близько 65% моторів доїхало до однієї з кінцевих точок, і три чверті досягли запрограмованої мети за 200 хв експерименту.

Біотехнологи вважають, що їхня методика може стати базою для створення складніших структур, що мають практичне значення, — зокрема, вони могли б селективно доставляти ліки в певні частини організму або прискорювати реакції в бактеріях-«біореакторах».

Джерело:

<http://podrobnosti.ua/technologies/2012/01/23/816270.html>

*Матеріал підготувала
О. С. Виноградова*

НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН

Therapeutic Antibody
Engineering

Current and Future Advances
Driving the Strongest Growth
Area in the Pharma Industry

William R. Strohl and Liza M. Strohl



THERAPEUTIC ANTIBODY ENGINEERING:
CURRENT AND FUTURE ADVANCES DRIVING THE STRONGEST
GROWTH AREA IN THE PHARMA INDUSTRY

**Інжиніринг терапевтичних антитіл: теперішні й майбутні досягнення,
що сприяють зростанню обсягу у фармацевтичній промисловості**

W. R. Strohl, L. M. Strohl

У пропонованій книзі розглянуто всі аспекти інжинірингу терапевтичних антитіл зі створення найбільш конкурентоздатних препаратів та роль у майбутньому генетичних підходів. Терапевтичні антитіла для лікування захворювань уперше було схвалено для маркетингу в 1986 році. На цей час клінічно випробувано понад 300 нових терапевтичних антитіл для використання в клінічній практиці. Серед них — рецептори IGF1-R, які можуть мати застосування в онкології. Стало вже цілком очевидним, що для можливості їх упровадження вони мають істотно відрізнятись від своїх конкурентів. Таким чином, інжиніринг антитіл — це життєво важлива й невід’ємна частина створення нових терапевтичних антитіл нового покоління з кращими порівняно з тими, що вже є на ринку, властивостями. Це важливе видання виходить за межі розгляду стандартних технічних питань. У ньому також висвітлено успіхи, невдачі і конкуренцію в галузі створення терапевтичних антитіл з абсолютно нейтрального погляду.

Обсяг: 400 стор.

Видавництво: «Biohealthcare Publishing» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



BIOPROZESSTECHNIK

Біопроцеси

За редакцією Н. Chmiel

«Біла біотехнологія» — це справжній прорив у біотехнологічному виробництві сипких речовин і тонкої хімії, харчових добавок, лікарських препаратів, біопалива і т. д. Вибір правильних процесів і параметрів для нарощування виробництва в промислових масштабах має вирішальне значення для економіки.

Пропонована книга — третє, перероблене й оновлене видання цього підручника, який є вступом до основ біотехнологічних технологій і дає пояснення найбільш важливих параметрів та їх значення у практичному застосуванні. У ній повною мірою висвітлено питання біотехнології та біоінженерії, що становлять інтерес для досліджень і виробничої практики.

Книга розпочинається зі вступу в клітинну біологію і біохімію з переходом до кінетики ензимів і мікроорганізмів. Далі йдуть розділи, присвячені властивостям реології біосуспензій та їх впливу на процеси в біореакторі. Детально висвітлено роботу біореакторів і проблему стерильності, а також контрольовано-вимірювальні технології. Особливу увагу приділено обробленню органічних продуктів. На завершення подано розділ, присвячений технологічним особливостям вищих еукаріотів та ензимів.

Обсяг: 400 стор.

Видавництво: «Spektrum Akademischer Verlag» (Німеччина).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: нім.



BACILLUS THURINGIENSIS BIOTECHNOLOGY Біотехнологія *Bacillus thuringiensis*

За редакцією E. Sansinenea

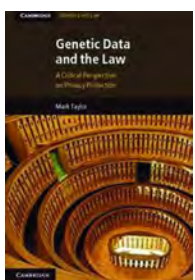
Паличку *Bacillus thuringiensis* (Bt) було використано як біопестицид для сільсько-го і лісового господарства та для боротьби із гнусом, що зумовлено перевагами її високої токсичності стосовно певних комах, відсутністю забруднювальних залишків і безпечністю для інших організмів. Та незважаючи на екологічні переваги, застосування Bt-біопестицидів відстає від використання синтетичних хімічних речовин. Генетичне поліпшення природних штамів Bt, зокрема рекомбінантів, пропонує перспективний засіб підвищення ефективності й рентабельності Bt-продуктів на основі біоінсектицидів для розроблення нових біотехнологічних підходів. З другого боку, різні види *Bacillus* мають важливе біотехнологічне застосування, одне з яких — виробництво вторинних метаболітів, які є об'єктом дослідження хімії природних продуктів. Дивовижний ступінь мінливості структури цих сполук привернув увагу хіміків, а біологічна активність надихнула фармацевтів на пошук потенціальних лікарських структур у мікробних екстрактах. Скринінг мікробних екстрактів відкриває велике структурне різноманіття природних сполук із широким спектром біологічної активності, зокрема антимікробної, противірусної, імуносупресивної і протиухлинної, що дає змогу бактеріям вижити в природному середовищі.

Обсяг: 350 стор.

Видавництво: «Springer» (Німеччина).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



GENETIC DATA AND THE LAW: A CRITICAL PERSPECTIVE ON PRIVACY PROTECTION (CAMBRIDGE. BIOETHICS AND LAW)

Генетичні дані та право: критичний погляд на захист конфіденційності
(Кембридж. Біоетика і право)

M. Taylor

Дослідження з використанням генетичних даних породжують різні проблеми, пов'язані із захистом недоторканності приватного життя. Багато із цих проблем виникають у зв'язку з дослідженнями, під час яких використовують й інші особисті дані, але не з такими несприятливими наслідками. Норми ексклюзивності, пов'язані з приватним життям, виходять за межі існуючої правової концепції персональних даних із включенням генетичних даних, що стосуються кількох осіб одночасно за додержання анонімності, які можуть бути пов'язані з іншими особами в різних, але достатньо передбачуваних контекстах. У пропонованій книзі показано, як можна узгоджувати суспільний інтерес до досліджень з використанням генетичних даних з інтересами суспільства за належного захисту приватного життя.

