



# BIOTECHNOLOGY

VOL. 1, N2, 2008

BIMONTHLY

## *Редакційна колегія*

Комісаренко Сергій Васильович  
(головний редактор)  
Стойка Ростислав Степанович  
(заст. головного редактора)  
Колибо Денис Володимирович  
(заст. головного редактора)  
Ковтун Ірина Володимирівна  
(відповідальний секретар)  
Волков Георгій Леонідович  
Гончар Михайло Васильович  
Дзядевич Сергій Вікторович  
Дробот Людмила Борисівна  
Карпов Олександр Вікторович  
Кунах Віктор Анатолійович  
Левицький Євген Леонідович  
Лукаш Любов Леонідівна  
Мельничук Максим Дмитрович  
Мінченко Олександр Григорович  
Стародуб Микола Федорович  
Товкач Федір Іванович  
Філоненко Валерій Вікторович

## *Редакційна рада*

Комісаренко Сергій Васильович  
(голова)  
Блюм Ярослав Борисович  
Єгоров Олексій Михайлович (Росія)  
Єльська Ганна Валентинівна  
Кордюм Віталій Арнольдович  
Кухар Валерій Павлович  
Мірошников Анатолій Іванович (Росія)  
Пастернак Чарльз (Великобританія)  
Підгорський Валентин Степанович  
Северин Євген Сергійович (Росія)  
Сибірний Андрій Андрійович  
Сидоров Володимирович Анатолійович  
(США)  
Скрябін Костянтин Георгійович (Росія)  
Созінов Олексій Олексійович  
Широбоков Володимир Павлович

## **Адреса редакції:**

Редакція журналу «Біотехнологія», вул. Леонтовича, 9, 01601, Київ, Україна  
Телефон: (38-044) 234-42-57; E-mail: biotech@biochem.kiev.ua

*Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації  
серія КВ №10391 від 14.09.05*

Науковий редактор Є. Л. Левицький  
Літературний редактор Г. М. Шевченко  
Редактор новин О. Ю. Нипорко

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

Підп. до друку 14.10.08. Формат 210×297. Папір офс. 65 г/м<sup>2</sup>. Гарн. SchoolBookC.  
Друк — офсетний. Обл.-вид. арк. 14,0. Наклад 330 прим. Замовлення 1/6.  
Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;  
друк — \_\_\_\_\_

# БІОТЕХНОЛОГІЯ

*Науковий журнал*

*Виходить один раз на два місяці*

**БИОТЕХНОЛОГИЯ / BIOTECHNOLOGY**

Том 1, №2, 2008

## ЗМІСТ

### КОЛОНКА ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Сучасний стан розвитку молекулярної медицини . . . . . 9

### ОГЛЯДИ

- Верьовка С. В.* Особливості формування структури трансгенних білків і зумовлені ними фактори ризику . . . . . 13
- Горюшкіна Т. Б.*  
*Дзядевич С. В.* Виноградні вина. Хімічний склад та методи визначення . . . . . 24
- Варбанець Л. Д.*  
*Авдіюк К. В.*  
*Борзова Н. В.* Мікробні  $\alpha$ -амілази: виділення, властивості, практичне застосування . . . . . 39

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

- Пирогова Л. В.*  
*Стародуб М. Ф.* Імобілізація антигену ретровірусу лейкозу великої рогатої худоби на поверхні імуного біосенсора . . . . . 52
- Апуховська Л. І.*  
*Василевська В. М.*  
*Безусяк А. І.*  
*Романова С. О.*  
*Калашніков А. В.*  
*Калашніков О. В.* Ефективність комплексних препаратів вітаміну D<sub>3</sub> при остеопорозі . . . . . 59
- Пенчук Ю. М.*  
*Карпов О. В.*  
*Поводзинський В. М.*  
*Верьовка С. В.*  
*Ульберг З. Р.* Технологічні параметри культивування клітин-продуцентів для одержання інтерферонів I типу . . . . . 69

<i>Влізло В. В.</i>	
<i>Стадник В. В.</i>	Ідентифікація патологічного пріона
<i>Майор Х. Я.</i>	при губчастоподібній енцефалопатії
<i>Вербицький П. І.</i>	великої рогатої худоби . . . . .75
<i>Стойка Р. С.</i>	
<i>Циганкова В. А.</i>	
<i>Мусатенко Л. І.</i>	Особливості дії регуляторів росту на експресію генів
<i>Галкіна Л. О.</i>	у клітинах зародків насіння в ранньому
<i>Галкін А. П.</i>	постембріогенезі . . . . .81
<i>Пономаренко С. П.</i>	
<i>Ситник К. М.</i>	
<i>Ікін Д. Є.</i>	
<b>НОВІ МЕТОДИ</b>	
<i>Диль О. Д.</i>	Сучасні підходи до контролю кількісного вмісту діючих
<i>Виноградова К. Г.</i>	компонентів комбінованих лікарських засобів . . . . .93
<i>Мінченко О. Г.</i>	
<i>Соловійов О. О.</i>	Нові методи аналізу мутацій у деяких екзонах генів
<i>Голомідов Д. О.</i>	<i>PAG</i> та <i>CFTR</i> людини з використанням денатуруючого
<i>Лівшиць Л. А.</i>	градієнтного гель-електрофорезу . . . . .99
<b>СТОРІНКИ ІСТОРІЇ</b>	
<i>Виноградова Р. П.</i>	Володимир Петрович Вендт — фундатор біотехнології
	в Україні . . . . .104
<b>НОВИНИ . . . . .112</b>	
<b>РЕЦЕНЗІЇ</b>	
<i>Левицький Є. Л.</i>	Рецензія на монографію В. А. Кунаха
	«Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні
	та фізіолого-біохімічні основи» (Київ: Логос, 2005) . . .122
<b>КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ . . . . .126</b>	
<b>НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ</b>	
<b>ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН</b>	
<i>Генна терапія . . . . .129</i>	
<b>ЮВІЛЕЇ</b>	
<i>Мельничук Д. О.</i>	Анатолій Леонідович Бойко: відомий український
<i>Мельничук М. Д.</i>	вчений — вірусолог, еколог, біотехнолог . . . . .134
<i>Григорюк І. П.</i>	

# СОДЕРЖАНИЕ

## КОЛОНКА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Современное состояние развития молекулярной медицины . . . . .9

## ОБЗОРЫ

- Веревка С. В.* Особенности формирования структуры трансгенных белков и обусловленные ими факторы риска . . . . .13
- Горюшкина Т. Б.*  
*Дзядевич С. В.* Виноградные вина. Химический состав и методы определения . . . . .24
- Варбанец Л. Д.*  
*Авдюк К. В.*  
*Борзова Н. В.* Микробные  $\alpha$ -амилазы: выделение, свойства, практическое использование . . . . .39

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Пирогова Л. В.*  
*Стародуб М. Ф.* Иммобилизация антигена ретровируса лейкоза крупного рогатого скота на поверхности иммунного биосенсора . . . . .52
- Апуховская Л. И.*  
*Василевская В. Н.*  
*Безусяк А. И.*  
*Романова С. О.*  
*Калашников А. В.*  
*Калашников О. В.* Эффективность комплексных препаратов витамина D<sub>3</sub> при остеопорозе . . . . .59
- Пенчук Ю. М.*  
*Карпов А. В.*  
*Поводзинский В. М.*  
*Веревка С. В.*  
*Ульберг З. Р.* Технологические параметры культивирования клеток-продуцентов для получения интерферонов I типа . . . . .69
- Влизло В. В.*  
*Стадник В. В.*  
*Майор Х. Я.*  
*Вербицкий П. И.*  
*Стойка Р. С.* Идентификация патологического приона при губчатообразной энцефалопатии крупного рогатого скота . . . . .75
- Цыганкова В. А.*  
*Мусатенко Л. И.*  
*Галкина Л. А.*  
*Галкин А. П.*  
*Пономаренко С. П.*  
*Сытник К. М.*  
*Икин Д. Е.* Особенности действия регуляторов роста на экспрессию генов в клетках зародышей семян в раннем постэмбриогенезе . . . . .81

## НОВЫЕ МЕТОДЫ

*Дыль Е. Л.*  
*Виноградова К. Г.*  
*Минченко О. Г.* Современные подходы к контролю количественного содержания действующих компонентов комбинированных лекарственных средств .....93

*Соловьев А. А.*  
*Голомидов Д. А.*  
*Лившиц Л. А.* Новые методики анализа мутаций в некоторых экзонах генов *PAH* и *CFTR* с использованием денатурирующего градиентного гель-электрофореза ...99

## СТРАНИЦЫ ИСТОРИИ

*Виноградова Р. П.* Владимир Петрович Вендт — основатель биотехнологии в Украине .....104

НОВОСТИ .....112

## РЕЦЕНЗИИ

*Левцикий Е. Л.* Рецензия на монографию В. А. Кунаха «Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи» (Київ: Логос, 2005) .....122

КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ, СИМПОЗИУМЫ .....126

## НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ

*Генная терапия* .....129

## ЮБИЛЕИ

*Мельничук Д. О.*  
*Мельничук М. Д.*  
*Григорюк И. П.* Анатолий Леонидович Бойко: известный украинский ученый — вирусолог, эколог, биотехнолог .....134

# CONTENTS

## EDITOR-IN-CHIEF'S COLUMN

Modern state of molecular medicine development . . . . .9

## REVIEWS

- Verevka S. V.* On some peculiarities of transgenic proteins' structure formation and connected risk factors . . . . .13
- Goryushkina T. B.* Grape wines. Chemical composition and methods  
*Dzyadevych S. V.* determination . . . . .24
- Varbanets L. D.* Microbial  $\alpha$ -amylases: isolation, purification  
*Avdiyuk E. V.* and practical usage . . . . .39  
*Borzova N. V.*

## EXPERIMENTAL ARTICLES

- Pyrogorova L. V.* Immobilization of bovine leucosis antigen  
*Starodub M. F.* on the transducer surface of biosensor . . . . .52
- Apukhovska L. I.* Effectiveness of vitamin D<sub>3</sub> complex preparations  
*Vasilevska V. M.* under conditions of osteoporosis . . . . .59  
*Bezysyak A. I.*  
*Romanova S. O.*  
*Kalashnikov An. V.*  
*Kalashnikov Ol. V.*
- Penchuk Yu. M.* The technological parameters of cultivation cells  
*Karpov O. V.* which are producers of type I interferons . . . . .69  
*Povodzinsky V. M.*  
*Veriovska S. V.*  
*Ul'berg Z. R.*
- Vlizlo V. V.* Identification of pathological prion in cattle  
*Stadnyk V. V.* with bovine spongiform encephalopathy . . . . .75  
*Mayor Kh. Ya.*  
*Verbytskii P. I.*  
*Stoika R. S.*
- Tsygankova V. A.* The peculiarity of growth regulator action on gene  
*Musatenko L. I.* expression in cell of embryo of seeds in early  
*Galkina L. O.* postembryogenesis . . . . .81  
*Galkin A. P.*  
*Ponomarenko S. P.*  
*Sytnik K. M.*  
*Eakin D. E.*

## NEW METHODS

*Dyl O. D.*  
*Vinogradova K. G.*  
*Minchenko O. H.* Modern approaches for the quantitative contents control  
of functional components of combined medical drugs . . . .93

*Solovyov O. O.*  
*Golomidov D. O.*  
*Livshyts L. A.* New techniques for mutation analysis in some exons  
of *PAH* and *CFTR* gene of men using denaturing gradient  
gel-electrophoresis . . . . .99

## PAGES OF HISTORY

*Vinogradova R. P.* Volodimir Petrovich Vendt is fundator biotechnology  
in Ukrain . . . . .104

NEWS . . . . .112

## NOTICES

*Levitsky E. L.* Notice on monograph V. A. Kunach «Biotechnology  
of medicinal plants. Genetic, physiological  
and biochemical foundations» ( Kyiv: Logos, 2005) . . . .122

CONFERENCES, CONGRESSES, SYMPOSIA . . . . .126

## NEW PUBLICATIONS ON BIOTECHNOLOGY AND ADJOINING BRANCHES OF SCIENCE

*Gene therapy* . . . . .129

## CELEBRATIONS

*Melnitchuk D. O.*  
*Melnitchuk M. D.*  
*Grigoruk I. P.* Anatoliy Leonidovitch Boyko: famous Ukrainian  
scientist — virologist, ecologist, biotechnologist . . . . .134



# 2008

## КОЛОНКА ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА



### СУЧАСНИЙ СТАН РОЗВИТКУ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МЕДИЦИНИ

Ми живемо в добу бурхливого розвитку фундаментальних наук, передусім біології. Недаремно наше сьогодні називають часом біології. Насамперед це стосується розвитку молекулярної біології та молекулярної генетики і створення на їхній основі по суті нової галузі знань — генетичної інженерії. Маніпулювання з генами, створення нових генетично модифікованих організмів, які посіли чільне місце у таких життєво важливих галузях, як сільське господарство та харчова промисловість, — ось тільки основні віхи розвитку цієї галузі сучасної науки.

Одним із визначальних досягнень молекулярної генетики було встановлення того факту, що багато з найпоширеніших та небезпечних захворювань людини зумовлені змінами у певних молекулярних процесах і, в кінцевому підсумку, — змінами у генах, перебіг яких вони визначають. Слід наголосити, що в цьому сенсі однією з найбільш вагомих можливостей генетичної інженерії є заміна патологічно змінених генів на нормальні. Саме такий підхід дав початок розвиткові нової галузі медицини — *молекулярної медицини*. Молекулярну медицину прийнято визначати як таку, що займається лікуванням захворювань за допомогою цілеспрямованої дії на чітко визначені молекулярні мішені. Ці мішені маркують на основі певних вивчених молекулярних процесів.

Таким чином, основним постулатом молекулярної медицини є положення про те, що для кожного захворювання, кожного патологічного стану є своя молекулярна мішень, яку можна використати для діагностики та лікування певної патології за умов цілеспрямованої дії лікарського препарату чи іншого медичного впливу.

До процесів, що були упродовж останніх років об'єктом вивчення молекулярної медицини, належить передусім апоптоз. На відміну від некрозу, апоптозом називають процес запрограмованого видалення ушкоджених клітин із популяції. Регуляція цього процесу, тобто його стимуляція чи, навпаки, інгібування за допомогою певних фізіологічно активних речовин, уможливить розроблення методів лікування таких небезпечних захворювань, як серцево-судинна патологія, злоякісні пухлини, ушкодження органів хімічної природи та деяких інших, у перебігу яких визначальне місце належить саме апоптозу.

Порушення процесу регуляції апоптозу призводить до виникнення різних захворювань, пов'язаних як із його посиленням, так й з інгібуванням. Дані про рецепторопосередковану регуляцію апоптозу дозволили розробити нові методи терапії гормонзалежних новоутворень. За допомогою андрогенблокувальної терапії лікують рак простати. Рак молочної залози часто піддається регресії за умов використання антагоністів естрогенових рецепторів. Інформація про

біохімічні сигналпередавальні шляхи регуляції апоптозу дозволяє ефективно застосувати антиоксидантну терапію, як це було показано за умов хімічного ураження клітин печінки хлоралканами та фосфорорганічними сполуками, а також використовувати препарати, що регулюють концентрацію кальцію або активують (інгібують) різні протеїнази. Усвідомлення ролі апоптозу в загибелі клітини інтенсифікувало пошук засобів захисту від нього. Перспективними є підходи, що пов'язані з регуляцією апоптозоспецифічних генів і реалізуються насамперед у *генній терапії* — одній з найважливіших галузей сучасної молекулярної медицини. Її застосовують під час лікування захворювань, зумовлених порушенням функціонування окремих генів.

За даними академіка РАН та РАМН М. А. Пальцева, до березня 2000 р. кількість клінічних випробувань у галузі генної терапії досягла 350, а кількість пацієнтів перевищила 200 осіб. Із них 76% становили хворі онкологічного профілю, причому в 31% випадків використовували імунотерапію *ex vivo*, у 32% — *in vivo*, у 15% — дію суїцидальних генів і лише у 2% випадків — векторактивуючий клітинний лізис. На жаль, розвиток генної терапії не завжди відбувається рівномірно та передбачувано. Надії на її широке застосування у лікуванні генетично зумовлених захворювань людини поки що не справдились. На думку швейцарських фахівців, має пройти не менше двох десятиріч, перш ніж можна буде говорити про широке впровадження генної терапії у повсякденну клінічну практику. Деякі автори вважають, що генна терапія ще не є придатною для ефективного використання у клініці. На думку ж інших фахівців у галузі молекулярної медицини, наявні дані доклінічних та низки клінічних випробувань, а також темпи розвитку сучасної техніки дозволяють з упевненістю стверджувати, що найближчі роки будуть відзначені швидким прогресом генної терапії та її застосування у трансплантології, онкології й лікуванні імунodefіцитних захворювань.

Поряд із цим у клінічних випробуваннях та клінічній практиці успішно поєднуються геннотерапевтичні методи з імунотерапевтичними, хіміотерапевтичними та радіаційними методами лікування.

Для розвитку генної терапії велике значення має розроблення принципово нових методів доставлення генетичного матеріалу у цільові клітини-мішені. На сьогодні для цієї мети найбільш ефективно використовують

наночастинки, різні вірусні системи та білки-переносники. Наночастинки мають селективну гідрофобність та більшу стабільність порівняно з ліпосомами і, отже, є більш технологічними. Окрім того, висока гідрофобність наночастинок дозволяє використовувати їх для вибіркового транспортування через гематоенцефалічний бар'єр.

Системи доставлення генетичного матеріалу із застосуванням аденовірусів та різних респіраторних вірусів характеризуються більшою ємністю та ефективністю, але в деяких випадках у разі їх використання спостерігається слабовиражена запальна реакція з боку респіраторного тракту.

Набули великого поширення також і системи, що ґрунтуються на явищі рецепторопосередкованого транспортування. За умов ендцитозу досягається ефективно доставлення лікарських препаратів усередину клітини. Як білки-переносники широко використовують осфетопротеїн, трансфери та ін.

Ще одним важливим напрямом молекулярної медицини є розроблення і застосування фармацевтичних препаратів цільової дії. Для створення лікарських препаратів вибіркової дії, які б дозволили здійснювати цілеспрямоване регулювання процесів проліферації та програмованої загибелі клітини, найперспективнішими виявились антисмислові олігонуклеотидні послідовності (антисенси). Вони можуть строго вибірково блокувати певні ділянки генів, що беруть участь у проліферації та апоптозі.

Важливим досягненням молекулярної генетики та генетичної інженерії було відкриття ферменту реплікації ядерної ДНК — теломерази. Вивчення роботи цього ферменту та його регуляції мало величезне значення для цілеспрямованого втручання й корекції таких важливих з медичного погляду патологічних станів, як процес старіння та злоякісного новоутворення. У середині 90-х років минулого сторіччя стало зрозуміло, що більшість безсмертних клітин, здатних до нескінченної проліферації (до них належать насамперед ракові), містять теломеразу. Механізм дії цього ферменту такий: теломераза зв'язується з 3'-кінцем теломери (залишок на одному із кінців ДНК, що реплікується, але не «забудовується» ДНК-полімеразою) і послідовно додає до нього дезоксирибонуклеотиди, комплементарні до РНК-матриці (елонгація), після чого відбувається транслокація, тобто переміщення ДНК, що подовжена на один повтор, відносно ферменту. Далі комплементарний ланцюг добудовується за допомогою ДНК-

полімерази. Теломера при цьому подовжується. Слід зазначити, що теломераза синтезує лише невелику ділянку теломери, яка втрачається внаслідок кінцевої реплікації. Основна ж частина теломерної ДНК реплікується звичайним синтезом ведучого та відстаючого ланцюгів за допомогою ДНК-полімерази.

У злоякісних клітинах виявляється досить високий рівень теломеразної активності, а самі теломери у них короткі та стабільні. Водночас для більшості соматичних клітин людини є характерною відсутність детектованого рівня теломеразної активності, а теломерна ДНК, що є досить довгою в момент народження, з віком вкорочується. Ця обставина викликала справжній бум навколо теломерази і слугувала імпульсом для подальших досліджень механізмів функціонування та регуляції цього ферменту.

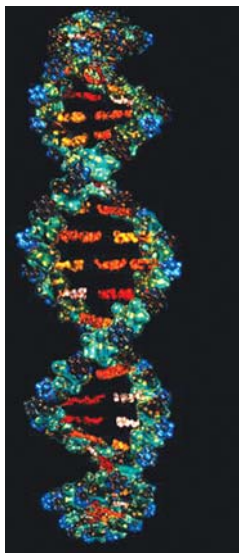
Зрозуміло, що опанувавши механізми подібної регуляції, можна буде певним чином втручатися у регуляцію процесів фізіологічного та прискореного старіння й онтогенезу. Для цього було клоновано ген, що кодує матричну РНК теломерази людини за допомогою заснованого на ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) методу зчитування. У переважній більшості соматичних клітин людини на стадії раннього ембріогенезу відбувається виключення гена (генів), що кодують теломеразу. Тим самим ініціюється процес вкорочення теломер, або так званого реплікативного старіння. На цей час накопичено значну кількість експериментальних даних, що підтверджують кореляцію між довжиною теломер та процесом старіння і слугують основою для досить чіткої так званої «теломерної теорії старіння та іморталізації». На відміну від нормальних клітинних штамів, лінії аномальних безсмертних клітин, передусім ракових, не старіють та містять активну теломеразу. Було виявлено експресію теломераз у деяких типах нормальних клітин, зокрема у тканинах плоду, сім'яниках, лімфоцитах периферійної крові та в епідермісі шкіри. При цьому для всіх цих клітин є характерною або висока швидкість оновлення, або належність до пулу диференційованих клітин, що постійно розмножуються. Теломеразну активність загалом виявлено у 89,4% випадків із понад 2 600 протестованих зразків пухлин людини. Активність цього ферменту вважають найбільш прийнятним онкомаркером людини. Імовірно, теломеразна активність є необхідною для проліферації ракових клітин.



Серед найголовніших об'єктів дослідження молекулярної медицини є також проблема «Геном людини та молекулярна медицина». Саме одним із вирішальних підсумків вивчення генома людини є поява та швидкий розвиток якісно нового етапу медичної науки — молекулярної медицини. Ідентифікація багатьох тисяч структурних та регуляторних генів, виявлення генної природи та молекулярних механізмів багатьох спадкових і багатофакторних хвороб, ролі генетичних факторів в етіології та патогенезі різних патологічних станів, у тому числі інфекцій, доказ генетичної неповторності кожного індивіда — ось досягнення, що становлять наукову основу молекулярної медицини.

Удосконалюються дослідження ще в одній з галузей молекулярної медицини — *фармакогенетиці* — науці про генетичну чутливість пацієнта до медикаментозного лікування. У найближчому майбутньому ліки будуть «підганятися» під хворого як кравець підганяє косяком під замовника.

Річ у тім, що в ході клінічних випробувань нових ліків у деяких пацієнтів відсутня клінічна відповідь на лікування або розвиваються тяжкі побічні ефекти. Причину цього явища вчені вбачають у генетичних розбіжностях між пацієнтами. За допомогою фармакогенетики можна ідентифікувати гени, якими зумовлені ці розбіжності у реакціях на фармацевтичні засоби. У результаті виграють пацієнти, оскільки вони не будуть піддаватися впливу неефективної терапії або зможуть розраховувати на зменшення частоти побічних реакцій. Фармакогенетична інформація може також справляти позитивний вплив на вартість та процедури клінічних випробувань. Окрім того можна очікувати зниження витрат на лікування пацієнтів, оскільки з'явиться можливість проведення більш прицільної терапії і стане простішим процес визначення необхідних



дозувань. З фармакогенетичними дослідженнями також тісно пов'язані питання етичного, правового та соціального характеру. Одним з важливих аспектів є захист даних поряд зі збереженням конфіденційності зібраної генетичної інформації.

Поза сумнівом, саме молекулярній медицині належить майбутнє, а з урахуванням генної терапії — це і є медицина 21 сторіччя. До загально-визнаних досягнень молекулярної медицини належать: розроблення точних, ефективних, значною мірою універсальних методів діагностики спадкових захворювань на будь-якій стадії онтоге-

незу, у тому числі й до народження (пренатальна діагностика); молекулярних підходів до абсолютно точної ідентифікації особистості (геномна дактилоскопія); експериментальних та клінічних підходів генної терапії до спадкових і неспадкових захворювань; досліджень із фармакогенетики та фармакогеноміки на основі даних про індивідуальний і біохімічний (генетичний) фінгерпринт; молекулярних основ профілактичної (предикативної) медицини.

Таким чином, загальна «генетизація» зумовила появу молекулярної медицини. Саме молекулярна медицина та основні її напрями (предикативна медицина, генна терапія, фармакогеноміка та ін.), фундаментом яких є дослідження генома людини, визначатиме у майбутньому все розмаїття фундаментальних та прикладних наук про людину.

*Академік НАН України  
С. В. Комісаренко*



## ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ СТРУКТУРЫ ТРАНСГЕННЫХ БЕЛКОВ И ОБУСЛОВЛЕННЫЕ ИМИ ФАКТОРЫ РИСКА



*С. В. ВЕРЕВКА*

Институт отоларингологии им. А.С. Коломийченко АМН Украины, Киев  
Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

*E-mail: verevka@biochem.kiev.ua*

Рассмотрены проблемы, обусловленные развитием технологии трансгенных продуктов питания. В свете данных о молекулярных механизмах формирования структуры белков и обеспечении межбелковой комплементарности обосновывается положение о комплексном характере функционирования структурообразующих, поддерживающих и элиминирующих систем. Обсуждаются пути нарушения трансгенными продуктами межбелкового согласования и его возможные последствия.

**Ключевые слова:** трансгенные белки, факторы риска, шапероны, мисфолдинг, прионы.

Трансгенные технологии составляют одно из наиболее спорных достижений современной науки, вызывая неослабевающую полемику вокруг создаваемых ими возможностей и порождаемых проблем. Поднимаемые вопросы и предположения охватывают редкий по широте диапазон от хорошо оплаченного оптимизма до ограничений, налагаемых религиозными догмами. Немалую роль играет и традиционное «как бы чего не вышло», не способствующее, но и не препятствующее все более широкому внедрению продуктов с непредсказуемым побочным действием. Не пора ли отказаться от обывательской точки зрения и попытаться оценить существующую проблему на основании имеющихся данных о молекулярных механизмах формирования белковых структур и путях обеспечения межбелковой комплементарности, лежащих в основе регуляции неисчислимого множества биологических процессов? Подобный подход позволит хотя бы в какой-то степени оценить остроту создаваемых трансгенными технологиями проблем, осознать факторы риска и разработать меры для их предупреждения.

### Механизмы формирования структурной организации белковых молекул

В основе функциональной активности белковых молекул лежит их способность участвовать в строго определенных для каждого белка межмолекулярных взаимодействиях [1, 2]. Подобная специализация обеспечивается формированием для каждой из белковых молекул нативной, единственно верной только для нее и только для каждого отдельного этапа процессинга молекулы, конформации. При этом каждая из белковых молекул представляет собой сложный молекулярный объект, находящийся в состоянии динамического равновесия между в той или иной степени стабилизированными изоформами [3]. Степень термодинамической стабилизации различных белков колеблется в широких пределах: одни сохраняют свою структуру при жестких химико-физических воздействиях, другие — в той или иной мере способны к обратимой денатурации, третьи — лабильны и постоянно пребывают в неупорядоченном состоянии. Белковым молекулам присуща многоуровневость структуры. Первичная структура белка — его аминокислотная последовательность — задается генетически и остается неизменной на протяжении

жизни данного организма. Регулярность структуры полипептидной цепи совместно со сложным комплексом внутримолекулярных взаимодействий обеспечивают формирование элементов вторичной структуры —  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -складчатых структур, нескольких видов конформационных изгибов и неупорядоченных участков. В контексте данной работы целесообразно подчеркнуть две особенности  $\beta$ -складчатых структур. Во-первых, заслуживает упоминания способность их к формированию антипараллельных укладок — стабилизированных многочисленными межцепочечными взаимодействиями регулярных структур, состоящих из двух и более взаимно противоположных участков полипептидной цепи. Из-за сложного комплекса межцепочечных взаимодействий поверхность подобных блоков отличается повышенной гидрофобностью. Крайний случай подобного структурирования представлен  $\beta$ -бочоночными структурами, сформированными блоком  $\beta$ -укладок и характерными для конститутивных белков клеточных мембран [4, 5]. Вторая особенность состоит в способности  $\beta$ -структурированных матриц вызывать лавинообразное агрегирование многих нативных белков с последовательной трансформацией их структуры по  $\beta$ -складчатому типу [6]. Формирование следующего — третичного — уровня белковой структуры представляет собой исключительно сложный и все еще не поддающийся компьютерному моделированию процесс, опосредованный взаимодействием элементов вторичной структуры не только между собой, но и с многочисленными белковыми компонентами клетки. Распространенная в свое время гипотеза о самосборке белковых молекул в сторону минимализации свободной энергии оказалась несостоятельной для большинства сколько-нибудь сложных белков, но, к сожалению, все еще составляет неотъемлемую атрибутику некоторых учебников биологической химии в качестве единственно возможного пути формирования структуры белков [7]. Гипотеза основывалась на ставших классическими экспериментах К. Б. Анфинсена по окислительной ренатурации полностью восстановленной и денатурированной рибонуклеазы [8]. Однако оставались без объяснения причины необратимой денатурации белков, равно как и безуспешность многочисленных попыток ренатурации последних [9]. Обнаружение ренатурирующего влияния клеточного цитозоля на не поддающиеся ренатурации традиционными методами денатурированные белки привело к откры-

тию молекулярных шаперонов — разнообразного и многофункционального класса белков, обеспечивающих формирование и поддержание нативного конформационного состояния других белков. Согласно общепринятому определению, молекулярные шапероны составляют класс белков, assisting процесс правильной нековалентной укладки полипептидов или полипептидсодержащих структур в условиях *in vivo*, но не являющихся компонентами образующихся структур [10]. То есть отнесение к шаперонам определяется функциями белка и не связано с его структурой. Обладая схожей функцией, шапероновые белки могут быть подразделены на две большие группы. К первой из них относятся мономерные шапероны с молекулярной массой порядка 70–100 кДа, вторую группу составляют олигомерные шапероны, называемые шаперонинами, с молекулярной массой около 800 кДа [11]. Каждая из этих групп подразделяется на несколько отличающихся друг от друга семейств, находящихся между собой в сложных функциональных взаимодействиях. Действие шапероновых белков состоит в своего рода ассистировании самоукладки формируемого белка в правильную, обладающую биологической активностью форму, что сопряжено с формированием локальных энергетических минимумов и является энергоемким, АТФ-зависимым процессом [11]. Не менее важная функция шапероновых белков состоит в поддержании белков в нативном состоянии. Резкое возрастание количества шаперонов под влиянием стрессовых факторов обусловило их распространенное определение как белков теплового шока [12, 13]. Это не совсем правильно, поскольку шапероны — многофункциональные белки, задействованные не только в формировании и поддержании белковой структуры, но и в транспортировке белков от эндоплазматического ретикулума к субклеточным частицам, переносе белков сквозь клеточные мембраны и многом другом [11, 14]. На примере недостаточных по шаперонам мутантов показано, что белки, не прошедшие опосредованную шаперонами укладку, проявляют тенденцию к формированию агрегатов [15]. Не подлежит сомнению, что гарантированное формирование нативной структуры белка может быть обеспечено только при его биосинтезе в родной клеточной системе, поскольку продуцируемые трансгенными клетками рекомбинантные белки подвержены сильнейшей агрегации, ведущей к формированию так называемых телец включения [16, 17].

### Структурные основы межбелковой комплементарности

Закономерно возникают вопросы, связанные с молекулярными механизмами формирования и распознавания белковых молекул. Каким образом шапероновые белки распознают подлежащие формированию или исправлению белковые молекулы на фоне характерного для живого организма множества других белков? Что обеспечивает правильность укладки каждого отдельного белка при огромном разнообразии возможных вариантов? Из-за очевидной невозможности обеспечения каждого белка персональной шапероновой системой рассматриваемая сторона вопроса становится как бы неразрешимой. С другой стороны, как распознаются подлежащие элиминации выполнившие свои биологические функции или денатурированные белки? Каким образом немногочисленные в общем убиквитин-лигазы E3 протеасомного комплекса [18] дифференцируют подлежащие маркировке молекулы на фоне невообразимого набора конформационных состояний множества белков данной клеточной системы? Схожие вопросы могут быть заданы и в отношении молекулярных механизмов функционирования иммунной системы. Например, каким образом обеспечивается дифференцирование множества собственных белков в нативной конформации от денатурированных или чужеродных? Систематизация данных о структурном обеспечении взаимной комплементарности белковых молекул позволяет в какой-то мере приблизиться к ответу на эти вопросы. Особого внимания при этом заслуживают данные об участках непосредственного межмолекулярного контакта белковых молекул, функционально формирующих межмолекулярный комплекс. Сравнение данных о величине поверхностей, маскируемых при образовании межбелковых комплексов, свидетельствует о высоком уровне групповой дискретности. Наблюдаются две группы размерности — «стандартная» (порядка  $1600 \pm 400 \text{ \AA}^2$ ) и «большая» (около  $3500 \pm 200 \text{ \AA}^2$ ) [19, 20]. Подобное распределение едва ли случайно и, по-видимому, свидетельствует о существовании термодинамически необходимого и достаточного минимума, обеспечивающего эффективное взаимное связывание функционально комплементарных белков [19, 21]. Основу «стандартной» группы формируют комплексы протеиназа–ингибитор и антиген–антитело. По скорости формирования эти комплексы относятся к наиболее

быстрым процессам межбелковой ассоциации, т. е. они соответствуют необходимым и достаточным условиям быстрого распознавания и взаимного связывания комплементарных белков. Поверхности непосредственного межбелкового контакта принято делить на связывающие участки и связываемые детерминанты (лигандные группы, эпитопы и т.п.). Для случая взаимодействий белковый ингибитор — протеиназа и антиген — антитело размерности связываемых детерминант практически одинаковы и примерно составляют  $600\text{--}800 \text{ \AA}^2$ , что соответствует группе из 2–3 компактно расположенных аминокислотных остатков [19, 20]. Наиболее подробно изучено комплексообразование белковых ингибиторов сериновых протеиназ с соответствующими ферментами. Показано, что шесть остатков (P3–P3 согласно номенклатуре Шехтера–Бергера) [22] реактивного центра ингибитора занимают до 77% поверхности ингибитора, маскируемой при комплексообразовании, причем на долю остатков в положениях P1 и P2' приходится повышенная степень маскируемости и аномально высокое число контактов с аминокислотными остатками фермента [23, 24]. Эти остатки адекватны по лигандной специфичности связывающему (S1-) и эффекторному (S2'-) участкам фермента и расположены в оптимальной, так называемой канонической, конформации [25]. Синхронное взаимодействие связывающего и эффекторного подучастков активного центра фермента с расположенными в надлежащей конформации аминокислотными остатками ингибитора составляет необходимое и достаточное условие высокоизбирательного и эффективного комплексообразования [26].

Сходным образом обеспечивается распознавание протеиназами участков активационного расщепления белковых проформ, равно как и ряд других случаев взаимодействия функционально комплементарных белков [27]. Оно может быть определено как мотив 1-X-3 межбелкового распознавания, при котором два функционально важных остатка разделены третьим, несущественным [28]. Во всех рассмотренных случаях связывающий компонент «видит» не всю связываемую молекулу, а лишь экспонированную на поверхности пару аминокислотных остатков мотива 1-X-3, своего рода поверхностный микрокластер, обеспечивающий распознавание и связывание белка-мишени комплементарным белком. Способность подобной группы к эффективному комплексо-

разованию определяется как природой соответствующих аминокислотных остатков, так и соответствием их конформационного расположения структурным требованиям белка-партнера. При несоответствии этим требованиям сколько-нибудь эффективное взаимодействие исключено, чем, в частности, может быть объяснено явление вторичной специфичности белковых ингибиторов протеиназ — зависимости способности белка блокировать ферменты одного и того же типа от источника получения последних [25, 29]. Степень конформационной подвижности составляющих связываемую группу остатков также оказывает значительное влияние на степень ее функциональной реализации. Искусственное нарушение «канонической» для данного фермента конформации лишает связываемый белок способности к эффективному комплексобразованию, что неоднократно наблюдалось при самых разнообразных воздействиях на конформацию реактивных центров белковых ингибиторов сериновых протеиназ [28]. Вместе с тем формирование на поверхности белковой молекулы стабилизированной группы — аналога эффективно связываемого микрокластера — обеспечивает ее участие в соответствующих взаимодействиях. В частности, для большинства ингибиторов сериновых протеиназ растительного происхождения отсутствует четкое объяснение их функциональной роли как ингибиторов [30]. С одной стороны, ингибируемые ферменты никоим образом не находятся в функциональной связи с этими белками [31], а с другой — известно множество высокомолекулярных белков из родственных источников, лишенных ингибиторных свойств [32]. Поэтому для белковых ингибиторов растительного происхождения допустимо предположение о случайном характере формирования в жестко структурированных резервных белках поверхностных групп — структурных аналогов реактивных центров белковых ингибиторов функционально чужеродных ферментов.

Не меньшего внимания заслуживают структурные особенности связываемых детерминант, обеспечивающих формирование комплексов антиген — антитело. Размерность маскируемых в ходе комплексобразования поверхностей практически одинакова со случаем взаимодействия протеиназа — белковый ингибитор [19, 20], причем структурное моделирование как тех, так и других связываемых фрагментов не сопровождается какими-либо методическими затруднениями [33, 34]. Иммуногенность или неиму-

ногенность белка определяется наличием на его поверхности микрокластера, состоящего из нескольких компактно расположенных аминокислот и обеспечивающего быстрое и высокоизбирательное связывание антителом. Для относящегося к данной биологической системе нативного белка наличие подобной «черной метки» исключается его нативной конформацией, на поверхности же чужеродного или денатурированного белка ее присутствие возможно, более того — обеспечено статистически. Вероятно, именно поэтому иммуноглобулины, будучи инертными по отношению к белкам в нативной конформации, эффективно связывают денатурированные и чужеродные. Степень конформационной стабилизации связываемой группировки также играет важную роль: как известно, увеличение иммуногенности пептидных эпитопов посредством ковалентной конъюгации относится к классическим методам молекулярной иммунологии.

В отличие от протеиназ, связывающие свойства иммуноглобулинов подвержены существенным изменениям. Так, модификация нативных иммуноглобулинов хаотропными агентами приводит к «размыванию» лигандной специфичности иммуноглобулина и проявлению аффинности по отношению к самым разнообразным антигенам. Предполагается, что подобные изменения обусловлены подвижностью субдоменных структур активных центров иммуноглобулинов, функционально необходимой для подстройки под структуру различных антигенов. Средство полиреактивных иммуноглобулинов к иммобилизованным на нерастворимой поверхности белкам возрастает при денатурации последних, введение же в систему низкомолекулярных лигандов с двумя-тремя подвижными гидрофобными группировками, расположенными на расстояниях, обеспечивающих перекрывание площади, характерной для взаимодействий антиген-антитело, приводит к существенному увеличению связывающих свойств как нативных, так и модифицированных хаотропными агентами иммуноглобулинов [35]. Отмеченный эффект может рассматриваться как результирующее проявление двух процессов: индукции эффектором структурирования иммуноглобулинов в высокоэффективную конформацию и конкуренции за сформированный сильносвязывающий участок иммуноглобулина между растворенными молекулами низкомолекулярного эффектора и статистически сформированными на поверхности иммобилизованного белка



лигандными группами. Иными словами, иммуноглобулинам присуща пластичная специфичность — способность подстраиваться под те или иные «чужие» поверхностные группы. Предполагается, что она обусловлена подвижностью субдоменных структур активных центров иммуноглобулинов и функционально необходима для подстройки под структуру различных антигенов [36, 37]. С другой стороны, подобная пластичная специфичность создает возможность переноса сформированного иммунного ответа на «свои» группы.

Таким образом, структурное обеспечение межбелковой комплементарности может быть сведено к классическому разделению формирующих поверхность белка малых структурных групп на «свои» и «чужие», причем «чужими» оказываются все, не относящиеся к «своим». Для простейшего случая мотива 1-X-3 любой поверхностный фрагмент полипептидной цепи (...ABCDEFGHI...) может рассматриваться как набор состоящих из трех аминокислотных остатков микрокластеров. При этом каждый из доступных для межбелкового контакта аминокислотных остатков оказывается составной частью двух групп (АХС, СХЕ, ЕХG, GXI) — в третьем и первом положениях, соответственно. Подобным образом, в частности, обеспечивается распознавание и расщепление протеиназами приманочного участка  $\alpha_2$ -макроглобулина. В зависимости от субстратной специфичности фермента фрагмент ...-Arg\*-Leu-Val\*-His-Val-... расщепляется либо по отмеченному аргинину, либо по валину [38, 39]. Этот фрагмент может рассматриваться как пара поверхностных групп -Arg-Leu-Val- и -Val-His-Val-. Тем самым поверхность любой белковой молекулы можно рассматривать как набор в той или иной мере стабилизированных микрокластеров, более или менее соответствующих или не соответствующих определенным для данной биологической системы структурным правилам. Степень визуализации каждого из микрокластеров определяется природой составляющих аминокислотных остатков, их конформационным расположением и степенью стабилизации последнего.

Приведенные положения в полной мере относятся к функционированию структурообразующих и поддерживающих систем. Формирование «правильной» конформации для каждого из множества синтезируемых белков сводится к исключению на поверхности формируемой молекулы групп, конформационно отличных от сравнительно не-

большого набора разрешенных. Подобного рода поверхностная «рихтовка» сопряжена с формированием локальных энергетических минимумов и не может не быть энергозатратной, АТФ-зависимой, что и наблюдается в действительности [11]. Показательно, что правильный фолдинг обеспечивается лишь для нативных белков данной клетки, формирование же полноценных структур рекомбинантных белков остается сложной и далекой от разрешения проблемой молекулярной биологии [16,17,40]. Сходным образом шапероновые белки различают нативные и денатурированные формы «родных» белковых молекул, оставаясь нейтральными к первым и энергично взаимодействуя со вторыми [41].

Аналогичным образом может быть объяснена способность к выявлению чужих или своих, но денатурированных белковых молекул компонентами иммунной системы, равно как и способность убиквитин-лигаз E3 протеасомного комплекса распознавать подлежащие маркировке молекулы на фоне огромного пула других белков. Наличие неправильного для данной клеточной системы поверхностного микрокластера оказывается достаточным для распознавания белка на фоне множества других, не имеющих подобного рода «черной метки». Естественным следствием такого распознавания является как включение полиубиквитицилированных компонентов в характерные для амилоидных заболеваний центральной нервной системы белковые агрегаты, так и ингибирование протеасомного комплекса филаментами и олигомерами соответствующих белков [42–44].

Тем самым структурное обеспечение процессинга белков сводится к формированию и распознаванию «своих» и «чужих» поверхностных микрокластеров, причем природа составляющих микрокластер аминокислот, их конформационное расположение и степень стабилизации последнего оказываются решающими факторами молекулярного дифференцирования. Подобная разбивка существенно упрощается функциональным подобием аминокислот в пределах одной группы (гидрофобных, полярных незаряженных, положительно или отрицательно заряженных). Для каждой конкретной клеточной системы структурирование белков ограничено разрешенными «своими» комбинациями, «чужими» же оказываются все, не соответствующие исключительным правилам, установленным для «своих».

Отмеченные положения имеют два исключительно важных функциональных следствия. С одной стороны, согласованность структурных правил распознавания молекулярных систем формирования, поддержания и элиминации белков оказывается неременным условием жизнеспособности организма в целом, обеспечивающим нормальный процессинг сколь угодно большого числа белков и позволяющим говорить о своего рода комплексной системе межбелкового согласования. С другой стороны, нарушение нормального функционирования хотя бы одного из компонентов подобной системы неизбежно сказывается на функционировании остальных. Появление сколько-нибудь значительного количества белковых молекул с «чужими» поверхностными группами неизбежно скажется на функционировании структурообразующих и элиминационных систем. Учет этих положений необходим для понимания проблем, создаваемых биотехнологией трансгенных белков.

#### **Мембранный фолдинг и возможности нарушения межбелковой координации трансгенными белками**

Возникновение и стремительное развитие трансгенных технологий также сопряжено с рядом проблем, обусловленных нарушением нативного фолдинга белка. Неспособность фолдинговой системы клеток-продуцентов обеспечить формирование нативной конформации трансгенного белка ведет к образованию телец включения — агрегатов, весьма подобных формируемым при амилоидных заболеваниях центральной нервной системы. Применение методов технологического рефолдинга позволяет в той или иной степени реактивировать получаемый продукт [16, 17], однако вопрос об его иммуногенности остается открытым [45]. Иммуногенность белковых препаратов, то ли обретенная вследствие самоповреждения нативных белков [46, 47], то ли из-за особенностей формирования структуры рекомбинантных белков, не только снижает эффективность соответствующего препарата и обуславливает необходимость увеличения лекарственной дозы, но и чревата развитием аутоиммунной реакции на нативные белки [45–47]. При этом в силу случайного подобию поверхностных эпитопов под прессом аутоиммунной реакции может оказаться не только белок, соответствующий вводимому препарату, но и белки, не имеющие с последним никакой функциональной связи.