Обсяг: 250 стор.

Видавництво: «Cambridge University Press» (Велика Британія).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



BIOTECHNOLOGY FOR PULP AND PAPER PROCESSING Біотехнологія у целюлозно-паперовій промисловості

P. Bajpai

Книга містить актуальну інформацію про різні біотехнологічні процеси, застосовувані у целюлозно-паперовій промисловості. Кожен з 20 розділів охоплює певний метод або технічний прийом з обговоренням переваг, обмежень і перспектив на майбутнє для найважливіших і найбільш популярних біотехнологічних процесів, використовуваних у відповідних галузях промисловості.

Обсяг: 435 стор.

Видавництво: «Springer» (Німеччина).

Дата публікації: 2011 р.

Мова: англ.



БИОМЕДИЦИНСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ
Біомедична інженерія. Проблеми і перспективи

Г. Н. Пахарьков

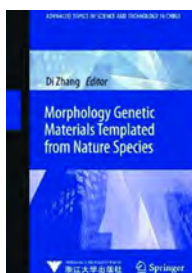
У посібнику розглянуто сучасні проблеми та перспективи розвитку основних напрямів біомедичної інженерії (БМІ): роль і значущість фундаментальних і прикладних медико-технічних досліджень та розробок, які є важливими елементами розвитку і підвищення ефективності системи національної охорони здоров'я. Наведено приклади застосування сучасних досягнень БМІ в практичній медицині, реабілітаційній індустрії, медицині критичних станів, людино-машинних системах. Велику увагу приділено таким інноваційним напрямам БМІ, як біонаносистеми і біонанотехнології, мікро- і нанороботи, медичні мікросистеми, біологічні хвильові впливи на організм людини, неінвазивні методи діагностики. Посібник призначено для студентів, бакалаврів, магістрів та аспірантів, які навчаються за напрямами медико-технічної підготовки, а також для фахівців, які працюють у галузі біомедичної техніки.

Обсяг: 232 стор.

Видавництво: «Политехника» (РФ).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



MORPHOLOGY GENETIC MATERIALS TEMPLATED FROM NATURE SPECIES (ADVANCED TOPICS IN SCIENCE AND TECHNOLOGY IN CHINA)
Морфологія генетичних матеріалів, отриманих із природних біологічних видів (наукові успіхи і розвиток технології в Китаї)

За редакцією D. Zhang

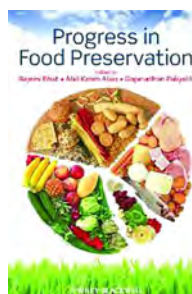
У монографії подано всебічний сучасний погляд на дослідження функціональних біоматеріалів, включаючи аспекти виготовлення, властивості та галузі застосування. Обговорюються стратегії інтеграції біозразків, біомінералізації та мімікрії у природі, у процесі виготовлення функціональних матеріалів з ієрархічною біоархітектурою та взаємозв'язаними характерними особливостями, а також значення та використання у фотоелектриці, фотоніці, фотокаталізі, хімічному виявленні, біозображеннях і в складових частинах/пристроях для перенесення фотоелектронів. Книгу призначено для науковців і аспірантів у галузі матеріалознавства, хімії, нанотехнологій, напівпровідникових пристроїв, біотехнології, охорони навколишнього середовища тощо.

Обсяг: 300 стор.

Видавництво: «Springer» (Німеччина).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



PROGRESS IN FOOD PRESERVATION
Успіхи у консервації харчових продуктів

R. Bhat

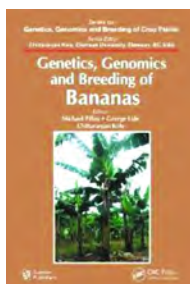
У довіднику подано широкий спектр нових підходів, спрямованих на підвищення безпеки і якості продуктів харчування та сільськогосподарських товарів. Кожен розділ містить докладну інформацію про нові методи консервації харчових продуктів, що розробляються, зокрема стосовно дегазації, сушіння і зневоднення, пакувальних інновацій та використання рослинних консервантів для свіжих продуктів тваринного і рослинного походження.

Обсяг: 648 стор.

Видавництво: «Wiley-Blackwell» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



GENETICS, GENOMICS, AND BREEDING OF BANANAS Генетика, геноміка та вирощування бананів

За редакцією *M. Pillay, G. Ude, C. Kole*

У пропонованій книзі подано новітню інформацію щодо дослідження геномів бананів. Група провідних фахівців з генетики, геноміки і розведення бананів зробили свій внесок у ці дослідження, описавши їх у єдиному стилі, що буде зрозумілий і студентам, і дослідникам. Книга містить основну інформацію, корисну для всіх, хто зацікавлений в отриманні додаткових відомостей про геном банана, а також для тих, хто проводить подальші дослідження цієї культури.

Обсяг: 350 стор.

Видавництво: «Science Publishers» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



THE BIOTECHNOLOGY DEBATE: DEMOCRACY IN THE FACE OF INTRACTABLE DISAGREEMENT

Дискусія з біотехнології: демократія перед лицем нерозв'язних розбіжностей

B. Bovenkerk

Книга ґрунтується на теорії розуміння практики дискусій з нерозв'язними моральними розбіжностями щодо нових технологій. На сьогодні дебати про біотехнологію тварин і рослин розглядаються як парадигматичні випадки важкорозв'язних суперечностей у плюралістичному суспільстві. Дослідження показують, що розбіжності в цій суперечці є багатограними і часто виникають під час проведення дискусій з приводу певних цінностей або світогляду.

У виданні наголошується на важливості політичної культури і ширших інституційних умов у формуванні потенціалу і схильності громадян брати участь в обговоренні, а також, наскільки уряд готовий поступитися своїм правом обговорення вузькому колу громадськості.

Обсяг: 353 стор.

Видавництво: «Springer» (Німеччина).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



ALTERNATIVE PRE-MRNA SPLICING: THEORY AND PROTOCOLS Альтернативний сплайсинг пре-мРНК: теорія і протоколи

За редакцією *S. Stamm, C. Smith, R. Luhrmann*

Усі еукаріотичні мРНК є похідними від попередників, пре-мРНК, за численною серією атомних модифікацій. Зокрема, видалення інтронів і об'єднання екзонів, що залишились, у процесі сплайсингу пре-мРНК має важливе значення для отримання мРНК, які відповідають матрицям для трансляції. Переважна більшість пре-мРНК людини піддаються альтернативному сплайсингу, в якому різні частини РНК або входять до складу зрілої мРНК, або не включені в неї. Цей процес дає змогу окремим генам виробляти множинні протеїни і створювати альтернативний сплайсинг пре-мРНК, який є центральним елементом у регуляції генів. Хоча сплайсинг пре-мРНК відбувається з високою точністю, дедалі більше захворювань пов'язано з дефектами, які призводять до помилок у сплайсингу мРНК.

Книгу призначено для молекулярних біологів, генетиків, лікарів і для всіх дослідників, які вивчають питання альтернативного сплайсингу.

Обсяг: 660 стор.

Видавництво: «Wiley-VCH» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



BIOTECHNOLOGY OF FUNGAL GENES
Біотехнологія грибкових генів

За редакцією *V. K. Gupta, M. Ayyachamy*

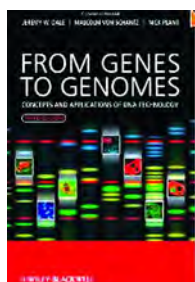
Книгу присвячено гіфоміцетам. Висвітлено успіхи, досягнуті за останнє десятиліття як у методології, так і в розумінні організації геному і регуляції генів та шляхів вираження генетичної інформації. Підходи і методи молекулярної біології дають змогу ставити питання й отримувати відповіді на основні проблеми, що стосуються багатьох аспектів біології грибів, і відкрити шлях до спрямованого маніпулювання їхньою генетикою.

Обсяг: 400 стор.

Видавництво: «Science Publishers» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



FROM GENES TO GENOMES:
CONCEPTS AND APPLICATIONS OF DNA TECHNOLOGY
Від генів до геномів: концепції і застосування ДНК-технології

J. W. Dale, M. Schantz, N. Plant

В останньому виданні цього підручника викладено основні методи і концепції, пов'язані з клонуванням, експресією та мінливістю генів:

– подано глибше дослідження технології визначення послідовності повного геному;

– наведено сучасне трактування біоінформатики;

– вміщено чіткі кольорові діаграми.

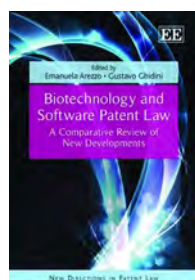
Гармонійне поєднання граничної ясності викладу і рівня конкретизації робить цю книгу ґрунтовним вступом до швидкоплинного світу молекулярної генетики.

Обсяг: 400 стор.

Видавництво: «Wiley» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



BIOTECHNOLOGY AND SOFTWARE PATENT LAW:
A COMPARATIVE REVIEW OF NEW DEVELOPMENTS
(NEW DIRECTIONS
IN PATENT LAW SERIES)

**Біотехнологія і програмне забезпечення патентного права:
порівняльний огляд нових тенденцій розвитку
(нові напрями в патентному законодавстві)**

E. Arezzo, G. Ghidini

Нове тисячоліття поставило низку проблем у сфері патентного права. У книзі подано огляд найважливіших питань стосовно патентного права.

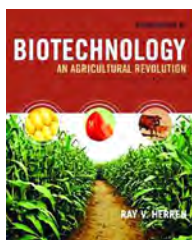
З'явилися нові технологічні сектори, кожен зі своїми особливостями у відношенні до інноваційного процесу. Від найбільш спірних випадків, що стосуються біотехнології, до найостанніших рішень у галузі патентного програмного забезпечення і бізнес-методів патентне право намагається розширити ці межі так, аби було враховано специфіку нововиниклих і спірних питань у сфері їхньої дії.

Обсяг: 360 стор.

Видавництво: «Edward Elgar Pub» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



INTRODUCTION TO BIOTECHNOLOGY. AN AGRICULTURAL REVOLUTION
Вступ до біотехнології. Революція в сільському господарстві

R. V. Herren

У книзі наведено докладний вступ до біотехнології та засоби радикальної зміни сучасного сільського господарства. Нещодавно оновлений текст містить обґрунтування основних концепцій біотехнології, а також інформацію про застосування передової науки і техніки в сільському господарстві, медицині та охороні здоров'я. Всебічно висвітлено такі теми, як функція клітин, генетика, застосування біотехнології, а також генна інженерія, генетично модифіковані організми, клонування і потенційні небезпеки для людини й довкілля. У виданні зроблено акцент на застосування математичних методів у біотехнології.

Обсяг: 413 стор.