И если побочные эффекты применения очищенных рекомбинантных белков медикаментозного назначения могут быть хоть как-то учтены, то последствия массового и практически неконтролируемого употребления трансгенных продуктов питания не поддаются даже приблизительной оценке. И дело даже не в несоизмеримо больших пищевых количествах поступающего в организм белка. В отличие от проходящих сложную систему очистки рекомбинантных белков медикаментозного предназначения, трансгенные продукты питания представляют собой невообразимую композицию биологических компонентов, включающую белки, сформированные в чужеродной клеточной системе. И если присутствие в пищевых продуктах практически нерастворимых белковых агрегатов влечет за собой лишь увеличение нагрузки на соответствующие компоненты пищеварительной системы, то белки, инкорпорированные в клеточные мембраны, создают намного более серьезные проблемы, обусловленные особенностями формирования их структур в чужеродной клеточной системе. Каковы же альтернативы нативному фолдингу, какие факторы влияют на формирование структуры рекомбинантного белка? Понятно, что альтернативное нативному фолдингу структурообразование белка в условиях реальной клетки весьма далеко от классической анфинсеновской самосборки, поскольку проходит в концентрированном (порядка 340 г/л) макромолекулярном окружении [15]. Однако еще более существенным фактором представляется структурообразующая роль фосфолипидного бислоя клеточных мембран. Исследование взаимодействий неструктурированных полипептидных цепей и белков с нативными и модельными мембранами позволило выявить ряд закономерностей, позволяющих говорить об опосредованном мембранными структурами фолдинге как о регулярном процессе, протекающем по своим, существенно отличным как от самосборки в сторону минимализации энергии, так и от шаперонопосредованной укладки, правилам [48–50]. Отмечается многостадийность процесса, охватывающего первичное связывание неструктурированной полипептидной цепи с поверхностью мембраны, ее свертывание, инкорпорацию внутрь гидрофобного бислоя и формирование элементов вторичной структуры [51]. Последующий переход на третичный уровень структуры также обусловлен комплексом взаимодействий между отдельными участками полипептидной цепи и гидрофоб-

ной составляющей фосфолипидного бислоя. Наряду с этим конститутивным белкам клеточных мембран присущи структурные особенности — повышенное содержание  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -укладок, взаимная компенсированность поверхностных заряженных групп и повышенная концентрация положительно заряженных остатков на внутриклеточной части молекулы. По уровню гидрофобности поверхности подвергшихся мембранному фолдингу структур соизмеримы с конститутивными белками клеточных мембран и существенно превосходят прошедшие нативный фолдинг растворимые белки [52–54]. Повышенная гидрофобность поверхности подобных белков обеспечивает способность инкорпорироваться или проходить сквозь клеточные мембраны, в гидрофильной же среде они подвержены агрегации. Взаимная компенсированность поверхностных заряженных групп существенно стабилизирует сформированную глобулу, что, с одной стороны, обеспечивает повышенную устойчивость молекулы к протеолизу, а с другой — может вызывать необратимое и прогрессирующее нарушение функционирования системы фолдинга новосинтезируемого белка. Вместе с тем присутствие в клеточной системе белков, не поддающихся нативному структурированию, не может не сказаться на функционировании последней, что, в свою очередь, не может не отразиться на функциональной активности множества «своих» белков и жизнеспособности клетки в целом. Повидимому, именно этим обстоятельством объясняется сомнительная репродуктивная состоятельность генетически модифицированных растений. При этом практически несущественно, является ли белок растворенным или агрегированным, рекомбинантным или подвергшимся мисфолдингу нативным. В любом случае формирование поверхностной структуры молекулы по правилам, существенно отличным от установленных в данной биологической системе, статистически обеспечивает присутствие как поверхностных микрокластеров, распознаваемых как «чужие», так и групп — структурных аналогов участков межмолекулярных взаимодействий, ничего общего с нормальным процессингом данного белка не имеющих. Иными словами, мембранный фолдинг способен наделять белковую молекулу комплексом свойств, обеспечивающих возникновение серьезных молекулярных дисфункций. Пожалуй, в наиболее яркой форме подобного рода патогенный мисфолдинг представлен в случае трансмиссивных спонгиформных энцефалопатий.

Трансмиссивные спонгиформные энцефалопатии составляют группу необратимо прогрессирующих и летальных заболеваний центральной нервной системы, отличающихся уникальной природой лишенного нуклеиновых компонентов белкового инфицирующего агента — так называемой патогенной формы прионов ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ), в генетическом и химическом отношении идентичного интенсивно нарабатываемому нервными клетками млекопитающих белка ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). Единственное отличие между нормальной и патогенной изоформами состоит в способе укладки полипептидной цепи: если в первой доминирует  $\alpha$ -спирализация и лишь 3% цепи имеет  $\beta$ -укладку, то во второй доля последней достигает 43% [55]. Конформационные различия белковых форм определяют отличия по целому ряду свойств. Прионовое инфицирование вызывает серьезные повреждения шапероновой системы нервных клеток [56–58]. Окончательное формирование протеиназостойчивой патогенной конформации прионового белка происходит в наружной мембране нервных клеток [59]. Следовательно, патогенная изоформа прионового белка может рассматриваться как типичный продукт мембранного фолдинга [60]. Ее структурные свойства в полной мере соответствуют свойствам, характерным для белковых структур, прошедших мембранный фолдинг. Это и возросшая доля  $\beta$ -укладки [55], и повышенная гидрофобность поверхности, обеспечивающая способность к прохождению сквозь клеточные мембраны [59, 61] и формированию амилоидных ассоциатов [62, 63]. Высокая стабильность молекулы и ее протеиназостойчивость также могут быть отнесены к следствиям мембранного фолдинга, обеспечивающего компенсированность заряженных аминокислотных остатков на поверхности белка. В силу тех же причин на поверхности  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  сформированы дипольные пары, эффективно связываемые лизинсвязывающими участками плазминогена [64], что наряду со способностью к прохождению сквозь клеточные мембраны создает возможность переноса внеклеточных протеиназ во внутриклеточное пространство. С другой стороны, при определенных условиях способность подобных белков инкорпорироваться в фосфолипидные мембраны может привести к физиологически необоснованному поверхностному накоплению и активации соответствующих ферментов.

Вероятно, трансмиссивные спонгиформные энцефалопатии представляют собой

крайний случай формирования негативной обратной связи самоподдерживающегося и необратимо прогрессирующего мисфолдинга. Однако ряд свойств, обретаемых патогенной изоформой прионового белка вследствие мембранного фолдинга, вызывают серьезные опасения в отношении прошедших структурирование в чужеродной клеточной системе трансгенных белков. Устойчивость подобного рода структур к денатурационным воздействиям и протеолизу в полной мере проявилась во время недавней эпизоотии крупного рогатого скота в Великобритании и ряде европейских стран. Упрощение технологии обработки белковых добавок к комбикормам, в частности отказ от ставшего нерентабельным экстрагирования жиров и жесткого автоклавирования, обусловило сохранение инфицирующего действия находившейся в сырьевых субпродуктах патогенной изоформы прионового белка.

Вследствие высокой конформационной устойчивости и устойчивости к протеолизу, способности к инкорпорации и прохождению сквозь клеточные мембраны, статистически сформированным на поверхности участкам высокоизбирательного взаимодействия с функционально чужеродными белками подобные структуры оказываются едва ли не идеально приспособленными для нарушения функционирования всего комплекса систем межбелкового согласования как в клетке-производителе, так и в организме потребителя подобного рода продукции. Инициация аутоиммунных заболеваний белками продуктов питания известна давно [65–67], однако в случае трансгенных продуктов питания риск несоизмеримо выше, поскольку в силу чужеродности трансгенных белков шапероновой системе клетки-производителя какая-то их часть может быть сформирована по правилам мембранного фолдинга со статистически гарантированным наделением белка комплексом рассмотренных свойств. Еще одним, весьма настораживающим, обстоятельством представляется возможность формирования на поверхности подвергшихся мембранному фолдингу белков дипольных пар, эффективно связываемых лизинсвязывающими участками плазминогена [64]. Присутствие подобного рода групп на поверхности подвергшихся мембранному фолдингу белков совместно с высокой конформационной стабильностью и способностью к инкорпорации в мембранные структуры способны обеспечить трансмембранный перенос соответствующих ферментов с последующим нарушением важнейшего принципа функционирования

биологических систем — компарментализации биохимических процессов [68]. С другой стороны, задействованность лизинсвязывающих участков, комплементарных им групп и соответствующих ферментов и факторов в процессах пролиферации и метастазирования [69–71] побуждает поднять вопрос о потенциальной онкогенности подвергшихся мембранному фолдингу белков.

Из-за значительных различий физико-химических свойств очистка белков медикаментозного назначения от возможной примеси подвергшейся мембранному фолдингу изоформы представляет собой вполне решаемую задачу. В случае же белков трансгенных продуктов питания статистически обеспеченное присутствие соответствующих эпитопов на поверхности подобных стабильных и легко проходящих сквозь клеточные мембраны изоформ обуславливает нарушение межмолекулярного согласования структурообразующих, поддерживающих и элиминирующих белковых систем с последующим развитием заболеваний самого широкого профиля. При этом, в отличие от упомянутой эпизоотии крупного рогатого скота или обусловленного ритуальным каннибализмом аборигенов Новой Гвинеи заболевания куру, сама возможность отслеживания причинно-следственных связей между потреблением трансгенных продуктов питания и необъяснимым возрастанием уровня самых разнообразных заболеваний крайне затруднена — не столько вследствие методических трудностей проведения соответствующих исследований, сколько по много более прозаическим причинам экономического характера. Изложенные соображения позволяют сделать вывод о потенциальном риске, сопряженном с продукцией трансгенных технологий, необходимости соответствующей его оценки и недопустимости коммерческой профанации этого интереснейшего направления современной биохимии и молекулярной биологии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Van Regenmontel M. H. V.* A paradigm shift is needed in proteomics: 'structure determines function' should be replaced by 'binding determines function' // *J.Mol.Recognit.* — 2002. — V. 15, N 6. — P. 349–351.
2. *Edelman G.* Biochemistry and the sciences of recognition // *J.Biol.Chem.* — 2004. — V. 279, N 9. — P. 7361–7369.
3. *Демченко А.П.* Люминесценция и динамика структуры белков. К.: Наук. думка, 1988. — 280 с.

4. Valavanis I. K., Bados P. G., Emiris I. Z. Beta-barrel transmembrane proteins: geometric modelling, detection of transmembrane region, and structural properties // *Comput. Biol. Chem.* — 2006. — V. 30, N 6. — P. 416–424.
5. Galdiero S., Galdiero M., Pedone C. Beta-barrel membrane bacterial proteins: structure, function, assembly and interaction with lipids // *Curr. Prot. Pept. Sci.* — 2007. — V. 8, N1. — P. 63–82.
6. Koga T., Taguchi K., Kogiso M. et al. Amyloid formation of native folded protein induced by peptide-based graft copolymer // *FEBS Lett.* — 2002. — V. 531, N2. — P. 137–140.
7. Губський Ю. І. Біологічна хімія: Підручник. — Київ-Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. — 508 с.
8. Anfinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains // *Science.* — 1973. — V. 181, N4096. — P. 223–230.
9. Белицер В. А. Макроструктура и денатурационные превращения белков // *Укр. биохим. журн.* — 1962. — Т. 34, №2. — С. 290–320.
10. Ellis J. The general concept of molecular chaperones // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* — 1993. — V. 339, N1289. — P. 257–261.
11. Евстигнеева З. Г., Соловьева Н. А., Сидельникова Л. И. Структура и функции шаперонов и шаперонинов // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2001. — Т. 37, №1. — С. 5–18.
12. Derham B. K., Harding J. J.  $\alpha$ -Crystallin as a molecular chaperone // *Prog. in Retin. Eye Res.* — 1999. — V. 18, N4. — P. 463–509.
13. Ellis J. Proteins as molecular chaperones // *Nature.* — 1987. — V. 328, N 6129. — P. 378–379.
14. Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity // *Nature Reviews (Immunology).* — 2002. — V. 2. — P. 185–194.
15. Hartl F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding // *Nature.* — 1996. — V. 381, N 6583. — P. 571–579.
16. Маркосян К. А., Курганов Б. И. Фолдинг, неправильный фолдинг и агрегация белков. Образование телец включения и агрегсом // *Биохимия.* — 2004. — Т. 69, №9. — С. 1196–1212.
17. Гильчук П. В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме // *Биополимери і клітина.* — 2004. — Т. 20, №3. — С. 182–192.
18. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: from a vague idea, through the lysosome and ubiquitin-proteasome system, and to human diseases and drug targeting (Nobel lecture) // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2005. — V. 44. — P. 5944–5967.
19. Janin J. Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics // *Biochimie.* — 1995. — V. 77, N7/8. — P. 497–503.
20. Lo Conte L., Chothia C., Janin J. Atomic structure of protein-protein recognition site // *J.Mol.Biol.* — 1999. — V. 285, N5. — P. 2177–2198.
21. Stites W. Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis // *Chem.Rev.* — 1997. — V. 97, N5. — P. 1233–1250.
22. Schechter I., Berger A. On the size of the active site in proteinases. I. Papain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1967. — V. 27, N2. — P. 157–162.
23. Blow D., Wright C., Kulka D. et al. A model for the association of bovine pancreatic trypsin inhibitor with chymotrypsin and trypsin // *J.Mol.Biol.* — 1972. — V. 69, N 1. — P. 137–144.
24. Janin J., Chothia C. Stability and specificity of protein-protein interactions: the case of trypsin-trypsin inhibitor complex // *Ibid.* — 1976. — V. 100, N2. — P. 197–211.
25. Laskowski M., Kato I. Protein inhibitors of proteinases // *Ann.Rev.Biochem.* — 1980. — V. 49. — P. 593–626.
26. Верева С. В., Сытник А. И., Колодзейская М. В. О роли S2'-стимуляции сериновых протеиназ в регуляции протеолиза // *Укр. биохим. журн.* — 1994. — Т. 66. — №6. — С. 32–38.
27. Verevka S. V. On the Structural Similarity of Serpentine's Reactive Sites to Places of Activating Splitting in Protein's Precursors // *Ibid.* — 1995. — Т. 67, N5. — С. 24–28.
28. Verevka S., Miroshnichenko O. 1-X-3 motif in inter-protein recognition: structures, widespreading and possible practical application // *J.Mol.Recognit.* — 2001. — V. 14, N5. — P. 315–318.
29. Travis J. Interaction of human trypsin with chicken ovomucoid // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1971. — V. 44, N4. — P. 793–796.
30. Мосолов В. В., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор) // *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2005. — V. 41, N3. — С. 261–282.
31. Werle E., Maier L., Löffler F. Über einen kallikrein-inaktivator aus pflanzlichem material // *Biochem. Z.* — 1951. — V. 321, N 5. — P. 372–376.
32. Мосолов В. В., Валуева Т. Л. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. — М.: ВИНТИ, 1993. — 207 с.

33. *Teng S. F., Sproule K., Hussain A., Lowe C. R.* A strategy for the generation of biomimetic ligands for affinity chromatography. Combinatorial synthesis and biological evaluation of an Ig binding ligand // *J. Mol. Recognit.* — 1999. — V. 12, N1. — P.67–75.
34. *Kolodzeyska M. V., Verevka S. V.* On the role of effector sites in serine proteinases hydrophobic chromatography // *Укр. биохим. журн.* — 1996. — Т.69. — №3. — С. 87–93.
35. *Ильина Л. В., Вережка С. В.* Лигандиндуцированное структурирование полиреактивных иммуноглобулинов // *Укр. биохим. журн.* — 2003. — Т. 75, №6. — С. 56–61.
36. *Бобровник С.А., Петрова Ю.И., Ефетов К.А.* Трансформация сывороточных иммуноглобулинов в полиреактивные антитела // *Укр. биохим. журн.* — 1997. — Т. 69, №3. — С. 36–42.
37. *Бобровник С. А.* Динамика взаимодействия полиреактивных иммуноглобулинов с иммобилизованными антигенами // Там же. — 1998. — Т. 70, №6. — С. 135–143.
38. *Roberts R.* Alpha-2-macroglobulin // *J.Med.* — 1985. — V. 16, N1–3. — P. 129–219.
39. *Sottrup-Jensen L., Petersen T., Magnusson S.* A thiol ester in  $\alpha$ -2-macroglobulin cleaved during proteinase complex formation // *FEBS Letters.* — 1980. — V. 121, N1. — P. 275–279.
40. *Horowitz P. M.* Ironing of the protein folding problem? // *Nat. Biotechnol.* — 1999. — V. 17, N2. — P. 136–137.
41. *Demchenko A. P.* Protein folding and molecular chaperones: stochastic process under control // *Biophysics.* — 2000. — V. 45, N3. — P. 404–410.
42. *Bence N. F., Sampat R. M., Kopito R. R.* Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation // *Science.* — 2001. — V. 292, N 5521. — P. 1552–1555.
43. *Lindersson E., Beedholm R., Hojrup P. et al.* Proteasomal inhibition by a-synuclein filaments and oligomers // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, N13. — P. 12924–12934.
44. *Valera A. G., Diaz-Hernandez M., Hernandez F. et al.* The ubiquitin-proteasome system in Huntington disease // *Neuroscientist.* — 2005. — V. 11, N6. — P. 583–594.
45. *Schellekens H., Casadevall N.* Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences // *J.Neurol.* — 2004. — V. 251. — Suppl 2: II. — P. 4–9.
46. *Шевель М. В., Вережка С. В.* Автоповреждения белковых препаратов: молекулярные механизмы и пути предотвращения // *Совр. пробл. токсикол.* — 2006. — Т. 3. — С. 41–45.
47. *MacLennan S., Barbara J.* Risks and side effects of therapy with plasma and plasma fractions // *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.* — 2006. — V. 19, N1. — P. 169–189.
48. *Kaiser E. T., Kezdy F. J.* Secondary structures of proteins and peptides in amphiphilic environment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1983. — V. 80, N4. — P. 1137–1143.
49. *Russel C. J., Thorgeirsson T. E., Shin Y-K.* Temperature dependence of polypeptide partitioning between water and phospholipid bilayers // *Biochemistry.* — 1996. — V. 35, N 80. — P. 9526–9532.
50. *Wimley W. C., White S. H.* Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interface // *Nat. Struct. Biol.* — 1996. — V. 3, N10. — P. 842–848.
51. *White S. H., Ladokhin A. S., Jashinghe S., Hristova K.* How membrane shape protein structure // *J. Biol. Chem.* — 2001. — V. 276, N 35. — P. 32395–32398.
52. *Rees D. C., De Antonio L., Eisenberg D.* Hydrophobic organization of membrane proteins // *Science.* — 1989. — V. 245, N 4917. — P. 510–513.
53. *Samatey F. A., Xu C., Popot J-L.* On the distribution of amino acid residues in transmembrane  $\alpha$ -helix bundles // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — V. 92, N 10. — P. 4577–4581.
54. *Heijne G. von.* Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and positive-inside rule // *J.Mol.Biol.* — 1992. — V. 225, N 2. — P. 487–494.
55. *Pan K. M., Baldwin M., Nguyen J. et al.* Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion protein // *Proc.Natl. Acad. Sci.USA.* — 1993. — V. 90, N 23. — P. 10962–10966.
56. *Horwich A. J., Weissman J. S.* Deadly conformation — protein misfolding in prion disease // *Cell.* — 1997. — V. 89, N4. — P. 499–519.
57. *Tatzelt J., Zuo J., Voellmy R., Scott M. et al.* Scrapie prion selectively modify the stress response in neuroblastoma cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — V. 92, N 7. — P. 2944–2948.
58. *Kenward N., Landon M., Laszlo L., Mayer R. J.* Heat shock proteins, molecular chaperones and the prion encephalopathies // *Cell Stress and Chaperones.* — 1996. — V. 1, N1. — P. 18–22.
59. *Caughey B. and Raymond G. J.* The scrapie-associated form of prp is made from a cell-surface precursor that is both protease-sensitive and phospholipase-sensitive // *J. Biol. Chem.* — 1991. — V. 266, N 27, P. 18217–18223.
60. *Verevka S. V.* TSE and diabetes mellitus — two grins of the same evil? / *Prions: New Research.* — N.Y.: Nova Science Publishers, 2006. — P. 285–293.

61. Forloni G., Angeretti N., Chiesa R. et al. Neurotoxicity of a prion protein fragment // *Nature*. — 1993. — V. 362, N 6420. — P. 543–546.
62. Oesch B., Jensen M., Nilsson P. and Fogh J. Properties of the scrapie prion protein: quantitative analysis of protease resistance // *Biochemistry*. — 1994. — V. 33, N 19. — P. 5926–5931.
63. Safar J., Roller P., Gajdusek D., Gibbs C. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity // *Protein Sci.* — 1993. — V. 2, N 12. — P. 2206–2216.
64. Fischer M., Roeckl C., Parizek P., Schwartz H. et al. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen // *Nature*. — 2000. — V. 408, N 6811. — P. 479–483.
65. Pesaurd D., Barranco-Mendoza A. Bovine serum albumin and insulin-dependent diabetes mellitus. Is cow milk still a possible toxicological agent of diabetes // *Food and Chem. Toxicol.* — 2004. — V. 42, N5. — P. 707–714.
66. Knip M., Akerblom H. R. Early nutrition and later diabetes risk // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2005. — V. 569. — P. 142–150.
67. Couper J. J. Environmental triggers of type 1 diabetes // *J. Paediatr. Child Health.* — 2001. — V. 37, N3. — P. 218–220.
68. Verevka S. V. Prions and protein inhibitors of proteinases: structural analogies and their consequences. III. Additive risk factor of transgenic technologies // *Укр. біохім. журн.* — 2001. — 73, № 1. — С. 153–154.
69. Cao Y., Cao R., Veitonmaki N. Kringle structures and antiangiogenesis // *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* — 2002. — V. 2. — P. 667–681.
70. Mac Donald N. J., Murad A. C., Fogler W. E. et al. The tumor-suppressing activity of angiostatin protein residues withing kringles 1 to 3 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1999. — V. 264, N2. — P. 469–477.
71. Cairns R. A., Khokha R., Hill R. P. Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view // *Curr. Mol. Med.* — 2003. — V. 3, N7. — P. 659–671.

## ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ СТРУКТУРИ ТРАНСГЕННИХ БІЛКІВ І ЗУМОВЛЕНІ НИМИ ФАКТОРИ РИЗИКУ

С. В. Верьовка

Інститут отоларингології  
ім. О. С. Коломійченка АМН України, Київ  
Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна  
НАН України, Київ

*E-mail: verevka@biochem.kiev.ua*

Розглянуто проблеми, зумовлені розвитком технології трансгенних продуктів харчування. У світлі даних про молекулярні механізми формування структури білків та забезпечення міжбілкової комплементарності обґрунтовується положення про комплексний характер функціонування структуроутворювальних, підтримувальних та елімінувальних систем. Обговорюються шляхи порушення трансгенними продуктами міжбілкового узгодження і його можливі наслідки.

**Ключові слова:** трансгенні білки, фактори ризику, шаперони, місфолдинг, пріони.

---

## ON SOME PECULIARITIES OF TRANSGENIC PROTEINS' STRUCTURE FORMATION AND CONNECTED RISK FACTORS

S. V. Verevka

Academy of Medical Sciences of Ukraine  
Kolomyychenko Institute of Otolaryngology  
Palladin Institute of Biochemistry  
of National Academy of Ukraine, Kyiv

*E-mail: verevka@biochem.kiev.ua*

The problems created by the development of transgenic food technologies are under consideration. Generalization of the data on the molecular mechanisms of the protein structure formation and processing allowed to base the principle of the correlative action of the structure-forming, structure-keeping and protein-eliminating systems. The ways of the possible disturbances of such inter-protein coordination by transgenic proteins as well as their possible consequences are discussed.

**Key words:** transgenic proteins, risk factors, chaperones, misfolding, prions.

## ВИНОГРАДНІ ВИНА. ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ

Т. Б. ГОРЮШКІНА<sup>1,2</sup>, С. В. ДЗЯДЕВИЧ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: dzyad@yahoo.com

В огляді наведено класифікацію вин та сполук, які входять до їхнього складу, докладно охарактеризовано хімічний склад сусла та вина, описано традиційні методи якісного й кількісного їх аналізу із зазначенням недоліків та переваг кожного з методів.

**Ключові слова:** вино, сусло, хімічний склад, традиційні методи аналізу.

Вина є продуктом ферментації соку різних ягід і плодів, їх розділяють на виноградні та плодово-ягідні. Виноградні вина — це напої, які одержують у результаті спиртового бродіння виноградного сусла (м'якоть та сік винограду) або мезги (ягоди винограду, роздроблені разом із твердими частинами лози) [1].

Виноградні вина класифікують за вмістом у них етилового спирту та цукру з урахуванням технології їх приготування у такий спосіб [1]:

1. **Натуральні, або столові (сухі та напівсолодкі)** — вина, які одержують повним чи неповним зброджуванням сусла або мезги і які містять етиловий спирт лише ендегенного походження. Сухі вина отримують повним зброджуванням виноградного соку. Вміст цукру у них — не більше 3 г/л, об'ємна частка спирту — 9–13% (рислінг, каберне, цинандалі). Напівсолодкі вина одержують неповним зброджуванням соку за різкого охолодження сусла, що бродить. Вміст цукру у напівсолодких винах — 30–80 г/л, спирту — 9–12% об. (ахашені, псоу, кіндзмараулі).

2. **Спеціальні, або десертні (міцні, напівсолодкі та солодкі)** — вина, які одержують повним чи неповним зброджуванням сусла або мезги з додаванням етилового спирту. У міцних винах вміст цукру становить 30–80 г/л, спирту — 17–20% об. (портвейн, херес, мадера, марсала). У напівсолодких спеціальних винах міститься 50–120 г/л

цукру, 15–16% об. спирту (хванчкара, твиші). У солодких винах вміст цукру становить 140–200 г/л, спирту — 16–17% об. (кагор, мускат, токай).

3. **Ароматизовані** — вина, що їх виготовляють додаючи у виноматеріали екстракт різноманітних частин рослин чи їхніх дистилатів. Вміст цукру в них — 80–140 г/л, спирту — 16–18% об. (вермут).

4. **Ігристі (сухі, напівсухі, напівсолодкі та солодкі)** — вина, які одержують вторинним зброджуванням у закритих резервуарах сухого виноградного вина з додаванням цукру та спеціальної культури дріжджів. Вміст цукру — 30–80 г/л, спирту — 11–13% об. (шампанське).

Залежно від сировини виноградні вина поділяють на сортові, виготовлені з одного сорту винограду, і купажовані — з декількох сортів [2].

Окрім того, вина класифікують на вироблені європейським (зброджується добре віджати́й сік) і кахетинським (бро́діння відбувається у присутності мезги — шкірки та кісточок винограду) способом. Тверді частинки мезги передають вину, приготованому кахетинським способом, барвники та дубильні речовини. Вважають, що за фізіологічною активністю вина цього типу перевершують вина, виготовлені за європейською технологією [3].

За кольором вина бувають білі, червоні та рожеві [2]. Під час виготовлення білого вина бродінню підлягає віджати́й виноградний сік. У процесі виробництва червоного вина у бродінні бере участь не лише сік, але



і м'якоть, шкірка та кісточки винограду. Пігменти шкірки надають червоному вину його колір, а таніни й інші речовини шкірки та кісточок — терпкий аромат і в'язучий смак. Під час виготовлення рожевих вин бродіння розпочинають у присутності шкірки та м'якоті винограду, а приблизно через добу сік віджимають, і його бродіння відбувається далі окремо [4].

Компоненти, що входять до складу вина, можуть бути класифіковані таким чином:

1. Сполуки, які надходять у вино з винограду (вода, зв'язані кислоти, цукри, феноли, пектини, азотовмісні сполуки, мінеральні сполуки, клейкі речовини, ферменти, ароматичні сполуки, вітаміни).

2. Сполуки, що утворюються у процесі спиртового бродіння (етанол, вищі спирти, багатоатомні спирти, зв'язані та вільні кислоти, кетони, альдегіди, ефіри та двоокис вуглецю).

3. Сполуки, які додають до вина у процесі ферментації (двоокис сірки, компоненти спеціальних вин), та сполуки, що утворюються під час дозрівання вина у результаті інших, ніж спиртове бродіння, процесів (органічні кислоти — продукти яблучно-молочнокислого та оцтовокислого бродіння).

Виноградні вина є багатокомпонентними системами. До їхнього складу входять органічні кислоти, вуглеводи, спирти та багато інших сполук. Вміст інгредієнтів вина широко варіює залежно від різновиду й сорту винограду, кліматичних, геологічних, агротехнічних та інших умов. За якісним та кількісним вмістом компонентів вин можна судити про натуральність напоїв і правильність технології їх виробництва [5].

В останні роки у виноробстві постала велика проблема присутності на ринку збути фальсифікованих вин. Не завжди вміст пляшки відповідає етикетці на ній. До того ж існує імовірність придбати не натуральне вино, а штучно зроблений напій. У цьому огляді стисло наведено дані про хімічний склад вина, охарактеризовано деякі його важливі компоненти та методи їх визначення, що традиційно застосовуються у виноробстві.

### **Хімічний склад виноградного суслу та вина і характеристика компонентів, що входять до їхнього складу**

З погляду хімії, виноградне сушло — це, в основному, вода. 18–25% його маси становлять цукри, кількість яких змінюється залежно від сортів винограду та його

зрілості. Від 0,3 до 1,5 % маси суслу становлять органічні кислоти: дві найголовніші — винна та яблучна і в невеликих кількостях — лимонна, щавлева, глюкуронова, глюконова тощо. Крім того, у виноградному суслі виявлено 20 амінокислот (у вільному стані й у складі білків), пігменти, таніни, ароматичні речовини, вітаміни, ферменти та мінеральні солі [4, 6].

Основним за кількісним вмістом компонентом вина також є вода біологічного походження, яка потрапляє до виноградних ягід із ґрунту разом із мінеральними речовинами. У воді розчинені й містяться у колоїдному або суспендованому стані понад 500 різноманітних органічних та мінеральних сполук. Їх можна розділити на дві групи: легкі речовини та екстрактивні речовини [6].

До легких речовин вина належать ті сполуки, що виокремлюються під час кип'ятіння та звітрюються при кімнатній температурі. Це етиловий спирт і так звані ароматичні речовини вина. Аромат вина надає складний комплекс сполук, до якого входять ефірні олії винограду та речовини, що виникають у процесі бродіння суслу і витримання вина. На сьогодні виділено понад 350 ароматичних компонентів, представлених спиртами, альдегідами, кетонами, леткими кислотами, вищими та терпеновими спиртами, фенолокислотами, складними ефірами [7].

Екстрактивні речовини вина містять нелеткі компоненти органічного й мінерального походження, а саме: вуглеводи, кислоти, фенольні, азотисті, мінеральні речовини та багатоатомні нелеткі спирти.

Баланс хімічного складу та співвідношення мінеральних і органічних речовин виноградного суслу та вина наведено у табл. 1, 2.

Найбільшою кількістю органічних речовин — переважно етанолу та вуглеводів — характеризуються десертні (спеціальні) вина. У столових (натуральних) винах значно більше води, ароматичних речовин, органічних кислот та інших дієтично корисних сполук. Столові вина, особливо червоні, містять набір біологічно активних речовин [6].

Розглянемо частину з них більш детально.

#### **Спирти**

Етанол є основним продуктом спиртового бродіння, який утворюють дріжджі під час зброджування цукрів. Фактичний вихід



**Таблиця 1. Співвідношення органічних і мінеральних компонентів суслу та вина, % від маси**

Речовина	Сусло	Столове вино		Десертне вино
		біле	червоне	
Вода	80,3	89,4	88,4	70,0
Мінеральні речовини	0,4	0,2	0,3	0,3
Органічні речовини	19,3	10,4	11,3	29,7
У тому числі етиловий спирт	Сліди	8,8	9,6	12,9

етанолу з 1 г цукру становить 0,58–0,6 мл, що залежить від стану та раси дріжджів. У столових винах спирту небагато, і він на 100% ендogenousного походження. У десертних винах спирту набагато більше, причому 80–90% — екзогенного походження [6]. Етанол визначає токсичні й калоричні властивості вина та інших алкогольних напоїв. Тому встановлення рівня безпечного споживання алкогольних напоїв ґрунтується на оцінюванні кількості етанолу, що потрапляє з ними до організму [8].

*Метанол* під час виробництва вина утворюється спонтанно у процесі деметоксилювання пектинових речовин ферментом пектинестеразою, який входить до складу вихідної сировини [8]. Припустимий вміст метанолу у вині — 50 мг/л [6]. Токсична дія метанолу пов'язана з утворенням його метаболітів — формальдегіду та мурашиної кислоти. Вміст метанолу у винах значно нижчий за небезпечний рівень токсичності [8]. Проте інколи у винах, виготовлених із певних сортів винограду, може накопичуватись до 600 мг/л метанолу [6]. Саме тому необхідно перевіряти та контролювати його вміст у виноградних винах.

*Аліфатичні одноатомні спирти* — пропіловий, бутиловий, ізобутиловий, аміловий, ізоаміловий, гексиловий тощо — є продуктами метаболізму дріжджів. Вміст їх у білих винах становить 150–400 мг/л, у червоних — 300–600 мг/л. Суміш вищих (C3–C10) аліфатичних одноатомних спиртів та ефірів звичайно називають сивушними маслами. Ці речовини складають приблизно 1% від загального вмісту спирту [9]. Від наявності сивушних масел значною мірою залежить смак та букет червоних столових і міцних вин. Проте великі кількості сивушних масел, особливо ізобутанолу та ізопропанолу, негативно впливають на смакові якості білих сухих вин [6]. Ці спирти у великих кількостях можуть також справляти небажаний

**Таблиця 2. Хімічний склад суслу та вина, г/л**

Речовина	Сусло	Столове вино		Десертне вино
		біле	червоне	
Ароматичні речовини	0,15	1,0	1,2	0,6
Екстрактивні речовини	200	20,0	24,0	180
У тому числі:				
Вуглеводи (до 20 найменувань)	189	2,5	4,5	167
Цукри	185	1,5	2,5	160
Полісахариди	3,0	1,0	2,0	1,5
Органічні кислоти (35 найменувань)	7,5	7,0	6,0	5,0
Фенольні речовини (до 60 найменувань)	0,9	0,3	1,5	0,6
Азотисті речовини (до 45 найменувань)	0,5	0,2	0,3	0,4
Мінеральні речовини (до 20 найменувань)	4,0	1,5	2,5	3,5
Гліцерол та інші багатоатомні спирти	Нема	8,0	9,5	3,5
Етиловий спирт (% об.)	Сліди	11,0	12,0	16,0

вплив на організм людини [8, 9]. Встановлено, що кількість вищих аліфатичних спиртів у виноматеріалах залежить від кількості амінокислот у вихідному суслі. Так, вміст ізоамілового спирту визначається наявністю аланіну та проліну, а 2-бутанолу — концентрацією аланіну, лейцину та ізолейцину [7].

*Аліфатичні дво- і триатомні спирти* у винах на 90% представлені 2,3-бутиленгліколем і гліцеролом, які утворюються у процесі спиртового бродіння як природні вторинні продукти. Гліцерол позитивно впливає на смак столових вин, надаючи їм маслянистості, солодкості та м'якості [6, 10–12]. Вихід гліцеролу є постійним: від 6 до 12 г на 100 г етанолу, що утворюється у процесі бродіння. Тож підрахувавши очікувану кількість гліцеролу та зробивши аналіз його фактичної наявності, можна зробити висновок про натуральність походження вина. Кількість гліцеролу показує ступінь зброджування цукрів. Так, у столових винах його у 5–8 разів більше, ніж у десертних. У сухих винах вміст гліцеролу становить 7–8 г/л. 2,3-бутиленгліколь міститься у вині у незначних кількостях — 0,4–1,4 г/л [9].

Крім того, у винах є *аліфатичні ненасичені спирти* (0,5–8,0 мг/л), представлені терпеновими спиртами (гераніол, ліналіол, цитронелол тощо).

*Ароматичні вищі спирти* у невеликій кількості (сумарно до 200 мг/л) виявлено

у мускатних ігристих та столових напівсолодких винах. Це фенілетанол, тирозол, терпеновий спирт фарнезол, які мають аромати троянди, конвалії, квітів липи. Наявність їх у вині в незначній кількості є бажаною й доцільною. Під час витримування вина вищі спирти вступають в етерифікацію з леткими кислотами та утворюють складні ефіри, які надають вину приємних тонів зрілості букета [6, 13].

### *Альдегіди, ефіри та кетони*

Альдегіди утворюються при окисненні спиртів. Загальна кількість альдегідів у вині становить 15–200 мг/л.

*Вищі аліфатичні альдегіди* на 90% за масою представлені ацетальдегідом. Зазвичай у процесі спиртового бродіння вихід ацетальдегіду — 100 мг/л [14]. Проте у винах типу хересу, які формуються шляхом дріжджового окиснення етилового спирту, вміст ацетальдегіду може сягати 600 мг/л і більше. Кількість ацетальдегіду зростає також під час старіння, аерації вин і дії сторонньої мікрофлори. У невеликих кількостях він надає відтінку старого, рівного вина і належить до основних факторів, що визначають смак вин типу марсали. Проте для більшості вин, особливо шампанського та столових, ацетальдегід є небажаним: він надає різкості аромату, а в разі переокиснення до оцтової кислоти — неприємного смаку. Через високу реакційну здатність альдегіди конденсуються з речовинами, що містять аміногрупу, з утворенням меланоїдів, відновлюються у відповідні спирти та взаємодіють з іншими продуктами бродіння [6].

*Ароматичні альдегіди* (ванілін) є продуктами гідролітичного розпаду лігніну — полімеру ароматичних спиртів, який міститься в оболонках клітин деревини [15]. Лігнін потрапляє у вино із дубових діжок під час витримування вин. Ароматичні альдегіди надають винам приємних плодкових ароматів.

*Альдегіди фуранового ряду* (фурфурол, оксиметилфурфурол та метилфурфурол) накопичуються в кількості до 35 мг/л у десертних та лікерних винах із високоцукристого винограду. Під час хересування вин фурфурол та оксиметилфурфурол зникають [10]. Головним джерелом фуранових альдегідів, які надають винам специфічних «малажних» уварених тонів, є пентози та гексози винограду [6].

*Кетони* (ацетон, діацетил, 2-бутанон, 2-пентанон і бути-

ролактон) містяться у вині в невеликих кількостях — до 50 мг/л. Кетони хімічно малоактивні, але мають характерні запахи і таким чином впливають на органолептичні якості вина [8].

*Складні ефіри* утворюються у процесі бродіння сусла, автолізу дріжджів, що особливо характерно для шампанського, та під час витримування вина. Вміст етилових ефірів жирних кислот у вині зазвичай становить 50–200 мг/л, етилових ефірів оксикислот — 100–500 мг/л. За тривалого витримування у винах накопичуються переважно кислі ефіри винної, яблучної та бурштинової кислот. Максимальний вміст складних ефірів виявляється у хересі (до 1 г/л). Більшість ефірів має приємний фруктовий запах. Ефірам кислот з парним числом атомів вуглецю (C<sub>4</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>) притаманний сильний фруктовий тон. Вони становлять основу так званого енантового ефіру. Встановлено, що енантовий ефір значно поліпшує, а ефіри оцтової, масляної та валеріанової кислот — погіршують органолептичні властивості вина [6, 8].

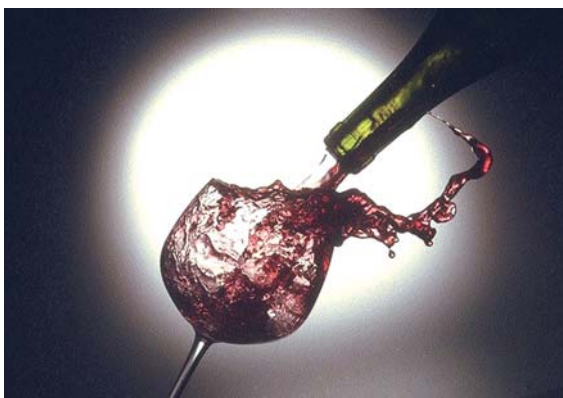
### *Вуглеводи*

У столових винах містяться лише незначні залишкові цукри та невелика кількість полісахаридів. У десертних винах присутній повний набір вуглеводів з переважанням фруктози та глюкози. Червоні вина та мадера збагачені пентозами, які утворюються у процесі гідролізу високомолекулярних пентозанів твердих частинок ягід винограду. Сахароза є лише в шампанських та ароматизованих винах.

Основні моносахариди винограду — глюкоза та фруктоза — майже повністю утилізуються дріжджовими клітинами під час приготування сухих вин. У столових винах міститься 0,2–1,0 г/л глюкози та 1,0–2,0 г/л фруктози. Окрім гексоз у винах містяться пентози (0,2 — 1,8 г/л) і полісахариди (0,2–2,8 г/л). Пектинові речовини виявляють у вині у слідових кількостях. Дані про

концентрацію основних вуглеводів у суслі та вині наведено в табл. 3 [6].

Вуглеводи відіграють важливу роль у формуванні органолептичних якостей вина. Цукри пом'якшують смак столових вин та надають солодкого смаку міцним і десертним винам. Важливе



Таблиця 3. Вміст вуглеводів у суслі та вині

Вуглеводи, г/л	Сусло	Вино столове
Глюкоза	80–130	0,2–1,0
Фруктоза	70–120	1,0–2,0
Пентоза	0,2–1,6	0,2–1,8
Пектинові речовини	0,1–1,0	Сліди
Полісахариди	0,3–8,5	0,2–2,8

значення мають моносахариди у реакції меланоїдоутворення — при цьому поліпшуються аромат, смак та колір вин типу мадери, портвейну, марсали. Вуглеводи є джерелом утворення діоксиду вуглецю у виробництві ігристих вин. Полісахариди, які перебувають у колоїдному стані, впливають на стабільність вина [6].

### Органічні кислоти

Частково надходять у вина з винограду і частково утворюються у процесі ферментації як інтермедіанти метаболізму дріжджів [9].

Активна кислотність вин звичайно варіює у межах 2,8–3,8 [6]. Органічні кислоти перебувають у винах переважно у зв'язаному або напівзв'язаному стані. Вони визначають бактерицидні, смакові та ароматичні властивості вина. Органічні кислоти захищають вино від бактеріальних захворювань. У кислому середовищі окисно-відновні процеси відбуваються повільніше, що гальмує дозрівання вина, але запобігає металоқвасним і залізофосфатним помутнінням. Кислоти беруть участь у створенні букета вина, утворюючи зі спиртами складні ефіри.

З аліфатичних монокарбонових кислот у вині в найбільших кількостях містяться оцтова (300–1 500 мг/л), пропіонова (10–200 мг/л) та масляна (6–100 мг/л) кислоти [6].

З аліфатичних полікарбонових кислот присутні бурштинова (500–1500 мг/л) та щавлева (до 150 мг/л). Аліфатичні монокарбонові оксикислоти представлені в основному молочною (500–5 000 мг/л) і глюконовою (до 120 мг/л) кислотами. Серед аліфатичних полікарбонових оксикислот центральне місце належить винній (1 500–5 000 мг/л) і яблучній (10–5 000 мг/л). Інші кислоти (метиляблучна, лимонна) містяться у вині в незначних або слідових кількостях [6].

Альдегідо- і кетокислоти (гліоксилова, глюкоуронова, галактууронова, піровиноградна та альфа-кетоглутарова) присутні у вині в кількості, меншій за 1 г/л [16].

Фенолкарбонові ароматичні кислоти (оксисбензойна, протокатехінова, ванілінова,

галола, саліцилова тощо) містяться у винах у незначній кількості, беруть участь в окисно-відновних процесах, впливають на смак та колір напою, підвищують стійкість під час зберігання завдяки антиоксидантній активності [17].

Дані про концентрацію основних органічних кислот у суслі та вині наведено у табл. 4 [6].

Контроль вмісту органічних кислот є актуальним на всіх етапах винного виробництва, адже кислотність — один із основних показників хімічного складу і смакових якостей вина. Наявність або відсутність органічних кислот у пробі, а також їх кількісний вміст і співвідношення дозволяють визначати справжність та якість напоїв, контролювати ферментативні процеси та проводити кореляцію зі смаком кінцевого продукту [18].

Недостатня кислотність робить смак вина простим, плоским, висока — призводить до різкого, грубого смаку. Встановлено, що кращі смакові відчуття викликають лимонна та винна, гірші — фумарова та яблучна кислоти. Вважається, що підвищений вміст яблучної кислоти у вині надає йому присмаку зелених ягід. Тому особливе практичне значення має перетворення молочнокислими бактеріями дикарбоксильної яблучної кислоти на монокарбоксильну молочну кислоту, яка має м'якший смак і робить вино більш гармонійним. Водночас велика кількість молочної кислоти також негативно впливає на смакові якості вина, особливо якщо бродіння відбувається у присутності гетеротрофних молочнокислих бактерій. У цьому разі утворюються ацетат, діацетил та інші речовини, що псуєть смак вина. Смак вина залежить головним чином від співвідношення винної та яблучної кислот. Якщо це співвідношення нижче 2, вино є негармонійним. Вино з кращим смаком та букетом утворюється за співвідношення винної і яблучної кислот вище 3 [9].

Важливо відзначити, що визначення концентрації оцтової кислоти дозволяє виявити фальсифікати вина, які є сумішшю виноградного соку, що не добродив, зі спиртом і цукром. У таких «винах»



Таблиця 4. Вміст органічних кислот у суслі та вині

Органічні кислоти, г/л	Сусло	Вино столове
Винна	2,0–7,0	1,5–5,0
Яблучна	2,0–15,0	До 5,0
Молочна	До 0,05	0,5–5,0
Бурштинова	0,1–0,3	0,5–1,5
Оцтова	До 0,05	0,3–1,5
Лимонна	0,2–0,5	До 0,8

оцтова кислота міститься в кількостях, характерних для виноградного сусла (до 0,05 г/л, тоді як у вині її вміст становить 0,3 — 1,5 г/л) [6]. Окрім того, вміст оцтової кислоти в натуральних винах лімітується, оскільки вона істотно впливає на органолептичні властивості вина та надає різкості його смаку [10, 16]. Підвищений вміст оцтової кислоти може свідчити про біохімічну природу недоліків вина.

#### Азотисті речовини

Вина містять мало азотистих сполук, вміст їх не перевищує 900 мг/л, а в середньому становить 200–400 мг/л. 70–80% усього азоту припадає на амінокислоти та поліпептиди, до 12% — на білки, майже 5% — на аміді глютамінової й аспарагінової кислот та аміни [6].

Амінокислоти вина мають у своєму складі амінокислоти як сусла, так і ті, що їх виділяють дріжджові клітини у процесі життєдіяльності та автолізу. Загальна кількість амінокислот у винах менша, ніж у вихідному суслі. Це пояснюється тим, що дріжджі під час алкогольного бродіння використовують амінокислоти для свого живлення. До основних амінокислот вин належать пролін, аспарагінова та глютамінова кислоти, треонін та гістидин (вони становлять 76–94% загальної кількості амінокислот вина) [7].

Азотовмісні речовини вина мають технологічне значення — вони є необхідним живильним середовищем для дріжджів і субстратом для синтезу альдегідів. Окрім того, продукти окиснювального дезамінування амінокислот — альдегіди жирного ряду — беруть участь у формуванні кольору, букету та смаку мадери і токайських вин [6]. Наприклад, у результаті перетворення амінокислоти фенілаланіну під час виробництва вина утворюються 2-фенілетанол та ацетатний ефір, що надають вину аромату троянди [13].