Видавництво: «Delmar Cengage Learning» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



THERAPEUTIC PROTEIN DRUG PRODUCTS:
 PRACTICAL APPROACHES IN THE LABORATORY, MANUFACTURING,
 AND THE CLINIC

**Протеїнові лікарські засоби: практичні підходи в лабораторних умовах,
 на виробництві та в клініці**

За редакцією В. К. Meyer

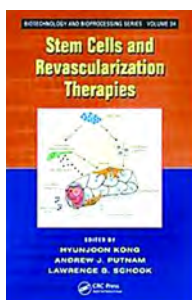
У пропонованій книзі подано повне уявлення щодо процесу розроблення терапевтичних протеїнів у лабораторних умовах, на виробництві та в клініці. Детально описано технологію виготовлення, очищення на останніх стадіях процесу, умови зберігання, транспортування і доставлення лікарського препарату. Також обговорюються нормативні вимоги використання протеїнів. Висвітлюються такі теми, як висока концентрація протеїну, фазове розшарування, опалесценція, а також нові тенденції в галузі доставлення ліків.

Обсяг: 220 стор.

Видавництво: «Biohealthcare Publishing» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.



STEM CELLS AND REVASCULARIZATION THERAPIES
Стовбурові клітини і терапія реваскуляризації

За редакцією Н. Kong, А. J. Putnam, L. B. Schook

В останні декілька десятиліть значно зріс інтерес до біології та інжинірингу стовбурових клітин, що сприяло прогресу в їх клінічному застосуванні для терапії реваскуляризації. Деякі стратегії ґрунтуються на мобілізації ендогенних популяцій стовбурових клітин, а для інших використано клітинну трансплантацію. Проте обидва методи є актуальними завдяки тому, що створюються біоматеріали і медико-біологічні засоби, які можуть поліпшити і контролювати долю стовбурових клітин, сприяючи розумінню їх функціонування.

У книзі подано пояснення, як визначити, ізолювати й охарактеризувати різні стовбурові та прогеніторні клітинні популяції для неоваскуляризації.

Обсяг: 342 стор.

Видавництво: «CRC Press» (США).

Дата публікації: 2012 р.

Мова: англ.

КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ, ВИСТАВКИ

2012 AAPS NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE Національна конференція американських фармацевтів з біотехнології 2012



Дата проведення: 21–23.05.2012 р.
Місце проведення: Сан-Дієго (США).
Веб-сайт: <http://www.aaps.org/nationalbiotech/>

Тематика конференції:

- різноманітність і складнощі виробництва вакцин, розширення діяльності та стратегії передачі інформації за новітніми технологіями;
- застосування різних фармакологічних систем;
- досягнення в галузі нових терапевтичних методик, що стосуються малих протеїнів;
- метаболоміки для оптимізації процесу розроблення біотерапевтичних засобів;
- розроблення холестичного і прогресивного підходу до біомаркерів трансляції;
- незвичайна і несподівана фармакокінетика;
- стратегія проведення протеїнової терапії.

12TH WORLD CONGRESS ON ENVIRONMENTAL HEALTH: NEW TECHNOLOGIES, HEALTHY HUMAN BEING AND ENVIRONMENT 12-й Всесвітній конгрес з охорони довкілля: нові технології, умови для здорового мешкання і навколишнє середовище



Дата проведення: 21–27.05.2012 р.
Місце проведення: м. Вільнюс (Литва).
Веб-сайт: <http://www.ifeh2012.org/welcome>

Конгрес присвячено таким украй актуальним питанням, як нові технології та умови для здорового мешкання людини і навколишнє середовище, а також традиційним темам і аспектам, зокрема вплив на здоров'я й оцінка ризику для здоров'я рівня шуму та електромагнітних полів, безпека харчових продуктів тощо. Обговорюватимуться питання, пов'язані з інформаційними технологіями, генною інженерією, епідеміями, зміною клімату та ін.

WC 2012 — WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING Всесвітній конгрес з медичної фізики і біомедичної інженерії — WC 2012



Дата проведення: 25–31.05.2012 р.
Місце проведення: Бейджинг (Китай).
Веб-сайт: <http://www.ifmbe.org>

Завдання конференції:

- заохочення досліджень і застосування знань, а також розповсюдження інформації в галузі медичної і біологічної інженерії;

- сприяння створенню, розповсюдженню й застосуванню медичних і біологічних інженерних знань, управління технологіями для поліпшення здоров'я та якості життя;
- сприяння розвитку фаху медичної і біологічної інженерії, визнанню й розумінню громадськістю потреб у такій професії;
- створення сприятливих умов для співпраці між національними і транснаціональними товариствами, промисловістю, урядовими і неурядовими організаціями в галузях охорони здоров'я і біомедичних досліджень, а також їх практичне застосування.

FIRST INTERNATIONAL CONGRESS OF BIOTECHNOLOGY AND BIODIVERSITY AND NINTH INTERNATIONAL BANANA FORUM Перший Міжнародний конгрес із біотехнології та біорізноманіття і дев'ятий міжнародний форум, присвячений рослинам родини бананових

Дата проведення: 28–31.05.2012 р.



Місце проведення: Гваякіль (Еквадор).

Веб-сайт: <http://cibe.espol.edu.ec/node/48>

Перший Міжнародний конгрес із біотехнології та біорізноманіття проходить паралельно з ІХ Міжнародним форумом, присвяченим рослинам родини бананових. Загальними для обох цих заходів будуть комерційний ярмарок і симпозиум. Заплановано здійснити аналіз основних тенденцій з найбільш важливих аспектів біотехнології, біорізноманіття та проблем, що стосуються рослин родини бананових, зокрема обговорюватимуться питання біорізноманіття, метагеноміки і генної інженерії за участю експертів світового класу.

Основні напрями:

1. Геноміка і метагеноміка

- Послідовність геному рослин і транскриптом (зокрема родини бананових).
- Послідовність та інтерпретації колективного геному мікробних угруповань.
- Функціональна геноміка певних видів.
- Біоінформатика.

2. Біорізноманіття і біоаналіз

- Ідентифікація та раціональне використання біорізноманіття мікробних ресурсів морських і наземних екосистем.
- Визначення біологічно активних молекул з використанням рослинних ресурсів та мікроорганізмів.
- Біорізноманіття і зміна клімату.

3. Генна інженерія

- Генетичні перетворення рослин і мікроорганізмів.

4. Молекулярна біологія і сільське господарство

- Гени та регуляторні послідовності у дослідженнях в галузі сільського господарства, навколишнього середовища, енергетики і біотехнології.
- Статистичні методи підтримки сільськогосподарських досліджень і контролю якості.
- Патологія рослин: діагностика й характеристика важливих патогенів рослин.

5. Сільськогосподарська біотехнологія та біопроекти.

- Біопаливо.
- Біоремедіація.

2012 WORLD BIOMATERIALS CONGRESS Всесвітній конгрес із біоматеріалів 2012



Дата проведення: 01–05.06.2012 р.

Місце проведення: Ченду (Китай).

Веб-сайт: <http://www.biomaterials.org/wbc/2012.cfm>

Конгрес, що відбувається один раз на чотири роки, є міжнародним форумом із налагодження співробітництва, розширення зв'язків і розповсюдження знань у галузі біотехнології.

Теми пленарного засідання:

- Біоматеріали — перехід від концепції до пацієнта.
- Біоматеріали у наноері.
- Смарт-супрамолекулярні наноструктури з блок-співполімерів для доставлення генів і ліків.
- Клітини, що взаємодіють з біоматеріалами.
- Інтелектуальні біоматеріали для медичних приладів з молекулярною можливістю розпізнавання.
- Підвищення регенерації тканин.
- Дорослі стовбурові клітини і регенерація тканин.

Теми сесійних засідань:

- Біоматеріали і підходи тканинної інженерії у дослідженнях онкологічних захворювань.
- Біоматеріали для регенерації нервів.
- Застосування біоматеріалів для лікування серцево-судинних захворювань.
- Взаємодії біоматеріалів зі стовбуровими клітинами.
- Біорозкладні метали.
- Розкладні біополімери.
- Еластичні біоматеріали.
- Використання біоматеріалів для доставлення генів.
- Гібридні біоматеріали і системи доставлення ліків.
- Молекулярна біосумісність біоматеріалів.
- Магнітні наноматеріали у біомедицині та оброблення зображень.
- Нові підходи до стоматологічних матеріалів.
- Скафолди.
- Унікальні біоматеріали для тканинної інженерії та регенеративної медицини.
- Кістково-тканинна інженерія: від біоматеріалів до мікрохірургії і васкуляризації.

**THE 3RD INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGY AND BIODIVERSITY
CONFERENCE AND EXHIBITION**
**3-тя Міжнародна конференція і виставка з біотехнології
та біорізноманіття**

Дата проведення: 10–11.06.2012 р.

Місце проведення: Джохор-Бахру (Малайзія).

Веб-сайт: <http://www.biojohor.my/>

Добра нагода репрезентувати свою роботу і поділитися здобутками в галузі прикладної мікробіології та мікробної технології з ученими і експертами зі всього світу.

До участі в конференції запрошують біотехнологів, учених, керівників, політиків, представників державних установ, підприємств і громадських діячів, які цікавляться питаннями екології або сільського господарства, а також усіх, кого хвилює раціональне використання природних ресурсів.

Тематика конференції:

- Біоекологічний інжиніринг.
- Біопроекти.
- Біомолекулярний інжиніринг.
- Нанобіотехнологія.
- Біофармацевтика.
- Біоенергетика.
- Біоматеріали.
- Біосенсиори.
- Біоінформатика.

13TH DRUG DISCOVERY SUMMIT 2012

13-й саміт з розроблення лікарських препаратів 2012



Дата проведення: 11–12.06.2012 р.
Місце проведення: Цюріх (Швейцарія).
Веб-сайт: <http://www.drugdiscovery-summit.com>

Саміт проводитиметься 6-ма інтерактивними потоками:

- наукові дослідження і розробки стратегії та бізнес-моделі;
- медична хімія/розроблення ліків;
- скринінг і проведення аналізу;
- передові технології;
- біоінформатика і управління даними;
- біопрепарати і біомаркери.

27 CHEMSPEC EUROPE 2012

27-ма міжнародна виставка тонкої хімії та спеціальних сполук



Дата проведення: 13–14.06.2012 р.
Місце проведення: Барселона (Іспанія).
Веб-сайт: <http://www.exproclub.ru/db/exhibition/view/7117/>

Паралельно з виставкою ChemSpec Europe проходитимуть галузева конференція, тематичні семінари. На цьому форумі буде репрезентовано агрохімічні розробки, досягнення в галузях біотехнології, хімії каталізаторів, косметики, а також туалетне приладдя, фарби і пігменти, виробництво і спеціальний синтез, напівфабрикати для фарбувальних речовин, хімікати, ароматичні речовини, спеціальні органічні сполуки: пептиди і протеїни, фармацевтичні інгредієнти та прекуртори, фотохімікати, хімічні засоби для репрографії та багато іншого.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON MASS DATA ANALYSIS OF IMAGES AND SIGNALS

Міжнародна конференція з аналізу масових даних зображень і сигналів



Дата проведення: 13–20.07.2012 р.
Місце проведення: Берлін (Німеччина).
Веб-сайт: <http://www.mda-signals.de>

Метою конференції є об'єднання зусиль учених, які займаються автоматичним аналізом зображень і сигналів у галузі медицини, біотехнології, хімії, харчової промисловості, дієтології, біометрії та сільського господарства.