Надлишок азотистих речовин за певних умов спричинює помутніння вин та їх мікробіальне захворювання, а за наявності доступу до них кисню — переокиснення та мадеризацію [19].

#### Мінеральні сполуки

Вміст мінеральних речовин у винах істотно варіює залежно від сорту винограду, складу ґрунту, кліматичних умов тощо. Мінеральні речовини присутні у вині в органічній і неорганічній формах. Загальний вміст їх коливається у межах 1,5–3,5 г/л, що приблизно на 50% менше, ніж у винограді. Із катіонів у вині переважає  $K^+$  (0,4–1,8 г/л),  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$  і  $Mg^{2+}$  (до 0,2 г/л кожен); із аніонів —  $SO_4^{2-}$  (до 1,0 г/л) та  $PO_4^{3-}$  (до 0,9 г/л); трапляється також  $Cl^-$  (до 0,2 г/л) [6].

Найбільш технологічно важливими катіонами металів є іони магнію, калію та кальцію через їхню здатність брати участь у формуванні помутнінь різної природи [7].

Іони калію, магнію, мангану, заліза та фосфору використовуються дріжджами як необхідні фактори росту клітин; іони заліза та міді беруть участь в окисно-



відновних реакціях у ролі каталізаторів, спричинюючи металеві помутніння, небажані зміни букету та смаку, тому вміст їх у вині суворо обмежений: мідь — до 2 мг/л, залізо — до 10 мг/л.

До мінеральних речовин вина належать також мікроелементи: бор (5–80 мг/л), йод (до 1 мг/л), рубідій (0,2–2 мг/л), фтор (до 5 мг/л) тощо.

Серед мінеральних речовин особливе місце посідають діоксид вуглецю та вугільна кислота. Перший є у будь-якому вині в кількості 0,1–4,0 г/л у розчиненому, дисоційованому, газоподібному та зв'язаному стані. Більша частина його розсіюється у повітрі, а менша — розчиняється у вині, утворюючи вугільну кислоту (до 5 г/л в ігристих винах). Наявність вуглекислоти у вині зумовлює гостроту смаку, а також ігристі та пінисті властивості ігристих вин. Надмірна кількість вуглекислоти запобігає окисненню вина, освіжає його смак [6].

Таблиця 5. Вміст вітамінів групи В і біотину у виноградному суслі та вині

Вітаміни	Сусло	Вино столове	
		біле	червоне
В <sub>1</sub> (тіамін), мк/л	240–550	0–50	1–100
В <sub>2</sub> (рибофлавін), мкг/л	200–1 000	100–1500	300–4 000
В <sub>3</sub> (пантотенова кислота), мк/л	140–495	180–340	300–400
В <sub>5</sub> (нікотинамід), мг/л	6–18	5–9	12–18
В <sub>6</sub> (піридоксин), мкг/л	90–500	100–360	190–360
В <sub>8</sub> (мезоінозит), мг/л	250–330	230–300	250–300
В <sub>9</sub> (фолієва кислота), мкг/л	1–2	До 5	До 5
Н (біотин), мкг/л	5–9	До 4	До 6

Діоксид сірки надходить у вина з винограду, його також використовують як харчову домішку, що справляє антимікробний та антиоксидантний вплив [4, 6]. Окиснюючись, сірчиста кислота запобігає окисненню інших компонентів вина (ароматичних сполук, барвників); окрім того, вона блокує діяльність окиснювальних ферментів, пом'якшує природні окисно-відновні процеси у суслі та вині. Сульфітація дозами до 100 мг/л гарантує добре екстрагування ефірних олій та надійний захист їх від окиснення [6].

#### Біологічно активні речовини

До біологічно активних речовин вина належать ферменти, вітаміни та біофлавоноїди. Вони сприяють нормальному розвитку дріжджів, а також є корисними для людини.

**Ферменти** вина представлені окремими ферментами виноградної ягоди та ферментними системами дріжджів, які під час автолізу дріжджових клітин переходять у вино. Це — оксидоредуктази (о-дифенолоксидаза, аскорбатоксидаза, пероксидаза, каталаза) та гідролази (інвертаза, полігалактуроназа, пектиностераза, протеїназа тощо). Значення ферментів дріжджів полягає у руйнуванні колоїдної системи сусла, звільненні й переході в сусло ефірних олій винограду та у проведенні спиртового бродіння з утворенням продуктів, які формують букет і смак вина [6, 9].

**Вітаміни.** Усі вітаміни, що присутні у вині, надходять з винограду. У процесі ферментації значна частина їх акумулюється дріжджами. Тому молоде вино істотно збіднене вітамінами. У міру витримання вина й автолізу дріжджових клітин вітаміни поступово вивільняються і знову надходять у вино.

Вино містить водорозчинні вітаміни групи В, вітамін Н та небагато аскорбінової кислоти. Найбільшу біологічну активність ма-

ють вітаміни групи В, вміст яких у суслі та вині може досягати 23 мг/л (табл. 5 [6]).

Вміст вітаміну С у молодому вині становить 6–12 мг/л, у витриманому — 2–3 мг/л, оскільки аскорбінова кислота витрачається на відновлення окиснених продуктів.

Найбільш збагачені вітамінами та ферментами молоді столові вина, усі ігристі вина й особливо шампанське пляшкового способу приготування. У червоних винах приблизно у 2 рази більше вітамінів, ніж у білих, оскільки тверді частинки ягід збагачують сусло вітамінами В<sub>2</sub>, В<sub>5</sub> та В<sub>6</sub>, а також біофлавоноїдами, які захищають від руйнування увесь комплекс вітамінів [6].

**Фенольні сполуки.** Згідно із сучасними теоріями, фенольні сполуки є основними об'єктами та ініціаторами окисно-відновних процесів, що відбуваються під час формування і дозрівання виноматеріалів [7].

Менша частина поліфенолів винограду представлена поліфенолами нефлавоноїдної природи — похідними оксикоричної та бензойної кислот та похідним стильбену ресвератролом. Поліфеноли нефлавоноїдної природи добре розчинні у виноградному соці, тому вони присутні у м'якоті виноградної ягоди.

Основна частина поліфенолів винограду міститься у шкірці ягід та в твердих структурних елементах грона і представлена флавоноїдами, серед яких переважають катехіни, лейкоантоціани, антоціани — група біологічно активних сполук, які містять у своєму складі фрагмент С<sub>6</sub> — С<sub>3</sub> — С<sub>6</sub> і мають Р-вітамінну активність [20]. Багато біофлавоноїдів у молодих червоних винах (до 1 г/л), у столових кахетинських винах Грузії, у десертних винах типу кагору [6]. У столовому вині присутня така кількість фенольних речовин: лейкоантоціани — 0,01–0,5 г/л,

катехіни — 0,02–0,1 г/л, антоціани — 0,03–0,5 г/л, фенолокислоти — 0,1–0,3 г/л. У разі багаторічного витримування вин Р-вітамінна активність їх знижується внаслідок окиснення катехінів та антоціанів [6].

Продукти полімеризації катехінів і лейкоантоціанів прийнято називати танінами, які охоплюються більш широким поняттям «дубильні речовини». Вплив дубильних речовин на якість вина різноманітний. Для столових білих та червоних кахетинських вин, а також для виноматеріалів, що йдуть на приготування мадери, великий вміст дубильних речовин є необхідним. Так, концентрація танінів у білому кахетинському вині досягає 2,7 г/л [3]. Для шампанських вин кількість дубильних речовин має бути мінімальною, тому що їх надлишок надає цим винам терпкості [9].

### Традиційні методи якісного та кількісного аналізу компонентів вина

Сьогодні існує ціла низка методів, за допомогою яких проводиться дослідження якісного та кількісного складу виноградних вин. До них належать газова та рідинна хроматографія, капілярний електрофорез, ферментативні, хімічні, колориметричні методи тощо.

#### Хроматографічні методи

*Розділювальна хроматографія* — метод аналізу сумішей, заснований на розділенні компонентів за рахунок різниці у параметрах розподілення їх між фазами під час переміщення через шар нерухомої фази потоком рухомої [21]. Завдяки різній спорідненості компонентів суміші до нерухомої та рухомої фаз досягається основна мета розділювальної хроматографії — розділення за

певний проміжок часу суміші на окремі смуги (піки) компонентів у міру просування їх колонкою з рухомою фазою [22]. Якщо рухомою фазою виступає газ — це газова хроматографія, якщо рідина — рідинна.

Отримана у результаті проведення аналізу хроматограма складається з набору піків, за відносним часом утримання (між моментом внесення зразка і появою максимуму піка) та положенням яких можна ідентифікувати компоненти суміші, а за площею, висотою або іншим параметром піка — оцінити концентрацію цих компонентів у пробі [23]. Вимірювання площі піків на реальних хроматограмах може бути пов'язано зі значними витратами праці та часу або потребуватиме застосування спеціального устаткування. Окрім того, чисельне значення параметра піка визначається не тільки кількістю речовини, якій цей пік відповідає, але й умовами аналізу, за яких його одержано [21].

*Газову хроматографію* використовують зазвичай для аналізу летких сполук вина, зокрема етанолу [24–27], метанолу [28] та ароматичних речовин [13]. Серед переваг методу можна відзначити високу чутливість, що дозволяє визначати концентрації  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  мг/мл, відносну експресність аналізу, який триває декілька десятків хвилин, інколи — до 1,5 год, високу точність аналізу (похибка  $\pm 5\%$ ) [21], можливість одночасної ідентифікації та кількісного визначення декількох речовин [27].



Суттєвими недоліками цього методу (характерні й для рідинної хроматографії) є висока вартість обладнання та необхідність у спеціально навченому персоналі [27]. Окрім того, він часто потребує попередньої підготовки проби (наприклад, дистиляції) [28].

*Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)* характеризується тим, що для збільшення роздільної здатності тут використовують дрібнозернисті однорідні сорбенти,



а елюент подають у колонку під тиском [23]. За допомогою цього методу проводять кількісне визначення у вині етанолу [29, 30], гліцеролу, органічних кислот [28, 30], антоціанів [28, 31, 32] та вуглеводів — глюкози, фруктози, сахарози [28, 30, 33]. Метод дозволяє проводити кількісне визначення вуглеводів з мінімальною концентрацією 0,12–0,4 г/л для фруктози та 0,18–0,6 г/л для глюкози [28]. За іншими даними, ліміт визначення вуглеводів у вині в разі застосування високоефективної рідинної хроматографії становить 0,5 г/л [33]. Варто зазначити, що в деяких винах міститься лише 0,2 г/л глюкози [6].

Перевагами методу високоефективної рідинної хроматографії є великий діапазон молекулярних мас речовин, з якими можна працювати. Поряд із цим м'якість умов ВЕРХ (майже всі розділення можна проводити при температурах, близьких до кімнатних, за відсутності контакту з повітрям) робить її особливо придатною для дослідження лабільних сполук, зокрема біологічно активних речовин. Ефективність розділення, яку забезпечує ВЕРХ, істотно перевершує досягнуту в газовій хроматографії [22]. Приблизний час проведення одного аналізу становить 50 хв [28].

Недоліком методу ВЕРХ є необхідність попередньої підготовки проби вина до аналізу. Така підготовка полягає у центрифугуванні, фільтруванні та екстрагуванні визначуваних компонентів [23, 28, 33].

*Хроматографія виключення за розміром* є варіантом рідинної хроматографії: молекули речовин розділяються за розміром через їхню різну здатність проникати у пори носія. Таким чином розділення компонентів суміші відбувається через розподіл молекул між розчинником, що міститься усередині пор сорбенту, та розчинником, що перебуває між його частинками [22].



Хроматографію виключення за розміром застосовують для кількісного аналізу органічних кислот у вині [34].

Недоліком цього методу є помітно менше, ніж в інших варіантах високоефективної рідинної хроматографії, число піків, які можуть бути повністю розділені на колонці заданої ефективності [22].

*Тонкошарова хроматографія.* За цим методом аналізу шар адсорбенту наносять не на колонки, а на скляні пластинки. Розділення компонентів суміші проводять у камері, в яку попередньо наливають розчинник. Для проведення кількісного аналізу розділених речовин застосовують декілька підходів — метод елювання, радіографічний і фотографічний методи, визначення концентрації за площею хроматографічної зони тощо. Час проведення дослідження становить 30–90 хв [35]. Особливо доцільно використовувати цей метод для аналізів невеликої кількості матеріалу. За допомогою тонкошарової хроматографії можна аналізувати амінокислоти, цукри [35], антоціани [31], поліфеноли, фенокислоти та феноальдегіди вина [32].

Перевагою методу тонкошарової хроматографії є те, що він дешевий та простий для здійснення якісного аналізу і дозволяє одночасно досліджувати декілька проб вина. До недоліків методу належать висока трудомісткість та значна тривалість аналізу в разі кількісного визначення речовин [23].

#### *Спектрофотометричні, колориметричні та флюорометричні методи*

Багато компонентів вина, що слабо поглинають світло у видимій ділянці, після реакції з іншими речовинами дають забарвлені продукти, кількість яких однозначно пов'язана з концентрацією вихідної речовини. Таку кольорову реакцію використовують для ідентифікації цих компонентів [35].

Спектрофотометричними методами визначають у вині метанол, гліцерол, 2,3-бутиленгліколь, органічні кислоти (після виділення їх на іонообмінній колонці), вітамін С [28] та фенольні речовини [13, 15, 28, 32].

*Метанол* із розведеного дистильованого вина окиснюється до формальдегіду перманганатом натрію, підкисленим фосфорною кислотою. Кількість формальдегіду визначають за фіолетовим кольором, який формується у результаті реакції хромотропної кислоти (4,5-дигідрокси-2,7-нафталендисульфурна кислота,  $C_{10}H_8O_8S_2 \cdot 2H_2O$ ) у сірковмісному середовищі. Інтенсивність кольору встановлюють спектрофотометрично при 575 нм.



Гліцерол та 2,3-бутиленгліколь після пропускання через іонообмінну колонку для фіксації цукрів, манітолу та сорбітолу окиснюються йодною кислотою до формальдегіду та етанолу відповідно. Продукт, що з'являється в результаті дії флороглюцинолу на формальдегід (утворився після окиснення гліцеролу), визначають колориметрично при 480 нм. Продукт, що виникає в результаті дії розчинів піперидину  $C_5H_{11}N$  та натрійферіціаніду  $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$  на етанол (утворився після окиснення 2,3-бутиленгліколю), визначають колориметрично при 570 нм.

Винну кислоту виявляють колориметрично вимірюванням червоного кольору, що з'являється в результаті реакції з ванадієвою кислотою. Елюат також містить яблучну та молочні кислоти, які не заважають аналізу.

Молочна кислота окиснюється до ацетальдегіду та визначається колориметрично після реакції з нітропрусидом натрію та піперидином.

Яблучна кислота детектується колориметрично вимірюванням жовтого забарвлення, яке вона формує з хромotropною кислотою (4,5-дигідрокси-2,7-нафталендисульфурна кислота,  $C_{10}H_8O_8S_2 \cdot 2H_2O$ ) у сірковмісному середовищі. Інтенсивність кольору визначають спектрофотометрично при 575 нм [28].

Для встановлення масової концентрації полімерних і мономерних форм фенольних речовин застосовують реакцію Фоліна та колориметричний метод детекції [13, 15, 28, 32]. У ході визначення всі фенольні компоненти проби вина окиснюються реактивом Фолін-Чокальтеу, що являє собою суміш фосфовольфрамової та фосфомолібденової кислот. Після окиснення фенолів реактив Фолін-Чокальтеу перетворюється на суміш блакитних оксидів вольфраму та молібдену. Блакитне забарвлення, що має максимальну абсорбцію при 750 нм, є пропорційним загальній кількості фенольних компонентів, присутніх у вині [28].

Аскорбінова кислота окиснюється йодом до дигідроаскорбінової, яка потім преципітується з використанням 2,4-динітрофенілгідразину з утворенням біс-(2,4-динітрофенілгідразону). Після розділення з використанням тонкошарової хроматографії і розчинення у середовищі з оцтовою кислотою компонент, що має червоне забарвлення, детектується спектрофотометрично при 500 нм.

Визначення аскорбінової кислоти у вині можна проводити і флюорометрично. Ас-



корбінова кислота перетворюється на дигідроаскорбінову, яка формує флуоресціюючу сполуку у реакції з ортофенілєндіаміном. Як контроль виступає препарат з боратною кислотою, що запобігає визначенню флуоресценції. Пробу та контроль аналізують флюорометрично, після чого підраховують концентрацію дигідроаскорбінової кислоти [28].

#### Хімічні методи визначення

Визначення вмісту етанолу та інших спиртів хімічними методами ґрунтується, в основному, на реакції окиснення з біхроматом калію, азотною кислотою або нітратом церію [22, 27]. У біхроматному методі етанол попередньо виділяють з аналізованого зразка дистиляцією, дифузиею або продуванням повітрям. Етиловий спирт окиснюється залежно від умов реакції до ацетальдегіду, оцтової кислоти або вуглекислого газу і води, відновлюючи біхромат-аніони до катіонів  $Cr^{3+}$  і змінюючи забарвлення суміші від жовто-оранжевого до синьо-зеленого. Етанол при цьому визначають або фотометруванням розчину оксника, або відтитруванням надлишку біхромату тіосульфатом натрію [27]. Межа детекції спиртів із застосуванням хімічних методів аналізу становить 20 мкг для біхроматного методу і 100 мкг для цитратного [22].

Хімічними методами також виявляють у вині органічні кислоти. Так, детекцію лимонної кислоти здійснюють після її екстрагування на аніонообмінній колонці. Для проведення кількісного аналізу її окиснюють до ацетону, який після виділення дистиляцією визначають йодометрично [28].

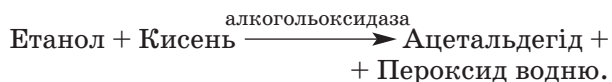
Кількісне визначення альдегідів, наявних у вині, проводять із застосуванням бісульфітного методу, який ґрунтується на високій реакційній здатності альдегідів сполучатися із сірчистою кислотою та її кислими солями [6].

**Ферментативні методи аналізу**

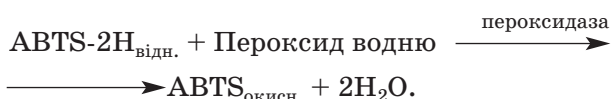
Ферментативний аналіз — це метод специфічного визначення речовин, заснований на використанні хімічних реакцій за участю ферментів. Методика проведення аналізу з використанням даного методу така. Усі компоненти штучної тест-системи — буфер, коферменти, активатори, допоміжні ферменти та зразок — змішують у фотометричній кюветі. Після вимірювання початкової екстинкції додають стартовий фермент, який ініціює реакцію. Наприкінці реакції проводять повторне вимірювання екстинкції тестової системи. Із різниці екстинкцій за рівнянням закону Ламберта–Бера розраховують концентрацію аналізованої сполуки. У більшості ферментативних методів прямою фотометричному вимірюванню доступне визначення концентрації допоміжних компонентів тестової системи — коферментів НАД/НАДН та НАДФ/НАДФН. Кількість окиснених або відновлених коферментів стехіометрично співвідноситься з кількістю компонента, що аналізується. Для контролю ферментативних реакцій застосовують стандартні лабораторні фотометри.

Загальна тривалість одного визначення є різною для різних речовин: від 10–25 хв у разі визначення етанолу, гліцеролу, оцтової та яблучної кислот до 30–45 хв, необхідних для аналізу молочної кислоти та глюкози [36].

Ферментативне визначення етанолу у вині можна здійснювати декількома шляхами — із застосуванням ферментів алкогольоксидази або алкогольдегідрогенази. У ході алкогольоксидазної реакції етанол спочатку окиснюється до ацетальдегіду та пероксиду водню:



У результаті наступної реакції пероксиду водню з АВТС (2,2'-азинобіс-3-етилбензтіазолін-6-сульфоною кислотою) утворюється кольоровий продукт, який детектується фотометрично (довжина хвилі 420 нм) [27]:



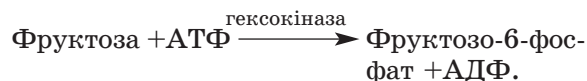
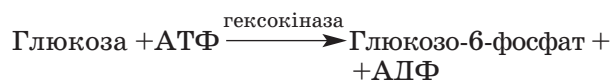
Застосовуючи даний метод, можна визначити до 0,001 г/л етанолу [36].

Недоліком цього методу визначення етанолу є його низька селективність [27].

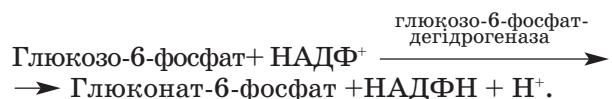
Ферментативне визначення метанолу у вині проводять також із застосуванням алкогольоксидазної реакції, у результаті якої метанол окиснюється до ацетальдегіду та пероксиду водню. На другій стадії відбувається окиснення пероксидом водню *o*-діанізидину, і утворений продукт детектується спектрофотометрично (довжина хвилі 490 нм).

Цей метод визначення метанолу характеризується високою селективністю, проте має низьку чутливість. Інший ферментативний метод визначення метанолу, у якому на другій стадії утворений пероксид водню окиснює не *o*-діанізидин, а *n*-фенілендіамін (причому реакція каталізується продуктом першої реакції — ацетальдегідом), навпаки, має вищу чутливість та меншу селективність [37].

Ферментативне визначення глюкози та фруктози у вині відбувається на декількох стадіях. На першому етапі глюкоза та фруктоза фосфорилуються АТФ у ході ферментативної реакції, що каталізується гексокіназою, у результаті якої утворюється глюкозо-6-фосфат та фруктозо-6-фосфат відповідно:

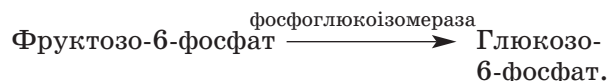


Утворений глюкозо-6-фосфат окиснюється до глюконат-6-фосфату нікотинамід-аденіндинуклеотидфосфатом у присутності ферменту глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази. Кількість відновленого НАДФН відповідає кількості Г6Ф і, відповідно, кількості глюкози, яка була присутня у пробі вина.



Відновлений НАДФ визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 340 нм [28]. Ферментативним методом можна встановити концентрацію глюкози 0,002 г/л [35].

Визначаючи концентрацію фруктози, утворений у першій реакції фруктозо-6-фосфат переводять у глюкозо-6-фосфат завдяки активності фосфоглюкоїзомерази:

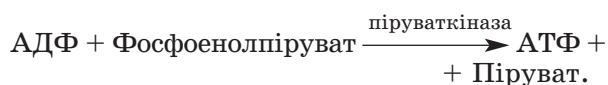


Глюкозо-6-фосфат знову взаємодіє з НАДФ, утворюючи глюконат-6-фосфат та відновлений НАДФ, який детектується спектрофотометрично, як і в попередньому випадку.

*Ферментативне визначення гліцеролу у вині* відбувається тристадійно. На першій стадії гліцерокіназа каталізує фосфорилування гліцеролу до гліцерол-3-фосфату із використанням АТФ:



На другій стадії АДФ знову перетворюється на АТФ у реакції з фосфоенолпіруватом, яку каталізує піруваткіназа:



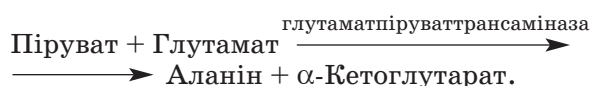
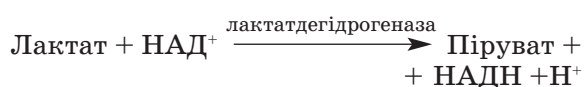
Нарешті, на третій стадії утворений у другій реакції піруват перетворюється на лактат під дією ферменту лактатдегідрогенази за участю НАДН:



Детекцію НАДН, кількість якого пропорційна концентрації гліцеролу у пробі вина, здійснюють при 334, 340 чи 365 нм [28].

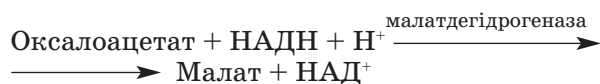
Використовуючи ферментативний метод аналізу, можна визначити концентрації гліцеролу на рівні 0,001 г/л [36].

*Ферментативне визначення молочної кислоти у вині.* Молочна кислота (лактат) окиснюється нікотинамідаденіндинуклеотидом до пірувату в реакції, що каталізується лактатдегідрогеназою. У присутності глутамату піруват перетворюється на аланін у реакції, що каталізується глутаматпіруваттрансaminaзою:



Кількість НАДН, що утворюється у реакції, вимірюють спектрофотометрично при 340 нм.

*Ферментативне визначення лимонної кислоти у вині.* Цитрат перетворюється на щавлево-оцтову та оцтову кислоти у реакції, що каталізується цитратліазою:



У присутності малатдегідрогенази та піруватдегідрогенази щавлево-оцтова кислота та її декарбоксільоване похідне, пірвіноградна кислота, перетворюються на яблучну й молочну кислоти у присутності НАДН. Кількість НАДН, окисненого до НАД<sup>+</sup>, пропорційна кількості лимонної кислоти, вимірюється при 340 нм [28].

Застосовуючи цей метод, можна визначити до 0,002 г/л лимонної кислоти [36].

### *Інші методи аналізу компонентів вина*

*Капілярний електрофорез* — метод розділення, заснований на різниці електрофоретичної рухливості заряджених частинок у водних та неводних буферних електролітах, які містяться у капілярах.

Здійснюючи аналіз методом капілярного електрофорезу, пробу невеликого об'єму вводять у кварцевий капіляр, заповнений електролітом. До капіляра прикладають напругу від -25 до +25 кВ. Під дією електричного поля компоненти проби починають рухатись по капіляру з різною швидкістю, яка залежить від їхньої структури, заряду та молекулярної маси, і, відповідно, у різний час досягають детектора. Основними методами детекції в разі застосування капілярного електрофорезу є фотометричне в УФ-видимій ділянці спектра (пряме та непряме) та флюорометричне (пряме та непряме) визначення. У результаті проведеного електрофоретичного аналізу отримують електрофореграму з певною послідовністю піків досліджуваних речовин. При цьому якісною характеристикою речовини є час її міграції, а кількісною — висота або площа піка, пропорційна концентрації сполуки у досліджуваній речовині. За методом капілярного електрофорезу спочатку аналізують стандартні розчини з відомими концентраціями речовин і для кожного компонента будують градувальну залежність відгуку детектора від концентрації речовини, після чого аналізують пробу невідомої сполуки та за градувальним графіком знаходять концентрацію речовин, що досліджуються [18].

Найчастіше метод капілярного електрофорезу застосовують для визначення у вині вмісту органічних кислот [13, 18, 32]. Для

розділення органічних кислот (щавлевої, мурашиної, винної, яблучної, бурштинової, лимонної, оцтової, молочної, пропіонової, масляної) у вині використовують варіант капілярного зонного електрофорезу з негативною полярністю напруги. Детектування ведуть непрямим способом в УФ-ділянці спектра при 254 нм. В основі розділення кислот лежить міграція їхніх аніонних форм під дією електричного поля внаслідок різної електрофоретичної рухливості. Першими мігруватимуть невеликі та швидкі неорганічні аніони (хлорид, сульфат, нітрат), потім усі, починаючи зі щавлевої, аніони органічних кислот, що визначаються. Діапазони вимірюваних концентрацій у середньому становлять 0,5–200 мг/л [18]. Слід зазначити, що за необхідності визначення у винах фумарової кислоти потрібна додаткова оптимізація умов розділення, оскільки у звичайних умовах фумарова кислота мігрує разом із винною кислотою. У разі визначення аскорбінової та бензойної кислот у вині методом капілярного електрофорезу використовують пряму детекцію, оскільки ці компоненти вина мають у ділянці 254 нм смуги поглинання того чи іншого ступеня інтенсивності.

За допомогою методу капілярного електрофорезу визначають також якісний та кількісний склад у вині неорганічних катіонів та аніонів [18], амінокислот [13, 18], барвників, ароматичних альдегідів і вітамінів, попередньо здійснивши їх екстрагування, фільтрування та центрифугування [18].

Безперечними перевагами цього методу є: можливість одночасного визначення декількох сполук, висока ефективність розділення, малий об'єм аналізованої проби та буферів (не більше 1–2 мл на день), проста та недорога апаратура, експресність і низька собівартість одиничного аналізу. До недоліків методу належать його невисока концентраційна чутливість і вимога до аналізованих сполук

розчинятись у воді та в розбавлених водно-органічних сумішах [18].

Для кількісного визначення органічних кислот вина застосовують також гравіметричний метод. Таким чином може бути детектована винна кислота після переведення її у форму кальцієвої солі [28].

Класичні методи визначення етанолу полягають у попередній відгонці спирту з наступним денситометричним або рефрактометричним аналізом дистилляту. Наявність інших летких сполук, які відганяються разом зі спиртом, заважає аналізу. Недоліком його є невисока специфічність, значні витрати часу та незручність у разі виконання серійних аналізів [27, 28].

Визначення масової концентрації антоціанів у вині може здійснюватись за показниками оптичної густини після стабілізації забарвлення виноматеріалу [32].

Отже, основними недоліками традиційних методів аналізу винопродуктів є висока вартість обладнання, велика трудомісткість та значна тривалість аналізу, а також необхідність попередньої підготовки проб до аналізу. Окрім того, таке обладнання досить важко увести безпосередньо в технологічний процес. Тим часом контроль та оптимізація біотехнологічних процесів під час виробництва вина в харчовій промисловості потребують швидкої та достовірної інформації щодо концентрації субстратів і продуктів реакції. Різні речовини, що їх одержують у процесі ферментації, потрібно аналізувати одночасно, постійно і бажано в режимі реального часу. До того ж, завжди необхідні недорогі прилади для контролю якості отриманих продуктів.

Альтернативою традиційним методам можуть бути біосенсори — нові прилади аналітичної біотехнології. Проте, щоб зайняти нішу в цій галузі, такі прилади мають бути недорогими та надійними, а методи аналізу — швидкими, простими у використанні, дешевими і, що вкрай важливо, рентабельними.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб».



## ЛІТЕРАТУРА

1. ГОСТ 7208-93. Вина виноградные и винома- териалы виноградные обработанные. Общие технические условия: Сб. ГОСТов. — М.: ИПК Изд-во стандартов, 2003.
2. Разуваев В. С. Винный корень // Виноград. Вино. — 2001. — № 6; 2002. — № 1, 2, 4.
3. Мгалоблишвили К.И. Грузинские виноград- ные вина // Химия и жизнь. — 1969. — №1. — С. 52–63.
4. Эмерин М.А. Я бы назвал это химической симфонией // Химия и жизнь. — 1965. — №2. — С. 60–65.
5. Родопуло А.К. Основы биохимии виноделия. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. — 240 с.
6. Шольц Е. П., Пономарев В. Ф. Технология переработки винограда. — М.: Агропромиздат, 1990. — 447 с.
7. Гугучкин А. А., Агеева Н. М., Гугучкина Т. И. Качественная характеристика вин из новых перспективных сортов винограда // Виноде- лие и виноградарство. — 2001. — № 3. — С. 12–15.
8. Нужный В. П. Токсикологическая характе- ристика этилового спирта, алкогольных на- питков и содержащихся в них примесей // Вопр. наркологии. — 1995. — № 3. — С. 65–74.
9. Родопуло А. К. Биохимия виноделия. — М.: Пищевая промышленность, 1971. — 428 с.
10. Козуб Г., Авербух Б. Новое в производстве хереса. — Кишинёв: Картя молдовеняскэ, 1980.
11. Compagnone D., Esti M., Messia M. C. et al. Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation // Biosensors Bioelectron. — 1998. — V. 13. — P. 875–880.
12. Kiba N., Azuma N., Furusawa M. Chemilu- minometric method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with co-immobilized glycerol dehydrogena- se/NADH oxidase // Talanta. — 1996. — V. 43. — P. 1761–1766.
13. Гугучкина Т. И., Шелудько О. Н., Якуба Ю. Ф. и др. Особенности биохимического состава вина из технических красных сортов ви- нограда нового поколения: Сб. «Новации и эффективность производственных процес- сов в виноградарстве и виноделии». — Т. II. — Краснодар: Виноделие, 2005. — С. 69–75.
14. Риберо-Гайон Ж., Пейно Э. Виноделие. — М: Пищевая промышленность, 1971. — 416 с.
15. Погожева А. В. Пищевые волокна в лечеб- но-профилактическом питании // Вопр. питания. — 1998. — №1. — С. 39–42.
16. Селиверстова И. В., Иванова Л. А., Ива- нов А.А. Использование данных анализа органических кислот в виноградных ви- нах при проведении идентификации // Партнеры и конкуренты. — 2003. — №5.
17. Кишковский З. Н., Скурихин И. М. Химия вина. — М.: Агропромиздат, 1988. — 273 с.
18. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практичес- кое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «Капель». — СПб: Веста, 2006. — 212 с.
19. Валуйко Г. Г. Технология виноградных вин. — Симферополь: Таврида, 2001. — 624 с.
20. Авидзба А. М., Иванченко В. И., Загоруй- ко В. А., Огай Ю. А. Перспективы разработ- ки новых биологически активных продук- тов питания на основе винограда: Матер. междунар. науч.-практ. конференции. — Симферополь: Сонат, 2001. — С. 6–7.
21. Винарский В. А. Хроматография: Курс лекций в двух частях — Часть 1. Газовая хро- матография. — Минск: БГУ, 2002. — 192 с.
22. Стыскин Е. Л., Ициксон Л. Б., Брауде Е. В. Практическая высокоэффективная жид- костная хроматография. — М: Химия, 1986. — 288 с.
23. Хефтман Э. Хроматография. Практическое приложение метода. — М.: Мир, 1986. — 336 с.
24. Caputi A., Mooney D. P. Gas-chromatograph- ic determination of alcohol in wine — a col- laborative study // J. Assoc. Anal. Chem. — 1983. — V. 66, N 3. — P. 1152–1157.
25. Macchia T., Mancinelli R., Gentili S. et al. Ethanol in biological fluids: headspace GC measurement // J. Anal. Toxicol. — 1995. — V. 19, N 4. — P. 241–246.
26. Liden H., Vijayakumar A.R., Gorton L., Marko-Varga G. Rapid Alcohol Determination in Plasma and Urine by Column Liquid Chromatography with Biosensor Detection // J. Pharm. Biomed. Anal. — 1998. — V. 17, N 6–7. — P. 1111–1128.
27. Гончар М. В. Традиційні та ферментативні методи визначення алкоголю в біологіч- них рідинах (огляд літератури) // лабора- торна діагностика. — 1999. — №1. — С. 45–49.
28. Office International de la vigne et du vin (OIV), recueil des methods internationles d'analyse des vine et des mouts. — Paris: OIV, 2006. — 321 p.
29. Pellegrino S., Bruno F. S., Petrarulo M. Liq- uid-chromatographic determination of ethyl- alcohol in body fluids // J. Chromatogr. B. — 1999. — V. 729, N 1. — 2. — P. 103–110.
30. Calull M., Marce R.M., Borrull F. Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchan- ge high-performance liquid chromatography with refractive index detection // J. Chroma- togr. — 1992. — V. 590, N 2. — P. 215–222.

31. *Сластья Е.А., Жилиякова Т.А., Аристова Н.И. и др.* Новый экспресс-метод количественного определения содержания мальвидин-3,5-дигликозида в винограде и вине // *Вісник Харків. нац. ун-ту.* — 2005. — № 669. Хімія. Вип. 13 (36). — С. 119–124.
32. *Чаплыгин А.В.* Совершенствование технологии производства красных виноградных вин: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. — Краснодар, 2007. — 24 с.
33. *Методика* выполнения измерений массовой концентрации углеводов в напитках методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Свидетельство № 21-03 от 04.07.2003). — М: ВНИИМС. — 2003. — С. 1–8.
34. *Селиверстова И.В., Иванов А.А., Иванова Л.А.* Определение органических кислот в вине методом жидкостной ионоэкслюзионной хроматографии // *Виноделие и виноградарство.* — 2001. — № 4. — С. 9–11.
35. *Уильямс Б., Уилсон К.* Методы практической биохимии. — М.: Мир, 1978. — 268 с.
36. *Колеснов А.Ю.* Ферментативный анализ качества продуктов питания // *Вопр. питания.* — 1997. — №3. — С. 21–25.
37. *Мизгунова У.М., Тескер А.Е., Краснослободцева Е.А., Долманова И.Ф.* Ферментативное определение примесей метанола в водно-этанольных растворах с применением алкогольоксидазы // *Вестн. Моск. ун-та.* — Серия 2: Химия. — 1998. — Т. 39, №6. — С. 378–382.



## ВИНОГРАДНЫЕ ВИНА. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

*Т. Б. Горюшкина<sup>1,2</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

*E-mail: dzyad@yahoo.com*

В обзоре приведена классификация вин и входящих в их состав компонентов, подробно охарактеризованы химический состав сусла и вина, описаны традиционные методы их качественного и количественного анализа с указанием недостатков и преимуществ каждого из методов.

**Ключевые слова:** вино, сусло, химический состав, традиционные методы анализа.

## GRAPE WINES. CHEMICAL COMPOSITION AND METHODS DETERMINATION

*T. B. Goriushkina<sup>1,2</sup>, S. V. Dzyadevych<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences, Kyiv

<sup>2</sup> National Taras Shevchenko University of Kyiv

*E-mail: dzyad@yahoo.com*

Classification of wines and their components were presented, chemical compositions of must and wine were characterized in detail, and traditional methods for their quantitative and qualitative analysis with their advantages and disadvantages were described.

**Key words:** wine, must, chemical composition, traditional methods of analysis.

# МІКРОБНІ $\alpha$ -АМІЛАЗИ: ВИДІЛЕННЯ, ВЛАСТИВОСТІ, ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

Л. Д. ВАРБАНЕЦЬ, К. В. АВДІЮК, Н. В. БОРЗОВА

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

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

$\alpha$ -Амілази — одна з найбільших родин глікозидгідролаз, трансфераз та ізомераз, що належать до клану GH-N. Ферменти цієї родини окрім  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-зв'язків здатні гідролізувати  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,5-глікозидні зв'язки, містять 4 незамінні залишки амінокислот (Asp204, Asp206, Glu230, Asp297) і мають  $(\beta/\alpha)_8$  або TIM-barrel каталітичний домен. Обговорюються питання щодо методів виділення і очищення  $\alpha$ -амілаз, які охоплюють осадження органічними розчинниками і нейтральними солями, діаліз, ультрафільтрацію, гель-фільтрацію, хроматографію, електрофорез тощо. Наведено сучасні дані щодо можливості продукування  $\alpha$ -амілаз мікроорганізмами різних таксономічних груп, зокрема бактерій, мікроміцетів. Докладно висвітлюються фізико-хімічні властивості  $\alpha$ -амілаз, їхні рН- та термооптими, рН- та термостабільність, молекулярні маси, вплив іонів металів і різних хімічних реагентів. Розглядається можливість використання  $\alpha$ -амілаз у різних галузях промисловості (спиртовій, крохмале-патоковій, хлібопекарській, кондитерській, текстильній, паперовій тощо), а також у медицині.

**Ключові слова:**  $\alpha$ -амілази, фізико-хімічні властивості, практичне використання.

В останні роки розширюються можливості використання мікроорганізмів як біотехнологічних джерел промислово важливих ферментів. Крохмальдеградуючі ферменти, зокрема амілази, привертають увагу дослідників завдяки їх технологічній важливості й економічній вигідності. Вони характеризуються широким спектром застосування в різних галузях, таких як клінічна, медична і аналітична хімія, у цукрофікації крохмалю, текстильній, харчовій, бродильній, фармацевтичній, паперовій, пивоварній і спиртовій промисловості. Амілази становлять близько 30% світової продукції ферментів [1]. Унаслідок підвищених потреб у цих ферментах в різних галузях промисловості існує величезний інтерес в одержанні ферментів з поліпшеними властивостями, зокрема такими, як здатність деградувати грубий (сирий) крохмаль, що робить їх придатними для застосування в деяких ефективних, але не дуже високоартісних технологіях. Особливості технологічних процесів у багатьох промислових виробництвах, де використовують амілолітичні ферменти, а саме у спиртовому, крохмале-патоковому, пивоварному, текстильному, целюлозно-паперовому, потребують використання комплексних ферментних препаратів, які були

б стійкими до підвищених температур і здатними гідролізувати сировину при 80–100 °С. Перевагами високотемпературного процесу є суміщення клейстеризації крохмалю і його ферментативного гідролізу, зниження дозування ферментів, скорочення тривалості конверсії крохмалю, підвищення виходу кінцевого продукту, зменшення собівартості процесу. Здатність до біосинтезу термостабільних амілолітичних ферментів у природних штамів виявляють рідко.

$\alpha$ -Амілази належать до глікозидгідролаз — ферментів, здатних метаболізувати різноманітні сахариди. Їх було поділено на класи (групи) — за механізмом дії, а також на родини — на основі подібності їхньої амінокислотної послідовності. Так, існує 4 класи глікозидаз: 1) ендоамілази, які розщеплюють внутрішні  $\alpha$ -1,4-зв'язки, утворюючи  $\alpha$ -аномерні сполуки; 2) екзоамілази, що гідролізують  $\alpha$ -1,4- або  $\alpha$ -1,6-зв'язки у термінальних залишках глюкози, утворюючи  $\alpha$ - або  $\beta$ -аномерні продукти; 3) ферменти, які відщеплюють виключно розгалужені  $\alpha$ -1,6-зв'язки, утворюючи лінійний полісахарид; 4) трансферази, що розщеплюють  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки донорної молекули і переносять частину донора до глікозидного акцептора з утворенням нового глікозидного зв'язку [2].

Концепцію такої групи ферментів, як  $\alpha$ -амілази (ЕС 3.2.1.1; 1,4- $\alpha$ -D-глюкан глюканогідролаза), було запропоновано в 1992 р. рядом авторів [3]. Це — одна з найбільших родин глікозидгідролаз, трансфераз та ізомераз, до якої належать близько 30 різних специфічностей. Згідно із зазначеною концепцією, а також відповідно до сучасної ситуації [4, 5] члени цієї родини мають задовольняти таким вимогам: 1) виявляти гліколітичну активність, розщеплюючи  $\alpha$ -глюкозидні зв'язки з утворенням  $\alpha$ -аномерних моно- і олігосахаридів, або трансглікозилуючу активність, внаслідок якої утворюються  $\alpha$ -1,4- або  $\alpha$ -1,6-глікозидні зв'язки або комбінація обох активностей; 2) серед 14 кланів (A–N), які визначено для глікозидаз і трансглікозидаз, родина  $\alpha$ -амілаз (1,4- $\alpha$ -D-глюкан глюканогідролаз) (GH-13) належить до восьмого клану (GH–H), який охоплює родини 13, 70 і 77. Представники одного клану характеризуються однаковою тривимірною структурою каталітичного домена, але з обмежено подібною послідовністю. Це свідчить про те, що білкова структура еволюційно краще захищена, ніж амінокислотна послідовність; 3) ферменти цієї родини можуть гідролізувати, крім  $\alpha$ -1,4- і  $\alpha$ -1,6- зв'язків, також  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- і  $\alpha$ -1,5-глікозидні зв'язки; 4) взаємозв'язки головної родини  $\alpha$ -амілаз (клан GH–H) з родиною екстремофільних  $\alpha$ -амілаз, родиною глікозидгідролаз 57 поки ще ані підтверджено, ані спростовано; 5) тільки 4 залишки амінокислот мають бути незамінними для представників усієї родини (Asp204, Asp206, Glu230 і Asp297, нумерація як у така-амілази). Деякі з цих консервативних амінокислот утворюють каталітичний центр, а деякі залучаються до стабільності консервативної топології TIM-barrel; 6) мати ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> або TIM-barrel (бочонок тріозофосфатізомерного типу) каталітичний домен; 7) 4 консервативні ділянки послідовностей, які присутні у ланцюгах  $\beta$ 3,  $\beta$ 4,  $\beta$ 5 і  $\beta$ 7 каталітичного ( $\beta/\alpha$ )-barrel домена, було ідентифіковано, їх використовують для визначення родини  $\alpha$ -амілаз. В останні роки дослідники [6] встановили наявність трьох додаткових ділянок консервативної послідовності, дві з яких розташовані на ланцюгах  $\beta$ 2 і  $\beta$ 8 каталітичного ( $\beta/\alpha$ )-barrel і одна — поблизу C-кінця домена В у  $\beta$ 3- $\alpha$ 3-зв'язку каталітичного ( $\beta/\alpha$ )-barrel. Тимчасом як 4 ділянки первісно консервативної послідовності містять каталітичні і субстратзв'язувальні залишки індивідуальних членів родини, останні 3 ділянки консервативної послідов-

ності містять амінокислотні залишки, які зумовлюють специфічність даного ферменту. Автори припускають, що ферменти родини  $\alpha$ -амілаз мають бути охарактеризовані як такі, що містять так багато ділянок консервативної послідовності, як тільки можливо.

Відомо, що ферменти родини  $\alpha$ -амілаз містять 3 суттєвих каталітичних залишки Asp206, Glu230 і Asp297, які строго консервативні як в амінокислотній послідовності, так і в тривимірній структурі. Мутагенез будь-якого із цих залишків на іншу амінокислоту призводить до майже повної втрати активності. Функціональні ролі Glu230 і Asp206, як прийнято вважати, такі, що беруть участь у каталізі як кислота (донор протона) і луг (нуклеофіл), відповідно. Однак критичну роль третього залишка Asp297 не було описано. Автор [7] показав, що Asp297 централізовано працює для зв'язування субстрату, що призводить до деформації кальцію субстрату в точці розщеплення, яка є цілковито необхідною для каталізу. Таким чином, показано роль цього залишка як «фіксатора» в каталізі  $\alpha$ -амілазних ферментів.

У табл. 1 наведено відомі на сьогодні глікозилгідролази родини 13 [8].