Визначений аналіз є складним і актуальним завданням. Оскільки при цьому виникає проблема автоматичного аналізу сигналу маси інформації, гостро постало питання про створення сигналінтерпретуючих систем, які б генерували автоматично задану інформацію від сигналів.

Основна тематика:

- Застосування в медицині, біотехнології, харчовій промисловості й дієтології, біометрії та сільському господарстві.
- Способи створення і відтворення сигналів і зображень.
- Відповідність об'єктові і спостереження за об'єктом у мікро- і відеомікроскопічних зображеннях.
- Аналіз і опис 1D-, 2D- і 3D-форм.
- Алгоритми для аналізу 1D-, 2D- і 3D-сигналів та їх інтерпретація.

- Алгоритми сегментації зображень.
- Розпаралелювання аналізу зображень і алгоритми інтерпретації.
- Семантичні теги мікроскопічних зображень.
- Застосування в медицині, біотехнології, хімії та інших галузях.
- Застосування в кристалографії.
- Застосування в протеоміці.
- Застосування в 2D- і 3D-аналізі осередку зображення.
- Методи і рішення для біометричних систем.
- Методи розпізнавання для рухомих об'єктів (обличчя, райдужна оболонка ока, тіло).
- Методи оброблення даних (наприклад, методи кристалографії).

BIOANALYTICAL SENSORS Біоаналітичні сенсори

Дата проведення: 17–22.06.2012 р.

Місце проведення: Ньюпорт (США).

Веб-сайт: <http://www.grc.org/programs.aspx?year=2012&program=biosens>

Теми для обговорення:

- нові елементи розпізнавання;
- досягнення в галузі оптичних, електрохімічних і механічних сигналів;
- використання нанотехнологій для розуміння молекулярних взаємодій;
- технології системної інтеграції.

Конкретні тематичні галузі включають (але не обмежуються) зондування на основі одиничних молекул, внутрішньоклітинне зондування, біоматеріали з поліпшеними оптичними або електронними властивостями, наноматеріали, наноструктури, інженерію поверхні, мініатюризацію й автоматизацію, мультиплексовані вияви в складних матрицях.

NANOBIO EUROPE 2012 — 8TH NANOBIO-EUROPE INTERNATIONAL CONGRESS & EXHIBITION ON NANOBIO TECHNOLOGY Нанобіо Європа 2012 — 8-й Міжнародний конгрес і виставка з нанобіотехнології



Дата проведення: 18–20.06.2012 р.

Місце проведення: Варезе (Італія)

Веб-сайт: <http://nanobio-europe-2012.jrc.ec.europa.eu/>

Основну увагу на цьому конгресі буде приділено медико-біологічним застосуванням нанобіотехнології, а саме можливості створення за допомогою нанотехнології пристроїв і систем, які мають стати основою для поліпшеної, доступнішої охорони здоров'я і стратегій тестування, що дають точніші результати.

Тематика:

- Доставлення ліків за допомогою нанотехнологій.
- Нанотехнологія для медичних застосувань.
- Отримання зображень *in vivo*.
- Біомаркери і наночастинки.
- Оброблення й аналіз клітин.
- Датчики та виконуючі пристрої.
- Біоаналітика.
- Біо-, наноматеріали і тканини.

BIO- & HYDROMETALLURGY '12 Біо- і гідрометалургія 2012

Дата проведення: 18–20.06.2012 р.

Місце проведення: Фелмос (Велика Британія).

Веб-сайт: <http://www.min-eng.com/biohydromet12/index.html>

Це — шостий міжнародний симпозиум з гідрометалургії. Увагу буде зосереджено на останніх досягненнях в галузі гідрометалургії, таких як: розроблення, оптимізація та застосування технологічних операцій при комплексних біорозробках мінеральних руд, зокрема низькосортної і поліметалевої; мікробіологічна біорозробка та застосування біогідрометалургії до нових ресурсів (підземних виробок і електронних відходів); (біо-)відновлення навколишнього середовища в разі виснаження ґрунту. Також розглядатимуться питання біовідновлення (наприклад, лікування, профілактика і прогнозування вікової дегенерації макули, добування металів з відходів і т. д.), інше застосування біотехнології в гірничодобувній і металургійній промисловості.

BIO 2012 — INTERNATIONAL CONVENTION Виставка і конференція з біотехнології



Дата проведення: 18–21.06.2012 р.

Місце проведення: Бостон (США).

Веб-сайт: <http://www.exproclub.ru/db/exhibition/view/4681/>

Виставка BIO є найбільш представницькою конференцією фахівців, які працюють у біотехнологічній індустрії. Проводиться щорічно в різних штатах США.

У цій виставці братимуть участь спеціалісти, зайняті в галузях охорони здоров'я, виробництва продукції для сільського господарства, захисту навколишнього середовища, а також біотехнології.

Тематика виставки:

- Біотехнологія у фармацевтиці та ветеринарії.
- Біотехнологія в сільському господарстві.
- Екобіотехнологія.
- Біогеотехнологія.
- Промислова і лабораторна безпека.
- Біоенергетика, нанотехнології, селекція і генетика мікроорганізмів.
- Біоенергетика, нанотехнології, селекція і генетика мікроорганізмів.
- Сировина для отримання біопродуктів, живильні середовища, біокаталіз та біокаталітичні технології. Процеси й апарати для біотехнологічних виробництв.
- Інформаційне забезпечення. Комп'ютерні технології.
- Стандартизація і сертифікація біотехнологічної продукції.
- Біотехнологія у медицині.
- Біотехнологія в промисловості.
- Харчова біотехнологія.
- Біочипи. Біосенсори.
- Наукові дослідження та реактиви.