$\alpha$ -Амілази ізолюють із різних біологічних джерел: тварин (панкреатична або слинна), злакових (пшениці або ячменю), грибів (види *Aspergillus*) і бактерій (види *Bacillus*). До бактеріальних  $\alpha$ -амілаз належать такі, що працюють як при нормальній температурі (представники *B. subtilis*), так і при дуже високих температурах (*B. licheniformis*).  $\alpha$ -Амілази каталізують розщеплення  $\alpha$ -1,4-глікозидних зв'язків в амілозі й амілопектині, які є первинними компонентами очищених крохмалів, що їх використовують під час приготування тіста. Вони зумовлюють швидке зменшення довжини полімера крохмалю. Утворювані фрагменти є олігосахаридами, які розчинні у воді й надто короткі, щоб зберігати здатність до адгезії.

$\alpha$ -Амілази відіграють суттєву роль у метаболізмі  $\alpha$ -глюкану. Кристалічну структуру раніше не ідентифікованої амілази (AmyC) з *Thermotoga maritima* було визначено за MAD (Multi-wavelength anomalous dispersion). Цей метод застосовують у X-променевої кристалографії [9]. У AmyC відсутня послідовність, яка аналогічна канонічним  $\alpha$ -амілазам, що належать до родин гідролаз 13, 70 і 77, однак виявляють суттєву подібність із групою ще не охарактеризованих білків у COG1543, і споріднена



Таблиця 1. Відомі глікозидгідролази родини 13 [8]

Фермент	Номер згідно ЕС	Головний субстрат
Амілосахараза	2.4.1.4	Сахароза
Сахарозофосфорилаза	2.4.1.7	Сахароза
Глюканрозгалужувальний фермент	2.4.1.18	Крохмаль, глікоген
Цикломальтодекстрин глікозилтрансфераза	2.4.1.19	Крохмаль
Аміломальтаза	2.4.1.25	Крохмаль, глікоген
$\alpha$ -Амілаза, що утворює мальтопентаозу	3.2.1	Крохмаль
$\alpha$ -Амілаза	3.2.1.1	Крохмаль
Оліго-1,6-глюкозидаза	3.2.1.10	1,6- $\alpha$ -D-зв'язки у деяких олігосахаридах
$\alpha$ -Глюкозидаза	3.2.1.20	Крохмаль
Амілопулулоназа	3.2.1.41	Пулулан
Цикломальтодекстриназа	3.2.1.54	Лінійний і цикломальтодекстрин
Ізопулулоназа	3.2.1.57	Пулулан
Ізоамілаза	3.2.1.68	Амілопектин
$\alpha$ -Амілаза, яка утворює мальтотетраозу	3.2.1.60	Крохмаль
Глюкодекстраназа	3.2.1.70	Крохмаль
Трегалозо-6-фосфатгідролаза	3.2.1.93	Трегалоза
$\alpha$ -Амілаза, яка утворює мальтогексаозу	3.2.1.98	Крохмаль
$\alpha$ -Амілаза, яка утворює мальтозу	3.2.1.133	Крохмаль
Неопулуланаза	3.2.1.135	Пулулан
Мальтоолігозилтрегалозогідролаза	3.2.1.141	Трегалоза
Мальтоолігозилтрегалозосинтаза	5.4.99.15	Мальтоза

з родиною гліцеролгідролаз 57 (GH-57). АмуС виявляє риси, характерні для  $\alpha$ -амілаз, такі, зокрема, як скривлена TIM-barrel структура, утворена 7  $\beta$ - і  $\alpha$ -геліксами (домен А) та двома додатковими, але менш консервативними доменами. Один із них — домен В, який містить 3 гелікси, які вставлені в TIM-barrel після  $\beta$ -гелікса 2, а другий — домен С, у якого 5 гелісових зон на С-кінцях. Цікаво, що, незважаючи на помірну спорідненість гомології, порівняння структур виявило значну спорідненість із членами GH-57, які характеризуються добре відомою тривимірною структурою 4-глюканотрансферази *Thermococcus litoralis*, і навіть більшу спорідненість зі структурою ферменту невідомої функції *Thermus thermophilus*.

#### Методи виділення й очищення $\alpha$ -амілаз

Оскільки  $\alpha$ -амілаза у більшості мікроорганізмів є екстрацелюлярним ферментом, то операції з її виділення й очищення зводяться до такого:

1) відділення клітинної біомаси від культуральної рідини;

2) очищення і концентрування розчинів, які містять вихідний фермент, за допомогою вакуум-концентрування, осадження з розчинів органічними розчинниками та нейт-

ральними солями, діаліз, ультрафільтрація, гель-фільтрація, електрофорез, хроматографія тощо.

І. П. Галич [10] розробила спосіб одержання високоочищеного препарату  $\alpha$ -амілази *A. oryzae*, який за основними властивостями відповідає кристалічному. Метод складається з дуже простих операцій (осадження спиртом, стабілізація іонами  $\text{Ca}^{2+}$ , висолування сульфатом амонію та діаліз) і дозволяє отримати фермент з виходом 50–60 % за активністю, що в 3–4 рази перевищує вихід у разі кристалізації. Запропонований спосіб може стати основою виробничого одержання ферменту з метою його використання в медицині і в деяких галузях харчової промисловості. Препарати високоочищеної  $\alpha$ -амілази мали амілолітичну активність 5 040–5 400 одиниць, містили 70–71% білка, 12–13% вуглеводів, 8–10% пептидів, 6–7% води і 3–4% золи.

Очищення  $\alpha$ -амілази з іншого штаму *A. oryzae* [11] проводили шляхом діалізу фільтрату глибинної культури і подальшою хроматографією на колонці з ДЕАЕ-целюлозою. Кількість  $\alpha$ -амілази в отриманій фракції становила близько 90% від загальної кількості ферменту, який наносили на колонку, і більше 20% від загальної кількості білка. Подальше очищення ферменту здійснювали

методом гель-хроматографії на колонці з сефадексом G-100. У результаті вдалося відокремити фермент від залишкової кількості неактивних білкових домішок. На очищеному ферменті встановлено, що кінцевою амінокислотою є аланін.

Колонковий метод на основі використання пористого технічного катіоніту КМ-2ПК було застосовано для виділення  $\alpha$ -амілази з культуральної рідини *A. oryzae*. Попереднє введення іонів кальцію в матрицю катіоніту підвищувало сорбційну ємність та селективність зв'язування і забезпечувало збереження нативної структури ферменту, оскільки макромолекула  $\alpha$ -амілази містить у своїй структурі декілька атомів кальцію, які стабілізують її активну конформацію. Уперше було показано, що сорбційна іммобілізація на полімерах, які мають у своїй структурі позитивно і негативно заряджені групи, запобігає афінній десорбції амілази розчином субстрату. У результаті на основі використання амілаз, що іммобілізовані на каучукових катіонітах (СКН), було створено колонковий реактор, який був здатен працювати протягом 10–12 днів, і показано можливість використання зв'язаних амілаз для ферментативного гідролізу крохмалю. Препарати іммобілізованих амілаз залишались активними під час зберігання в замороженому стані протягом року [12].

У процесі вивчення амілолітичної активності *A. niger-475* досліджуваний розчин ферментного препарату одержували осадженням фільтрату глибинної культури чотирма об'ємами етилового спирту і наступним діалізом осаду, після чого його піддавали розділенню на колонці з ДЕАЕ-целюлозою. У такий спосіб було отримано препарат, який складався з двох білків —  $\alpha$ -амілази і глюкоамілази. Питома активність  $\alpha$ -амілази після хроматографії на іонообміннику зросла з 0,25 Од · мл<sup>-1</sup> до 1,2 Од · мл<sup>-1</sup> [11].

Виділення  $\alpha$ -амілази з гриба *A. flavipes*, добутого з морської води, здійснювали, вдаючись до стандартних методів — хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі й сефадексах G-75, G-100. У результаті одержали три фракції амілаз з різними фізико-хімічними властивостями [13].

В. М. Шкуматов зі співавт. [14] розробили схему отримання з культуральної рідини *B. subtilis*  $\alpha$ -амілази у гомогенному стані, яка включала такі стадії очищення, як фракціонування сульфатом амонію, іонообмінну та гель-хроматографію.

Н. А. Кічакова [15] для розділення та очищення амілолітичних ферментів, що синте-

зуються штамом *Bacillus sp. 86*, застосовувала класичні методи білкової хімії: фракціонування білків насиченим розчином сульфату амонію, іонообмінну й афінну хроматографію, гель-фільтрацію. На етапі видалення протеїназ, які майже завжди утворюються паралельно з амілазами, із ферментного розчину хроматографією на бацитрацин-силохромі здійснили розділення амілолітичних ферментів на дві фракції. Ці ферменти були очищені до гомогенного стану. Перший із них становив типову  $\alpha$ -амілазу *Bacillus*. Другий, який поряд з амілолітичною виявляв і пулуланазну активність, імовірно, належить до пулуланаз, однак не виключена можливість, що це амілаза, яка розщеплює 1,4-глюкозидні зв'язки у крохмалі й пулулані.

Комбінація методів хроматофокусування і гель-фільтрації дозволила здійснити ефективне очищення  $\alpha$ -амілази із *B. licheniformis*. Із застосуванням вищезазначених методів фермент було очищено у 77 разів [16].

#### Фізико-хімічні та каталітичні властивості амілаз

Відомо, що продуцентами амілаз є мікроміцети (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) і бактерії (*Bacillus*). Дані щодо деяких їхніх фізико-хімічних властивостей наведено в табл. 2.

Дослідження  $\alpha$ -амілаз *A. flavus*, *A. awamori* та *A. oryzae* [17] показало, що вони характеризувались однаковими значеннями рН-оптимумів активності 5,0–5,25; зона їхньої рН-стабільності — 6,0–8,0; точка найбільшої стійкості — 7,0. Усі три  $\alpha$ -амілази стабільні при кімнатній температурі, утім фермент *A. flavus* був стійкішим до нагрівання, ніж *A. awamori* та *A. oryzae*, і при 55 °С протягом 1 год зберігав 70% вихідної активності. Температурний оптимум  $\alpha$ -амілази *A. flavus* — 50 °С, а  $\alpha$ -амілаз *A. awamori* та *A. oryzae* — 40 °С. Стабільність досліджуваних ферментів до теплової денатурації підвищувалась у присутності субстрату (крохмалю). Галогеніди у концентрації 0,25 М не стабілізували  $\alpha$ -амілази, а навпаки, прискорювали їх інактивацію. Цей вплив зростав у послідовності  $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{F}^- < \text{I}^-$  і притаманний усім трьом ферментам. Сечовина концентрацією від 1,0 до 6,0 М денатурувала білки. Інактивуюча дія була більш вираженою для  $\alpha$ -амілаз *A. awamori* та *A. oryzae*, стійкішим був фермент із *A. flavus*. ЕДТА — сильний інгібітор усіх трьох  $\alpha$ -амілаз, а атоми кальцію — важливі для їхньої активності й стабільності.

Таблиця 2. Фізико-хімічні властивості деяких  $\alpha$ -амілаз

Джерело виділення	Молекулярна маса, кДа	Оптимум дії		Інгібітор	Активатор
		pH	t, °C		
<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. awamori</i> <i>A. oryzae</i> [17]	–	5,0–5,25	50 40 40	ЕДТА	Ca <sup>2+</sup>
<i>A. flavipes</i> [18] 1 2 3	50 63 50	6,0–7,5 5,5 5,5; 7,5	30–50 30–50 60–80	ЕДТА Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
<i>A. niger</i> [19]	–	4,0	50–55	–	–
<i>Bacillus sp. 86</i> [21]	83–90	6,0; 8,5	85–90	–	–
<i>Bacillus sp. PN5</i> [22]	–	10,0	90	–	–
<i>B. subtilis</i> [24]	48	–	–	Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	–
<i>B. subtilis</i> JS-2004 [25]	–	7,0	50	Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
<i>B. licheniformis</i> MIR-61 [26]	–	7,0	45	–	–
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> HR-010 [32]	58	5,5	80	ЕГТА, ЕДТА	–
<i>Thermomyces lanuginosus</i> F1 [35]	55	4,0	–	Гуанідин-НСl, сечовина, ЕДТА	Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>

Примітка: «–» — даних нема; ЕГТА — етиленглікольтетраацетат; ЕДТА — етилендіамінтетраацетат.

Оскільки мікробна конверсія крохмалю і дотепер залишається одним із важливих напрямів досліджень у біотехнології, для удосконалення біотехнологічних процесів необхідним є пошук вискоєфективних амилітичних ферментів з новими властивостями. Так, автори [18] із 245 штамів морських грибів відібрали перспективний продуцент позаклітинних амілаз — *Aspergillus flavipes* і показали, що залежно від умов культивування він здатен продукувати різні амилітичні комплекси. На живильному середовищі, яке містить пептон і дріжджовий екстракт (pH 7,0), *A. flavipes* синтезував три форми амілази, які відрізнялись оптимальним pH. Зміна початкового значення pH середовища (8,6) або видалення з живильного середовища пептона супроводжувалось утворенням однієї з форм ферменту. Присутність протеолітичних ферментів знижувала активність ізольованих форм амілаз. У разі внесення в живильне середовище інгібітору протеаз дізопропілфторфосфату синтезувалась нова форма амілази з оптимальним pH 5,5 та 7,5, максимальною активністю при 60–80 °C і високою стабільністю. Амілаза 1 виявляла активність у широкому діапазоні значень pH (5,5–8,0), оскільки становила суміш двох молекулярних форм: кислої (м.м. 50 кДа, оптимальне значення pH 6,0, термооптимум 30–50 °C) і лужної (м. м. 14,5 кДа, оптимум

pH 7,5, термооптимум 30–50 °C) амілаз. Амілаза 2 мала характерні для більшості грибних амілаз властивості: м. м. 63 кДа, оптимум pH 5,5, максимальна активність у діапазоні температур 30–50 °C і температурна стабільність до 50 °C. Однак досліджувані форми амілаз були нестабільними у процесі виділення внаслідок присутності протеолітичних ферментів. Амілаза 3 (м. м. 50 кДа) помітно відрізнялась від вищезазначених форм ферменту. Вона виявляла активність у широкому діапазоні pH (5,5–8,5), два максимуми активності при 5,5 і 7,5 і температурі 60–80 °C, мала високу термостабільність (70 °C) і зберігала початкову активність упродовж 20 днів при температурі 22 °C за обох значень pH. Амілаза 3 була металозалежним ферментом, її активність підвищували іони Ca<sup>2+</sup> і Mg<sup>2+</sup>, інгібували — ЕДТА й деякі метали — Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>. На відміну від амілаз морських бактерій, амілаза морського гриба *A. flavipes* виявляла стійкість до екстремально високих концентрацій солі (15% NaCl).

*A. niger* 1119 під час глибинного вирощування продукував амілази з високою активністю (3,9 Од·мл<sup>-1</sup>) при 50–55 °C і pH 4,0 і зберігав стабільність при 53 °C протягом 200 год. Для того щоб встановити, чи можна використовувати цей фермент у процесі очищення, різні детергенти досліджували

з використанням екстракту амілази *A. niger* і встановили можливість їх застосування для очищення хірургічних і ендоскопічних інструментів [19].

Деякі дослідники [20] показали здатність Твін-80 і рамноліпиду стимулювати активність позаклітинної амілази *Penicillium simplicissimum*.

Амілазу виявили також у різних представників бактерій, як патогенних (*Vibrio cholerae*, *B. anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pneumococcus*), так і непатогенних (*B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. macerans*) видів. Промислове значення, безумовно, можуть мати і фактично мають лише непатогенні бактерії. На особливу увагу заслуговують термостабільні амілази, які здатні гідролізувати нативний крохмаль і витримувати високі концентрації солей, а також лужні амілази, оскільки більшість відомих грибних амілаз, що їх широко застосовують у промисловості, виявляють активність у кислому середовищі.

Амілолітичні ферменти термофільного штаму *Bacillus sp. 86* виявляли активність при температурі 30–95 °С (термооптимум 85–90 °С) і в інтервалі значень рН 5,0–10,5 з двома рН-оптимумами (6,0 і 8,5). Активність препарату при 60 °С залишалася без змін протягом 4 год, а час його напівактивації при цій температурі — 9 год, при 90 °С активність препарату не змінювалась упродовж 50 хв, а час напівактивації становив 2 год [21]. Здатність досліджуваного ферменту здійснювати гідроліз крохмалю в умовах слабкого, нейтрального і лужного середовищ є істотною перевагою перед іншими  $\alpha$ -амілазами і зумовлює можливість використання його як каталізатора різних промислових реакцій розрідження крохмалевмісної сировини. Іони кальцію, які не впливають на активність  $\alpha$ -амілази, значно підвищують стабільність ферменту, до того ж потреба в іонах цього металу зростає з підвищенням температури інкубації. Крохмаль, як специфічному субстрату  $\alpha$ -амілази, також притаманний високий стабілізуючий ефект. У 22,5% -му розчині крохмалю  $\alpha$ -амілаза *Bacillus sp. 86* за відсутності іонів кальцію цілком стабільна протягом 100 хв при 90 °С і 80 хв при 100 °С. Встановлено, що даний фермент є глікопротеїном. Білкова глобула ферменту тісно зв'язана з вуглеводним компонентом, який становить до 16% сухої маси. Молекулярна маса  $\alpha$ -амілази дорівнює 83–90 кДа. Молекула  $\alpha$ -амілази *Bacillus sp. 86*, що містить 16 амінокислот і налічує в середньому 254 амінокислотних

залишки, відзначається високим вмістом аспарагінової і глутамінової кислот, аланіну, валіну і триптофану. У молекулі ферменту не виявлено цистеїну. Припускають, що роль дисульфідних зв'язків у створенні структури термостабільної  $\alpha$ -амілази відіграють іони кальцію [15].

Високотермостабільну амілазу, яка продукується *Bacillus sp. PN5*, було ізольовано з ґрунту [22]. У разі вирощування на середовищі, яке містить (%) крохмаль (0,6), пептон (0,5) і дріжджовий екстракт (0,3), при 60 °С, рН 7,0, упродовж 60 год активність амілази, яка продукувалась, становила 65,23 Од/мл. Максимуму активності було досягнуто при рН 10,0 і температурі 90 °С. Активність ферменту пригнічувалась при 105 °С на 65%, а при температурі від 80 до 100 °С була стабільною протягом 1 год. Фермент зберігав 83% активності після 1 год інкубації з додецилсульфатом натрію. Ці властивості вказують на можливість використання даної амілази при цукрофікації крохмалю і утворенні детергенту.

У Росії на цей час у промисловому масштабі виробляють препарати  $\alpha$ -амілази на основі двох продуцентів — *B. subtilis* (аміло-субтилін) і *A. oryzae* (амілоризин) [23]. Однак ці амілази не належать до термостабільних ферментів, оскільки оптимальна температура їхньої дії 55–65 °С. Автори [23] методами мутагенезу і селекції одержали високопродуктивний штам *B. licheniformis* 103, який здатен синтезувати термостабільну  $\alpha$ -амілазу (температурний оптимум 90–95 °С, рН-оптимум 6,0–8,5). Оптимізацією складу ферментаційного середовища і умов глибинного культивування продуцента їм вдалося майже у 8 разів у порівняно з вихідним штамом підвищити активність амілази, яка становила 260 Од · мл<sup>-1</sup>.

За допомогою іонообмінної хроматографії і гель-фільтрації очистили позаклітинну  $\alpha$ -амілазу *B. subtilis* [24]. Молекулярна маса її дорівнювала 48 кДа. Різноманітні іони металів навіть за низьких концентрацій інгібували активність  $\alpha$ -амілази. Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> і Ni<sup>2+</sup> були слабкими, а Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> і Cu<sup>2+</sup> — сильними інгібіторами. Високі концентрації Ca<sup>2+</sup> сприяли зниженню ферментативної активності, а за концентрації 2,5 мМ активність підвищувалась. ЕДТА також впливав на активність, аналогічно до впливу Ca<sup>2+</sup> за низьких концентрацій. Відзначено підвищення активності ферменту в разі використання іонів металів у концентрації 10 мМ. Показники K<sub>m</sub> і V<sub>max</sub> для  $\alpha$ -амілази становили 2,2 · 10<sup>-4</sup> г · мл<sup>-1</sup>

і  $0,020 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$ ,  $2,91 \cdot 10^{-4} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$  і  $0,016 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$ ;  $4,04 \cdot 10^{-4} \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1}$  і  $0,021 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$  у випадку використання як субстратів крохмалю, амілози і глікогену, відповідно.

Автори [25] ізолювали штами *B. subtilis* JS-2004 з максимальною активністю  $72 \text{ Од} \cdot \text{мл}^{-1}$  під час вирощування на рідкому середовищі з картопляним крохмалем упродовж 48 год при рН 7,0 і  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Додавання іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і дріжджового екстракту підвищувало продукування ферменту, тимчасом як додавання 1% глюкози сприяло значному інгібуванню. Оптимальної активності було досягнуто при рН 8,0 і  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . Фермент був стабільним протягом 1 год при  $60$  і  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , водночас при  $80$  і  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  вихідна активність втрачалась на 12 і 48%, відповідно. Фермент активували іони  $\text{Ca}^{2+}$  (117%), значною мірою інгібували іони  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  та  $\text{Hg}^{2+}$  і меншою мірою  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  і  $\text{Mn}^{2+}$ . Штам продукував високі рівні  $\alpha$ -амілази, яку можна використовувати в крохмале-паточковій та харчовій промисловості.

Зі зразків південноамериканських ґрунтів виділено штам *B. licheniformis* MIR-61, який продукував підвищену кількість кислоти  $\alpha$ -амілази. У періодичних культурах *B. licheniformis* MIR-61 у фазі експоненційного росту виявляли позаклітинні  $\alpha$ -амілази та глюкозидази. Максимальної активності  $\alpha$ -амілази було досягнуто при  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  і рН 7,0 у пізній експоненційній фазі. Оптимум активності цього ферменту спостерігався при  $50$ – $67 \text{ }^\circ\text{C}$  і рН від 5,5 до 6,0.  $\alpha$ -Амілаза характеризувалася термостабільністю при  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  [26].

$\alpha$ -Амілаза *B. licheniformis* є високостабільним ферментом, який широко використовують у біотехнологічних процесах. Незважаючи на те, що її продукує не термофільна бактерія, вона зберігає активність протягом декількох годин при температурі, вищій за  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , в умовах промислового гідролізу крохмалю. Вона також більш стабільна, ніж  $\alpha$ -амілаза *B. stearothermophilus* і *B. amyloliquefaciens*, попри значну подібність послідовностей між цими трьома білками.  $\alpha$ -Амілаза *B. licheniformis* є цікавою моделлю для білкової інженерії під час дослідження термостабільності й термостабілізації. Автори [27] здійснили мутаційний і структурний аналіз  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis*, для того щоб з'ясувати походження незвичайних термальних властивостей і, якщо можливо, підвищити термостабільність ферменту. Ще до того як було встановлено тривимірну структуру, дослідники використали мутагенез та ідентифікували два критичних поло-

ження, в яких заміщення амінокислот може або підвищити, або знизити значною мірою необоротну термоінактивацію. Коли детальну X-променеву структуру  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis* було встановлено, заснований на структурі мутагенез застосували для визначення ролі залишків, які залучаються до утворення сольових містків, зв'язування з кальцієм або потенціальних процесів деамідування. Результати дослідників [27] свідчать про ключову роль домена В та його взаємодії з доменом А у термостабільності  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis*. Більшість мутацій, які автори вводили в цю ділянку, так чи інакше модифікували стабільність завдяки впливу на електростатичну взаємодію тріади металів  $\text{Ca}$ – $\text{Na}$ – $\text{Ca}$  у місці контакту доменів А/В. Мутаційні дослідження показали важливість тріади металів для підтримання правильного вигину домену А, а також розщеплення конформації активного центру. Однак подібний тріадний металзв'язувальний центр також присутній у менш термостабільних бактеріальних гомологів, таких як *B. stearothermophilus* і *B. amyloliquefaciens*. Тому підвищена термостабільність  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis* не може бути зумовлена присутністю цієї тріади металів. У процесі мутаційних досліджень автори сконструювали понад 500 варіантів амілази, що несли від однієї до численних мутацій, серед яких було багато як високошкідливих, так і певною мірою корисних для стабільності. Кумулятивний ефект мутацій дав дослідникам можливість модулювати стабільність ферменту в діапазоні  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , включаючи значне втручання в амілолітичну функцію. Незважаючи на те, що повного розуміння походження природної термостабільності  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis* ще не досягнуто, дослідження авторів показали, що вона не є оптимальною і що є можливість підвищувати або знижувати її штучно декількома шляхами, використовуючи як випадковий, так і цілеспрямований мутагенез. Цікаво, що інженерно створені гіпертермостабільні варіанти  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis* є також більш стабільними за низьких значень рН.

Вивчаючи взаємодію  $\alpha$ -амілази *B. amyloliquefaciens* з дивалентними катіонами кальцію і кобальту, дослідники [28], встановили 17 сайтів зв'язування кальцію на ферменті зі слабкою позитивною кооперативністю. Зв'язування як кальцію, так і кобальту є екзотермічним процесом. Кальцій стабілізував фермент проти сурфактантів і термальної денатурації. Більш того, зв'язування з кальцієм запобігало спонтанному

зменшенню біологічної активності  $\alpha$ -амілази. На ферменті існує 25 некооперативних сайтів для зв'язування іонів кобальту. Активність ферменту значно підвищується зі збільшенням концентрації кобальту, але температура денатурації ферменту знижується. Таким чином, дивалентні катіони кальцію і кобальту діють як стабілізатор і активатор, відповідно, для  $\alpha$ -амілази *B. amyloliquefaciens*.

Дослідники показали [29] здатність продукувати високоактивну амілазу для штамів *Streptomyces somaliensis* GS 1242 і *Streptomyces sampsonii* GS 1322.

Зростаючи на середовищі з глюкозою, *Clostridium acetobutyricum* продукує позаклітинну  $\alpha$ -амілазу. Фермент достатньо охарактеризований біохімічно, однак його ген поки що не ідентифіковано. Ген *amyP* кодує 80 013-Да зрілий білок з N-кінцевим доменом, який є ідентичним такому родині 13 глікозилгідролаз, таких як  $\alpha$ -амілаза *Bacillus*. Транскрипційний аналіз показав, що *amyP* транскрибується в розчині хемостатної культури. Наведені дані відповідають активності  $\alpha$ -амілази, а це свідчить про те, що експресія *amyP* регулюється на транскрипційному рівні. *AmyP* локалізували на мегаплазміді pSOL1, яка несе всі гени, що беруть участь у кінцевій стадії утворення розчину. Дегенерація *C. acetobutyricum* пов'язана зі втратою pSOL1. Показано, що *amyP* можна використати як рецепторну систему для характеристики цього явища [30].

Новий термофільний спороутворювальний штам MR3C<sup>t</sup>, що його ізолювано з геотермального ґрунту, локалізованого на горі Рітманн в Антарктиці, був здатен продукувати позаклітинну амілазу. На основі 16 S рРНК-последовності було показано, що штам близький до *Anoxybacillus amylolyticus* [31].

З *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 [32] виділено й очищено до гомогенного стану (13,6 раза, 11,5% вихід)  $\alpha$ -амілазу. Молекулярна маса, визначена за допомогою ДСН-ПААГ-електрофорезу, становила 58 кДа. Активність була оптимальною на картопляному крохмалі при рН 5,5 і 80 °С. У присутності іонів Ca<sup>2+</sup> залишкова активність досягала 92% після 1 год інкубації при 70 °С.  $\alpha$ -Амілаза не втрачала активності у присутності фітату (селективний інгібітор  $\alpha$ -амілази) у концентрації 10 мМ і зберігала 90% максимальної активності після 1 год інкубації при 70 °С. ЕГТА і ЕДТА були сильними інгібіторами ферменту.  $\alpha$ -Амілаза гідролізувала розчинний крохмаль при 80 °С з  $K_m$  3,05 мг·мл<sup>-1</sup> і  $V_{max}$  7,35 Од·мл<sup>-1</sup>.

Здатність до продукування позаклітинної  $\alpha$ -амілази було виявлено і в галофільної бактерії *Halomonas meridiana* [33]. Найвища продукція  $\alpha$ -амілази спостерігалась наприкінці логарифмічної фази під час зростання культури на середовищі з 5% солей чи крохмалю за відсутності глюкози. Фермент виявляв максимальну активність при рН 7,0, але був відносно стійким і в лужних умовах. Оптимальні значення температури і солоності для активності  $\alpha$ -амілази становлять відповідно 37 °С і 10% NaCl.

У біотехнологічних процесах, а саме у ферментативному гідролізі крохмалю у процесі одержання глюкози, використовують амілолітичні ферменти, які синтезуються термофільними археями [34].

Здатність до синтезу термостабільної  $\alpha$ -амілази виявлена у *Thermomyces lanuginosus* F<sub>1</sub>. Молекулярна маса й ізоелектрична точка для цього ферменту становили відповідно 55 кДа і 4,0. Максимальну стабільність  $\alpha$ -амілаза виявляла при рН 4,0 і зберігала > 80% активності за рН 5,0–6,0 протягом 24 год. Після інкубації при 90 °С упродовж 1 год  $\alpha$ -амілаза зберігала лише 6% активності. Активність ферменту зростала у присутності Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> і Fe<sup>2+</sup>, але інгібувалася гуанідин-НСІ, сечовиною і ЕДТА. Цей фермент має такі параметри рН і термостабільності, які роблять його перспективним для промислового використання [35].

Таким чином, представники різних таксономічних груп мікроорганізмів здатні продукувати активні  $\alpha$ -амілази, з різноманітними фізико-хімічними властивостями, що визначає практичне використання їх у різних сферах життєдіяльності людей.

### Практичне застосування $\alpha$ -амілаз

Відомо, що  $\alpha$ -амілазу *Aspergillus* вже протягом багатьох століть використовують у промисловому виробництві для виготовлення соєвих соусів і напою саке. Соєві соуси виготовляють із автоклавованих соєвих бобів, які інокулюють культурою *Aspergillus*, переважно *A. flavus*, після інтенсивного розвитку матеріал переносять у сольовий розчин, куди додають також дріжджі. Тут відбувається тривалий (приблизно рік) процес дозрівання, протягом якого продукт набуває специфічного смаку й аромату. Саке — напій, що містить від 12 до 15% алкоголю, виготовляють із рису. Рис спочатку автоклавують, потім оцукрюють дією койї (койя — ферментативний препарат, що є продуктом сукупності декількох видів *Aspergillus*,

вирощених на пшеничних висівках і соєвих бобах, переважають *A. flavus* і *A. oryzae*), після чого гідролізат зброджують, додаючи дріжджі [36].

На сьогодні за кордоном описано близько 200 поліферментних лікарських засобів, що їх застосовують для поліпшення травлення, зокрема при диспепсії, гастриті, діареї [37]. Разом із ліпазами і/або протеазами, амілази можуть бути використані для лікування травних розладів, при панкреатитах, циститних фіброзах, діабеті типу I і/або типу II.

Так, у Латвії в 90-х роках минулого століття випускали препарат сомілаза, який містить ліполітичний і амілолітичний ферменти і використовувався для поліпшення травлення [38].

Ефективну лікувальну й лікувально-профілактичну дію справляють засоби, до складу яких входить амілаза і якими послуговуються у стоматології [39].

Два амілолітичні препарати: амілосубтилін Г3х-1 та амілосубтилін Г10х-1 застосовують у косметиці. Ці препарати одержують у вигляді порошоків різного ступеня чистоти й активності під час глибинного культивування *B. subtilis*. Препарат типу Г3х-1 виробляють розпилювальним висушуванням упареного фільтрату культуральної рідини, а препарат Г10х-1 — осадженням упареного фільтрату культуральної рідини органічним розчинником (етиловий спирт). Препарати відрізняються за активністю: у амілосубтиліну Г3х-1 стандартна активність 600 Од/г за колориметричним методом, а в амілосубтиліну Г10х-1 — 3 000 Од/г. Оптимальні умови дії обох препаратів — рН 6 і температура 50–55 °С [40]. Зниженням у 1,5–2 рази в'язкості культуральної рідини під впливом глікозидази Г3х було поліпшено технологію виробництва ферментних препаратів  $\alpha$ -амілази *B. subtilis*. У процесі одержання амілосубтиліну Г3х ферментативне розрідження дозволило висушити культуральну рідину з підвищеним ступенем концентрування в 1,5–2,5 рази і збільшити продуктивність розпилювальної сушарки на 13%, а у виробництві амілосубтиліну Г10х — збільшити швидкість фільтрації культуральної рідини в декілька разів і скоротити втрати амілолітичної активності на 10%. Оброблення культуральної рідини глікозидазою не призводить до втрати амілолітичної активності, що дозволило інтенсифікувати технологічні процеси виділення  $\alpha$ -амілази [41].

Амілази набули широкого біотехнологічного застосування в таких галузях, як текс-

тильна, фармацевтична, харчова, у виробництві мийних засобів. Гідролітичні ферменти здатні до 100%-ї деградації, і тому ферментативні детергенти можуть забезпечити ефективне очищення в разі використання тільки теплої води.

Сучасна технологія виробництва глюкози, мальтози та інших вуглеводів, які використовують у харчовій біотехнології, базується на гідролізі крохмалевмісної сировини високоактивними ферментами  $\alpha$ -амілази і глюकोамілази.

Для промислового одержання препаратів бактеріальної  $\alpha$ -амілази, окрім *B. subtilis*, використовують також культури *B. amyloliquefaciens* і *B. licheniformis*.  $\alpha$ -Амілазу *B. amyloliquefaciens* застосовують для гідролізу крохмалю при температурі до 90 °С. Однак галузь промисловості, де є переробка крохмалю, зацікавлена в підвищенні температури гідролізу. Це стало можливим після одержання  $\alpha$ -амілази із *B. licheniformis*. Ця амілаза дозволяє проводити гідроліз крохмалю при температурі до 105–110 °С. *B. amyloliquefaciens* у процесі культивування утворює, окрім  $\alpha$ -амілази, нейтральну протеазу,  $\alpha$ -глюканазу, геміцелюлазу. Під час гідролізу крохмалю присутність протеази небажана, оскільки деградація білкових фракцій крохмалю призводить до потемніння сиропу. З огляду на це для одержання більшості комерційних препаратів  $\alpha$ -амілаз використовують штами, які не продукують протеазу. Винятком є  $\alpha$ -амілази *B. licheniformis*. Їхня висока термостабільність дозволяє позбутися небажаних домішок протеази термічною інактивацією без значних втрат  $\alpha$ -амілазної активності.

Бактеріальні  $\alpha$ -амілази випускають переважно у вигляді рідких препаратів, що містять як консервант 20% -й розчин хлориду натрію, але бувають і тверді препарати.

На ринок окрім бактеріальних надходять також  $\alpha$ -амілази грибного походження. Для їх одержання застосовують культури *A. oryzae* і *A. niger*. Так,  $\alpha$ -амілаза *A. oryzae* є основним компонентом ферментного препарату така-діастаза, що є одним з найперших ферментних препаратів цієї групи, який почали виробляти. Оптимальне для дії цієї амілази значення рН лежить в інтервалі 4,8–5,8, а термостабільність її нижча, ніж у  $\alpha$ -амілази *B. amyloliquefaciens*.

Властивості  $\alpha$ -амілази *A. niger* мало чим відрізняються від властивостей  $\alpha$ -амілази *A. oryzae*. Деякі штами *A. niger* продукують амілазу, яка зберігає стабільність у ще кислому середовищі (при рН < 2) і є більш

термостійкою. Однак препарати  $\alpha$ -амілази *A. niger* мають обмежене застосування через низьку амілазну активність і, отже, їхню високу вартість.

Препаратам  $\alpha$ -амілази *Aspergillus* притаманна більша оцукрювальна здатність порівняно з препаратами  $\alpha$ -амілази *Bacillus*: з їхньою допомогою можна досягти вищого виходу цукрів (50% -й вихід мальтози під час гідролізу крохмалю) [42].

У виробництві спирту як основний ферментовмісний матеріал раніше застосовували солод, який від початку виникнення спиртової промисловості використовували для оцукрювання крохмалю сировини і який з успіхом було замінено на культури мікроміцетів з активним амілолітичним комплексом ферментів [43]. Застосування у процесі виробництва спирту грибної амілази замість солоду дозволяє: а) зекономити десятки тисяч тонн високоякісного зерна; б) підвищити вихід спирту; в) різко скоротити в часі процес одержання ферментного препарату. Як відомо, для одержання активного зернового солоду потрібно 7–8 діб, для вирощування ж культури гриба й отримання з неї препарату ферменту — кілька десятків годин; г) зменшити кількість виробничих площ, а також усіх видів енергії.

У пивоварінні амілази використовують замість зернового солоду. Смакові якості пива при цьому практично не змінюються. Для застосування у пивоварінні найбільш придатними є ферменти грибного походження (*A. oryzae*), що дозволяє заощадити десятки тисяч тонн ячменю. Якщо у виробництві пива зменшити кількість солоду і збільшити кількість ферментного препарату до 4–5%, то можна взагалі обійтися без солоду і з несолодженої сировини одержати сушло, яке майже не відрізнятиметься від сусла, виготовленого із солоду. Якщо затір у процесі такого способу виробництва піддати гідротермічній обробці певного режиму, то він набуває смаку й аромату солоду.

Амілолітичні ферменти також використовують у крохмале-патоковій промисловості для виготовлення глюкозної і мальтозної патоки [43]. У цьому разі застосування амілаз різноманітне. Насамперед, за їхньою участю може бути отримана розчинна форма крохмалю. За допомогою бактеріальних і рослинних амілаз вдається одержати мальтозну і глюкозну патоки, зокрема з кукурудзяного і маїсового борошна, а також чисту глюкозу. Різні види паток використовують головним чином у кондитерському виробництві, де вони перешкоджають кристалізації

сахарози і лактози, поліпшують консистенцію виробів і збільшують терміни їх зберігання, а також у виробництві морозива, консервованих фруктів і варення, безалкогольних напоїв, столових сиропів тощо.

У крохмале-патоковій промисловості ферментативний гідроліз має переваги перед кислотним завдяки ряду переваг, таких як специфічність реакції, стабільність продуктів, нижчі енергетичні потреби [44].

У хлібопекарській промисловості амілолітичні ферментні препарати застосовують як біологічні поліпшувачі якості хліба: значно покращуються смак, аромат, забарвлення кірки, збільшується питомий об'єм, пористість, вміст цукру. Крім того, вони інтенсифікують біохімічні й мікробіологічні процеси, прискорюючи процес тістоведення.  $\alpha$ -Амілазу *A. oryzae* додають у разі недостатнього вмісту амілаз у борошні. Амілаза гідролізує крохмаль тіста, а утворювана при цьому мальтоза слугує субстратом для пекарських дріжджів у процесі заквашування. Низька термостійкість  $\alpha$ -амілази *A. oryzae* має позитивне значення, дозволяє уникнути деградації м'якуша у процесі випікання.

У виробництві різних виробів із круп'яних продуктів амілази застосовують для попереднього оброблення сировини, з якої виробляють харчовий продукт у вигляді пластівців чи зерен або круп'яних концентратів. Готові продукти після гідролізу набувають поліпшених смакових якостей, збагачуються розчинними цукрами, компоненти їх краще перетравлюються і засвоюються.

У виробництві овочепродуктів, зокрема пюре, супів, різних форм сушених овочів, крохмаль так само модифікують. Процес має ряд технологічних переваг: для супів і пюре — необхідне розрідження за збереження сухої речовини у продуктах; для сушених овочів — деяке прискорення процесу висушування. В усіх випадках повніше використовується сировина.

Відходи кондитерської промисловості часто містять значні кількості крохмалю, особливо це стосується відходів виробництва цукерок. За допомогою бактеріальних і грибних амілаз можна виділити з них цукри і використовувати їх.

*Дитяча їжа.* На сьогодні в деяких країнах налагоджено випуск нових харчових продуктів, які попередньо оброблені ферментами. Так, під час виготовлення дитячої їжі крохмаль чи білки частково гідролізують амілолітичними чи протеолітичними ферментами. Це значно полегшує перетравлення і засвоєння зазначених цінних речо-



вин в організмі дитини і, крім того, поліпшує смакову якість їжі, що в даному разі також є дуже важливим.

*Вироби із фруктів.* У виробництві різної продукції з фруктів — соків, екстрактів, деяких сортів варення, фруктових пюре — застосовують грибні амілази для повного розщеплення в них крохмалю. Залишки крохмалю можуть призводити до поступового загусання продуктів, деякого помутніння соків, екстрактів, погіршення їхнього товарного вигляду.

Амілази можна широко використовувати і в легкій промисловості [45]. Так, у *текстильному виробництві* їх застосовують для розбліхтування рослинного волокна перед відблюванням і фарбуванням. Вихідний продукт — суворя тканина — містить 5% крохмалю і чимало інших домішок, які треба видалити, зробивши тим самим тканину м'якою, здатною змочуватися, краще відблюватися і зафарбовуватися. Найпридатнішими для цієї мети виявилися бактеріальні амілази. Для фарбування текстильних виробів, навпаки, необхідним є крохмаль. Його вводять у друкувальну фарбу у вигляді загущувача, для того щоб надати фарбі клейкості, пластичності й чіткості. Крохмаль, що його використовують у цьому разі, має бути розчинним. Для цього його деякою мірою гідролізують за допомогою амілолітичних ферментів (краще бактеріального походження, утім можна й рослинного).

У *паперовій промисловості* за допомогою амілаз одержують спеціальний крохмаль, який додають під час проклеювання паперу. Ця операція додає паперу пружності, щільності, глянцею, збільшує його міцність.

Амілази використовують і в *промисловості очищення*. За їх участю готують розчинний крохмаль, який застосовують для підкромалювання білизни. І навпаки, очищуючи білизну й одяг, можна легко розщепити крохмальний шар і швидко видалити його разом із плямами. Під час ремонтних робіт за допомогою амілаз знімають зі стін шпалери, що були приклеєні крохмальним клейстером.

Амілази, разом із протеазами й ліпазами, широко використовують у виробництві *мийних засобів*. Амілази полегшують видалення плям, які містять крохмальні речовини, наприклад, від макаронних виробів, картоплі, шоколаду, дитячої їжі. Крохмаль, що висихає, важко видаляється при середніх і низьких температурах прання, особливо в разі застосування мийних засобів середньої лужності. Крохмаль прилипає до поверхні тканини, відіграючи роль клею

для інших компонентів забруднень. Амілаза гідролізує крохмаль у декстрини і цукри, які легко розчиняються у мийному розчині.

Таким чином, у поданому огляді систематизовано наявні на цей час дані щодо фізико-хімічних і каталітичних властивостей бактеріальних та грибних  $\alpha$ -амілаз, наведено результати молекулярних досліджень структури білка та безпосередньо активного центру ферменту, що, у свою чергу, дозволяє досить повно визначити положення  $\alpha$ -амілаз у сучасній класифікації глікозидгідролаз.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Kesavan Madhavan Nampoothiri et al.  $\alpha$ -Amylases from microbial sources an overview on recent developments // Food Technol. Biotechnol. — 2006. — V. 44, N 2. — P. 173–184.
2. Maarel M. J. E. C. van de, Veen B. van der, Uitdehaag J. C. M et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family // J. Biotechnol. — 2002. — V. 94. — P. 137–155.
3. Takata H., Kuriki T., Okada S. et al. Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at  $\alpha$ -(1,4)- and  $\alpha$ -(1,6)-glucosidic linkages // J. Biol. Chem. — 1992. — V. 267. — P. 18447–18452.
4. MacGregor E. A. An overview of clan GH – H and distantly-related families // Biologia (Bratislava). — 2005. — V. 60. — P. 5–12.
5. Kuriki T., Imanaka T. The concept of the  $\alpha$ -amylase family: structural stability and common catalytic mechanism // J. Biosci. Bioeng. — 1999. — V. 87. — P. 557–565.
6. Janesek S. How many conserved regions are there in the  $\alpha$ -amylase family // Biologia (Bratislava). — 2002. — V. 11. — P. 29–41.
7. Matsuura Y. A possible mechanism of catalysis involving three essential residues in the enzymes of  $\alpha$ -amylase family // Ibid. — 2002. — V. 11. — P. 21–27.
8. Reddy N. S., Nimmagadda A., Rao S. An overview of the microbial  $\alpha$ -amylase family // African J. Biotechnology. — 2003. — V. 2, N 12. — P. 645–648.
9. Dickmanns A., Ballschmitter M., Liebl W., Ficher R. Structure of the novel  $\alpha$ -amylase AmyC from *Thermotoga maritima* // Acta Cryst. — 2006. — V. 62. — P. 262–270.
10. Галич И. П. Хроматографическое исследование высокоочищенных препаратов микробных  $\alpha$ -амилаз и некоторых других глобулярных белков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 093. — К., 1978. — 27 с.
11. Квеситадзе Г. И., Коконашвили Г. Н., Фениксова Р. В.  $\alpha$ -Амилаза *Aspergillus oryzae* // Ферменты. — Тбилиси.: Мецниереба, 1975. — 115 с.