АСЧЕМА 2012 30-й Міжнародний конгрес і спеціалізована виставка з хімічного машинобудування, біотехнології та захисту довкілля



Дата проведення: 18–22.06.2012 р.

Місце проведення: Франкфурт-на-Майні (Німеччина).

Веб-сайт: <http://www.exproclub.ru/db/exhibition/view/7366/>

АСЧЕМА — світовий форум, на якому визначають нові напрями розвитку хімічної промисловості, біотехнології та охорони довкілля. Проводиться 1 раз на 3 роки і є наймасштабнішою подією у світі в цих галузях.

Тематика конференції:

– дослідження та інновації; дизайн і проектування в машинобудуванні; лабораторне й аналітичне устаткування; насоси, компресори, клапани і фітинги; інструментальне, контролююче устаткування та автоматика; біотехнологія для фармацевтичної промисловості; біотехнологія для харчової промисловості; пакувальні технології; промислова і лабораторна безпека; біотехнологія: біореактори, периферійне і продукувальне устаткування, стерилізатори, молекулярна біологія, лабораторні й аналітичні технології; розроблення і виробництво нових матеріалів; захист довкілля, хімічне виробництво, системи безпеки, інгредієнти для фармацевтики, технології пакування і зберігання, вимірювальні системи тощо.

BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE\SYSTEMS BIOLOGY — BGRS/SB'2012

Міжнародна конференція з біоінформатики регуляції і структури геному і структурної\системної біології (BGRS/SB–2012)



Дата проведення: 26–28.06.2012 р.
Місце проведення: Новосибірськ (РФ).
Веб-сайт: <http://www.konferencii.ru/info/id/87150>

Напрями роботи конференції:

- комп'ютерна геноміка, транскриптоміка і хромосоміка, секвенування повного геному і персональні геноми, просторова організація генетичного матеріалу в клітині;
- алгоритми ансамблювання, анотація геномів і метагеномів;
- GWAS, асоціативні ознаки, аналіз поліморфізму;
- біоінформатика складних кількісних ознак (QTL);
- біоінформатика і структурна біологія, молекулярна динаміка біологічних макромолекул та супрамолекулярних комплексів;
- біоінформатика і пошук нових фармакологічних мішеней;
- реконструкція та моделювання генних мереж;
- метаболічна інженерія і біоінформатика;
- синтетична комп'ютерна біологія та експериментальне конструювання штучних молекулярно-генетичних систем;
- еволюційна біоінформатика;
- біоінформатика нервової системи і мозку;
- біоінформатика морфогенезу;
- біоінформатика стовбурових клітин та епігеноміка;
- суперкомп'ютерні і паралельні обчислення в біоінформатиці;
- інтеграція даних і автоматичне добування необхідної інформації з текстів наукових публікацій і баз даних.

9TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON WEARABLE MICRO AND NANO TECHNOLOGIES FOR PERSONALIZED HEALTH (pHealth)
9-та Міжнародна конференція з мікро- і нанотехнологій для персоналізованої охорони здоров'я (pHealth)



Дата проведення: 26–28.06.2012 р.
Місце проведення: Порто (Португалія).
Веб-сайт: <http://www.phealth2012.com/> Related subject(s) Medicine (in general)

Теми конференції:

- невідкладна допомога;
- біомедична інженерія;
- допоміжні технології;
- інформатика;

- заходи зі зміцнення здоров'я;
- технології охорони здоров'я;
- виробничі лабораторії;
- нанотехнологія, працетерапія, безпека пацієнтів;
- інновації медичного обслуговування;
- управління охороною здоров'я;
- інформатика;
- персоналізована медицина.

GNB2012 — THIRD CONFERENCE OF THE ITALIAN NATIONAL GROUP OF BIOENGINEERING

GNB2012 — Третя конференція італійської національної групи біоінженерії



Дата проведення: 26–29.06.2012 р.
Місце проведення: Рим (Італія).
Веб-сайт: <http://www.congressognb2012.it>

Метою конференції є надання всеосяжної картини дослідницької діяльності в галузі біоінженерії.

2ND INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCES IN BIOTECHNOLOGY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES (ICABPS'2012)

2-га міжнародна конференція з досягнень у галузі біотехнології та фармацевтичних наук (ICABPS'2012)



Дата проведення: 30.06.–01.07.2012 р.
Місце проведення: Балі (Індонезія).
Веб-сайт: <http://psrcentre.org/>

На конференції обговорюватимуться досягнення в галузі біотехнології і фармацевтичних наук, а також поточні дослідження. До участі запрошують учених, науковців, інженерів, студентів університетів та представників промисловості.

THE 2012 INTERNATIONAL CONFERENCE ON GENETIC AND EVOLUTIONARY METHODS (GEM'12)

Міжнародна конференція з генетичних і еволюційних методів (GEM'12)



Дата проведення: 16.–19.07.2012 р.
Місце проведення: Лас-Вегас (США).
Веб-сайт: <http://www.world-academy-of-science.org/worldcomp12/ws/conferences/gem12>

Тематика конференції:

- генетичне програмування;
- штучне життя;
- генетичний орієнтири, штучні імунні системи;
- біологічно інспіровані системи;
- еволюційне планування;
- еволюційна багатоцільова оптимізація;
- біологічні методи.
- генетичні алгоритми;
- еволюційне програмування;
- адаптивна поведінка систем;
- еволюційні стратегії;
- коеволюція;
- робототехніка;

**MUSCULOSKELETAL BIOLOGY & BIOENGINEERING —
MUSCULOSKELETAL SCIENCE: BEDSIDE TO BENCH TO BEDSIDE**
**Біологія опорно-рухового апарату та біоінженерія —
опорно-руховий апарат: успіх у лікуванні лежачих хворих**

Дата проведення: 05–10.08.2012 р.