12. Потехина Т.С. Сорбционная иммобилизация микробных амилаз на карбоксильных и углеводных сорбентах: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04. — Л., 1988. — 22 с.
13. Фролова Г.М., Сильченко А.С., Пивкин М.В. Амилолитические ферменты морского гриба *Aspergillus flavipes* // Биоактивные вещества из морских макроорганизмов и микроорганизмов и наземных растений Дальнего Востока: Материалы науч. конференции. — Владивосток, 2001. — С. 205–207.
14. Шкуматов В.М., Рудой А.Л., Овсянко С.Л. и др. Химические проблемы создания новых материалов и технологий. — М., 1988. — С. 549–558.
15. Кичакова Н. А. Выделение и изучение свойств термостабильной альфа-амилазы *Bacillus* sp. 86: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. — К., 1991. — 16 с.
16. Damodara R., Purnima A., Ramesh D., Ayyanna C. Purification of  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* by chromatofocusing and gel filtration chromatography // World J. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — V. 18, N 6. — P. 547–550.
17. Перевозченко И. И. Сравнительное исследование  $\alpha$ -амилаз некоторых плесневых грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 093. — К., 1981. — 24 с.
18. Фролова Г.М., Сильченко А.С., Пивкин М.В., Михайлов В. В. Амилазы гриба *Aspergillus flavipes*, ассоциированного с *Fucus evanes-cens* // Приклад. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 2. — С. 155–160.
19. Mitidieri S., Martinelli A. H. S., Schrank A., Vainstein M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations // Bioresource Technology. — 2006. — V. 97, N10. — P. 1117–1224.
20. Zeng G.-M., Shi J.-G., Yuan X.-Z., Liu J. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost // Enzyme Microb. Technol. — 2006. — V. 39, N 7. — P. 1451–1456.
21. Павлова И.Н., Кичакова Н.А., Захарова И.Я. Термостабильные амилазы штамма *Bacillus* sp. // Методы получения, анализа и применения ферментов. — Рига, 1990. — С. 34.
22. Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5 // Bioresource Technology. — 2007. — V. 98, N 2. — P. 260–265.
23. Цурикова Н. В., Нефедова Л. И., Костилова Е. В. и др. Получение активного штамма *Bacillus licheniformis* — продуцента термостабильной  $\alpha$ -амилазы // Приклад. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 5. — С. 502–508.
24. Uyar F., Baysal Z., Dogru M. Purification and some characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from a thermotolerant *Bacillus subtilis* // Ann. Microbiol. — 2003. — V. 53, N 3. — P. 315–322.
25. Asgher M., Asad M. J., Rahman S. U., Legge R. L. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing // J. of Food Engineering. — 2007. — V. 79, N 3. — P. 950–955.
26. Castro G., Baigori M., Sinerir F. Studies on  $\alpha$ -amylase production by *Bac. licheniformis* MIR-61 // Acta Biotechnol. — 1999. — V. 19, N 3. — P. 263–272.
27. Decklerck N., Machius M., Joyet Ph. et al. Engineering the thermostability of *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase // Biologia (Bratislava). — 2002. — V. 11. — P. 203–211.
28. Saboury A.A. Stability, activity and binding properties study of  $\alpha$ -amylase upon interaction with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  // Ibid. — 2002. — V. 11. — P. 221–228.
29. Kumar J. P., Richa J., Jain P. C. Production of industrially important enzymes by some actinomycetes producing antifungal components // Hindustan Antibiot. Bull. — 2003–2004. — V. 45–46. — С. 29–33.
30. Sabathe F., Croux C., Comillot E., Soucaille P. AmyP, a receptor gene for study strain degeneration in *Clostridium acetobutyricum* ATCC 824 // FEMS Microbiol. Letters. — 2002. — V. 210, N 2. — P. 93–98.
31. Poli A., Esposito E., Lama L., Orlando P. *Anoxybacillus amylo-liticus* sp. novo., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from mount Rittmann (Antarctica) // System. App. Microbiol. — 2006. — V. 29, N 4. — P. 300–307.
32. Ezeji T. C., Bahl H. Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase from *Geobacillus thermodinitrificans* HRO10 // J. Biotechnol. — 2006. — V. 125, N 1. — P. 27–38.
33. Coronado M., Vargas C., Hofemeister J., Nieto J. Production and biochemical characterization of an  $\alpha$ -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana* // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — V. 183, N1. — P. 67–71.
34. Leveque E., Janecek S., Hays B., Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes // Enzyme Microb. Technol. — 2000. — V. 26, N1. — P. 3–14.
35. Odibo F., Ulbrich-Hofmann R. Thermostable  $\alpha$ -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F<sub>1</sub> // Acta biotechnol. — 2001. — V. 21, N 2. — P. 141–153.
36. Пронин С. И. Амилолитические ферменты и их роль в пищевой промышленности. — М.: Гизлегпищепром, 1953. — С. 5–12.
37. Gupta R., Gigras P., Mohapatra H. et al. Microbial  $\alpha$ -amylases. A biotechnological perspective // Process Biochem. — 2003. — V. 38. — P. 1599–1616.
38. Ортенберг Э.Ш., Парр Г.С., Столыпин О.С. и др.  $\alpha$ -Амилаза медицинского назначения // Методы получения, анализа и применения ферментов. — Рига, 1990. — С. 171–177.
39. Лупова Л. М. Косметика — новая область использования ферментных препаратов. — М., 1977. — 36 с.

40. Авиженис В. Ю. Создание технологии производства новых ферментных препаратов для сельского хозяйства и пищевой промышленности: Автореф. дис. ... докт. техн. наук: 05.18.10. — М., 1992. — 70 с.
41. Устинников Б. А., Цурикова Н. В., Иванов В. В., Воронцова Н. Н. Промышленное культивирование *Bacillus subtilis-82* — продуцента  $\alpha$ -амилазы и *Asp. awamori* ВУДТ-2 — продуцента глюкоамилазы для применения в пищевой биотехнологии // Биосинтез ферментов микроорганизмами. — Ташкент: Фан, 1988. — С. 154.
42. Люджус Л. Л., Чекменева Т. М., Куниский Д. Г. Состояние производства и применение ферментов за рубежом. — М., 1986. — С. 6–8.
43. Рухлядева А. П., Польшгаллина Г. В. Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Легпищпром, 1981. — С. 34–43.
44. Satyanarayana N., Rao J., Ezhilvannan M.  $\alpha$ -Amylases // Enzyme Technology / Eds. A. Pandey, C. Webb, C. Soccol, C. Larroche. — New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2005. — P. 189–220.
45. Riegal E. R., Bissinger H. G. Industrial fermentation: Principles, Processes and Products // Riegal's Handbook of Industrial Chemistry. — New York: Kluwer Academic Publishers, 2002. — P. 963–1045.

### МИКРОБНЫЕ $\alpha$ -АМИЛАЗЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ, СВОЙСТВА, ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

*Л. Д. Варбанец, Е. В. Авдюк, Н. В. Борзова*

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

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

$\alpha$ -Амилазы представляют одно из наибольших семейств гликозидгидролаз, трансфераз и изомераз, входящих в клан GH-H. Ферменты этого семейства наряду  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-связями способны гидролизовать  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,5-гликозидные связи, содержат 4 незаменимых остатка аминокислот (Asp204, Asp206, Glu230, Asp297) и характеризуются  $(\beta/\alpha)_8$  или TIM-barrel каталитическим доменом. Обсуждаются вопросы, касающиеся методов выделения и очистки  $\alpha$ -амилаз, которые включают осаждение органическими растворителями и нейтральными солями, диализ, ультрафильтрацию, гель-фильтрацию, хроматографию, электрофорез. Приведены современные данные относительно возможности продуцирования  $\alpha$ -амилаз микроорганизмами разных таксономических групп, в частности бактерий, микромицетов. Детально обсуждаются физико-химические свойства  $\alpha$ -амилаз, их pH- и термооптимумы, pH- и термостабильность, молекулярные массы, влияние ионов металлов и различных химических реагентов. Рассматривается возможность использования  $\alpha$ -амилаз в разных отраслях промышленности (спиртовой, крахмально-паточковой, хлебопекарской, кондитерской, текстильной, бумажной и др.), а также в медицине.

**Ключевые слова:** микробные  $\alpha$ -амилазы, физико-химические свойства, практическое использование.

### MICROBIAL $\alpha$ -AMYLASES: ISOLATION, PURIFICATION AND PRACTICAL USAGE

*L. D. Varbanets, K. V. Avdiyuk, N. V. Borzova*

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

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

The  $\alpha$ -amylase family is the largest family of glycoside hydrolases, transferases and isomerases, comprising in clan GH-H. The enzymes of this family, except of  $\alpha$ -1,4-,  $\alpha$ -1,6-bonds, are able to hydrolyse  $\alpha$ -1,1-,  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3-,  $\alpha$ -1,5-glycosidic bonds, contain 4 conserved aminoacid residues (Asp204, Asp206, Glu230 и Asp297) and have  $(\beta/\alpha)_8$  or TIM barrel catalytic domain. The questions concerning methods of isolation and purification of  $\alpha$ -amylases, which include the precipitation of organic solvents and neutral salts, dialysis, ultrafiltration, gel-filtration, chromatography, electrophoresis are discussed. The current data on possibility of  $\alpha$ -amylases from different taxonomic groups of microorganisms, in particular, bacteria and micromycetes are given. Physico-chemical properties of  $\alpha$ -amylases, its pH- and thermo-optimum, pH- and thermostability, molecular masses, influence of metal ions and different chemical reagents are discussed in detail. It's shown the possibility of  $\alpha$ -amylases usage in different branches of industry — food, detergent, paper, textile, pharmaceutical.

**Key words:** microbial  $\alpha$ -amylases, physico-chemical properties, practical usage.

УДК: 577.112.087:577.150.87:577.352.52 57:66:5773

## ІММОБІЛІЗАЦІЯ АНТИГЕНУ РЕТРОВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ НА ПОВЕРХНІ ІМУННОГО БІОСЕНСОРА

*Л. В. Пирогова  
М. Ф. Стародуб*

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ  
E-mail: lyudmilasy@ukr.net

Проаналізовано ефективність іммобілізації антигену вірусу лейкозу великої рогатої худоби на поверхні перетворювача, вкритій різними хімічними агентами (додекантіолом, поліелектролітами і похідними декстрану) для створення функціонально стабільних уніфікованих чутливих елементів оптичного імунобіосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу. Показано, що використання поліелектролітів поліаліламіну гідрохлориду і полістиренсульфонату для модифікації поверхні перетворювача біосенсора є найбільш доцільним, дешевим і простим під час проведення скринінгових досліджень. Змінні пластинки, що їх використовують як перетворювач, можуть бути підготовлені завчасно і використані в разі потреби.

**Ключові слова:** велика рогата худоба, вірусний лейкоз, діагностика, імунобіосенсорний аналіз, поверхневий плазмонний резонанс, додекантіол, поліелектроліти, декстран.

Експресний контроль за розповсюдженням ретровірусної інфекції серед людей та тварин — важлива світова проблема. Як відомо, ретровіруси є збудниками набутого імунодефіциту в людей, що кваліфіковано як захворювання на СНІД; вони, зокрема, є також збудниками вірусного лейкозу великої рогатої худоби (ВРХ), вірусних хвороб риб, наприклад карциноми в щуки, тощо. Основним заходом для подолання захворювань, зумовлених ретровірусною інфекцією, є своєчасна діагностика їх. Хворих тварин вилучають з гурту та знищують. Загальноприйнятим засобом виявлення лейкозу ВРХ є традиційний імуноферментний аналіз, відомий як ELISA-метод. Для цього використовують, як правило, проби крові із шийної вени. Однак цей метод є довготривалим (аналіз триває близько 6 год), високоартістичним (вартість одного аналізу — близько 5 доларів США), досить складним, вимагає високої професійної підготовки виконавців та спеціального обладнання і реагентів (різних кон'югат, хімічних компонентів). В Україні застосовують дешевший, але менш чутливий і ще більш рутинний метод — реакцію імунодифузії (РІД). Ефективне оздоровлен-

ня стада потребує проводити його обстеження принаймні через кожні 10 днів у разі виявлення в ньому хворих тварин. Існуючими методами це неможливо здійснити через досить значну вартість аналізу і необхідність частого взяття проб крові. Ці проблеми успішно вирішуються із застосуванням запропонованого нами імунобіосенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) [1, 2]. Такий біосенсор може забезпечити прямий (без використання додаткових реагентів), експресний (здійснюваний протягом 3–5 хвилин), дешевий (вартістю менше 1 долара США) аналіз і навіть без взяття крові, а використовуючи лише краплину молока.

У попередніх дослідженнях була показана ефективність імунобіосенсора на основі ППР для реєстрації специфічної взаємодії антиген–антитіло, а також доведена можливість його використання для експресного визначення рівня антитіл, індукованих вірусом лейкозу (ВЛ) великої рогатої худоби, у крові тварин [3]. Для цього на поверхню перетворювача іммобілізували антиген ВЛ, отриманий від науково-виробничого ТОВ «Лейкопол» (м. Полтава). Іммобіліза-

ція антигену на поверхні забезпечувала селективне зв'язування специфічних антитіл із сироватки крові тварин. Виявилось, що результати аналізу істотно залежать від того, яким чином підготовлено шар золота на скляній поверхні, у який спосіб цю поверхню попередньо обробляли та який стан іммобілізованого біологічного матеріалу на поверхні трансдюсера. Нанесення на поверхню золота різних покриттів дозволяє збільшити чутливість біосенсора. Зокрема, модифікація сенсорної поверхні додекантіолом збільшує її в 1,3 рази [4]. Окрім того, у разі іммобілізації біологічних молекул звичайною фізичною адсорбцією на чистій поверхні золота або ж попередньо обробленій додекантіолом чи поліелектролітами [4, 5] досить значна частина їх може бути блокована внаслідок контакту активних центрів (наприклад, антигензв'язувальних сайтів) з поверхнею. Аби уникнути цього недоліку, використовують різні підходи, серед яких найпоширенішими є орієнтоване включення біологічних молекул у плівки Ленгмюр-Блоджет різного складу [6] або попередня іммобілізація на поверхні білка А із *Staphylococcus aureus* [5] та лектинів [7, 8], що мають спорідненість до F<sub>c</sub>-фрагмента IgG або ж до його карбогідратного компонента [9].

У наших дослідженнях особливу увагу приділяли саме оптимізації умов іммобілізації селективного біологічного матеріалу. В цій статті наведено експериментальні дані щодо порівняльного використання поліелектролітів, тіолів та похідних декстрану для іммобілізації антигену ВЛ з метою забезпечення ефективності процесу та функціональної стабільності підготовленої поверхні трансдюсера.

### Матеріали і методи

Вимірювальний пристрій і принцип його роботи детально розглянуто раніше [1, 2]. Перетворювач імунного біосенсора у вигляді попередньо хромованої (3–5 нм шару Cr) скляної пластинки з напиленням шаром золота товщиною 45 нм поєднується з призмою оптичного приладу за допомогою імерсійної рідини (поліфенілового ефіру) з коефіцієнтом заломлення 1,6.

Антиген вірусу лейкозу отримано від науково-виробничого ТОВ «Лейкопол» (м. Полтава). В експерименті використовували розчин такого антигену в концентрації 1 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 8,2, що містив 140 мМ хлористого натрію.

Сироватки крові корів було взято в різних господарствах Полтавської області. Усі

сироватки попередньо перевіряли у РІД. Для досліджень імунним біосенсором на основі ППР готували різні розведення сироваток у 1 мМ-трис-НСІ-буфері, рН 7,4, що містив 140 мМ хлористого натрію (ЗФР).

1% -й розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА), отриманого від фірми Sigma (США), готували, використовуючи ЗФР.

Для модифікації поверхні перетворювача застосовували додекантіол та поліелектроліти. Хімічну сорбцію додекантіолу HS(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub> здійснювали, занурюючи виготовлену пластинку з нанесеним шаром золота в 1 мМ розчин етанолу при кімнатній температурі на 15 год, після чого промивали чистим етанолом і висушували у потоці повітря.

Поліелектролітна нерозчинна плівка на поверхні золота формувалась за допомогою поліаліламіну гідрохлориду (ПАА). Поліелектроліт використовували в концентрації 1 мг/мл, час експозиції 30 хв, при кімнатній температурі. Поверхню промивали дистильованою водою.

У разі застосування декстрану сульфату (5 kDa) його розчин в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 4,0, концентрація 2 мг/мл, наносили на поверхню і витримували там 25 хв, а потім поверхню промивали буфером.

Тестування сироваток на наявність у них антитіл, специфічних до білків ретровірусу, проводили, як описано раніше [3].

### Результати та обговорення

Важливою вимогою до роботи біосенсора є стабільність і відтворюваність результатів досліджень. Тому одним з основних завдань, які мають бути вирішені на шляху впровадження у практику розробленого нами раніше [10] біосенсорного методу діагностики ретровірусного лейкозу ВРХ, є забезпечення ефективної стандартизованої іммобілізації біологічного матеріалу та оптимізація функціональних параметрів ППР-біосенсора.

У попередніх експериментах на моделі взаємодії антиген-антитіло досліджено й проаналізовано ефективність іммобілізації біологічного матеріалу на поверхні перетворювача ППР, укрітій різними біологічними та хімічними агентами (лектинами, додекантіолом, поліелектролітами та похідними декстрину), що було застосовано для створення функціонально стабільних уніфікованих чутливих елементів біосенсора [7]. Оскільки чутливість ППР біосенсора досить висока й достатня для проведення скринінгових експресних досліджень на лейкоз [3], то для інтеграції антигену на поверхні біосенсора

послугувались лише такими способами, які в інших випадках [10] були найпростішими і виявляли високу ефективність.

### Модифікація поверхні перетворювача тіолами та поліелектролітами

У спеціальній серії досліджень доведено, що адсорбція антигену на поверхні перетворювача, вкритій шаром додекантіолу або поліелектроліту ПАА, є стабільною в часі й не руйнується під час промивання вимірювальної комірки ЗФР. Імобілізація антигену супроводжується зміною резонансного кута в межах 1 200–1 500 кут. с. Разом з тим показано, що в разі використання поліелектроліту кількість сорбованого на поверхні антигену була дещо більшою, а відгук біосенсора за імобілізації антигену був більш стабільним і відтворюваним порівняно з необробленою поверхнею, хоча достовірного підвищення концентрації антигену ВЛ на поверхні не відзначалось (рис. 1). Застосування додекантіолу також сприяє стабілізації моношару антигену ВЛ. Імобілізований у такий спосіб антиген зберігав майже стовідсоткову активність упродовж 3 місяців, тоді як антиген, нанесений на некриту поверхню, втрачав активність вже через 2–3 тижні.

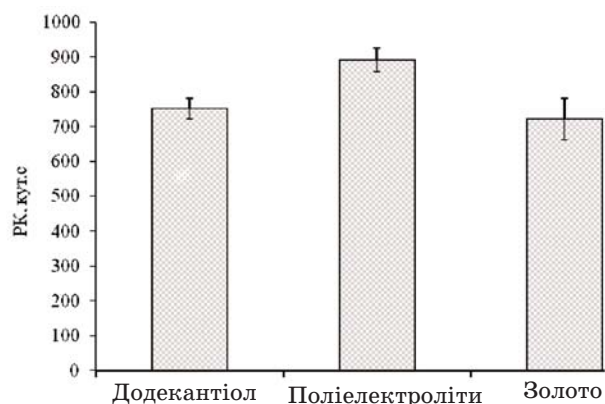


Рис. 1. Відгук ППР біосенсора на внесення антигену ВЛ з використанням різних типів поверхні

Оброблення поверхні 1%-м розчином БСА після сорбції антигену не вносить суттєвих змін у величину резонансного кута, що реєструється. Це, на нашу думку, означає, що на поверхні практично не залишається вільних місць зв'язування, а концентрація антигену є достатньою для створення максимально щільного шару. Зі введенням у вимірювальну комірку специфічної антисироватки корів, клінічно хворих на лейкоз, величина відгуку біосенсора корелює зі сту-

пенем її розведення. Таким чином, імобілізація антигену забезпечує селективне зв'язування специфічних антитіл із сироватки крові тварин. Утворення на поверхні біосенсора імунних комплексів спричинює зсув резонансного кута, пропорційний кількості антитіл у пробі.

Показано, що нанесення антигену на поверхню позитивно зарядженої поліелектролітної плівки підвищує відгук біосенсора на 15–20% порівняно з тим випадком, коли використовували необроблену поверхню біосенсорного перетворювача (рис. 2).

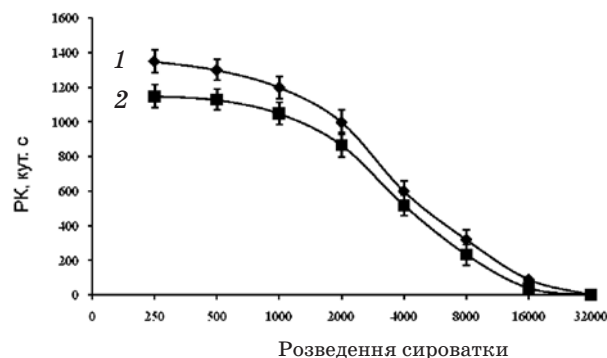


Рис. 2. Величина відхилення резонансного кута імунного сенсора на основі ППР під час дослідження сироваток корів:

- 1 — модифікована ПАА поверхня;
- 2 — некрита золота поверхня

Встановлено також, що модифікація трансдюсерної поверхні тіолами майже не впливає на чутливість аналізу, тобто відгук біосенсора під час визначення інтенсивності його специфічної імунної взаємодії з антитілами, що містились у сироватці крові, є приблизно таким, як і без попереднього застосування тіолів. Це зумовлено лише тим, що імобілізується більше антигену на поверхні, однак орієнтація антигенних детермінант на поверхні не є такою, що сприяє їх максимальній експозиції, як у разі, коли попередньо наносили поліелектролітний шар. Разом з тим, така модифікація стабілізує адсорбцію антигену, підвищуючи також відтворюваність результатів аналізів. Розбіжність результатів під час вимірювання однієї проби значно менша порівняно з випадком, коли антиген імобілізували безпосередньо на поверхні золота.

Таким чином, показано, що застосування додекантіолу та поліелектроліту ПАА для покриття шару золота на поверхні перетворювача дозволяє, передусім, підвищити відтворюваність роботи чутливих елементів оптичного імунного біосенсора на базі ППР. Проте кількість біологічних молекул,

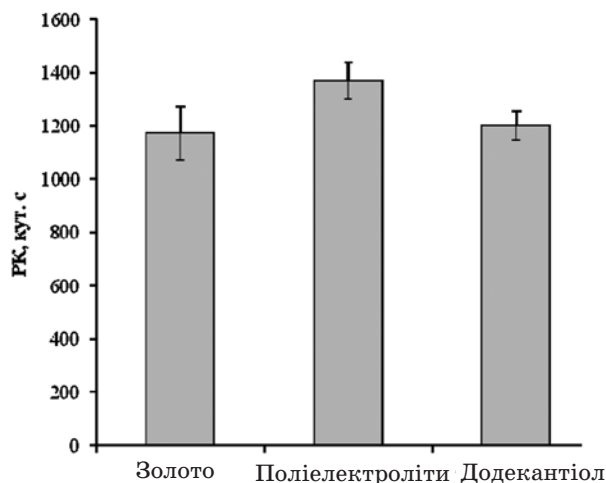


Рис. 3. Відгук ППР біосенсора на внесення антисироватки (1:500) з використанням різних типів поверхні

фіксованих на поверхні фізичною сорбцією або за допомогою проміжних шарів зазначених вище сполук, обмежена площиною поверхні перетворювача. Цьому обмеженню можна запобігти за допомогою сполук, які здатні формувати на поверхні розгалужені структури і в такий спосіб забезпечувати розташування біологічного матеріалу у тривимірному просторі. Таким чином кількість іммобілізованого матеріалу можна збільшити, підвищивши тим самим чутливість біосенсора.

У даній роботі запропоновано ще одну схему застосування поліелектролітів, коли полікатиони та поліаніони використовувались для формування подвійного розгалуженого шару біомолекул.

Така схема іммобілізації біологічного матеріалу була спочатку відпрацьована на традиційній для наших досліджень моделі антиген-антитіло: IgG людини та поліклональні антитіла кролика до імуноглобулінів людини.

Антитіла кролика у концентрації 200 мкг/мл в ЗФР, рН 8,0, адсорбували спонтанною фізичною сорбцією на поверхні перетворювача, інкубували 30 хв при кімнатній температурі, після чого комірку промивали ЗФР. Потім у комірку вносили розчин поліелектролітів у послідовності ПАА — ПСС — ПАА. Концентрація кожного поліелектроліту становила 1 мг/мл, час інкубації — 20 хв. Далі у комірку знову вносили антитіла кроля до імуноглобулінів людини в такий самій концентрації, витримували 20 хв і промивали ЗФР. Потім у комірку додавали 0,5% глутарового альдегіду. Після інкубації протягом 10 хв поліелектроліти вимивали 0,01 М

трис-НСІ-буфером, змінюючи рН від 4,0 до 8,0 і руйнуючи електростатичні зв'язки між IgG та поліелектролітами. Таким чином, на поверхні перетворювача формується не моношар, а подвійний шар антитіл за рахунок ковалентних зв'язків між молекулами IgG, утворених за допомогою глутарового альдегіду (рис. 4). Насамкінець у комірку вносили розчин IgG людини в діапазоні концентрацій від 1 нг/мл до 100 мкг/мл у ЗФР та фіксували відгук імуносенсора. Зміщення резонансного кута було пропорційне концентрації IgG людини у розчині.

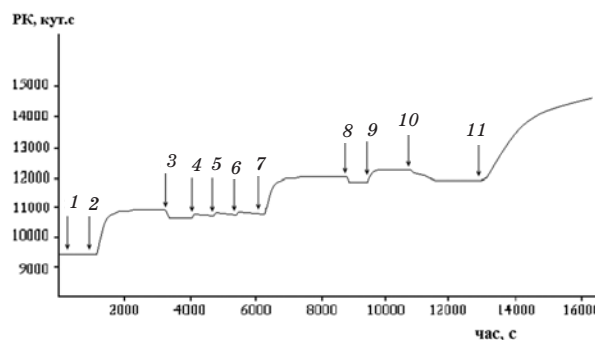
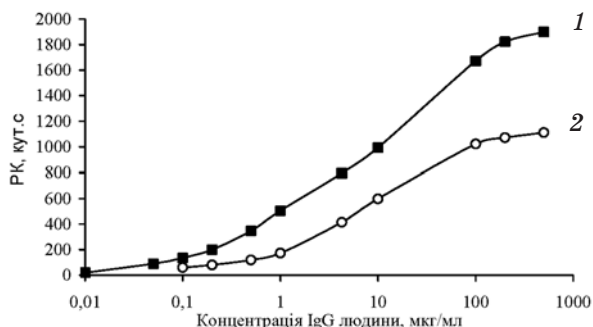


Рис. 4. Відгук ППР імуносенсора на внесення біологічних та хімічних компонентів:

- 1 — дистильована вода;
- 2 — поліклональні антитіла кролів до IgG людини;
- 3 — ЗФР;
- 4, 5, 6, — ПАА, ПСС, ПАА, відповідно;
- 7 — поліклональні антитіла кролів до IgG людини;
- 8 — ЗФР;
- 9 — глутаровий альдегід;
- 10 — 0,05 М трис-НСІ-буфер, рН 4 та рН 8;
- 11 — IgG людини, 100 мкг/мл

Показано, що підготовка чутливої поверхні у такий спосіб дозволяє значно підвищити чутливість аналізу, яка в даному разі становила 20 нг/мл, причому лінійний відрізок графіка залежності ППР сигналу від кількості IgG людини у розчині знаходиться в діапазоні концентрацій від 100 нг/мл до 100 мкг/мл. Чутливість імуносенсора з використанням моношару антитіл, сформованого на некритій поверхні золота, становила 100 нг/мл, лінійна ділянка графіка лежить у межах 1–10 мкг/мл (рис. 5). Встановлено, що формування на поверхні перетворювача багатошарової (тривимірної) розгалуженої структури з антитіл за допомогою поліелектролітів та глутарового альдегіду дозволяє значно підвищити чутливість ППР імуносенсора.

Аналогічну схему було використано і для іммобілізації антигену ВЛ. Розчин антигену ВЛ у концентрації 0,5 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 8,2, вносили у вимірювальну



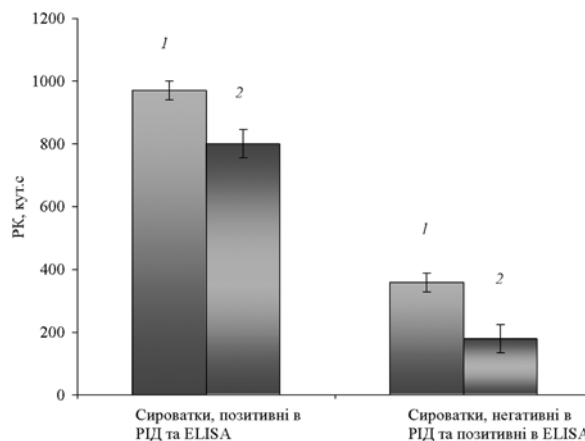
**Рис. 5.** Відгук ППР біосенсора на внесення розчину IgG людини у діапазоні концентрацій від 10 нг/мл до 500 мкг/мл за різних варіантів чутливої поверхні:

- 1 — подвійний шар антитіл, створений за допомогою поліелектролітів;
- 2 — моношар антитіл, сформований на некритій золотій поверхні

комірку та інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Потім комірку промивали зазначеним буфером і послідовно вносили поліелектроліти ПАА — ПСС — ПАА в концентрації 1 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері з відповідним рН. Комірку промивали буфером і вносили розчин антигену ВЛ. Інкубували 20 хв і промивали буфером. Далі додавали 0,5% -й розчин глутарового альдегіду, витримували 15 хв, після чого видаляли поліелектроліти 50 мМ трис-НСІ буфером, змінюючи рН від 4,0 до 8,0. Сформовану таким чином двошарову чутливу поверхню використовували для дослідження антисироваток.

В експерименті досліджено 3 групи сироваток крові ВРХ. Перша група — це сироватки, позитивні за даними РІД та методу ELISA. Титр таких сироваток у РІД становив від 1:64 до 1:256. Для проведення методу ELISA використовували тест-систему IDEX (США). Друга група — це сироватки, негативні за результатами РІД, але позитивні за даними методу ELISA. І нарешті, третя група — це сироватки, негативні за результатами РІД та ELISA. Кожну пробу сироватки у розведенні 1:200 в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 7,4, вносили у вимірювальну комірку і фіксували специфічний сигнал. Утворення на поверхні біосенсора імунних комплексів супроводжувалось зміною резонансного кута. На рис. 6 наведено середні значення одержаних даних тестування перших двох груп. У пробах третьої групи сироваток, негативних за результатами двох традиційних методів РІД та ELISA, за допомогою імуносенсорного аналізу специфічних антитіл до ВЛ також не виявлено.

Встановлено, що формування подвійного шару антигену ВЛ на поверхні перетворюва-



**Рис. 6.** Відгук ППР біосенсора на внесення розчину сироватки крові ВРХ у розведенні 1:500 за різних варіантів чутливої поверхні:

- 1 — подвійний шар антигену ВЛ, створений за допомогою поліелектролітів;
- 2 — моношар антигену ВЛ, сформований на некритій золотій поверхні

ча істотно підвищує чутливість сенсора до специфічних антитіл. Це має особливе значення під час дослідження тварин на ранніх етапах захворювання, коли титр специфічних антитіл невисокий. Оскільки поверхню готують заздалегідь, то на експресність аналізу це не впливає.

### Модифікація поверхні за допомогою декстранів

Антиген ВЛ іммобілізували на поверхню, вкриту сульфатом декстрану. Похідні декстрану мають розгалужену структуру і створюють на поверхні більшу кількість сайтів зв'язування порівняно з чистою (необробленою) поверхнею [5]. Розчин антигену ВЛ у концентрації 0,5 мг/мл в 1 мМ трис-НСІ-буфері, рН 6,0, вносили у вимірювальну комірку й інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі. Потім комірку промивали зазначеним буфером і після блокування вільних місць зв'язування вносили зразки сироватки та фіксували зміщення резонансного кута.

Іммобілізація антигену супроводжується зміною резонансного кута в межах 1 600 –1700 кут. с, що на 200–250 кут. с більше порівняно з некритою поверхнею. Відгук сенсора був більш стабільним і відтворюваним, ніж тоді, коли використовували необроблену поверхню золота, — розбіжність у значенні зсуву резонансного кута в разі іммобілізації одного й того самого зразка антигену була мінімальною, у межах 30–60 кут. с. Разом з тим, у разі вико-



ристання попередньо необробленої поверхні розбіжність результатів від пластинки до пластинки перетворювача становить 15–20%. Збільшення кількості адсорбованого антигену на поверхні сприяє підвищенню чутливості біосенсора до виявлення антитіл у розчині. Після внесення антисироватки спостерігали на 20% більший відгук біосенсора порівняно з необробленою поверхнею (рис. 7). Недоліком такого способу модифікації є висока вартість декстранів.

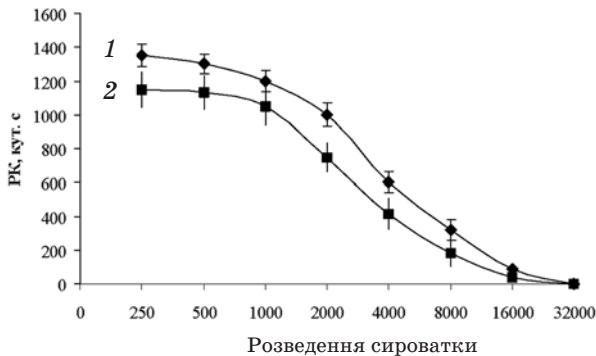


Рис. 7. Величина відхилення резонансного кута імуносенсора на основі ППР під час дослідження сироваток корів: 1 — модифікована декстраном поверхня; 2 — невкрита золота поверхня

Щоб зробити підсумок, ми порівняли результати наших досліджень, одержані за різних способів підготовки поверхні перетворювача біосенсора. Було відібрано 8 сироваток крові корів, для яких рівень екстинкції за даними методу ELISA становив 2,0–2,5 опт. од. Проби розводили ЗФР у співвідношенні 1:500 і вносили їх у вимірювальну комірку після іммобілізації антигену відповідним чином на підготовленій поверхні перетворювача. Далі реєстрували відгук біосенсора. На рис. 8 подано середні значення одержаних даних. Підтверджено, що найбільша чутливість притаманна біосенсору, на поверхні перетворювача якого сформовано подвійний шар антигену за допомогою поліелектролітів. В інших випадках, зокрема в разі застосування тіолових та декстранових покриттів, суттєвого підвищення чутливості не спостерігалось.

Таким чином, було проаналізовано ефективність іммобілізації селективного біологічного матеріалу на поверхні перетворювача ППР, попередньо вкритій різними хімічними агентами (додекантіолом, поліелектролітами та похідними декстрану), для створення функціонально стабільних уніфікованих

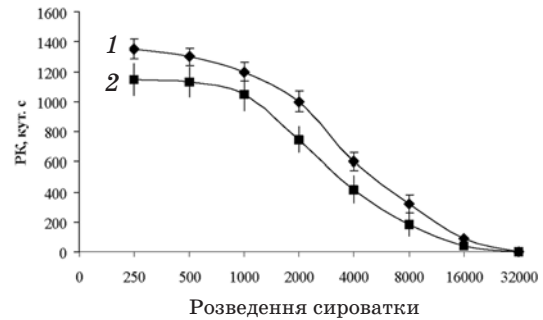


Рис. 8. Відгук ППР біосенсора на внесення розчину сироватки крові ВРХ у розведенні 1:500 за різних варіантів чутливої поверхні:

- 1 — невкрите золото;
- 2 — додекантіол;
- 3 — золото, вкрите шаром ПАА;
- 4 — подвійний шар антигену;
- 5 — декстран

чутливих елементів оптичного імуноного біосенсора на базі ППР та оптимізації функціональних параметрів ППР біосенсора.

Оскільки чутливість та специфічність ППР біосенсора є достатньо високою для проведення експресного аналізу проб з метою виявлення хворих на лейкоз тварин, то нема потреби застосовувати високовартісні сполуки та ускладнювати алгоритм проведення аналізу. Використання поліелектролітів для модифікації поверхні перетворювача імуноного біосенсора на базі ППР є найбільш доцільним, дешевим і простим.

Також слід додати, що загальна тривалість аналізу розробленим імуноним біосенсором становить лише понад 40 хв, включаючи час, витрачений на іммобілізацію антигену на поверхні трансдюсера, блокування вільних місць зв'язування та промивання вимірювальної комірки. Сама ж процедура тестування сироваток не перевищує 10 хв, і це робить аналіз експресним, особливо зважаючи на те, що поверхня трансдюсера обладнана змінними пластинками, які можуть бути попередньо підготовлені і використані в разі потреби. У наших дослідках вже одержано результати, які демонструють стабільність таких поверхонь протягом трьох і більше місяців. Спостереження тривають і далі, а отже є надія, що зазначений термін може бути значно довшим. Імунобіосенсорний аналіз можна проводити і в польових умовах, а приладова частина для його здійснення може мати портативний вигляд. Усе це створює умови для простого, швидкого та дешевого скринінгу лейкозу безпосередньо в господарствах або ж на карантинних станціях.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. *Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I.* Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing // *Sensors & Actuators B.* — 1983. — № 4. — P. 299–304.
2. *Kooyman R. P. H., Kolkman H., van Gent J. et al.* Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations // *Anal. Chim. Acta.* — V. 213. — 1988. — P. 35–45.
3. *Пирогова Л. В., Нагаєва Л. І., Стародуб М. Ф.* Експресна діагностика лейкозу великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, № 3. — С. 88–92.
4. *Starodub N. F., Starodub V. M.* Ultrathin Multilayer Polyelectrolyte Films on Gold // *Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry: NATO Proceedings / Ed. F. Bozoglu et al.* — Cluver Acad. Publ., 2001. — P. 63–94.
5. *Starodub N. F., Nabok A. V., Starodub V. M. et al.* Immobilization of biocomponents for immune optical sensor // *Ukr. Biochem. Zhurn.* — 2001. — V. 73, N4. — P. 55–64.
6. *Nakamura R., Muguruma H., Ikebukuro K. et al.* A plasma polymerized film for surface plasmon resonance immunosensing // *Anal. Chem.* — V. 69. — 1997. — P. 4649–4652.
7. *Пирогова Л. В., Стародуб М. Ф.* Імобілізація імуноглобулінів за допомогою лектинів при створенні імунних сенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, № 2. — С. 45–50.
8. *Иммунология: В 3 томах / Под. ред. У. Пола.* — 1987. — Т. 1. — С. 255–313.
9. *Стародуб М. Ф., Стародуб В. М.* Біосенсори: витоки, досягнення і перспективи // *Укр. біохім. журн.* — 2002. — Т. 74, №4–5. — С. 147–163.
10. *Starodub N. F., Pirogova L. V., Demchenko A., Nabok A. V.* Antibody immobilization on the metal and silicon surface. The use of self-assembled layers and specific receptors // *Bioelectrochemistry.* — 2005. — V. 66, N 1–2. — P. 111–115.

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ АНТИГЕНА  
РЕТРОВИРУСА ЛЕЙКОЗА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА  
НА ПОВЕРХНОСТИ ИМУННОГО  
БИОСЕНСОРА**

*Л. В. Пирогова, М. Ф. Стародуб*

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

*E-mail: lyudmilasy@ukr.net*

Проанализирована эффективность иммобилизации антигена вируса лейкоза крупного рогатого скота на поверхности преобразователя, покрытой различными химическими агентами (додекантиолом, полиэлектролитами и производными декстрана) для создания функционально стабильных унифицированных чувствительных элементов оптического иммунного биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса. Показано, что использование полиэлектролитов полиалиламина гидрохлорида и полистиренсульфоната для модификации поверхности преобразователя указанного биосенсора является наиболее целесообразным, дешевым и простым при проведении скрининговых исследований. Сменные пластинки, применяемые в качестве преобразователя, могут быть подготовлены заблаговременно и использованы по мере надобности.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, вирусный лейкоз, диагностика, иммунобиосенсорный анализ, поверхностный плазмонный резонанс, додекантиол, полиэлектролиты, декстран.

**IMMOBILIZATION OF BOVINE LEUCOSIS  
ANTIGEN ON THE TRANSDUCER SURFACE  
OF BIOSENSOR**

*L. V. Pyrogova, M. F. Starodub*

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

*E-mail: lyudmilasy@ukr.net*

Efficiency of immobilization of bovine leukaemia virus (BLV) antigen on the transducer surface of SPR biosensor by using of various agents (polyelectrolyte selfassembly, dodecantiol, dextran sulphate) was investigated. This technique was compared with direct immobilisation of the immune components on the bare gold. It was shown that modification of sensor surface with polyelectrolytes is most expedient and chip for screening of bovine leukosis.

**Key words:** bovine leucosis, bovine leukaemia virus, diagnostics, immune sensor analysis, surface plasmon resonance, dodecantiol, polyelectrolytes, dextran.

УДК: 616.71-007.234: 577.161.2

## ЕФЕКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНИХ ПРЕПАРАТІВ ВІТАМІНУ D<sub>3</sub> ПРИ ОСТЕОПОРОЗІ

**Л. І. Апуховська<sup>1</sup>****В. М. Василевська<sup>1</sup>** <sup>1</sup> Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ**А. І. Безусяк<sup>1</sup>****С. О. Романова<sup>1</sup>****А. В. Калашніков<sup>2</sup>** <sup>2</sup> Інститут травматології та ортопедії АМН України, Київ**О. В. Калашніков<sup>2</sup>***E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru*

В експерименті на щурах лінії Wistar вивчали ефект різних комплексних препаратів вітаміну D<sub>3</sub> при дисфункціональному остеопорозі. Встановлено, що препарат з низьким вмістом кальцію є найбільш ефективним у нормалізації мінерального й ліпідного обміну, структури і функції кісткової тканини та епіфізарного хряща. Відсутність побічних ефектів дає можливість застосовувати комплексний D-вітамінний препарат «Кальмівід» при дисфункціональному остеопорозі.

**Ключові слова:** дисфункціональний остеопороз, мінеральний обмін, ліпідний обмін, кісткова тканина, комплексний препарат вітаміну D<sub>3</sub>.

Згідно з рекомендаціями експертів ВООЗ остеопороз розглядають як системне захворювання скелета, яке характеризується низькою масою кісток та порушенням мікроархітектоніки кісткової тканини, що призводить до підвищення крихкості кісток і ризику виникнення переломів [1]. У найбільш розвинених країнах Європи, США, Японії сукупна кількість людей, які хворіють на остеопороз, досягає 75 млн. Тільки в США остеопороз визначають у 30% жінок [2]. Відомо, що з остеопорозом пов'язано 70% усіх травм у людей, у тому числі переломи кісток та шийки стегна. Згідно зі світовою статистикою ризик переломів шийки стегна у жінок внаслідок остеопорозу досягає 15%, що близько до рівня захворюваності на рак молочної залози [3]. Слід зазначити, що в останні роки у країнах СНД спостерігається тривожна тенденція: у клінічно здорових молодих людей віком 18–25 років, тобто у період, коли закінчується формування піка кісткової маси, відзначається порушення мінеральної щільності кісткової тканини, імовірно внаслідок змін якості життя, рівня та якості харчування [4].

Економічні витрати, пов'язані з лікуванням та реабілітацією травм на ґрунті остеопорозу, надто великі. У США вартість тако-

го лікування й реабілітації сягає 7–10 млрд. доларів на рік. У Європі ці витрати становлять близько 5 млрд. євро на рік [5, 6]. При цьому до 85% усіх витрат, пов'язаних з остеопорозом, припадають на лікування переломів шийки стегна [7].

Оскільки остеопенічний синдром має поліетіологічну природу, фактори ризику розвитку цього захворювання різні [8]. Однією з найпоширеніших форм остеопорозу є дисфункціональна форма. Група дисфункціонального остеопорозу об'єднує інволюційний, іммобілізаційний та остеопороз внаслідок гіподинамії. До інволюційного остеопорозу відносять постменопаузний, пресенільний та сенільний остеопороз, які слід розглядати як фази, що мають характерні для стану резорбційних процесів ті чи інші особливості в певні періоди інволюції, старіння організму. В основі дисфункціонального остеопорозу лежить поступове згасання функції опорно-рухового апарату, яке значною мірою пов'язано із розладами функції інших органів та систем організму, передусім регуляторної і корегуляторної функцій нервової та гуморальної систем. Порушення трофіки кісткової тканини пов'язані також із циркуляторними розладами внаслідок зменшення проявів гідродинамічних ефектів пружних

деформацій. Також у людей, старших за 50 років, відзначається високий ризик D-гіповітамінозу внаслідок зниження у них інтенсивності синтезу вітаміну D<sub>3</sub> у шкірі та активності вітамін-D<sub>3</sub>-гідроксилазних ферментів [9–11]. Згодом до цих механізмів виникнення остеопорозу приєднується вплив інших чинників, що прискорює його прогресування [12].

Остеопороз є результатом порушення рівноваги між активністю остеобластів і остеокластів у процесі ремоделювання кісткової тканини у бік зниження остеобластичної активності, яка контролює процес утворення нової кісткової тканини та її мінералізацію. Розвиток остеопорозу пов'язаний із негативним балансом кальцію в організмі, насамперед у зв'язку зі зниженням його biodоступності внаслідок меншого надходження або порушення обміну вітаміну D<sub>3</sub> в організмі.

Дефіцит кальцію, який є причиною розвитку значної кількості захворювань кісткової тканини, може мати як екзогенне, так і ендогенне походження. Недостатнє надходження кальцію з їжею призводить до порушень росту і формування піка кісткової маси у дітей, виникнення остеопорозу та його ускладнень у дорослих [13, 14]. Окрім недостатності у харчовому раціоні, з віком у 40% людей значно знижується рівень засвоюваності вжитого кальцію внаслідок хвороб кишково-шлункового тракту [15]. Тому для профілактики та лікування остеопорозу, як правило, препарати кальцію призначають разом з вітаміном D<sub>3</sub> [16, 17].

Незважаючи на те, що вже понад 50 років тривають експериментальні та клінічні дослідження з обґрунтування застосування кальцію для профілактики й лікування порушень структурно-функціонального стану кісткової тканини, це питання й дотепер лишається невирішеним.

На сьогодні з метою профілактики та лікування захворювань опорно-рухового апарату застосовують препарати з різним вмістом кальцію та вітаміну D<sub>3</sub> [18, 19]. Утім, серед фахівців нема єдиної думки щодо достатньої для щоденного вживання кількості кальцію.

За даними одних авторів, із цією метою доцільно вживати до 1 500 мг кальцію на добу [20, 21]. Однак в інших дослідженнях було показано, що інтенсивність всмоктування кальцію підвищується у разі зниження його вмісту в раціоні, і це пов'язано зі зростанням активності ферменту вітамін D<sub>3</sub>-1α-гідроксилази. За цих умов зростає активне

транспортування кальцію внаслідок збільшення синтезу кальційзв'язувального білка [22]. Активність цього ферменту знижується з підвищенням рівня кальцію у раціоні [23, 24].

Використання великих доз кальцію також призводить до порушення мінерального обміну та структурно-функціональної активності кісткової тканини [25]. Ці результати свідчать про необхідність встановлення оптимального співвідношення кальцій-вітамін D<sub>3</sub> у препаратах для лікування остеопорозу. Препарати, які містять лише кальцій та вітамін D<sub>3</sub>, — це препарати другого покоління. До складу препаратів третього покоління додатково включають мінеральні компоненти, які позитивно впливають на структурно-функціональну активність кісткової тканини, що розширює можливість використання їх у старших вікових групах. Враховуючи вищезазначене було розроблено препарат з комерційною назвою «Кальмівід», до складу якого крім вітаміну D<sub>3</sub> та кальцію введено ще такі мінеральні компоненти: фосфор — важливий елемент структури біологічно активних макромолекул та регулятор обміну речовин, у тому числі мінерального компонента кісткової тканини; цинк — забезпечує активність багатьох ферментів, зокрема лужної фосфатази; мідь — бере участь у синтезі колагену і еластину, перешкоджає демінералізації кісткової тканини; марганець — нормалізує синтез глікозаміногліканів, необхідних для формування кісткової та хрящової тканини (Пат. 48909А/ІВХ, UA, 7А 6/к 31/593; Опубл. 17.05.2004, Бюл. №5).

Метою даної роботи було вивчення порівняльної ефективності розробленого та комерційного препаратів для лікування дисфункціонального остеопорозу.

## Матеріали і методи

Завданням, що його покладено в основу винаходу, є створення вітамінно-мінерального препарату для лікування остеопорозу вищої ефективності та більшої тривалості зберігання, який водночас не дає негативних побічних явищ у разі довготривалого використання.

Створюючи препарат керувались такими принципами:

- вплив умов зберігання компонентів препарату, а саме: відсутність їх хімічної взаємодії та окиснення, що може значно знизити ефективність препарату;
- виключення негативної дії доз складників препарату на обмін речовин в організмі;

- висока біодоступність компонентів препарату;
- синергізм взаємодії інгредієнтів препарату.

Враховуючи ці положення, використовували вітамін D<sub>3</sub>, невеликі дози кальцію, також до складу препарату вводили фосфор, оскільки засвоюваність кальцію залежить від його співвідношення з фосфором. Окрім того остеопороз супроводжується D-гіповітамінозом. За цих умов інгібується синтез кишкового ізоферменту лужної фосфатази, який регулює відщеплення фосфору від органічних сполук, наслідком чого при цьому захворюванні є гіпофосфатемія, що може призвести до порушення багатьох видів обміну речовин в організмі. Введення до складу препарату вітаміну D<sub>3</sub> у вигляді білкового комплексу з казеїном значно підвищує строк зберігання вітаміну D<sub>3</sub> без використання стабілізаторів та запобігає утворенню продуктів його окиснення, які є токсичними для організму. Застосування вітаміну D<sub>3</sub> у комплексі з казеїном істотно знижує вплив детергентів шлунково-кишкового тракту на вітамін, внаслідок чого значно підвищується його всмоктуваність у кров.

Раціональний вибір взаємопов'язаних мінеральних компонентів та їх дозування у межах, що відповідають оптимальному фізіологічному впливу на організм людини, створює умови для підсилення лікувальної дії препарату. До складу препарату також входять цинк, мідь і марганець, які регулюють диференціацію та активність остеобластів, синтез ферментів і процеси осифікації кісткової тканини. Недостатність цих елементів сприяє розвитку остеопорозу та остеоартрозу.

Діючі мінеральні компоненти, що їх уведено до складу препарату, — це фармацевтично допустимі солі або окисні сполуки, які придатні для призначення людині й не мають небажаних побічних ефектів.

Разова форма випуску для перорального приймання може бути у вигляді капсули, таблетки або сипкого порошку. Для захисту інгредієнтів препарату від впливу вологи, кисню, світла та для маскування небажаного смаку тверда разова форма може мати покриття, а також може бути покрита полірувальними речовинами. Спосіб отримання препарату «Кальмівід» запатентовано (патент України № 48909). Разова доза препарату містить: вітамін D<sub>3</sub> — 1 000 МО; кальцій — 100 мг; фосфор — 40 мг; цинк — 5 мг; мідь — 1,1 мг; марганець — 0,6 мг.

Як препарат порівняння використовували «Кальцемін адванс» виробництва США,

який містить такі діючі речовини (одна таблетка): вітамін D<sub>3</sub> — 200 МО; кальцій — 500 мг; магній — 40 мг; цинк — 7,5 мг; марганець — 1,8 мг; бор — 250 мкг.

Дослідження проводили на щурах лінії Wistar масою 300±5г. Дисфункціональну модель остеопорозу відтворювали, утримуючи щурів у тисних відсіках клітки з малою площею та об'ємом, що супроводжувалось обмеженням рухливості тварин протягом 2,5 місяців. У період акліматизації (тиждень) та під час експерименту тварини перебували у віварії при температурі 18–22 °С, вологості 50–60%, природному світловому режимі «день–ніч» у стандартних пластикових клітках на стандартному харчовому раціоні [26]. Підбір тварин та формування груп проводили за методом «випадкових чисел» [27, 28]. Дослідні препарати вводили один раз на добу внутрішньошлунково за допомогою зонду у вигляді водної суспензії таблетованої маси у дозах 20,0 мг/на 1 особину для препарату «Кальмівід» (виходячи з максимальних добових доз) та 20,0 мг/кг і 60,0 мг/на 1 особину для препарату порівняння, до складу яких входять вітамін D<sub>3</sub> та мінеральні компоненти. Ці препарати близькі за складом діючих компонентів, але відрізняються за їх кількісним вмістом. Об'єм дози препаратів, становив 0,1 мл. Препарати вводили упродовж 30 днів.

Рівень кальцію у сироватці крові визначали за допомогою біотест-наборів (Lachema, Чехія). Вміст фосфору у золі кісткової тканини та сироватці крові після осадження білків 12% -м розчином ТХО встановлювали методом Дусе [29]. Активність загальної лужної фосфатази визначали за допомогою біотест-наборів виробництва Lachema (Чехія), активність її ізоферментів — з використанням інгібіторів згідно з методом [30, 31].

Рівень загальних ліпідів у сироватці крові визначали, застосовуючи біотест-набори (Lachema, Чехія), загального, вільного та етерифікованого холестеролу — відповідно [32, 33], загальних фосfolіпідів — [34]. Вміст 250HD<sub>3</sub> встановлювали методом радіоконкурентного зв'язування відповідно до описаного [35]. Морфологічні дослідження кісткової тканини проводили згідно з наведеним [36].

Вміст глюкози, сечовини визначали за допомогою біотест-наборів (Lachema, Чехія). Час згортання крові — методом Морвіца, кількість гемоглобіну — методом Салі згідно [37].

Усі маніпуляції з тваринами виконували під легким ефірним наркозом.

Статистичний аналіз здійснювали з використанням t-критерію Стьюдента.

### Результати та обговорення

Як видно з наведених у табл. 1 даних, у групі експериментальних тварин порівняно з контрольною групою змінюється товщина дистального епіметафізу та довжина стегнової й великогомілкової кісток, а також маса, зольність і вміст мінеральних компонентів у великогомілковій кістці. Це свідчить про порушення структури кісткової тканини та мінерального обміну в ній за досліджуваної моделі остеопорозу.

**Таблиця 1. Остеометричні дослідження та мінеральний стан кісткової тканини при дисфункціональній формі остеопорозу ( $M \pm m, n = 10$ )**

Досліджувані показники	Контрольна група	Дослідна група
<b>Стегнова кістка:</b>		
Довжина, мм	39,8±0,3	38,3±0,2*
Товщина ДЕМ	7,70±0,04	7,40±0,03*
<b>Великогомілкова кістка:</b>		
Довжина, мм	42,0±0,5	40,0±0,2*
Товщина ДЕМ, мм	7,90±0,04	7,30±0,03*
Маса, г	672,0±5,0	649,0±6,0*
Зольність, %	52,0±0,5	48,0±0,4*
Вміст кальцію, %	26,7±0,1	25,1±0,2*
Вміст фосфору, %	14,2±0,1	12,3±0,1*

*Примітка.* ДЕМ — дистальний епіметафіз; \* — вірогідність порівняно з контрольною групою,  $p < 0,05$ .

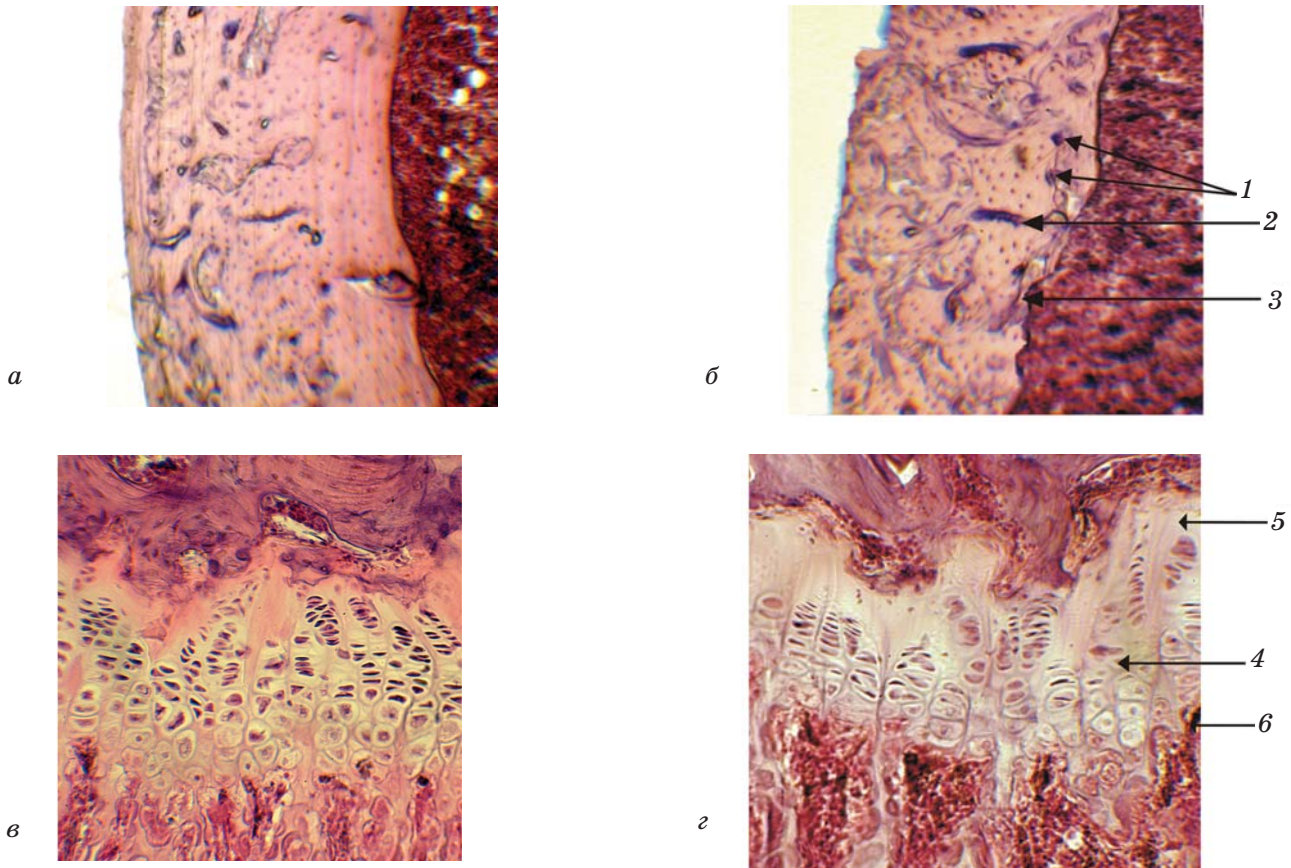
Результати остеометричних досліджень підтверджують дані гістоморфологічних досліджень (рис. 1). Встановлено, що товщина компактної кісткової тканини зменшується, водночас збільшується кількість розширених центральних судинних каналів переважно у глибокому шарі (з боку кісткового мозкового каналу) компактної кісткової тканини. Спостерігається також потоншення та ділянками зникнення внутрішніх оточуючих пластин, що є результатом розвитку остеопорозу.

Таким чином, результати біохімічних, гістоморфологічних та остеометричних досліджень свідчать про розвиток остеопорозу за цієї експериментальної (дисфункціональної) моделі, що обґрунтовує її використання з метою визначення ефективності запропонованого препарату для лікування остеопорозу.

Дані щодо впливу препаратів на остеометричні показники та мінеральний стан кісткової тканини наведено у табл. 2.

Як випливає з одержаних результатів, за умов експериментальної моделі дисфункціонального остеопорозу на 9,3% і на 10% зменшуються довжина й товщина дистального епіметафізу (ДЕМ) стегнової та великогомілкової кісток відповідно. При цьому знижуються маса, зольність кісток та вміст кальцію і фосфору в золі. З уведенням «Кальмівіду» довжина й товщина ДЕМ практично досягають контрольних величин. Маса кісток, зольність і вміст мінеральних компонентів наближаються до показників у контрольних тварин, однак повної нормалізації не відзначається ( $p < 0,05$ ). Слід ураховувати, що вітамін D<sub>3</sub> має пролонгуючий ефект упродовж трьох місяців після закінчення введення препарату, що може супроводжуватись більш повною нормалізацією структури кісткової тканини. У разі застосування препарату порівняння також спостерігається підвищення досліджуваних показників, але вони менш виражені, ніж у випадку введення «Кальмівіду». Довжина стегнової та великогомілкової кісток збільшується на 6 та 7% відповідно, і різниця між цією групою і контролем вірогідна ( $p < 0,01$ ). Маса великогомілкової кістки з уведенням препарату «Кальмівід» та препарату порівняння досягає відповідно 120 та 92% відносно маси кісток контрольних тварин. Зольність дорівнює 107,5 та 100% відповідно. У разі введення препарату «Кальмівід» та препарату порівняння вміст кальцію у золі становить 96,2 та 94,9%, фосфору — 93,1 та 86,3% відповідно до аналогічних показників у контрольних тварин. Отже, одержані результати біохімічних та остеометричних досліджень дають змогу зробити висновок про те, що зазначені препарати справляють нормалізуючий ефект на стан кісткової тканини, який більш виражений у препарату «Кальмівід», ніж у препарату порівняння.

Дані остеометричних досліджень щодо нормалізуючої дії препарату «Кальмівід» підтверджено результатами гістологічних досліджень (рис. 2), які свідчать про те, що за цих умов нормалізуються товщина та структура компактної тканини великогомілкової кістки. Окрім того результати остеометричних та гістологічних досліджень підтверджують дані стосовно впливу зазначених препаратів на мінеральний обмін (табл. 3).



**Рис. 1.** Гістоморфологічні дослідження кортикального шару та епіфізарного хряща тварин при дисфункціональному остеопорозі. Поперечні гістологічні зрізи нижньої третини діафіза стегнової кістки щурів контрольної групи (а) та групи з дисфункціональним остеопорозом (б).

Зменшення щільності компактної кісткової тканини у тварин групи з дисфункціональним остеопорозом унаслідок збільшення кількості центральних (1), пронизливих (2) судинних каналів та порушення системи внутрішніх оточуючих кісткових пластинок (3). Гематоксилін-еозин.  $\times 60$ . Ділянки проксимального епіфізарного хряща великогомілкової кістки щурів контрольної групи (в) та групи з дисфункціональним остеопорозом (г). Значне порушення зональної будови та потоншення епіфізарного хряща (4). Припинення хондро- (5) та ендохондріального остеогенезу (6). Гематоксилін-еозин.  $\times 120$

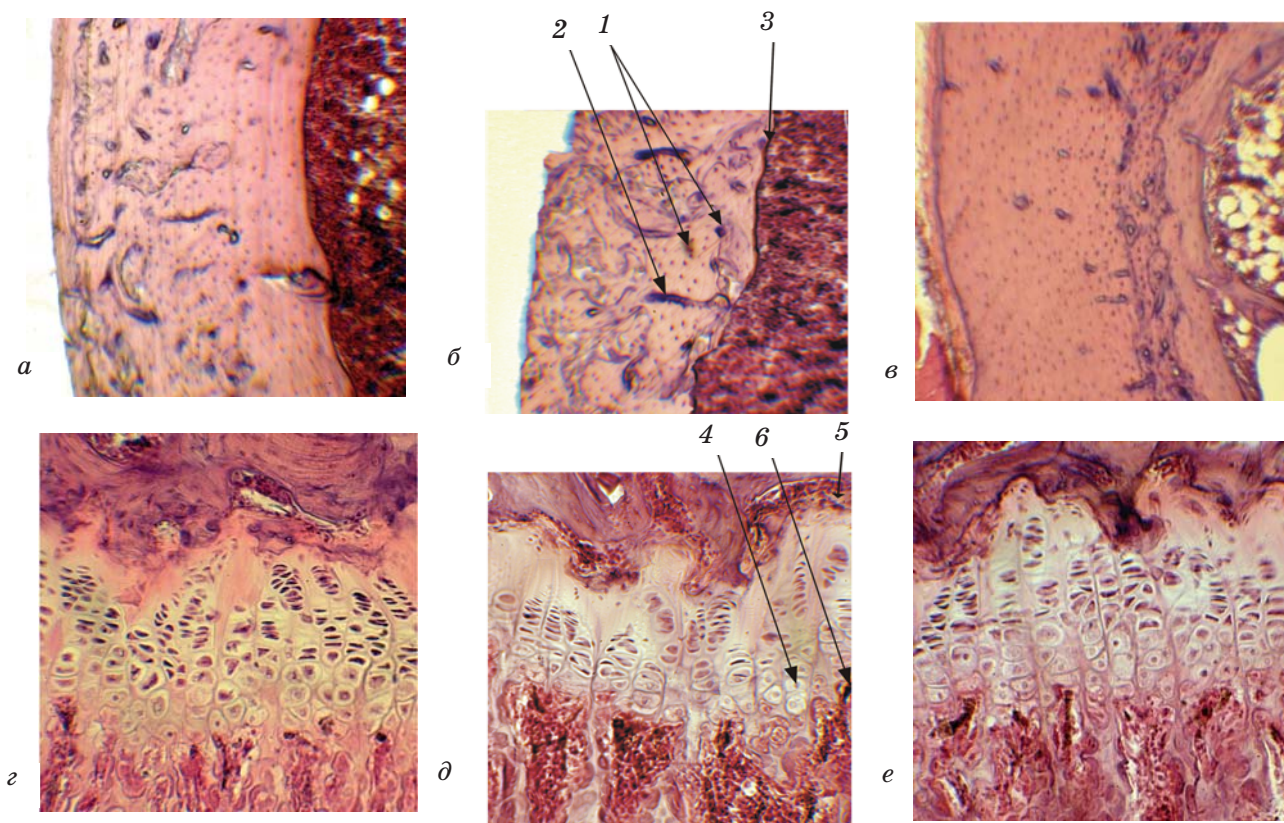
**Таблиця 2.** Вплив препаратів на остеометричні показники та мінеральний стан кісткової тканини ( $M \pm m, n = 10$ )

Досліджувані показники	Контроль	Дисфункціональний остеопороз		
		Остеопороз	+ «Кальмівід»	+ Препарат порівняння
Стегнова кістка:				
Довжина, мм	$39,8 \pm 0,3$	$36,4 \pm 0,2$	$38,9 \pm 0,2^*$	$37,5 \pm 0,1^{***}$
Товщина ДЕМ, мм	$7,70 \pm 0,04$	$7,00 \pm 0,03$	$7,50 \pm 0,03^*$	$7,20 \pm 0,01^{**}$
Великогомілкова кістка:				
Довжина, мм	$42,0 \pm 0,5$	$38,4 \pm 0,2$	$41,0 \pm 0,1^*$	$39,0 \pm 0,2^{***}$
Товщина ДЕМ, мм	$7,90 \pm 0,04$	$7,00 \pm 0,03$	$7,70 \pm 0,02^*$	$7,30 \pm 0,03^{***}$
Маса, г	$0,98 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,03$	$1,20 \pm 0,02^*$	$0,90 \pm 0,03^{***}$
Зольність, %	$46,5 \pm 0,5$	$42,0 \pm 0,4$	$50,0 \pm 0,3^*$	$47,0 \pm 0,2^{***}$
Вміст кальцію, %	$28,9 \pm 0,1$	$25,1 \pm 0,2$	$27,8 \pm 0,1^*$	$26,9 \pm 0,2^{***}$
Вміст фосфору, %	$15,6 \pm 0,1$	$12,0 \pm 0,2$	$14,8 \pm 0,1^*$	$13,5 \pm 0,1^{***}$

**Примітка.** ДЕМ — дистальний епіметафіз;

\* — вірогідність змін порівняно з групою із дисфункціональним остеопорозом;

\*\* — вірогідність змін порівняно з групою, яка отримувала «Кальмівід», у подальших таблицях аналогічно,  $p < 0,05$ .



**Рис. 2.** Гістоморфологічні дослідження кортикального шару та епіфізарного хряща тварин при дисфункціональному остеопорозі на фоні лікування препаратом «Кальмівід».

Поперечні гістологічні зрізи нижньої третини діяфіза стегнової кістки щурів контрольної групи (а), групи з дисфункціональним остеопорозом (б) та після місячної медикаментозної корекції препаратом «Кальмівід» (в). Зменшення щільності компактної кісткової тканини у тварин групи з дисфункціональним остеопорозом через збільшення кількості центральних (1), пронизливих (2) судинних каналів та порушення системи внутрішніх оточуючих кісткових пластинок (3). Відновлення структури компактної кісткової тканини на фоні введення препарату «Кальмівід». Гематоксилін-еозин. х 60. Ділянки проксимального епіфізарного хряща великогомілкової кістки щурів контрольної групи (г), групи з дисфункціональним остеопорозом (д) та після місячної медикаментозної корекції препаратом «Кальмівід» (е). Значне порушення зональної будови та потоншення епіфізарного хряща (4). Припинення хондро- (5) та ендохондріального (6) остеогенезу. Відновлення структури епіфізарного хряща на фоні введення препарату «Кальмівід». Гематоксилін-еозин. х120

**Таблиця 3. Вплив препаратів на показники мінерального обміну в сироватці крові (M ± m, n = 15)**

Досліджувані показники	Контроль	Дисфункціональний остеопороз		
		Остеопороз	+ «Кальмівід»	+ Препарат порівняння
Кальцій, ммоль · л <sup>-1</sup>				
загальний	1,35±0,01	0,98±0,02	1,52±0,03*	1,20±0,02*,**
білокзв'язаний	0,18±0,01	0,16±0,03	0,17±0,02	0,18±0,01
ультрафільтрувальний	1,17±0,02	0,82±0,01	1,36±0,01*	1,02±0,02*,**
Фосфор неорг., ммоль · л <sup>-1</sup>	1,64±0,02	1,38±0,01	1,67±0,03*	1,45±0,02*,**
Лужна фосфатаза, О · л <sup>-1</sup>				
загальна	268±10	330±11	277±12*	300±10
кишковий ізофермент	81,2±2,1	112,0±1,8	81,9±1,0*	98,4±0,9*,**
кістковий ізофермент	220±5	280±4	240±3*	260±2*,**
25 ОНД <sub>3</sub> , нг · мл <sup>-1</sup> (нмоль · л <sup>-1</sup> )	19,8±0,4 (49,4)	14,5±0,2 (36,3)	22,8±0,4* (57,0)	17,0±0,3*,** (42,5)



Як видно з наведених у табл. 3 результатів, рівень загального кальцію та його фракцій значно вищий у разі введення препарату «Кальмівід». При цьому більший відсоток вмісту кальцію припадає на частку біологічно активної ультрафільтрувальної фракції, яка на 80–90% складається з іонізованого кальцію та на 10–20% — зі зв'язаного з фосфорною та вугільною кислотами. Враховуючи, що у щурів контрольної групи спостерігається порушення мінерального обміну порівняно з молодими тваринами, препарат «Кальмівід» дає більший нормалізуючий ефект, що має позитивне значення [38]. Препарат порівняння справляє менш виражений вплив на регуляцію мінерального обміну в організмі.

Дані щодо вмісту мінеральних компонентів підтверджуються показниками активності лужної фосфатази. Після введення препарату «Кальмівід» активність загальної лужної фосфатази та її ізоферментів зростає, практично досягаючи показників у контрольних тварин. Водночас у разі застосування препарату порівняння зазначені показники нижчі, ніж у тварин з дисфункціональною формою остеопорозу, але достовірно вищі за показники у контрольних щурів ( $p \leq 0,01$ ). Ці результати збігаються з даними стосовно вмісту  $25\text{ОНD}_3$  у сироватці крові. З уведенням препарату «Кальмівід» рівень цього метаболіту вітаміну  $\text{D}_3$  порівняно з таким рівнем у хворих на остеопороз підвищується в 1,6 раза і навіть на 15% перевищує відповідний показник у тварин контрольної групи (наближається до рівня у молодих тварин). Водночас унаслідок дії препарату порівняння вміст  $25\text{ОНD}_3$  підвищується в 1,24 раза порівняно з його рівнем у хворих, але на 8% нижче, ніж у контрольних тварин ( $p \leq 0,01$ ).

Таким чином, результати визначення показників мінерального обміну також підтверджують наведені раніше дані про вищу ефективність препарату «Кальмівід» проти препарату порівняння.

Оскільки, як зазначали вище, вітамін  $\text{D}_3$  є регулятором ліпідного обміну, порушення якого призводить до структурно-функціональних змін стану клітинних та субклітинних мембран, вивчали вплив препаратів на ліпідний склад сироватки крові при дисфункціональній формі остеопорозу.

Як впливає з наведених результатів (табл. 4), з уведенням досліджуваних препаратів відзначається їхня нормалізуюча дія на ліпідний стан сироватки крові, однак, як і стосовно інших показників, більш вираже-

ний ефект спостерігається у тварин, що одержували «Кальмівід». Слід зауважити, що характер порушень ліпідного складу сироватки крові при аліментарній та дисфункціональній формах остеопорозу різний, але в обох випадках вітамін  $\text{D}_3$  нормалізує порушення ліпідного обміну [38].

Враховуючи, що в разі дефіциту вітаміну  $\text{D}_3$  можуть порушуватись рівень гемоглобіну, вуглеводний обмін, функція нирок, вивчали вплив препарату на відповідні показники крові (табл. 5).

Одержані результати свідчать, що при дисфункціональній формі остеопорозу рівень гемоглобіну вірогідно знижується (на 36%) порівняно з його вмістом у контрольних тварин ( $p \leq 0,01$ ). Уведення препарату «Кальмівід» практично нормалізує його рівень ( $p \leq 0,01$ ). Препарат порівняння не впливає на цей показник. Слід зазначити, що у контрольних щурів похилого віку порівняно з молодими тваринами час згортання крові знижується практично на 28%, і це дає підставу стверджувати, що з віком ризик утворення тромбів зростає [38]. За умов остеопорозу час згортання крові практично не змінюється. Після введення препарату «Кальмівід» спостерігається збільшення часу згортання крові на 23% і наближення до відповідних показників у щурів молодого віку. Водночас у щурів, які одержували препарат порівняння, час згортання крові знижується порівняно з контрольною групою та групою з дисфункціональним остеопорозом. Це потребує обережності у використанні його при захворюваннях, які супроводжуються порушенням процесу згортання крові. Зазначені препарати нормалізують вуглеводний обмін та вміст сечовини. Ці ефекти більш виражені у препараті «Кальмівід».

Таким чином, проведені дослідження свідчать про ефективність препарату «Кальмівід» у нормалізації структури й мінерального обміну в кістковій тканині та в нормалізації мінерального, ліпідного, вуглеводного D-вітамінного обміну. Він підвищує рівень гемоглобіну, не впливає на час згортання крові. Нормалізуюча дія препарату «Кальмівід» вища за дію комерційного препарату порівняння.

Таблиця 4. Вплив препаратів на ліпідний склад сироватки крові ( $M \pm m, n = 10$ )

Досліджувані показники	Контроль	Дисфункціональний остеопороз		
		Остеопороз	+ «Кальмівід»	+ Препарат порівняння
Загальні ліпіди, г · л <sup>-1</sup>	2,92±0,03	1,65±0,08	2,26±0,03*	1,78±0,02*,**
Сумарні фосfolіпіди, ммоль · л <sup>-1</sup>	1,13±0,02	1,14±0,03	1,33±0,01*	1,24±0,03*,**
Холестерол, ммоль · л <sup>-1</sup> загальний вільний етерифікований	2,15±0,20	1,56±0,12	2,34±0,04*	1,53±0,10**
	0,27±0,05	0,60±0,06	0,33±10,03*	0,48±0,02*,**
	1,88±0,06	0,96±0,05	2,01±0,06*	1,13±0,08*,**
Етерифікований холестерол / загальний холестерол	0,87±0,01	0,61±0,01	0,86±0,02*	0,74±0,01*,**

Таблиця 5. Вплив препаратів на деякі показники крові ( $M \pm m, n = 10$ )

Досліджувані показники	Контроль	Дисфункціональний остеопороз		
		Остеопороз	+ «Кальмівід»	+ Препарат порівняння
Гемоглобін, г%	14,8±0,4	8,9±0,1	15,3±0,2*	9,1±0,2**
Згортання крові, с	36,0±0,3	35,1±0,5	44,6±0,8*	31,2±0,4*,**
Сечовина, ммоль · л <sup>-1</sup>	5,60±0,10	12,23±0,07	8,90±0,04*	10,30±0,03*,**
Глюкоза, ммоль · л <sup>-1</sup>	6,50±0,02	7,90±0,03	6,90±0,04*	7,20±0,01*,**

### ЛІТЕРАТУРА

1. Riis B. J. Biochemical markers of bone turnover. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis // *Am. J. Med.* — 1993. — V. 95, N. 5A. — P. 17–21.
2. Цейтлин О. Я. Эпидемиология остеопороза // *Вестн. РАМН.* — 2002. — №3. — С. 54–57.
3. Беневоленская Л. И. Остеопороз — актуальная проблема медицины // *Остеопороз и остеопатия.* — 1998. — №1. — С. 5–7.
4. Бакулин А. В., Оганов В. С., Новиков В. Е. Типичные значения минеральной плотности поясничных позвонков и проксимального отдела бедренной кости у различных возрастных групп населения московского региона // *Первый Российский симпозиум по остеопорозу.* — М., 1995. — С. 71.
5. Лесняк О. М., Кузьмина Л. И. Социально-экономические аспекты профилактики и лечения остеопороза: Обзор литературы // *Остеопороз и остеопатия.* — 2000. — №1. — С. 35–39.
6. Коструб О. О., Хохол М. І., Павлішен Ю. І. Динаміка інвалідності від травм і захворювань опорно-рухового апарату та заходи щодо її зниження // *Вісник ортопедії, травматології та протезування.* — 1999. — Т. 25, №1 — С. 10–11.
7. Ершова О. Б., Семенова О. В., Дегтярев А. А. Результаты проспективного изучения исходов переломов проксимального отдела бедра у лиц пожилого возраста // *Остеопороз и остеопатия.* — 2000. — №1. — С. 9–10.
8. Дедов И. И., Марова Е. И., Рожинская Л. Я. Остеопороз: патогенез, диагностика, принципы профилактики и лечения: Методическое пособие для врачей. — М., 1999. — 63 с.
9. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes: Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride. — Washington: National Academy Press, DC, 1999.
10. Holick M. F., Matsuoka L. Y., Wortsman J. Age, vitamin D and solar ultraviolet // *Lancet.* — 1989. — V. 2. — P. 1104–1105.
11. Need A. G., Morris H. A., Horowitz M., Nordin C. Effect of skin thickness, age, body fat and sunlight on serum 25-hydroxyvitamin D // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1993. — V. 58. — P. 882–885.
12. Бруско А. Т., Рой І. В., Калашніков А. В., Гайко О. Г. Системна класифікація остеопорозу // *Травма.* — 2001. — Т. 2, № 2. — С. 201–203.
13. Рожинская Л. Я. Системный остеопороз. — М.: Медицина. — 1996. — 186 с.
14. Matkovic V., Fontana D., Tominac C. et al. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females // *Am. J. Clin. Nutr.* — 1990. — V. 52. — P. 878–888.
15. Recker R.R. Calcium absorption and achlorhydria // *N. Engl. J. Med.* — 1985. — V. 513. — P. 70–73.
16. Риггз Б. Л., Мелтон Л. Дж. Остеопороз: Этиология, диагностика и лечение. — М. — СПб: БИНОМ, Невский диалект, 2000. — 560 с.

17. *Peacock M.* Effect of calcium and vitamin D insufficiency on the skeleton // *Osteoporosis Int.* — 1998. — Suppl. — P. 45–51.
18. *Dawson-Hughes B., Harris S.S., Krall E., Dallae G.E.* Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — V. 337. — P. 670–676.
19. *Prince R.L.* Diet and the prevention of osteoporotic fractures // *N. Engl. J. Med.* — 1997. — V. 337. — P. 700–702.
20. *Рожинская Л. Я.* Остеопороз: диагностика нарушений метаболизма костной ткани и кальций-фосфорного обмена (лекция) // *Клиническая лабораторная диагностика.* — 1998. — № 5. — С. 25–32.
21. *Руденко Э. В.* Остеопороз: диагностика, лечение и профилактика. — Минск: Бел. наука, 2001. — 153 с.
22. *Kowarski S., Cowen L.A., Tarahaski M.T., Schachter D.* Tissue distribution and vitamin D dependence of IMCAL in the rat // *Am. J. Physiol.* — 1987. — V. 253, N3. — P. 411–419.
23. *Rummens K., van Herck E., van Bree R. et al.* Dietary calcium and phosphate restriction in guinea-pigs during pregnancy: fetal mineralization induces maternal hypocalcemia despite increased 1 alpha, 25-dihydroxycholecalciferol concentrations // *Br. S. Nutr.* — 2000. — V. 84, N4. — P. 495–504.
24. *Wolf R.L., Caunley J.A., Baker C.E.* Factors associated with calcium absorption efficiency in pre- and perimenopausal women // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2000. — V. 72, N2. — P. 466–471.
25. *Калашников А. В., Бруско А. Т.* Вплив додаткових доз кальцію та вітаміну D<sub>3</sub> на структурно-функціональну організацію кісток // *Вісн. ортопед., травматол. та протез.* — 2002. — №1. — С. 42–45.
26. *Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А.* Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та робота з ними. — К.: Авіценна, 2002. — 156 с.
27. *Урбах В. Ю.* Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М.: Медицина, 1975. — 295 с.
28. *Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2000. — 320 с.
29. *Dyce B.J., Bessman S.P.* A rapid nonenzymatic assay for 2,3-DPG in multiple specimen of blood // *Arch. Environ. Health.* — 1973. — V. 27, N2. — P. 112–115.
30. *Вагнер В. К., Путилин В. М., Харабуга Г. Г.* Методы и результаты исследования изоферментов (кишечной и печеночной фракций) сывороточной щелочной фосфатазы при острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости // *Вопр. мед. химии.* — 1981. — Т. 27, № 6. — С. 752–754.
31. *Плеханов Б., Цветкова Т., Пиперков Т., Чиговская М.* Щелочная фосфатаза: современное состояние вопроса // *Лаб. дело.* — 1989. — №11. — С. 4–7.
32. *Anderson J.T., Engelbrecht F., Mori F., Nishimoto S.* A stable reagent for cholesterol // *Feder. Proc.* — 1964. — V. 23, N1. — P. 555.
33. *Kamel G.* Blood lipid in infantile rickets // *J. Egypt. Med. Assoc.* — 1976. — V. 65, N2. — P. 98–101.
34. *Камышников В. С.* Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. — Минск: Беларусь, 2000. — Т. 2. — С. 134–138.
35. *Ануховская Л. И., Хрестовая Н. Л., Антоненко Л. В.* Метаболизм вітаміна D<sub>3</sub>, введенного в липосомах, в печени крыс // *Укр. биохим. журн.* — 1991. — Т. 63, №5. — С. 89–94.
36. *Гайко Г. В., Ануховська Л. І., Бруско А. Т. та ін.* Вплив вітаміну D<sub>3</sub> та різних доз вітаміну Е на мінеральний обмін, структурну організацію кісткової тканини та ріст довгих кісток // *Вісн. ортопед., травматол. та протез.* — 2005. — №1. — С. 5–13.
37. *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. Е. А. Кост.* — М.: Медицина, 1975. — 383 с.
38. *Гайко Г. В., Ануховська Л. І., Бруско А. Т. та ін.* Вплив комплексного препарату вітаміну D<sub>3</sub> «Кальмівід» на метаболізм і структурну організацію кісткової тканини при аліментарному остеопорозі // *Укр. морфол. альманах.* — 2005. — Т. 3, №4. — С. 101–107.

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ  
ПРЕПАРАТОВ ВИТАМИНА D<sub>3</sub>  
ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ**

*Л. И. Апуховская<sup>1</sup>  
В. Н. Василевская<sup>1</sup>  
А. И. Безусяк<sup>1</sup>  
С. А. Романова<sup>1</sup>  
А. В. Калашников<sup>2</sup>  
Ал. В. Калашников<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Институт травматологии и ортопедии  
АМН Украины, Киев

*E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru*

В эксперименте на крысах линии Wistar изучали эффект различных комплексных препаратов витамина D<sub>3</sub> при дисфункциональном остеопорозе. Установлено, что препарат с низким содержанием кальция наиболее эффективен в нормализации минерального и липидного обмена, структуры и функции костной ткани и эпифизарного хряща. Отсутствие побочных эффектов позволяет использовать комплексный D-витаминный препарат «Кальмивид» при дисфункциональном остеопорозе.

**Ключевые слова:** дисфункциональный остеопороз, минеральный обмен, липидный обмен, костная ткань, комплексный препарат витамина D<sub>3</sub>.

**EFFECTIVENESS OF VITAMIN D<sub>3</sub>  
COMPLEX PREPARATIONS UNDER  
CONDITIONS OF OSTEOPOROSIS**

*L. I. Apukhovska<sup>1</sup>  
V. M. Vasilevska<sup>1</sup>  
A. I. Bezysyak<sup>1</sup>  
S. O. Romanova<sup>1</sup>  
An. V. Kalashnikov<sup>2</sup>  
Ol. V. Kalashnikov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Palladin Institute of Biochemistry  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv  
Institute of Traumatology and Orthopedyc of  
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru*

The effects of different vitamin D<sub>3</sub> complex preparations under conditions of dysfunctional osteoporosis in the experiment of Vistar rats were studied.

It was determined that preparations with small doses of calcium is most effective in normalization of mineral and lipid metabolism and of the bone tissue and epiphyseal cartilage structure and function. The absence of the side effects allows to use the vitamin D<sub>3</sub> complex preparations «Calmivid» under dysfunctional osteoporosis.

**Key words:** dysfunctional osteoporosis, mineral metabolism, lipid metabolism, bone tissue, vitamin D<sub>3</sub> complex preparation.

# ТЕХНОЛОГІЧНІ ПАРАМЕТРИ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН-ПРОДУЦЕНТІВ ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ІНТЕРФЕРОНІВ І ТИПУ

Ю. М. Пенчук<sup>1</sup>

О. В. Карпов<sup>1</sup>

В. М. Поводзинський<sup>1</sup>

С. В. Верьовка<sup>2</sup>

З. Р. Ульберг<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Національний університет харчових технологій, Київ

<sup>2</sup> Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

<sup>3</sup> Інститут біологічної хімії ім. Ф. Д. Овчаренка НАН України, Київ

*E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru*

Вивчали основні технологічні параметри культивування клітин-продуцентів інтерферону І типу ( $\alpha/\beta$ -ІФН) у створеній авторами дослідній установці з використанням як індуктора молекулярного комплексу дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізованого на гранулах сферону-300 (ІММК). Досліди проводили на мононуклеарних клітинах крові людини (суспензійна культура) та клітинах перещеплюваної лінії тестикулів поросят (моношарова культура). Визначено оптимальні співвідношення кількості клітин-продуцентів та частинок ІММК у середовищі культивування й оптимальні для культивування клітин швидкості перемішування культурального середовища для кожної з культур. Зроблено висновок щодо важливості точного визначення зазначених технологічних параметрів для застосування біореакторів з метою одержання препаратів ІФН у виробничих умовах з використанням ІММК.

**Ключові слова:** інтерферон, індуктор, іммобілізація, сферон, культура клітин, ролерне культивування, мононуклеари.

У сучасних біотехнологіях, що ґрунтуються на використанні культур еукаріотичних клітин-продуцентів біологічно активних сполук застосовують різноманітну за конструкцією апаратуру. Вибір того чи іншого способу культивування та відповідного апаратурного оформлення процесу визначається фізіологічними особливостями (суспензійна чи моношарова культура) і потребами клітинної культури, методами керування процесом, а також способом накопичення (екзо- чи ендогенним) цільового продукту або біомаси клітин [1,2].

Раніше нами було запропоновано принципово новий індуктор інтерферонів (ІФН) типу І: молекулярний комплекс дріжджова РНК-гідрохлорид тилорону, іммобілізований на гранулах сферону (ІММК) [3]. З метою відпрацювання технології одержання в культурах еукаріотичних клітин препаратів ІФН із використанням ІММК сконструювали й випробували дослідну установку як прототип апаратури для виробництва препаратів ІФН у промислових умовах. Доведено ефективність цієї установки щодо підтримання життєздатності культивованих

у ній клітин-продуцентів ІФН різного типу, а також здатності таких клітин до вищого, ніж за стаціонарних умов, продукування ІФН [4]. Метою даної роботи було встановлення основних технологічних параметрів культивування клітин в установці з використанням ІММК, а саме: 1) оптимального співвідношення кількості клітин-продуцентів ІФН та частинок ІММК у середовищі культивування; 2) оптимальної для культивування клітин інтенсивності перемішування культурального середовища.

## Матеріали і методи

**Клітини-продуценти ІФН.** Досліди проводили на перещеплюваній лінії клітин тестикулів поросят (ПТП), отриманій з НДІ ветеринарії УААН (моношарова культура), та первинній культурі мононуклеарних клітин крові людини (суспензійна культура). Культивування клітин здійснювали, як описано раніше [4]. Клітини суспензійної культури (мононуклеари крові) вносили в місткості для культивування одночасно із зависсю ІММК. У разі моношарової культури ПТП

клітини перед внесенням ІММК підрощували в місткостях для культивування протягом однієї доби на середовищі з 10% -ї сироватки великої рогатої худоби (НВП «Біо-Тест-Лабораторія», Україна) для утворення суцільного моношару на внутрішній поверхні стінок місткостей.

**ІММК.** Інтерфероногенний молекулярний комплекс є конструкцією на основі гранул сферону-300 (Lachema, Чехія) з ковалентно приєднаними до цих гранул молекулами одноланцюгової дріжджової РНК (НПО «Біохімреактив», Латвія), інтеркальованими після приєднання молекулами гідрохлориду тилорону (Sigma, США). Приготування ІММК здійснювали відповідно [3,5].

Готуючи вихідну завесь ІММК, виходили з таких розрахунків. Оскільки об'єм однієї гранули сферону-300 в набухлому стані становить  $10^{-11}$  см<sup>3</sup> (згідно з інструкцією виробника), приблизна кількість частинок ІММК за наших дослідних умов дорівнюватиме  $7 \cdot 10^9$ . При цьому кількість клітин-продуцентів ІФН у вихідних клітинних завесях була на рівні  $1-5 \cdot 10^6$  кл/мл. Користуючись вихідною зависсю ІММК, одержували низку місткостей ІММК із клітинами у певних дослідних співвідношеннях, які вносили у відповідні місткості й культивували в установці за відповідного режиму.

**Дослідна установка.** В основу дії створеної нами дослідної установки було покладено принцип ролерного переміщення горизонтально закріплених місткостей для культивування. Установку конструювали як універсальну, маючи на увазі можливість культивувати як моношарові, так і суспензійні культури. Опис та схему установки наведено раніше [4].

За допомогою електронного блоку здійснювали керування вихідними параметрами системи — швидкістю обертання вала та дискретністю зміни швидкості його обертання. Регулювання процесу культивування виконував оператор через персональний комп'ютер за допомогою програми BioTech v.1, що дозволяло користуватися певними режимами обертання вала впродовж фіксованих проміжків часу залежно від технологічних потреб.

**Визначення кількості живих клітин** у зразках здійснювали методом виключення барвника живими клітинами під час фарбування 0,1% -м розчином трипанового синього в ізотонічному розчині NaCl згідно зі стандартною методикою [6].

**Титрування ІФН** у зразках проводили відповідно до стандартної методики [7], ви-

користовуючи як тест-вірус вірус везикулярного стоматиту штаму Індіана у дозі 100 ТЦД<sub>50</sub>.

## Результати та обговорення

Раніше нами було встановлено, що початковим етапом синтезу ІФН клітинами-продуцентами, індукованими ІММК, є безпосередній контакт їх із частинками цього інтерфероногену [6]. Очевидно, що вірогідність здійснення таких контактів в умовах місткості для культивування клітин відповідатиме статистичним закономірностям і залежатиме передусім від кількості як клітин-продуцентів, так і частинок ІММК у розчині. Однак вплив зазначених контактів на життєздатність культивованих клітин та їхню спроможність продукувати ІФН є досить імовірним і водночас багатфакторним феноменом, що потребує експериментальної оцінки. З огляду на це для оптимізації біосинтезу ІФН у разі використання ІММК як індуктора надзвичайно важливим є попередній дослідний підбір оптимального для інтерфероногенезу співвідношення кількості клітин-продуцентів до частинок ІММК. Результати такого підбору для конкретних місткостей для культивування з відповідними об'ємними параметрами, які ми використовували (об'єм — 15 мл, внутрішня поверхня — 28 см<sup>2</sup>, коефіцієнт заповнення — 0,7) [4], наведено на рис. 1.

Як видно, присутність частинок ІММК у середовищі культивування в кількостях, що перевищують кількість культивованих клітин (10/1), негативно впливає як на їхню життєздатність (рис. 1, а), так і на спроможність до інтерфероногенезу (рис.1, б). Це, можливо, пояснюється надлишком контактів між клітинами та частинками ІММК з відповідними необоротними порушеннями структури клітинних мембран. При цьому слід відзначити, що частинки сферону-300, на основі якого було створено ІММК, у набухлому стані мають об'єм  $10^{-11}$  см<sup>3</sup>, що практично на порядок перевищує об'єм середньої еукаріотичної клітини, і тому потенційно здатні не тільки завдавати механічних ушкоджень клітинам, але й пасивно перешкоджати трансмембранному проходженню іонів та субстратів до клітини.