Місце проведення: Андовер (Велика Британія).

Веб-сайт: <http://www.grc.org/programs.aspx?year=2012&program=musculo>

Конференція присвячена дослідженням біології опорно-рухового апарату та біоінженерії і є головним форумом для подання і обговорення нової і неопублікованої інформації в цій галузі. Сприятиме новому розумінню цієї проблеми, новій співпраці дослідників, визначенню нових напрямів досліджень. Вивчення опорно-рухового апарату включає низку міждисциплінарних галузей, зокрема біології та біоінженерії, кінцева мета яких полягає в застосуванні біоінженерії в клініці, включаючи ортопедичну хірургію, ревматологію і радіологію.

**THE 30TH WORLD CONGRESS
OF BIOMEDICAL LABORATORY SCIENCE**

30-й Всесвітній конгрес з експериментальної біомедичної науки



Дата проведення: 18–22.08.2012 р.

Місце проведення: Берлін (Німеччина).

Веб-сайт: <http://www.ifbls-dvta2012.com/>

Тематика конференції:

- молекулярна діагностика бактерійних і вірусних інфекційних захворювань;
- відродження забутих хвороб;
- готовність до боротьби з пандемією;
- плюси і мінуси «Системи швидкого тестування» в діагностиці інфекційних захворювань;
- аналітичні дослідження мутації зсідання крові — сучасна діагностична лабораторія;
- сучасна лабораторна діагностика — генетично детерміновані захворювання;
- геном людини–2020;
- порівняльний аналіз у медико-біологічних дослідженнях.

**ІХ З'ЇЗД УКРАЇНСЬКОГО ТОВАРИСТВА ГЕНЕТИКІВ
І СЕЛЕКЦІОНЕРІВ ІМ. М. І. ВАВИЛОВА**



Дата проведення: 24–28.09.2012 р.

Місце проведення: Алушта (Україна).

Веб-сайт: http://icbge.org.ua/ukr/_/_2012

Напрями наукової роботи з'їзду:

- Загальна, молекулярна та біохімічна генетика.
- Молекулярна структура та організація геному.
- Генетика людини та медична генетика.
- Генетика і селекція мікроорганізмів.
- Біотехнологія в сільському господарстві та медицині.
- Екогенетика.
- Генетика і селекція рослин.
- Аналіз і оцінка генетичних ресурсів.
- Генетика і селекція тварин.

Адреса для листування:

E-mail: dubrovny@ukr.net; тел. (044)5260798 (Кунах Віктор Анатолійович);

0677887104 (Лялько Ірина Іванівна);

Поштова адреса: 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17, ІФРГ НАН України.

BIOHYDROLOGY CONFERENCE 2012 Конференція «Біогідрологія 2012»

Дата проведення: 28–31.08.2012 р.
Місце проведення: Ландау (Німеччина).
Веб-сайт: <http://www.biohydrology2012.de>

Форум для вчених біологів і гідрологів проходитиме під девізом «Біо- зустрічається з гідрологією». Мета конференції — обговорення і об'єднання ідей, методів і концепцій фахівців-екологів у галузі біологічних, хімічних і фізичних наук з гідрологічними науками.

Теми конференції:

- Зміна клімату, землекористування і біорізноманіття.
- Взаємозв'язані водно-земляні екосистеми.
- Динаміка процесів біогідрології.
- Гідрологічні функції біогеохімічних інтерфейсів.

4 GERMAN-UKRAINIAN SYMPOSIUM 4-й німецько-український симпозиум

Дата проведення: 18–20.09.2012 р.
Місце проведення: Ільменау (Німеччина).
Веб-сайт: <http://conference.scholar.ru/conference/1208/>

Метою симпозиуму є проведення динамічного форуму з обговорення процесів синтезу, пов'язаного з наноматеріалами, і вироблення концепцій їх застосування в промисловості, біотехнології та медицині.

Симпозиум охоплює коло таких питань в галузі нанонауки і нанотехнологій:

- | | |
|--|-------------------------------------|
| – синтез і методи підготовки; | – методи досліджень; |
| – теоретичні дослідження та моделювання; | – перенесення електронів і енергії; |
| – магнітні явища; | – біоактивність; |
| – матеріали для біосенсорів; | – мікронаноінтеграція. |

BPA — BIOPHARM AMERICA 2012 Біофарм Америка 2012



Дата проведення: 19–21.09.2012 р.
Місце проведення: Бостон (США)
Веб-сайт: <http://www.ebdgroup.com/bpa>

На конференції розглядатимуться питання, що стосуються партнерських зв'язків. Ця триденна конференція дасть можливість встановити нові ділові контакти, зустрітися з представниками біотехнологічних і фармацевтичних компаній зі всього світу, виробити стратегічні відносини.

Основні теми:

- встановлення партнерства;
- розвиток бізнесу;
- біотехнологія;
- фармацевтика;
- медичні пристрої;
- діагностика;
- ліцензування;
- фінанси.

ПЕРЕДПЛАТА — 2012

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 «Біотехнологія» в електронній бібліотеці PressPoint: www.presspoint.ua