Близьким до оптимального за обома параметрами згадане співвідношення стає на рівні 1/10 для обох типів культур. І хоча за меншої кількості частинок ІММК у випадках обох культур спостерігалася дещо більша кількість життєздатних клітин, титри одер-

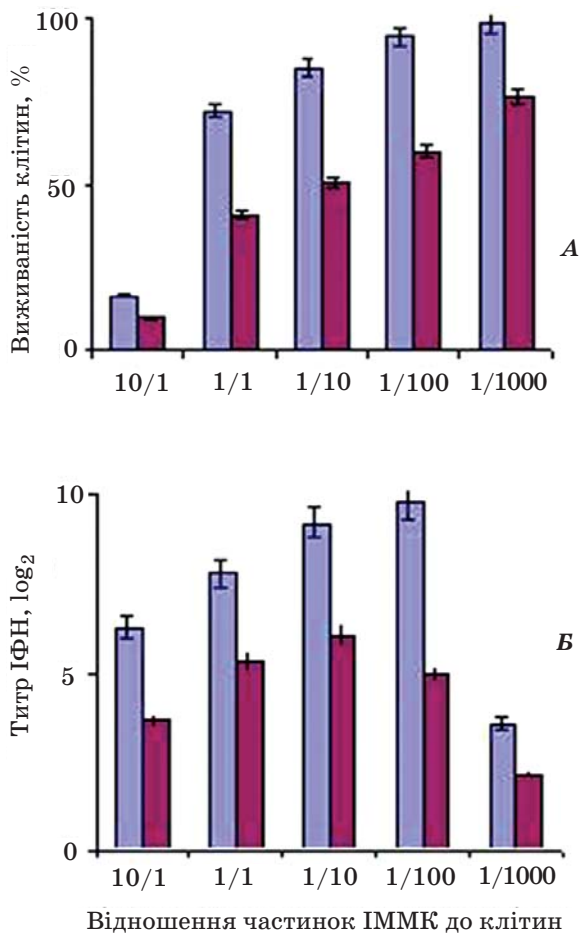


Рис. 1. Залежність життєздатності клітин (А) та виходу синтезованого ІФН (Б) від співвідношення частинок ІММК до клітин у місткостях для культивування:

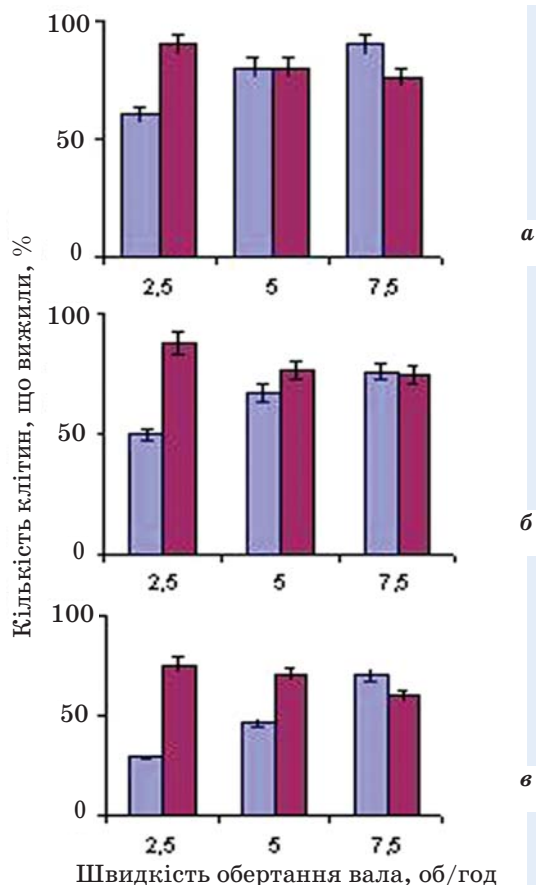
■ — суспензійна культура (мононуклеарні клітини крові людини);  
 ■ — моношарова культура (ПТП). Вимірювання проводили на 12-ту годину культивування

жаного ІФН достовірно знижувалися на 7 одиниць для лейкоцитів ( $p > 0,05$ ) та на 3 одиниці для ПТП ( $p > 0,05$ ) імовірно внаслідок зменшення кількості контактів ІММК з клітинами-продуцентами, які зумовлюють включення процесу індукції ІФН. Те, що зниження титрів ІФН не було пропорційним зменшенню кількості частинок ІММК у середовищі, зокрема, свідчить, що після зіткнення клітин із частинками ІММК останні не утримують клітини на своїй поверхні, а й далі вільно переміщуються у розчині, здійснюючи подальші контакти, які також спричинюють індукування ІФН іншими клітинами.

Поряд з іншими впливовими факторами забезпечення життєдіяльності клітин ссавців, до яких зазвичай відносять температурний режим (у межах 36–37 °С) та рівень рН середовища (7,2–7,5), чого ми до-

тримувались у наших дослідах, велике значення в умовах культивування *in vitro* мають чинники, пов'язані з рухом середовища. До таких чинників, належить передусім гідродинаміка системи, яка визначає інтенсивність потоків живильного середовища. Тимчасом як значення рН та температури є величинами практично сталими для всіх типів клітин і не залежать від конструктивних особливостей апаратури, швидкість перемішування культурального середовища впливає на гідродинаміку та, відповідно, на масопередачу в місткостях для культивування і, у такий спосіб, на забезпечення клітин киснем. Як моношарові, так і суспензійні культури клітин є дуже чутливими до змін у кисневому споживанні. Це, у свою чергу, відбивається на життєздатності клітин, а отже й на біосинтезі культурою цільового продукту — у нашому випадку ІФН. Слід також зважати й на залежність кількості здійснених контактів клітин з ІММК від швидкості обертання місткостей. Тому надзвичайно важливим було встановлення інтенсивності перемішування культурального середовища, оптимальної для культивування конкретних клітин у дослідній установці. Для цього вивчали залежність життєздатності клітин обох типів та інтерфероногенезу від швидкості обертання вала з розміщеними на ньому місткостями для культивування. При цьому час культивування умовно поділили на три проміжки по дві години, які наближено відповідали фазі контакту ІММК та передачі індукційного сигналу, фазі продукування ІФН і фазі початку рефрактерності.

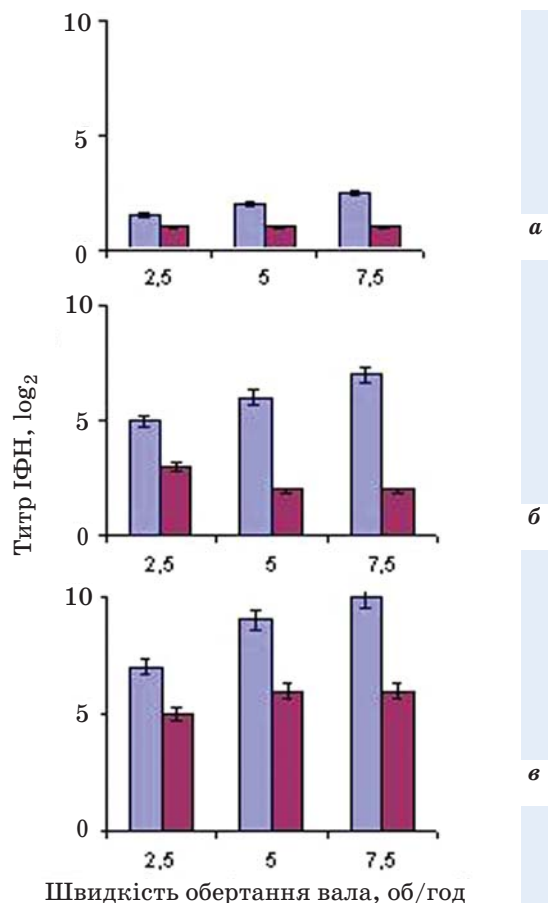
Отримані дані наведено на рис. 2 та рис. 3. Як видно, на першому етапі культивування, коли відбувається індукування ІФН (рис. 2, а), підвищення швидкості обертання достовірно збільшувало життєздатність клітин суспензійної культури на 20–25% ( $p > 0,05$ ) і, водночас, зменшувало її у клітин моношарової культури на 10% ( $p > 0,05$ ) через змив із поверхні. Така сама тенденція спостерігалася й на подальших фазах культивування (рис. 2, б, в). Це явище, на наш погляд, можна пояснити фізіологічними відмінностями росту зазначених культур в умовах використаних для культивування місткостей. У той час як клітини суспензійної культури за умови підвищеної швидкості обертання одержували більше кисню й поживних речовин, клітини в моношарі не встигали отримувати достатньо кисню за короткий час перебування в газовому оточенні, а поживні речовини за такого циклічного руху уздовж поверхні клітинного моношару також не встигали



**Рис. 2. Залежність життєздатності культивованих клітин від швидкості обертання вала установки упродовж фаз культивування:**  
*a* — фаза контакту ІММК та передачі індукційного сигналу; *б* — фаза продукування ІФН; *в* — фаза початку рефрактерності;  
 ■ — суспензійна культура (мононуклеарні клітини крові людини);  
 ■ — моношарова культура (ПТП)

достатньою мірою потрапляти до клітин. До того ж збільшення швидкості обертання вала і, як наслідок, підвищення рівня гідродинамічних зусиль, що виникають при цьому, порушує процес прикріплення моношарових клітин до поверхні місткостей для культивування; у результаті порушується загальна життєздатність клітин.

Що стосується синтезу ІФН клітинами, то в суспензійній культурі клітин на першому етапі культивування цей процес помітно інтенсифікувався зі збільшенням швидкості обертання вала установки на 1,5–2 одиниці. Водночас у моношаровій культурі інтерферогенез практично не залежав від згаданого параметра (рис. 3, *a*). Ми вважаємо, що підвищення рівня продукування ІФН у першому випадку зумовлено збільшенням кількості контактів, які відбуваються між частинками



**Рис. 3. Залежність продукування ІФН клітинами-продуцентами від швидкості обертання вала установки упродовж фаз культивування:**  
*a* — фаза контакту ІММК та передачі індукційного сигналу; *б* — фаза продукування ІФН; *в* — фаза початку рефрактерності;  
 ■ — суспензійна культура (мононуклеарні клітини крові людини);  
 ■ — моношарова культура (ПТП)

ІММК та поверхнею клітин-продуцентів і зумовлюють запуск індукції ІФН. У разі ж моношарової культури кількість таких контактів практично не змінюється, оскільки її обмежує кількість клітин-продуцентів ІФН, що містяться на зовнішній поверхні моношару.

Другий і третій етапи культивування (рис. 3, *б*, *в*) також характеризувалися підвищенням продукування ІФН клітинами суспензійної культури зі збільшенням швидкості обертання вала установки, що може пояснюватися більшою кількістю клітин-продуцентів, присутніх на цих етапах у місткостях. Слід відзначити і досить суттєве збільшення кількості ІФН, продукованого клітинами моношарової культури на третьому етапі культивування зі збільшенням швидкості обертання вала. Можливо, цей феномен зу-



мовлений ефективнішим вивільненням синтезованого ІФН з поверхні клітинного моношару за умов більш інтенсивного перемішування маси рідини живильного середовища. Загалом же, оптимальною для синтезу ІФН швидкістю обертання на всіх етапах під час культивування суспензійної культури моноцитів слід вважати 7,5 об/год, а в разі культивування моношарової культури ПТТІ — 5 об/год.

Підсумовуючи, слід наголосити, що результати проведеного дослідження свідчать про важливість підбору основних технологічних параметрів культивування клітин-продуцентів ІФН за своєрідних умов технології з використанням гранул ІММК як інтерферону. Вочевидь, застосування більш об'ємної апаратури для культивування клітин і, відповідно, потужніших пристроїв для перемішування культурального середовища (лопатових і турбінних мішалок або імпелерів різних конструкцій) потребуватиме в кожному разі окремого визначення оптимальних співвідношень кількості клітин-продуцентів та частинок ІММК у середовищі, а також оптимальної швидкості перемішування. При цьому правильне визначення цих параметрів прямо впливатиме на продуктивність використання біореакторів для одержання препаратів ІФН у виробничих умовах за такою технологією.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Nelson K. L., Geyer S. Bioreactor and process design for large-scale mammalian cell culture manufacturing // *Bioprocess Technol.* — 1991. — V.13. — P. 112–143.
2. Runstadler P. W. The importance of cell physiology to the performance of animal cell bioreactors // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 1992. — V. 665. — P. 380–390.
3. Карпов А. В., Пенчук Ю. Н., Верева С. В. Применение иммобилизованных индукторов в технологии получения природных интерферонов I типа в культурах клеток. Использование гранулярных носителей // *Биотехнология.* — 2006. — №1. — С. 30–35.
4. Пенчук Ю. М., Карпов О. В., Поводзинский В. М. та ін. Оцінка ефективності дослідної установки для одержання інтерферонів I типу // *Біотехнологія.* — 2008. — № 1. — С. 80–85.
5. Карпов О. В., Верьовка С. В., Манджос О. П. та ін. Індукція інтерферонів I типу в умовах *in vitro* за допомогою іммобілізованого комплексного інтерферогену // *Доп. НАН України.* — 2003. — №9. — С. 178–181.
6. Doyle A., Griffiths J. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.* — John Willey and Sons, 1998. — 332 p.
7. Ершов Ф. И., Новохатский А. С. Интерферон и его индукторы. — М.: Медицина, 1980. — 193с.

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК-  
ПРОДУЦЕНТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ  
ИНТЕРФЕРОНОВ I ТИПА**

*Ю. Н. Пенчук<sup>1</sup>  
А. В. Карпов<sup>1</sup>  
В. Н. Поводзинский<sup>1</sup>  
С. В. Вережка<sup>2</sup>  
З. Р. Ульберг<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> Национальный университет  
пищевых технологий, Киев

<sup>2</sup> Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев

<sup>3</sup> Институт биокolloидной химии  
им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

*E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru*

Изучали основные технологические параметры культивирования клеток-продуцентов интерферона типа I ( $\alpha/\beta$ -ИФН) в созданной авторами опытной установке с использованием в качестве индуктора молекулярного комплекса дрожжевая РНК–тилорона гидрохлорид, иммобилизованного на гранулах сферона-300 (ИММК). Опыты проводили на мононуклеарных клетках крови человека (суспензионная культура) и клетках перевиваемой линии тестикулов поросят (монослойная культура). Определены оптимальные соотношения количества клеток-продуцентов и частиц ИММК в среде культивирования и оптимальные для культивирования клеток скорости перемешивания культуральной среды для каждой из культур. Сделан вывод относительно важности точного определения указанных технологических параметров при использовании биореакторов для получения препаратов ИФН в производственных условиях с использованием ИММК.

**Ключевые слова:** интерферон, индуктор, иммобилизация, сферон, культура клеток, роллерное культивирование, мононуклеары.

**THE TECHNOLOGICAL PARAMETERS  
OF CULTIVATION CELLS WHICH  
ARE PRODUCERS OF TYPE I  
INTERFERONS**

*Yu. M. Penchuk<sup>1</sup>  
O. V. Karpov<sup>1</sup>  
V. M. Povodzinsky<sup>1</sup>  
S. V. Veriovka<sup>2</sup>  
Z. R. Ul'berg<sup>3</sup>*

National University of Food Technologies, Kyiv

<sup>2</sup>Palladin Institute of Biochemistry of National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>4</sup>Ovcharenko Institute of Biocolloid Chemistry  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

*E-mail: penchuk-yuri@yandex.ru*

The authors investigated the main technological parameters of cultivation of interferon type I ( $\alpha/\beta$ -IFN) producing cells in home-made experimental device; the yeast RNA-tilorone hydrochloride molecular complex immobilized on Sferon-300 beads (IMMC) was used as an IFN inducer. The experiments were made using human blood mononuclear cells (suspension culture) and established testicular porcine cells (monolayer culture). The authors determined the optimal producing cell quantity/IMMC beads ratios as well as the optimal cultural medium stirring velocity for each culture. There are conclusions concerning the importance of parameters mentioned above using bioreactors to obtain IFN preparations during large-scale cultivation using the IMMC.

**Key words:** interferon, inductor, immobilization, spheron, cell culture, roller cultivation, mononuclears.

УДК 616-003.811:619:636.2

# ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПАТОЛОГІЧНОГО ПРІОНА ПРИ ГУБЧАСТОПОДІБНІЙ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

В. В. Влізло<sup>1</sup>В. В. Стадник<sup>1</sup>Х. Я. Майор<sup>1</sup>П. І. Вербицький<sup>1</sup>Р. С. Стойка<sup>2</sup><sup>1</sup> Інститут біології тварин УААН, Львів<sup>2</sup> Інститут біології клітини НАН України, Львів

E-mail: stadnyk@inenbiol.com.ua

Наведено результати порівняльного дослідження молекулярних характеристик губчастоподібної енцефалопатії та губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби. Окрім загальноновизнаних відмінностей, характерних для губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби, таких як зміна молекулярної маси ізоформ патологічного пріона (PrP<sup>Sc</sup>) та утворення амілоїдоподібних фібрил, виявлено ряд нових ознак на клітинному та субклітинному рівнях. До цих ознак слід віднести накопичення PrP<sup>Sc</sup> у нейронах олівково-жовтого ядра засувки довгастого мозку та зміну характеру депонування PrP<sup>Sc</sup> із дифузного на гранулярний. Сукупність вищезазначених ознак, специфічних для губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби, спрощує процедуру диференційної діагностики трансмісивних спонгіформних енцефалопатій великої рогатої худоби.

**Ключові слова:** губчастоподібна амілоїдна енцефалопатія великої рогатої худоби, пріонні інфекції, патологічний пріон, діагностика.

Трансмісивні спонгіформні енцефалопатії (ТСЕ), або пріонні інфекції, — це група нейродегенеративних захворювань, які трапляються в жуйних, норок, оленів, котятчих та людей [1, 2]. Спричинює ТСЕ ураження організму патологічним пріоном (PrP<sup>Sc</sup>), який накопичується переважно в центральній нервовій системі (ЦНС) [1–4], трансформуючись із клітинного пріона (PrP<sup>C</sup>). PrP<sup>C</sup> експресується в багатьох органах та тканинах організму. Найвищий його рівень спостерігається у клітинах ЦНС. Вважають, що фізіологічний пріон бере участь у процесах транспортування міді і є компонентом декількох сигнальних шляхів, зокрема Функкіназного та MAP-кіназного, а також залучений до передавання сигналу при клітинній адгезії [5–8].

На сьогодні відомі штами PrP<sup>Sc</sup>, які викликають ТСЕ у тварин та людей. Наприклад, існує понад 20 штамів скрейпі овець, 2 — трансмісивної енцефалопатії норок. Уражуючи організм, вони, після різної тривалості інкубаційного періоду, спричинюють розвиток специфічних клінічних симптомів. Водночас ці пріони мають різний ступінь стійкості до оброблення протеїназами, характеризуються певним співвідношенням глікоформ

PrP<sup>Sc</sup>, що локалізуються в ділянці ураження довгастого мозку [9–13].

Дотепер вважали, що існує один штам патологічного пріона, який зумовлює губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби (ГЕ ВРХ). Однак на цей час є дані, що велика рогата худоба хворіє на ГЕ ВРХ та губчастоподібну амілоїдну енцефалопатію (ГАЕ ВРХ) [14]. Ці хвороби дуже схожі за клінічним перебігом і симптоматикою, але відрізняються за біохімічними характеристиками та локалізацією патологічного пріона. Так, у разі ГЕ ВРХ накопичення PrP<sup>Sc</sup> відбувається переважно у довгастому мозку, гіпоталамусі й таламусі, а при ГАЕ ВРХ — у нюховій бульбі, нюховому кортексі та гіпокампі [14]. Для ГАЕ ВРХ описано декілька мутацій у гені *PrP*, тоді як для ГЕ ВРХ ще не детектовано жодної мутації у відповідному гені [15]. Також для ГАЕ ВРХ є характерним утворення амілоїдоподібних фібрил, що зближує це захворювання із хворобою Крейцфельдта–Якоба (КЯХ) у людини [14,16,17].

Незважаючи на вищезазначені відмінності, диференційна діагностика цих хвороб є доволі складною, оскільки в деяких випадках (автоліз, ушкодження мозкової тканини)

окремі частини мозку, необхідні для типування ГАЕ ВРХ як різновиду GE ВРХ, важко піддаються виділенню.

Визначення штамів пріона в кожному конкретному випадку захворювання є вкрай актуальним не лише для великої рогатої худоби. Такий моніторинг дає змогу виявити нові штами PrP<sup>Sc</sup>, які можуть бути потенційно небезпечні для людини.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

**Забір та оброблення тканин.** Дослідження проводили на довгастому мозку великої рогатої худоби, віком 5–8 років. Як негативний контроль використовували довгастий мозок здорових тварин. Позитивним контролем слугувала тканина довгастого мозку тварин, хворих на GE ВРХ, що їй було надано Інститутом контролю за ветеринарними хворобами (Moedling, Австрія). Дослідний зразок від тварини, яка хворіла на ГАЕ ВРХ, одержали з Європейської референс-лабораторії з діагностики TSE (Weybridge, Велика Британія). Діагностику GE ВРХ здійснювали за допомогою люмінесцентно-імуного аналізу (Prionics LIA<sup>®</sup>). Позитивний результат підтверджувався референс-методом Prionics ChekWestern<sup>®</sup>. Після підтвердження діагнозу тканину мозку зберігали до наступних досліджень при –80 °С.

**Імуноблот-аналіз амілоїдоподібних фібрил PrP<sup>Sc</sup> [18].** Після розморожування тканину лізували у спеціальному буфері (10% -й N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенолметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, pH 7,4). Центрифугували лізат при 20 000 g та 10 °С 30 хв. Супернатант переносили в нові пробірки та центрифугували при 177 000 g і 10 °С 135 хв. Осад розчиняли у KI-HSB-розчині (1,5% -й Na-тіосульфат, 1% -й N-лаурилсаркозин, 15% -й йодид калію в 10 мМ трис-HCl, pH 7,4). Далі зразки обробляли протеїназою K у кінцевій концентрації 1 мкг/мл, 60 хв при 37 °С. Зразок нашаровували на 20% -ну сахарозу та центрифугували протягом 60 хв при 189 000 g та 10 °С. Осад ресуспендували у 40 мкл буфера Леммлі [19] (Sigma, Німеччина), після чого проводили електрофорез у 12% -му ПААГ (Invitrogen, США) та електротрансфер білків на PVDF-мембрану (Millipore, США). Для контролю трансферу та визначення відносних молекулярних мас досліджуваних білків використовували набір білкових маркерів SeaBlue Plus2 (Invitrogen, США). Після електротрансферу мембрану блокували інкубуванням

у 5% -му знежиреному молоці на ЗФРТ (0,01% -й Твін-20 на забуференому фізіологічному розчині) протягом 60 хв. Далі мембрану інкубували з моноклональними анти-PrP<sup>Sc</sup> антитілами 6H4 (Prionics, Швеція) — 1:2 000 у ЗФРТ упродовж 90 хв, поліклональними козячими антимишиними антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою (Sigma, США), — 1:5 000 у ЗФРТ протягом 30 хв. Детекцію імуних комплексів здійснювали, використовуючи комерційний розчин субстрату для лужної фосфатази — CDP-Star (Tropix, Велика Британія). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявлення плівок (Kodak, Німеччина).

**Імуноблот-аналіз глікоформ PrP<sup>Sc</sup> [20].** Після розморожування тканину лізували в десятикратному об'ємі спеціального буфера (10% -й N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенолметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилмалеїмід в 0,01 М Na-фосфатному буфері, pH 7,4). Далі зразки центрифугували при 5 200 g і 4 °С протягом 5 хв. До очищених лізатів додавали однаковий об'єм 2% -го саркозилу в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР), після чого лізати інкубували 10 хв при 37 °С. Бензоназу (Sigma, Poole, Велика Британія) та MgCl<sub>2</sub> додавали в кінцевій концентрації 50 Од/мл та 1 ммоль/л відповідно, після чого зразки інкубували 30 хв при 37 °С. До лізатів додавали розчин натрієвої солі фосфорновольфрамової кислоти (Sigma, Німеччина) у 170 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, до кінцевої концентрації 0,3%, після чого проводили преципітацію упродовж 30 хв при 37 °С. Зразки центрифугували при 20 800 g і 37 °С 30 хв. Осад ресуспендували в 0,1% -му розчині саркозилу в ЗФР та розщеплювали протеїназою K у концентрації 50 г/мл протягом 30 хв. Розщеплення зупиняли, додаючи 1 ммоль/л PefaBloc SC (Roche, Lewes, Велика Британія). Далі зразки розчиняли в буфері Леммлі [19] і проводили електрофорез з наступним імуноблот-аналізом та ECL-детекцією, як було описано вище.

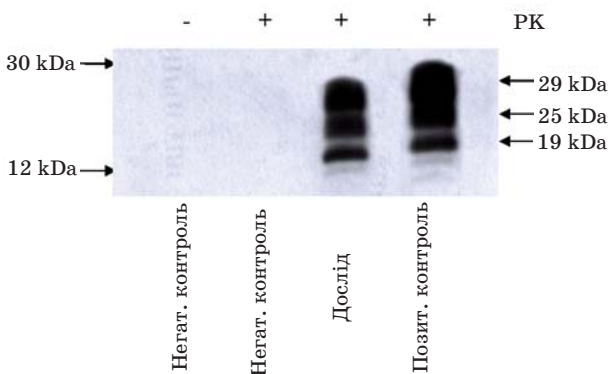
**Імуногістохімічна детекція PrP<sup>Sc</sup> [18].** Залиті в парафін зрізи тканин укладали на предметні скельця, депарафінізували в о-ксилолі та спиртах зі спадною концентрацією від 100 до 50%. Знешкоджували PrP<sup>Sc</sup> інкубацією зрізів у формаліні протягом 15 хв. Далі зрізи обробляли 0,004% -м розчином протеїнази K у забуференому фізіологічному розчині 15 хв, 37 °С. Потім зразки інкубували з моноклональними анти-PrP<sup>Sc</sup> антитілами L42 [21] — 1:200, 90 хв при 37 °С;

біотинільованими поліклональними козячими антимишиними антитілами — 1:100, протягом 30 хв при 37 °С. Наступним етапом була інкубація з АВС-комплексом (Vector, Австрія) — протягом 30 хв та хромогенним субстратом (ДАКО Cytomation, Данія). Після цього зразки фарбували гематоксиліном та аналізували за допомогою світлового мікроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для всіх штамів патологічного пріона PrP<sup>Sc</sup> характерним є наявність трьох глікоформ (ди-, моно- та деглікозильованої), молекулярні маси яких можуть коливатися в межах від 30 до 15 kDa залежно від типу захворювання. Електрофоретична рухливість глікоформ PrP<sup>Sc</sup> штамоспецифічна. Характерною ознакою при ідентифікації штаму патологічного пріона є також співвідношення між трьома глікоформами — PrP<sup>Sc</sup>, ди-, моно- та деглікозильованою, яке залежно від типу хвороби може варіювати від 70:20:10 до 20:20:60.

Під час екстракції PrP<sup>Sc</sup> фосфотунгстиковою кислотою з наступним імуноблот-аналізом було виявлено, що співвідношення глікоформ у позитивному контролі та досліді практично не змінюється, лише відзначається деяке зростання рівня деглікозильованої форми PrP<sup>Sc</sup> у дослідному зразку, що свідчить про присутність у ньому штаму патологічного пріона, відмінного від того, який спричинює GE ВРХ (рис. 1). Сам по собі цей результат не дає змоги встановити кінцевий діагноз, але свідчить про необхідність проведення додаткових досліджень.

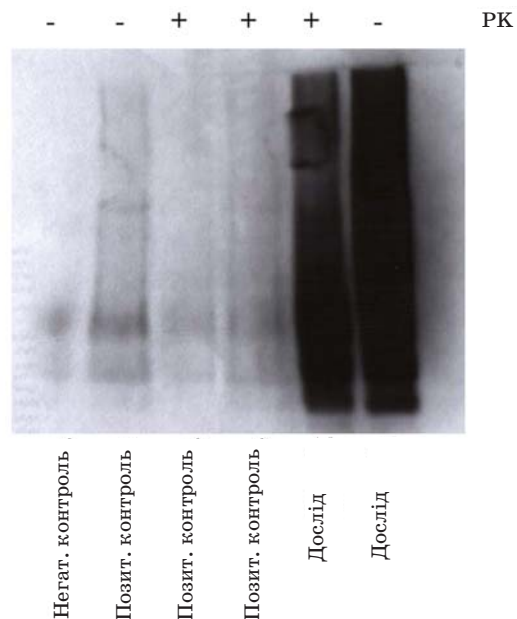


**Рис. 1.** Імуноблот-аналіз глікоформ патологічного пріона у довгастому мозку:  
РК — протеїназа К;  
негативний контроль — здорові тварини;  
позитивний контроль — тварини, хворі на GE ВРХ;  
дослід — дослідна тварина

Дослідження експресії ізоформ патологічного пріона показали, що, порівняно з GE ВРХ, де три основні форми PrP<sup>Sc</sup> мали молекулярну масу 29, 25 та 19 kDa відповідно, у дослідній тварини спостерігається збільшення електрофоретичної рухливості ди-, моно- та деглікозильованої форм PrP<sup>Sc</sup>, яка відповідала молекулярній масі 27 kDa для диглікозильованої, 23 kDa для моноглікозильованої та 17 kDa для деглікозильованої форм (рис. 1). Такий розподіл глікоформ за молекулярною масою є характерним для ГАЕ ВРХ [4].

Відомо, що характерною ознакою ГАЕ ВРХ є утворення та накопичення амілоїдоподібних фібрил патологічного пріона, що не властиво для GE ВРХ [15]. Тому для перевірки припущення про присутність у досліджуваному зразку штаму PrP<sup>Sc</sup>, здатного спричинити ГАЕ ВРХ, нами проведено дослідження вмісту амілоїдоподібних фібрил у довгастому мозку дослідної тварини. Для цього було застосовано метод ультрацентрифугування у градієнті сахарози з наступною імуноблот-детекцією.

У результаті проведених досліджень встановлено, що в дослідному зразку виявлено високу концентрацію амілоїдоподібних фібрил, тоді як у мозку тварин, хворих на GE ВРХ, були тільки сліди фібрилярного PrP<sup>Sc</sup> (рис. 2). Отже, можна зробити висновок, що дослідна тварина хворіла на ГАЕ ВРХ, нетипову форму GE ВРХ. Особливістю штаму PrP<sup>Sc</sup>, який зумовлює ГАЕ ВРХ, є підвищена



**Рис. 2.** Імуноблот-аналіз амілоїдоподібних фібрил PrP<sup>Sc</sup> у довгастому мозку (позначення аналогічно рис. 1).

електрофоретична рухливість основних ізоформ патологічного пріона та утворення амілоїдоподібних фібрил у довгастому мозку.

Для більш детального вивчення молекулярних ознак даного клінічного випадку ТСЕ було проведено імуногістохімічний аналіз довгастого мозку дослідної тварини. Встановлено, що акумуляція патологічного пріона спостерігається тільки в зоні засувки довгастого мозку, каудальніше і краніальніше від цієї зони PrP<sup>sc</sup> був відсутній. Така обмежена локалізація PrP<sup>sc</sup> є характерною практично для всіх пріонних хвороб жуйних [18], тому вона не може слугувати критерієм для диференційної діагностики ТСЕ та детекції окремих штамів патологічного пріона.

Докладніший імуногістохімічний аналіз зональної локалізації PrP<sup>sc</sup> дослідного зразка дав змогу детектувати його високий рівень в оливному ядрі, водночас у мозку тварин, хворих на ГЕ ВРХ, PrP<sup>sc</sup> виявляється тільки в дорзальному ядрі блукаючого нерва та солітарному тракті (рис. 3, А, Б), що є характерною діагностичною ознакою ГЕ ВРХ.

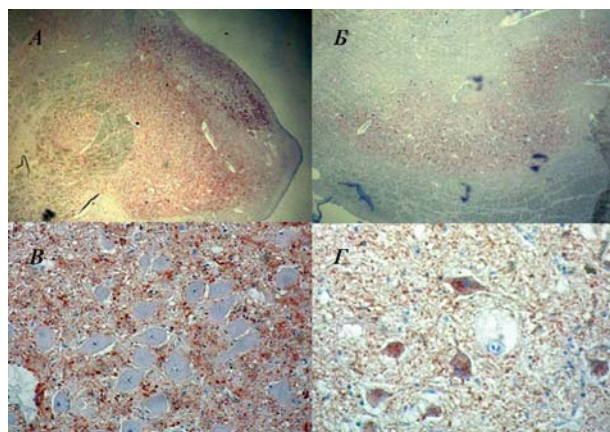


Рис. 3. Імуногістохімічний аналіз локалізації патологічного пріона в зоні засувки довгастого мозку:

- А — позитивний контроль — тварина, хвора на ГЕ ВРХ, показано зону дорзального ядра блукаючого нерва та солітарний тракт.  $\times 25$ ;
- Б — дослідна тварина, зона оливного ядра.  $\times 40$ ;
- В — позитивний контроль, зона дорзального ядра блукаючого нерва.  $\times 200$ ;
- Г — дослідна тварина, зона оливного ядра.  $\times 400$

Існують відмінності в субклітинній локалізації PrP<sup>sc</sup>. Так, при ГЕ ВРХ він детектується переважно в нейрофілі (позаклітинному середовищі), тимчасом як у дослідному зразку спостерігається транслокація PrP<sup>sc</sup> у середину нейронів оливного ядра (рис. 3, В, Г). Окрім цього, змінюється характер депонування патологічного пріона з дифузного на гранулярний (рис. 4). Це свідчить про

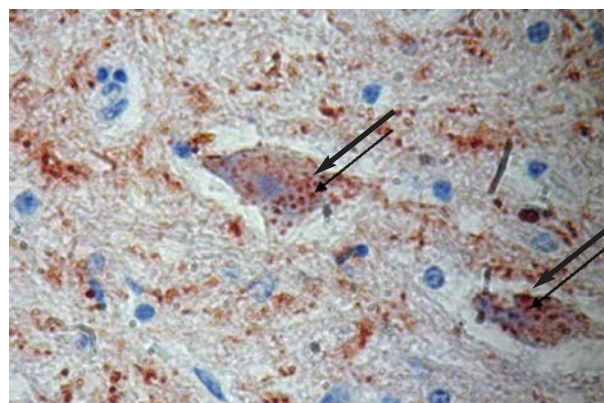


Рис. 4. Імуногістохімічний аналіз характеру депонування PrP<sup>sc</sup> у нейронах оливного ядра довгастого мозку дослідної тварини.  $\times 1000$  (стрілками позначено типові гранули PrP<sup>sc</sup>, характерні для амілоїдоподібних фібрил)

утворення амілоїдоподібних структур усередині клітини та є ще одним підтвердженням того, що даний випадок слід віднести до ГАЕ ВРХ.

Спираючись на вищенаведені результати, ми пропонуємо для диференційної діагностики штамів патологічного пріона використовувати наведені в таблиці молекулярні ознаки, що є характерними для ГЕ ВРХ та ГАЕ ВРХ.

Окрім загальновідомих ознак ГАЕ ВРХ, таких як зміна співвідношення глікоформ патологічного пріона, підвищення електрофоретичної рухливості трьох основних глікоформ PrP<sup>sc</sup> та утворення амілоїдоподібних фібрил, нами було виявлено ряд нових ознак, зокрема акумуляцію патологічного пріона в оливному ядрі довгастого мозку, інтранейрональний тип накопичення PrP<sup>sc</sup> в оливному ядрі та переважну гранулярність агрегатів патологічного пріона. Сукупність цих ознак дозволяє визначити штам патологічного пріона та диференціювати ГЕ ВРХ від ГАЕ ВРХ.

Таким чином, підтверджено існування нетипової форми ГЕ ВРХ — губчастоподібної амілоїдної енцефалопатії великої рогатої худоби (ГАЕ ВРХ). Встановлено ряд молекулярних та морфологічних ознак, за якими можна проводити діагностику ГАЕ ВРХ. На основі даних ознак запропоновано спрощену процедуру діагностики ГАЕ ВРХ.

Колектив авторів висловлює щирі вдячність Dr. Joachim Weikel, Dr. Hermann Schildorfer та Dr. Zoltan Bago (Institute for Veterinary Disease Control, Moedling, Австрія) за всебічну допомогу у виконанні роботи. Робота здійснювалася за фінансової підтримки ROTARY-Club (Moedling, Австрія).

Молекулярні ознаки, які можна використовувати для диференційної діагностики  
ГЕ ВРХ та ГАЕ ВРХ

Ознака	ГЕ ВРХ	ГАЕ ВРХ
Співвідношення глікоформ PrP <sup>Sc</sup> *	Переважає диглікозильована форма, моно- і деглікозильована форми — у мінімальній кількості	Зростання частки деглікозильованої форми
Електрофоретична рухливість глікоформ PrP <sup>Sc</sup> *	Стандартна (29, 25 та 19 kDa)	Підвищена (27, 23 та 17 kDa)
Кількість ізоформ PrP <sup>Sc</sup> *	Три основні (29, 25 та 19 kDa)	Три основні (27, 23 та 17 kDa)
Наявність амілоїдоподібних фібрил у довгастому мозку	Відсутні або слідові кількості	Велика кількість
Акумуляція PrP <sup>Sc</sup> у довгастому мозку	Переважно у дорзальному ядрі блукаючого нерва та в солітарному тракті	Значна концентрація PrP <sup>Sc</sup> в оливному ядрі
Локалізація PrP <sup>Sc</sup> у тканині довгастого мозку	Нейрофілярна (позаклітинна) локалізація	Інтранейрональна (внутрішньоклітинна) локалізація
Тип депонування PrP <sup>Sc</sup>	Переважно дифузний	Гранулярний

\* На підставі характеристик, наведених у [4].

## ЛІТЕРАТУРА

1. Prusiner S. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie // *Science*. — 1982. — N 216. — P.136–144.
2. Prusiner S. Prions // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1998. — N 95. — P.13363–13383.
3. Castilla J., Saa P., Hetz C. et al. In vitro generation of infectious scrapie prions // *Cell*. — 2005. — N 121. — P.195–206.
4. Kocisko D., Come J., Priola S. et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein // *Nature*. — 1994. — N 370. — P.419–420.
5. Gaeta A., Hider R. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy // *Br. J. Pharmacol.* — 2005. — N 146. — P. 1041–1059.
6. Martinsa V., Lindenb R., Pradoc M. et al. Cellular prion protein: on the road for functions // *FEBS Letters*. — 2002. — N 512. — P. 25–28.
7. Milhavel O., McMahon H., Rachidi W. et al. Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* — 2000. — V.97, N 25. — P. 13937–13942.
8. Shyng S., Lehmann S., Moulder K. et al. Sulfated Glycans Stimulate Endocytosis of the Cellular Isoform of the Prion Protein, PrP<sup>C</sup>, in Cultured Cells // *J. of Biol. Chem.* — 1995. — V.270. — N 50. — P. 30221–30229.
9. Bessen R., Marsh R. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent // *J. Virol.* — 1992. — N 66. — P. 2096–2101.
10. Bessen R., Marsh R. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy // *Ibid.* — 1994. — N 68. — P. 7859–7868.
11. Collinge J., Sidle K., Meads J. et al. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD // *Nature*. — 1996. — N 383. — P.685–690.
12. Hill A., Sidle K., Joiner S. et al. Molecular screening of sheep for bovine spongiform encephalopathy // *Neurosci. Lett.* — 1998. — N 255. — P.159–162.
13. Parchi P., Castellani R., Capellari S. et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease // *Ann. Neurol.* — 1996. — N 39. — P.767–778.
14. Casalone C., Zanusso G., Acutis P. et al. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2004. — N 101. — P.3065–3070.
15. Capobianco R., Casalone C., Suardi S. et al. Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE? // *PLoS Pathog.* — 2007. — V.3, N 3. — P. 0001–0008.
16. Biacabe A., Laplanche J., Ryder S. et al. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases // *EMBO J.* — 2004. — N 5. — P.10–14.
17. Watts J., Balachandran A., Westaway D. The expanding universe of prion diseases // *PLoS Pathog.* — 2006. — V. 2, N 3. — P. 0152–0163.

18. *OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. — 5th Ed. — V. 1, 2. — World Organization for Animal Health, 2004. — 498 p.
19. *Laemmly U., Beguin F., Gujer-Kellenberg G.* A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation // *J. Mol. Biol.* — 1970. — V.47, N1. — P. 69–85.
20. *Peden A., Ritchie D., Head M. et al.* Detection and Localization of PrP<sup>Sc</sup> in the Skeletal Muscle of Patients with Variant, Iatrogenic, and Sporadic Forms of Creutzfeldt-Jakob Disease // *Amer. J. Pathol.* — 2006. — V. 168, N 3. — P.927–935.
21. *Vorberg I., Buschmann A., Harmeyer S. et al.* A Novel Epitope for the Specific Detection of Exogenous Prion Proteins in Transgenic Mice and Transfected Murine Cell Lines Source // *Virology.* — 1999. — V.255, N 1. — P.26–31.

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ  
ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРИОНА  
ПРИ ГУБЧАТООБРАЗНОЙ  
ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО  
РОГАТОГО СКОТА**

*В. В. Влизло<sup>1</sup>  
В. В. Стадник<sup>1</sup>  
Х. Я. Майор<sup>1</sup>  
П. И. Вербицкий<sup>1</sup>  
Р. С. Стойка<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Институт биологии животных УААН, Львов

<sup>2</sup> Институт биологии клеток НАН Украины,  
Львов

*E-mail: stadnyk@inenbiol.com.ua*

Приведены результаты сравнительного исследования молекулярных характеристик губчатоподобной энцефалопатии и губчатой амилоидной энцефалопатии крупного рогатого скота. Кроме общепринятых отличий, характерных для губчатой амилоидной энцефалопатии крупного рогатого скота, таких как изменение молекулярной массы изоформ патологического приона и образования амилоидоподобных фибрилл, обнаружен ряд новых признаков на клеточном и субклеточном уровнях. К этим признакам следует отнести накопление патологического приона (PrP<sup>Sc</sup>) в нейронах оливарного ядра продолговатого мозга и изменение характера аккумуляции PrP<sup>Sc</sup> с диффузного на гранулярный. Совокупность этих признаков, специфических для губчатой амилоидной энцефалопатии крупного рогатого скота, упрощает процедуру дифференциальной диагностики трансмиссивных спонгиозных энцефалопатий крупного рогатого скота.

**Ключевые слова:** губчатоподобная энцефалопатия крупного рогатого скота, прионные инфекции, патологический прион, диагностика.

**IDENTIFICATION OF PATHOLOGICAL  
PRION IN CATTLE WITH BOVINE  
SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY**

*V. V. Vlizlo<sup>1</sup>  
V. V. Stadnyk<sup>1</sup>  
Kh. Ya. Mayor<sup>1</sup>  
P. I. Verbytskii<sup>1</sup>  
R. S. Stoika<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Animal Biology, UAAS, Lviv  
<sup>2</sup> Institute of Cell Biology of National Academy  
of Sciences of Ukraine, Lviv

*E-mail: stadnyk@inenbiol.com.ua*

The article presents a comparative study of the molecular characteristics of spongiform cattle encephalopathy and spongiform amyloid-like cattle encephalopathy. Except general differences typical to spongiform amyloid-like cattle encephalopathy, such as change in the molecular mass of pathological prion isoform and amyloid-like fibrils formation, several new characteristics on cellular and subcellular level were discovered. These characteristics are as following: accumulation of the pathological prion (PrP<sup>Sc</sup>) in olivary nucleus neurons of the medulla oblongata and change in deposition nature of PrP<sup>Sc</sup> from diffuse to granular. All these characteristics specific for spongiform amyloid-like cattle encephalopathy simplifies a procedure of differential diagnostics of the transmissible spongiform cattle encephalopathy.

**Key words:** spongiform cattle encephalopathy, prion infections, pathological prion, diagnostics.



УДК 631.811.98

# ОСОБЕННОСТИ ДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ ЗАРОДЫШЕЙ СЕМЯН В РАННЕМ ПОСТЭМБРИОГЕНЕЗЕ

**В. А. Цыганкова**<sup>1</sup> <sup>1</sup>Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев  
**Л. И. Мусатенко**<sup>2</sup> *E-mail: sponom @ukr.net*  
**Л. А. Галкина**<sup>1</sup>  
**А. П. Галкин**<sup>1</sup> <sup>2</sup>Институт ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины, Киев  
**С. П. Пономаренко**<sup>1</sup>  
**К. М. Сытник**<sup>2</sup>  
**Д. Е. Икин**<sup>3</sup> <sup>3</sup>Тихоокеанская северо-западная лаборатория, США  
*E-mail: david.eakin @pnl.gov*

С помощью  $\alpha$ -аманитина — специфического ингибитора синтеза мРНК и актиномицина D, блокирующего преимущественно синтез рРНК, показано, что до завершения лаг-фазы прорастания семян фасоли (18 ч) на фоне подавления синтеза мРНК и рРНК после их набухания (с 6 ч) включаются и активизируются во времени в клетках зародышевой оси процессы биосинтеза белка. На основании этого сделан вывод о том, что в инициацию биосинтеза белков в самый ранний период постэмбриогенеза вовлекаются отложенные в запас в позднем эмбриогенезе транскрипты мРНК и рРНК, а перед проклевыванием корешка (после 18 ч) в биосинтез белка включаются и новосинтезированные мРНК и рРНК.

С помощью афидиколина, избирательно подавляющего репликативный синтез ДНК, установлено, что возрастающие потребности в продуктах экспрессии генов (белках) на стартовых стадиях постэмбриогенеза обеспечиваются амплификацией и структурных, и рибосомных генов. Стимулирующее действие регуляторов роста растений связано не с дополнительным увеличением числа копий генов, а с активацией генов путем усиления функций промоторных и энхансерных регуляторных последовательностей генов через активацию трансфакторов белковой природы.

Сформулирована концепция действия экзогенных регуляторов роста растений на генетическом уровне.

**Ключевые слова:** зародышевая ось, синтез РНК, амплификация генов, регуляторы роста.

Широкое применение в биотехнологии растений физиологически активных соединений требует изучения механизмов их действия с целью эффективного использования без нанесения ущерба организму растений и окружающей среде.

В своих исследованиях мы акцентируем внимание на изучении влияния регуляторов роста на генетические процессы в клетках зародышей семян, поскольку важно знать, в каком направлении под влиянием физиологически активных соединений пойдет развитие организма растений (ускоренном нормальном или же с отклонениями) начиная с раннего этапа его онтогенеза (постэмбриогенеза).

В наших работах [1, 2] было установлено, что уже на начальной стадии постэмбриогенеза, в первые сутки прорастания семян фасоли (т. е. в начале темновой фазы — фазы набухания и выхода семян из состояния физиологического покоя) в клетках зародышевой оси запускается и быстро возрастает во

времени синтез РНК. Имеются также сведения об активации в раннем постэмбриогенезе в зародышах растений синтеза не только РНК, но и белков, и ДНК [3].

Примерно в те же годы другими авторами на семенах различных растений было установлено, что в ранний предростовой постэмбриональный период биосинтезу мРНК предшествует биосинтез белка, причем его скорость и спектр синтезированных белков находятся в прямой зависимости от гидратационных способностей зародышей (оводненности семян) и продолжительности жизни резервных мРНК. В этих работах был сделан вывод об участии в инициации белкового синтеза преобразованных (отложенных в запас в позднем эмбриогенезе) мРНК. Вопрос о соотносительной роли резервных и новосинтезированных рРНК в инициации биосинтеза белка в раннем постэмбриогенезе по сравнению с мРНК менее изучен. Приведенные кратко данные подробно рассмотрены в содержательной монографии Н. В. Обручевой

[4]. Структуре и физиологической роли запасных мРНК посвящена также книга М. А. Айтхожина и Б. К. Исакова [5].

Однако неизученным остался вопрос: происходит ли наблюдаемое, резко нарастающее во времени, увеличение синтезов мРНК и рРНК в ранний период постэмбриогенеза вследствие усиления активности генов или же за счет увеличения числа их копий путем амплификации? Основанием для постановки такого вопроса служат данные об обнаружении синтеза ДНК в зародышах растений в раннем постэмбриогенезе [3], амплификации структурных и рибосомных генов в разных эукариотических организмах на ранних этапах их развития [6–10], а также тот факт, что по крайней мере в первые сутки прорастания семян фасоли рост зародышевой оси осуществляется не за счет клеточного деления (т.е. увеличения числа клеток, связанного с репликацией ДНК), а вследствие растяжения клеток (удлинения) ее гипокотыля, при котором репликативный синтез ДНК не происходит [1, 2, 11].

Основываясь на результатах наших исследований и данных литературы, в настоящей работе мы поставили цель провести комплекс исследований соотносительной роли предсуществующих и новосинтезированных мРНК и рРНК в процессах биосинтеза белка на ранних этапах постэмбриогенеза, а также механизмов увеличения во времени уровня экспрессии генов в процессе роста и развития зародышей и, используя аналогичные методические подходы, попытаться определить, каким образом регуляторы роста действуют на генетическом уровне, ускоряя рост и развитие зародышевого организма.

### Материалы и методы

В опытах использовали семена спаржевой фасоли сорта Белозерная, анатомо-морфологическая и физиолого-биохимическая характеристики роста и развития зародышевой оси которых нами были подробно изучены [6]. В качестве «инструментов» для изучения поставленных вопросов в работе применяли:

1.  $\alpha$ -Аманитин ( $\alpha$ -Ам) фирмы Sigma Aldrich (США), избирательно выключающий экстрадрюшковый синтез РНК (т.е. синтез мРНК) [12,13, 14];

2. Актиномицин D (AD) фирмы Sigma Aldrich (США), выключающий при малых концентрациях преимущественно синтез РНК в ядрышках (т.е. синтез рРНК), но не ингибирующий синтез и выход в цитоплазму мРНК [15];

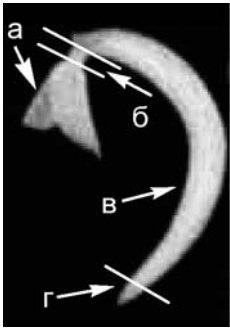
3. Афидиколин (АФ) фирмы Fluka (Швейцария), избирательно выключающий катализируемый ДНК-полимеразой  $\alpha$ -репликативный синтез ДНК, но не затрагивающий процесса амплификации ДНК [16;17].

Простерилизованные раствором  $KMnO_4$  семена фасоли проращивали на водных растворах 0,02% -го  $\alpha$ -Ам либо 0,028% -го AD (опыты), а контроль — на дистиллированной воде. При изучении синтезов РНК и белков в среды также добавляли соответственно  $^3H$ -уридин и  $C^{14}$ -лейцин (фирмы «Изотоп», Россия). В серии опытов по гибридизации ДНК-РНК в среду вносили  $Na_2H^{33}PO_4$  (фирмы Amersham, Великобритания) с высокой удельной активностью (370 MBq/ml). С целью увеличения проницаемости мембран клеток для проникновения в них указанных ингибиторов в средах для инкубации присутствовал также 0,5% -й диметилсульфоксид. Каждый опыт проведен в трех повторениях.

После инкубации отпрепарированные от семядолей зародышевые оси использовали для выделения из них препаратов цитоплазматической РНК, суммарных белков и ядерной ДНК. Разделение цитоплазматической РНК на поли-А<sup>+</sup>РНК (т.е. мРНК) и поли-А РНК (т.е. в основном рРНК) проводили соответственно описанному ранее способу [11]. Выделенные препараты ДНК из зародышевых осей сухих семян (контроль) и из семян через разные сроки их проращивания (опыт) предварительно денатурировали, фиксировали на нитроцеллюлозных фильтрах и подвергали гибридизации (дот-блоттингу) с насыщенными в растворе концентрациями  $^{33}P$ -РНК (гибридизационными зондами мРНК и рРНК), как описано в руководствах [18,19]. Радиоактивность проб определяли по [1,2].

### Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлена увеличенная в раз- мере зародышевая ось семени фасоли, в которой различают (сверху вниз) первичные лист, эпикотиль, гипокотиль (стебель) и корень. Согласно нашим исследованиям, преобладающую часть зародышевой оси составляет гипокотиль (3,5–4,0 мм), размер корневой меристемы с корневым чехликом — 1,5 мм. Формирование проростка при прорастании длится около трех суток. Период набухания семени — около 6 ч (для изолированной из семени оси около 1 ч), что связано с интенсивностью поглощения воды: больше всего ее поглощает гипокотиль (53%), меньше — семядоли (46%), первичные листья



**Рис. 1. Стрoение зарoдышевой оси семян фасоли:**  
*а* — первичный лист, *б* — эпикотиль, *в* — первичный стебель (гипокотиль); *г* — зарoдышевый корень

(47%) и зарoдышевый корень (39%). Дальнейшие 12–13 ч (лаг-фаза) масса и длина зарoдыша почти не изменяются. Следующий период характеризуется увеличением размеров и массы зарoдыша и завершается проклевыванием семени (выход корешка за пределы семенной оболочки). Но если первый этап, когда поступление воды происходит по физическим законам, свойствен как живым, так и нежизнеспособным семенам, то третья фаза присуща только живым и связана с общим возрастанием метаболизма семени.

Следует подчеркнуть, что проклевывание семени (24 ч) происходит вследствие растяжения клеток гипокотыля, которое начинается в его базальной части — у корня и постепенно перемещается к семядольному узлу. При этом клетки не растягиваются сразу до их окончательной длины, а наблюдается несколько периодов наиболее энергичного роста. Спецификой роста гипокотыля является ограниченный, заканчивающийся к 8-м сут после замачивания рост, обеспечивающий выполнение основной функции — выноса семядолей со стеблевой почечкой из почвы.

В корневой меристеме первые митозы обнаруживаются, как правило, в уже проклюнувшихся семенах, т. е. рост корня начинается спустя примерно сутки (через 25–28 ч) после замачивания практически одновременной инициацией деления и растяжения. В первые 24 ч длина клеток и их количество в ряду не изменяются, а размеры зон (меристема — 0,5 мм и растяжение — 1 мм) и соответственно размер корня (около 1,5 мм), свойственные сухому семени, остаются постоянными. Через 32 ч длина зон меристемы и растяжения увеличивается вдвое. Зона зрелых клеток формируется примерно через 36 ч и составляет 0,8 мм. К 44- и 72-му ч прорастания стабилизируется размер соответственно зон меристемы (1,4 мм) и растяжения (5 мм).

В стеблевой меристеме клетки начинают делиться лишь через 36–40 ч, а в листе — че-

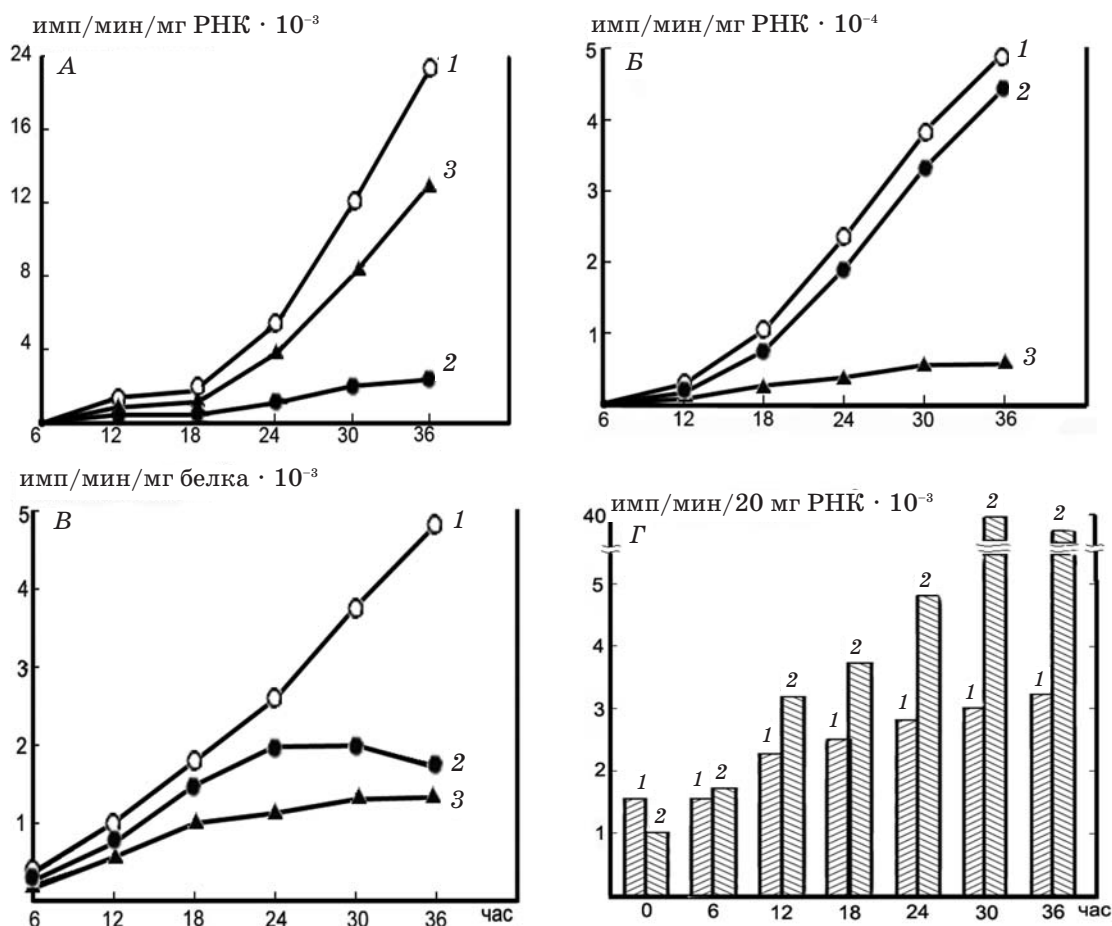
рез 48 ч. Установлена определенная последовательность инициации ростовых процессов, отражающая особенности развития отдельных органов зарoдышевой оси: гипокотиль, зарoдышевый корень, лист.

Приведенные результаты послужили основой для осмысливания полученных нами данных по синтезу РНК, белков и ДНК.

Из рис. 2, А явствует, что практически до 12 ч после начала прорастания семян фасоли в клетках зарoдышевой оси не происходит синтез мРНК, который начинается только с 18 ч и непрерывно нарастает вплоть до 36 ч инкубации (рис. 2, А, кривая 1).  $\alpha$ -Ам вызывает практически полное подавление синтеза мРНК на протяжении всего периода инкубации семян растений (рис. 2, А, кривая 2), что вполне согласуется с данными других авторов о полном подавлении синтеза мРНК  $\alpha$ -Ам и в клетках других организмов [12, 13]. В то же время нами обнаружено частичное, видимо неспецифическое, ингибирование синтеза мРНК AD (рис. 2, А, кривая 3), хотя по данным литературы [15] он избирательно ингибирует только синтез рРНК и не затрагивает (при используемой нами его концентрации) синтеза и перехода в цитоплазму мРНК. Все-таки, очевидно, AD обладает меньшей избирательной специфичностью по сравнению с  $\alpha$ -Ам как ингибитор синтеза какого-либо одного класса РНК.

Подобная картина временной кинетики синтеза мРНК получена нами при изучении синтеза рРНК (рис. 2, Б): до 12 ч отсутствие синтеза, включение синтеза к 18 ч и дальнейший резко возрастающий подъем синтеза до 36 ч инкубации семян (рис. 2, Б, кривая 1). По чувствительности синтеза рРНК к ингибиторам  $\alpha$ -Ам и AD наблюдается противоположная картина по сравнению с мРНК: слабое, очевидно также неспецифическое, ингибирование  $\alpha$ -Ам мРНК (рис. 2 Б, кривая 2) и почти полное ингибирование AD синтеза рРНК (рис. 2, Б, кривая 3).

В свете полученных нами данных по синтезу мРНК и рРНК весьма информативным представляется сопоставление этих данных с данными по синтезу белка (рис. 2, В). Уже с 6 ч в клетках зарoдышевой оси начинается синтез белка и через каждые 6 ч (12 ч, 18 ч и т. д.) уровень биосинтеза белка возрастает примерно вдвое (рис. 2, В, кривая 1), притом, что фактически только с 18 ч начинается синтез как мРНК, так и рРНК. Интересно и то, что до этого времени практически не наблюдается влияние на синтез белка ни  $\alpha$ -Ам, ни AD (рис. 2, В, кривые 2 и 3), т. е. синтез белка в этот промежуток времени происходит,



**Рис. 2. Кинетика включения  $^3\text{H}$ -уридина в поли-А+РНК (А), поли-А-РНК (Б) и  $^{14}\text{C}$ -лейцина в белки (В) клеток зародышевой оси семян фасоли:**  
 1 — контроль; 2 — в присутствии  $\alpha$ -Ам; 3 — в присутствии АД;  
 дот-блоттинг (Г) препаратов  $^{33}\text{P}$ -поли-А+РНК (столбик 1) и  $^{33}\text{P}$ -поли-А-РНК (столбик 2), полученных из зародышевой оси через 24 ч после начала прорастания семян фасоли, с препаратами ДНК, выделенными из зародышевых осей соответственно из сухих семян (контроль) и через 6; 12; 18; 24; 30 и 36 ч после начала прорастания семян (опыт)

вероятно, на предсуществующих, запасенных мРНК и рРНК). Этот вывод согласуется и с данными о том, что существуют короткоживущие и долгоживущие мРНК, период полужизни которых исчисляется от нескольких минут до нескольких часов и даже суток [7, 14, 20–22].

Судя по замедлению дальнейшего подъема после 18 ч биосинтеза белка по отношению к контролю под влиянием  $\alpha$ -Ам и АД, можно констатировать, что по крайней мере с 24 ч и далее в синтезе белка участвуют уже и новосинтезированные мРНК и рРНК, синтез которых подавляется соответственно  $\alpha$ -Ам и АД. Следует также отметить, что длительное торможение биосинтеза белка, опосредованное угнетением синтезов мРНК и рРНК, приводит к аномалиям в росте и развитии зародышевой оси, что проявляется в замедлении роста гипокотила примерно в 4 раза.

Таким образом, данные наших исследований четко показали, что в ранний переходный период от состояния покоя к активному росту и развитию при прорастании семени для инициации ростовых процессов используются отложенные в запас в позднем эмбриогенезе специфические продукты экспрессии генов (транскрипты в виде мРНК и рРНК), необходимые для экстренной наработки какого-то количества специфических белков, без которых невозможно было бы дальнейшее развитие (приведение в действие) в клетках генетической программы роста и развития зародышевого организма.

Синтез и отложение в запас в клетках зародышевой оси этих транскриптов при вхождении семян в состояние физиологического покоя в эмбриогенезе осуществляются, очевидно, с целью обеспечения начальных этапов генетического контроля выхода зародышей из «спящего» в физиологически

активное состояние и поступательного развертывания независимой уже от генетических факторов материнского организма автономной генетической программы постэмбрионального роста и развития зародышей с постепенным формированием из них растений со специализированными высококодифференцированными клетками, органами и тканями.

С помощью  $\alpha$ -Ам исследован также соотносительный вклад пула запасенных и ново-синтезированных мРНК в прорастание семян *Arabidopsis* и соответственно в процессы роста и развития зародышей этих растений [14]. Показано, что даже при избыточных дозах  $\alpha$ -Ам происходит выход корешка наружу из семени, но дальнейший рост и развитие зародышей прекращаются. Сделан вывод о том, что для дальнейшего развития зародыша необходима транскрипция мРНК *de novo*. Однако, прорастание семян полностью блокируется при подавлении биосинтеза белка ингибитором трансляции циклогексимидом, что доказывает, по мнению авторов, участие пула запасенных мРНК в белковом синтезе прорастающих семян и в реализации процесса выхода корешка наружу из семени. Полученные в этих исследованиях данные позволили авторам сделать следующие обобщения:

- в регуляции скорости прорастания принимают участие регуляторные факторы, синтез которых *de novo* подавляется  $\alpha$ -Ам;

- наблюдаемое 15-кратное снижение чувствительности к гибберелловой кислоте прорастающих семян под влиянием  $\alpha$ -Ам свидетельствует о приоритетной роли этого фитогормона в процессах прорастания;

- наряду с запасенными белками в зародышах в эмбриогенезе необходимы синтез *de novo* некоторых ферментов, вовлекаемых в мобилизацию резервов, возобновление метаболической активности после физиологического покоя и обеспечение адаптивных реакций зародышей к стрессовым факторам (например, к водному стрессу);

- прорастание семян запускается с помощью генетической программы, заложенной при созревании, составляющими которой являются как использование в процессах инициации прорастания отложенных в запас при созревании мРНК и белков, так и последовательная активация генов синтеза *de novo* аналогичных и других белков, обеспечивающих процесс прорастания семян растений.

При этом все еще малоизученными остаются механизмы инициации экспрессии генов и наблюдаемое быстрое возрастание

уровня экспрессии генов в зародышах растений в ранний постэмбриональный период. По мере быстрого истощения резервов (отложенных в запас транскриптов узкого назначения — для запуска первоначального синтеза белков) включаются генетически запрограммированные механизмы последующей быстрой наработки нового или дополнительного массива продуктов экспрессии генов. К числу таких механизмов относят усиление активности генов и увеличение числа их копий (амплификацию). Как показано [7–10], последний механизм часто используется в период развития зародышей многих эукариотических организмов.

По аналогии с этим мы предположили, что на начальном этапе развития зародышевой оси фасоли, когда еще не включены репликативные процессы, относящиеся к процессам увеличения численности клеток и направляемые на создание дифференцированных и специализированных клеток и органов, возможно, используется механизм амплификации генов для экстренной наработки продуктов экспрессии генов. К тому же на начальном этапе постэмбриогенеза рост зародышевой оси, как уже отмечалось, происходит не за счет увеличения числа клеток, а вследствие растяжения клеток гипокотыля [1,2]. Для проверки этого предположения мы использовали афидиколин, который выключает репликативный синтез (если таковой имеется) и не влияет на процесс амплификации генов [16,17].

Рис. 2, Г свидетельствует о резком возрастании во времени в геномной ДНК последовательностей, гибридизирующих с  $^{33}\text{P}$ -гибридизационными зондами мРНК и, особенно, с рРНК (столбики 1, 2). Афидиколин, по крайней мере до 30 ч, не снижает увеличения генетического материала, гибридизирующегося с продуктами транскрипции (во всех случаях для гибридизационного анализа использовали  $^{33}\text{P}$ -транскрипты, выделенные из зародышевой оси на 24-й ч прорастания семян). И только спустя 30 ч после начала прорастания семян, судя по диаграмме, включаются механизмы репликации ДНК, ингибируемые афидиколином. В противоположность этому, ДНК, полученная из исходных сухих семян (как видно из рис. 2, Г) содержит относительно меньше копий последовательностей, гибридизирующихся с  $^{33}\text{P}$ -РНК-зондами.

Эти опыты четко показали, что в зародышах растений, как и в других эукариотических зародышах, на начальных этапах развития используются механизмы амплификации

структурных и еще в большем масштабе рибосомальных генов для интенсивной работы конечных продуктов экспрессии генов (белков).

В проведенной работе нам также удалось показать, что стимуляторы роста растений (в частности, ивин или зеастимулин) ускоряют ростовые процессы не дополнительным увеличением числа копий генов в зародышах растений (данные не приводятся), а их активацией (таблица). Стимуляторы роста способствуют максимальному раскрытию генетического потенциала клеток растений [23]. Это происходит, видимо, посредством усиления активности промоторных и энхансерных (усиливающих уровень и скорость транскрипции) последовательностей ДНК за счет ускорения формирования в промоторах растений инициаторных транскрипционных комплексов (рис. 3) из элементов регуляторных областей генов, РНК-полимеразы и трансфакторов белковой природы. Такие комплексы состоят из более чем 70 белков (поэтому их называют транскриптомой по аналогии с рибосомой) [24].

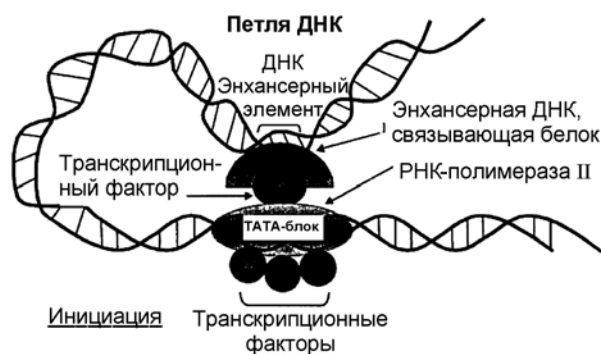


Рис. 3. Схематическое изображение инициаторного транскрипционного комплекса [24]

Таким образом, регуляторы роста растений не затрагивают базовые генетические процессы (амплификацию генов), а, ускоряя процессы экспрессии генов, сокращают сроки их протекания.

Несмотря на достигнутые успехи в использовании регуляторов роста в растениеводстве, строгие научно обоснованные нормативы или «рецепты» применения их не предложены из-за ограниченности знаний о механизмах их действия (влиянии каждого из соединений на метаболизм клеток на протяжении всего периода онтогенеза растений, особенностях действия соединения в зависимости от его концентрации и условий выращивания, влияния регуляторов на наследственные свойства растений и др.).

**Включение <sup>3</sup>H-уридина в суммарную РНК цитоплазмы клеток зародышевой оси в динамике прорастания семян фасоли без (контроль) и со стимулятором роста ивином (имп/мин/мгРНК)**

Время, ч	Контроль	Опыт (ивин)
6	230 ± 1,8	260 ± 2,4
12	350 ± 2,6	480 ± 4,2
18	1 500 ± 7,4	2 200 ± 8,6
24	3 500 ± 12,3	7 200 ± 15,4
30	8 150 ± 16,4	18 300 ± 18,9
36	16 400 ± 20,6	39 380 ± 26,1

В контексте перечисленных общих направлений определения регуляторных свойств соединений первостепенным является изучение следующих вопросов:

– Действуют ли экзогенные регуляторы роста (природные либо синтетические), а также другие химические соединения непосредственно на функции генов или же через каких-то посредников?

– Каким образом синтетические химические соединения, с совершенно несвойственной для фитогормонов структурой (например, триамелон [25]), действуют порой так же, как и природные соединения (по интегральным конечным результатам)?

– Почему во многих случаях синтетические соединения оказывают выраженный физиологический эффект при значительно более низких концентрациях (некоторые даже при концентрации  $10^{-12}$  М), чем природные соединения (от  $10^{-5}$  до  $10^{-8}$  М)?

В поисках ответов на эти вопросы мы сочли целесообразным ниже представить некоторые литературные и наши данные, касающиеся этих проблем, а также сложившиеся в науке представления о принципах формирования в клетках растений ответных реакций на различные воздействия и их механизмах.

Несомненно, к числу фактов, связанных с выяснением указанных вопросов, можно отнести обнаружение в клетках растений резкого увеличения концентрации эндогенного пула фитогормонов и изменения соотношения фитогормонов под влиянием экзогенных регуляторов роста (природных или синтетических) [26].

С этими данными интерферируют и результаты наших исследований, показывающие, что:

– присутствие в среде регуляторов роста является мощным импульсом развития у растений вегетативных органов (рис. 4, А, Б, В), что можно объяснить индуцированием

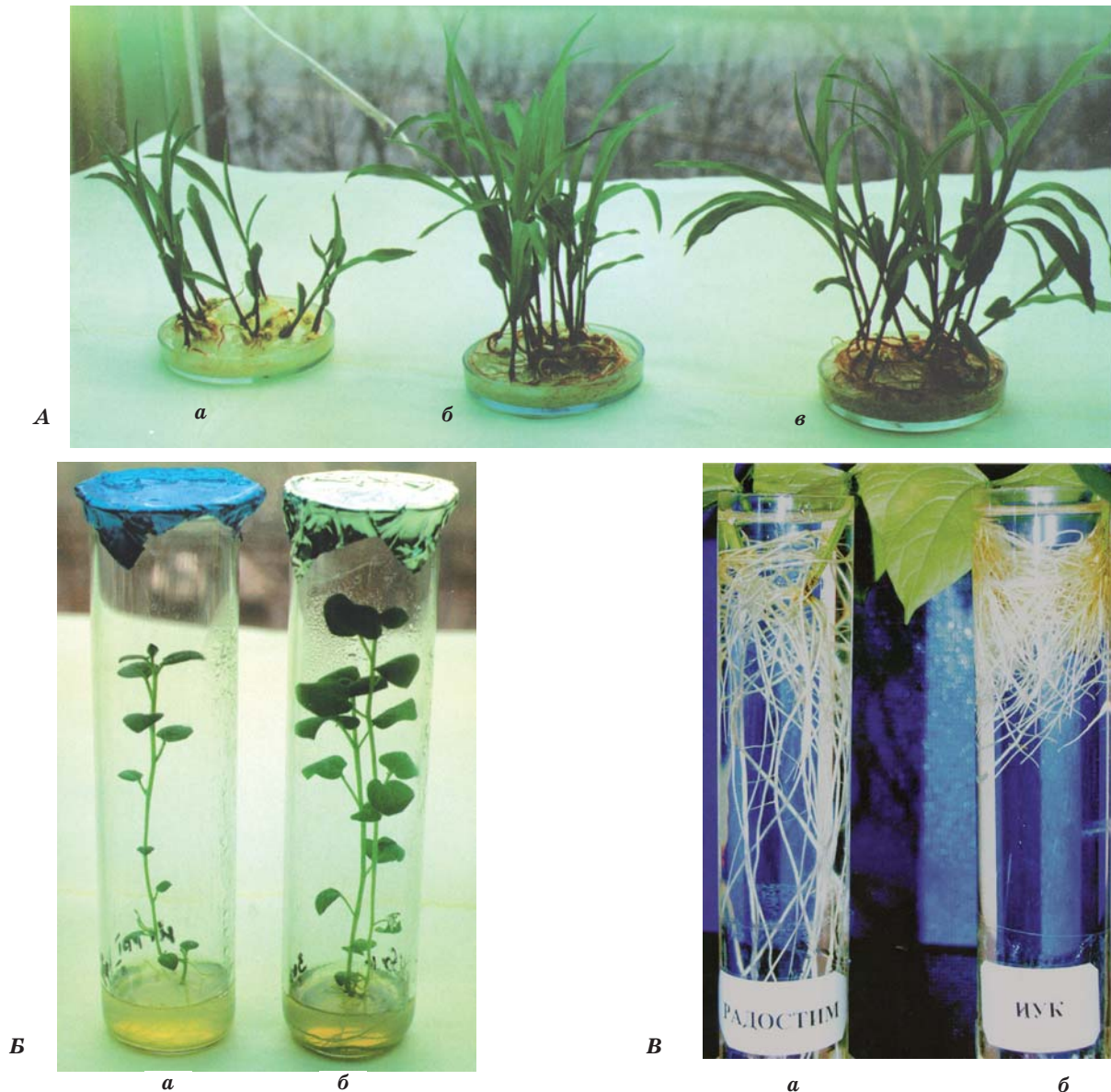


Рис. 4. Влияние (А) зеастимулина на рост проростков кукурузы: контроль, вода (а); зеастимулин —  $10^{-8}$ М (б);  $10^{-10}$ М (в); (Б) потейтина на рост растений-регенерантов картофеля на средах: с кинетином (контроль, а) и с потейтином вместо кинетина (опыт, б); (В) радостима  $10^{-10}$ М (а) и индолилуксусной кислоты  $10^{-10}$  М (в) на укоренение черешков листа фасоли

экзогенными регуляторами синтеза фитогормонов, контролирующих эти процессы;

- действие синтетических регуляторов на рост гипокотыля у декапитированных (т.е. лишенных верхушечной части) зародышевых осей семян растения отсутствует [27];

- стимулирующего действия регуляторов роста на одноклеточные организмы (бактерии, дрожжи), где регуляция роста иная, чем у растений, нами не обнаружено;

- в работах с культурами клеток и тканей растений *in vitro* в питательных средах для индуцирования тех или иных морфоген-

етических процессов можно с успехом использовать вместо одного или даже двух фитогормонов какое-либо одно отобранное в процессе скрининга химическое соединение [28].

В предлагаемой ниже концепции приведенные наши и литературные данные в цепочке механизма действия регуляторов роста растений мы рассматриваем как определяющие. В краткой форме суть этой концепции сводится к следующему: регулятор(ы) роста растений активирует(ют) трансфакторный(ые) белок(ки) по принципу аллостерического эффекта (проявлению сродства структуры

регулятора роста к структуре или части структуры активного центра белковой молекулы трансфактора). В результате изменения пространственной структуры (а возможно и опосредованной каталитическим действием регулятора роста ферментативной модификации трансфактора) происходит активация трансфактора(ов), что приводит к ускорению формирования инициаторного транскрипционного комплекса в регуляторной части (промоторе) гена(ов) синтеза фитогормона(ов) и далее по цепочке активации генов синтеза и других фитогормонов, образующих специфический на действие регулятора баланс фитогормонов. В свою очередь, этот комплекс фитогормонов включает или активирует гены синтеза структурных или функциональных белков либо одновременно тех и других в случае стимуляции регулятором(ами) сбалансированного роста и развития организма растений.

В пользу описанной последовательности приведенных механизмов реализации сигналов регулятора(ов) роста свидетельствуют следующие факты:

- у растений именно фитогормоны являются посредниками между сигналами внешней (или внутриклеточной) среды и генами в формировании клетками соответствующих ответных реакций;

- факты увеличения концентрации и изменения баланса эндогенного комплекса фитогормонов под влиянием экзогенных регуляторов приведены нами выше;

- механизм опосредованной (через специфические трансфакторы белковой природы) регуляции экспрессии генов фитогормонами четко доказан в работах многих авторов [29, 30]. В данном случае структура фитогормонов и структура трансфакторов в полной мере подходят друг другу как «ключ к замку»;

- по аналогии с приведенными аргументами логично предположить, что сигналы регуляторов роста, как и другие внешние или внутриклеточные сигналы опосредуют свое действие через регуляторную систему фитогормонов.

Далее мы попытаемся дать более подробное обоснование некоторых положений сформулированной нами концепции. Как уже отмечалось, у растений существует двойственный контроль их роста и развития: генетический контроль и фитогормональная регуляция, тесно взаимодействующие между собой. Гены программируют синтез фитогормонов, а фитогормоны по принципу обратных связей регулируют ак-

тивность генов синтеза структурных и функциональных белков. Вследствие активации одного из генов синтеза какого-либо фитогормона происходит по цепочке включение и других генов синтеза этого же фитогормона, а затем параллельно (синхронно) генов синтеза и иных фитогормонов, совместно образующих баланс фитогормонов, которые запускают каскад структурных генов, формирующих ответные реакции/процессы на то или иное воздействие [26]. Причем такой баланс фитогормонов является кратковременным. Однако продолжительное присутствие в окружающей среде активатора генов синтеза фитогормонов (регулятора роста) может стабилизировать их баланс, в результате чего фитогормоны будут продолжать действовать в том же составе под влиянием регулятора роста (подтверждением этого является обнаруженное нами резкое замедление «старения» каллусов при их пассировании и длительном культивировании на средах с синтетическими регуляторами). Длительная задержка в смене баланса (ансамбля) фитогормонов стимулятором роста может привести к ускоренному увеличению размера растения (из-за избыточного синтеза структурных элементов клетки, обеспечивающих быстрый рост вегетативных органов) и запаздыванию или подавлению включения генов синтеза специфических (специализированных) белков, участвующих в закладке и формировании генеративных органов растения.

Учитывая то, что могут образовываться и смешанные пулы фитогормонов в ответ не на один, а на два или несколько сигналов (например, на температуру и регулятор роста), весьма сложно определить истинный пул фитогормонов на то или иное воздействие. К этому следует добавить, что трудно также определить, какой из фитогормонов подвергается деструкции: находившийся до формирования пула в ответ на сигнал или же после реализации сигнала.

Известно, что все внешние воздействия либо сигналы (свет, темнота, тепло, холод, затопление, засуха, химические вещества, включая и регуляторы роста, засоление почв, загрязнение ионами тяжелых металлов и др.) воспринимаются вначале рецепторами или эффекторами клеток, и что система рецепторов располагается как внутри их, так и на поверхности мембран. Рецепторы представляют собой сложные комплексы, содержащие многомерные белки. Очевидно, что узнавание рецепторами химических структур может быть специфичным, отчас-



ти специфичным или неспецифичным (т. е. вследствие образования случайных связей между химическим соединением и какой-то частью многомерной структуры рецептора). Другая возможность действия регуляторов — формирование комплекса между ними и активной частью молекул белка — трансфактора, минуя рецептор, благодаря случайно проявленному сродству (аллостерическому эффекту) какой-то части структуры трансфактора и регулятора роста (структура ДНК инертна для взаимодействия с регулятором роста), в результате чего меняется пространственная организация трансфактора, что, вероятно, и приводит к его/их активации и соответственно ускорению формирования инициаторных транскрипционных комплексов в промоторах генов синтеза фитогормонов. По нашему мнению, все поступающие извне сигналы клеток опосредуют свое действие именно через изменение пула (т.е. синтеза) соответствующих фитогормонов, а полученный биологический эффект достигается уже посредством включения либо выключения или же активации фитогормонами структурных генов, кодирующих функциональные белки, отвечающие за тот или иной процесс либо ответ в клетках (например, за ускорение роста и развития растений).

Само по себе попавшее в клетку чужеродное химическое соединение вряд ли сможет найти вслепую специфические точки приложения для формирования специфического ответа, являющегося продуктом цепи последовательных реакций, программируемых не одним, а многими генами. Специфическое последовательное включение одних генов и выключение других «под силу» только фитогормонам, которые узнают регулируемые ими гены «в лицо» и знают, когда и в какой последовательности их запускать, а какие выключать (схема опосредованной через фитогормоны регуляции активности генов в зародышах растений представлена нами ранее [27]).

Другой аспект этой проблемы заключается в том, что отобранный в процессе скрининга для определенного периода развития химический регулятор, в отличие от фитогормонов, вряд ли будет обладать такой же активностью на другом этапе развития. Действительно, как мы уже отмечали, инициация ростового процесса происходит за счет отложенных в запас мРНК и рРНК и последующего включения ограниченного количества ранних генов синтеза подобных классов РНК и синтеза на них ранних белков, участвующих в запуске и разворачивании генетической программы роста и развития растений.

Эти ранние (возможно примитивные) гены, очевидно, содержат относительно простые регуляторные последовательности и небольшой круг «обслуживающих» их трансфакторов (т. е. вероятно у этих генов короткие промоторные и энхансерные последовательности, а может, отсутствуют энхансеры), которые воспринимают ограниченное количество регуляторных сигналов и экспрессируют ограниченное количество ранних, видимо в основном регуляторных, белков, которые обеспечивают выключение ранних генов и включение средних генов уже с более сложной разветвленной системой регуляции.

Таким образом, каждый период роста и развития растений характеризуется включением генов со все более сложными областями регуляции и соответственно взаимодействующих со все большим количеством трансфакторов, обеспечивающих регуляцию самих генов, межгенные взаимодействия, процессы дифференциации и специализации клеток, межклеточные и межорганные взаимодействия. К тому же все гены и их регуляторные последовательности отличаются первичной и пространственной структурой. Ясно, что отобранный при скрининге и случайно оказавшийся «подходящим» регулятор роста на первом этапе развития вряд ли может оказаться таким же эффективным на последующих этапах онтогенеза (за исключением, очевидно, регуляции генов синтеза каких-то общих для всех этапов развития структурных белков). Вероятно, идеальным было бы проводить дробный скрининг химических соединений через короткие интервалы в процессе роста и развития. Известно, что именно такой подход используется в работах с культурами клеток и тканей растений *in vitro*. В этих работах для индуцирования тех или иных морфогенетических процессов экспланты растений последовательно переносят с одной среды на другую с измененным составом стимуляторов морфогенеза (природных или синтетических) [31]. С рассмотренных позиций можно объяснить и обнаруженную нами разную сортовую чувствительность сельскохозяйственных растений к регуляторам роста. Причиной этого, видимо, является микрогетерогенность по генам в семействах «многосемейственных» генов у сортов растений (т.е. небольшие различия в нуклеотидных последовательностях и их регуляторных областях) и, соответственно, в структуре трансфакторов, обеспечивающих функции генов, проявляющих и не проявляющих сродство к регулятору роста.

С высокой избирательностью действия регуляторов роста на активность генов можно связать и зависимость биологического эффекта от концентрации физиологически активных соединений [32, 33]. Превышение их концентрации (передозировка) может привести к несвоевременному (одновременному) включению средних или поздних генов, неспецифическому угнетению регуляторами функции окружающих генов, оказавшихся мишенями негативного влияния на них регуляторов роста (ингибирования в этих генах энхансерных и активации сайленсерных последовательностей ДНК — ингибиторов транскрипции), нарушению межклеточных и органных взаимодействий, что может явиться причиной несбалансированного роста и развития зародышевого организма, который определяется преобладанием работающих генов с позитивным ответом над негативным, либо наоборот, на действие регулятора роста. Опыт показывает, что использование композиций регуляторов роста обеспечивает сбалансированное развитие растения.

Полученные данные и представления авторов о механизмах действия, а также описанные закономерности имеют важное значение для биотехнологии, в частности, для активации «нужных» и выключения «ненужных» генов при синтезе необходимых физиологически активных соединений.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Сьтник К. М., Мусатенко Л. И., Пушкарев В. М. и др. Исследование синтеза РНК в органах зародышевой оси прорастающих семян фасоли // Укр. ботан. журн. — 1982. — Т. 39, №3. — С. 104–111.
2. Мусатенко Л. И., Галкин А. П., Пушкарев В. М., Сьтник К. М. Изучение начальных стадий экспрессии генома в первичных органах зародышевой оси в течение созревания и прорастания семян фасоли // Геном растений: структура и экспрессия. — Уфа: Башкирское Отделение АН СССР, 1983. — С. 154–161.
3. Heun A. N. J. Molecular basis of auxin-regulated extension growth and role of dextranase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1981. — V. 78, N11. — P. 6608–6612.
4. Obroucheva N. V. Seed Germination: A Guide to the Early Stages. — Backhuys Publishers: Leiden, 1999. — 158 p.
5. Айтхожин М. А., Искаков Б. К. Информосомы растений. — Алма-Ата: Наука, 1982. — С. 41–48.
6. Мусатенко Л. И. Рост и метаболизм зародышевых органов растений: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — К., 1985. — 52 с.
7. Кафиани К. А., Костомарова А. А. Информационные макромолекулы в раннем развитии животных. — М.: Наука, 1978. — 336 с.
8. Stark G. R. Gene amplification. // Ann. Rev. Biochem. — 1984. — V. 53. — P. 447–491.
9. Гилберт С. Биология развития. — М.: Мир, 1994. — Т. 2. — 236 с.
10. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. — М.: Мир, 1998. — Т. 2. — 392 с.
11. Tsygankova V. A., Zayets V. N., Galkina L. A. et al. An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracils // Biopolimeri i Kletka. — 1998. — V. 14, N5. — P. 438–448.
12. Blair G. R., Dommasch M. Nuclear DNA-dependent RNA polymerases of Ehrlich ascites tumor cells: two discrete  $\alpha$ -amanitin sensitive forms. Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1972. — V. 49, N 4. — P. 877–883.
13. Hastie N. D., Mahy B. W. J. Effects of  $\alpha$ -amanitin in vivo on RNA polymerase activity of cultured chick embryo fibroblast cell nuclei: resistance of ribosome RNA synthesis to the drug. // FEBS Lett. — 1973. — V. 32, N 1. — P. 95–99.
14. Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I, et al. The Effect of  $\alpha$ -Amanitin on the Arabidopsis Seed Proteome Highlights the Distinct Roles of Stored and Neosynthesized mRNAs during Germination // Plant Physiology. — 2004. — V. 134, N3. — P. 1598–1613.
15. Perry R. P. and Kelley D. E. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D. Characteristic dose-response of different RNA species. // J.Cell.Physiol. — 1970. — V. 76, N 2. — P. 127–140.
16. Sala F., Parisi B., Burroni D. et al. Specific and reversible in the alpha-like DNA polymerase in plant cells. — FEBS Lett. — 1980. — V. 117 (1). — P. 93–98.
17. Arabshahi L., Brown N., Khan N., Wight G. Inhibition of DNA polymerase alpha by aphidicolin // Nucleic Acids Res. — 1998. — V. 16 (11). — P. 5107–5113.
18. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. — М.: Мир, 1998. — Т. 1. — 375 с.
19. Маниатис Т., Фриг Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
20. Гайцхоки В. С. Информационные РНК клеток животных. — М.: Медицина, 1980. — 200 с.
21. Газарян К. Г., Тарантул В. З. Геном эукариот. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. — 272 с.
22. Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология. — Мир, 2002. — Т. 3. — 451 с.
23. Кухарь В. П., Карабанов Ю. В., Павленко А. Д. и др. Новый регулятор роста — Ивин //

- Физиологически активные соединения. — 1986. — №18. — С. 3–14.
24. Potenza C., Aleman L., Sengupta-Goplan C. Invited Review: Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation // *In Vitro Cell. Dev. Biol.* — 2004. — Plant 40. — P. 1–22.
25. Galkina L. A., Tsygankova V. A., Synytsa A. D. Triamelon — a new effective inductor of organogenesis in plant tissue culture in vitro // *Журн. орг. фарм. хімії.* — 2006. — Т. 4, вип.2 (14). — С. 78 — 80.
26. Куранов П. Б. Гормональный баланс растений. Методы его изучения и регулирования: Дис. ... докт. биол. наук. — М., 1996. — 275 с.
27. Tsygankova V. A., Zayets V. N., Galkina L. A., Blume Y. B. The phytohormone-mediated action of the synthetic regulators on cell extension growth in higher plants // *Biopolymers and cell.* — 1999. — V. 15. — P. 432–441.
28. Tsygankova V. A., Blume Ya. B. Screening and peculiarity of the biological action of synthetic plant growth regulators // *Ibid.* — 1997. — V. 13, N 6. — P. 484–492.
29. Кулаева О. Н., Прокопцева О. С. Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов. // *Биохимия.* — 2004. — Т. 69, №3. — С. 293–310.
30. Галкин А. П., Лешина Л. Г., Медведева Т. В. и др. Регуляторные области промоторов генов растений и белки — регуляторы промоторной активности // *Биополимеры и клетка.* — 2004. — Т. 20, №5. — С. 363–379.
31. Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация семейства пасленовых. — К.: Наук. думка, 1985. — 130 с.
32. Ашмарин И. П., Лелекова Т. В., Санжиева Л. Ц. Об эффективности ультрамалых доз и концентраций биологически активных соединений // *Известия Росс. АН. Серия биол.* — 1992. — № 4. — С. 531–536.
33. Пономаренко С. П. Изучение регуляторных механизмов клетки — путь к управлению качеством продукции в растениеводстве // *Зб. наук. праць Уманського держ. агр. ун-ту. Спец. випуск: Біол. науки та проблеми рослинництва.* — Умань, 2003. — С. 15–19.

**ОСОБЛИВОСТІ ДІЇ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ  
НА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ  
У КЛІТИНАХ ЗАРОДКІВ НАСІННЯ  
В РАНЬОМУ ПОСТЕМБРИОГЕНЕЗІ**

В. А. Циганкова<sup>1</sup>  
Л. І. Мусатенко<sup>2</sup>  
Л. О. Галкіна<sup>1</sup>  
А. П. Галкін<sup>1</sup>  
С. П. Пономаренко<sup>1</sup>  
К. М. Ситник<sup>2</sup>  
Д. Е. Ікін<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії  
НАН України, Київ  
*E-mail: sponom @ukr.net*

<sup>2</sup>Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН  
України, Київ

<sup>3</sup>Тихоокеанська північно-західна лабораторія,  
США

*E-mail: david.eakin @pnl.gov*

За допомогою  $\alpha$ -аманітину — специфічного інгібітору синтезу мРНК і AD, що блокує переважно синтез рРНК, показано, що до завершення лаг-фази проростання насіння квасолі (18 год) на тлі пригнічення синтезу мРНК і рРНК, після їх набухання (із 6-ї год), включаються й активізуються у часі в клітинах зародкової

**THE PECULIARITY OF GROWTH  
REGULATOR ACTION ON GENE  
EXPRESSION IN CELL OF EMBRYO OF  
SEEDS IN EARLY POSTEMBRYOGENESIS**

V. A. Tsygankova<sup>1</sup>  
L. I. Musatenko<sup>2</sup>  
L. O. Galkina<sup>1</sup>  
A. P. Galkin<sup>1</sup>  
S. P. Ponomarenko<sup>1</sup>  
K. M. Sytnik<sup>2</sup>  
D. E. Eakin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

*E-mail: sponom @ukr.net*

<sup>2</sup>Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>3</sup>Pacific Northwest National Laboratory, USA

*E-mail: david.eakin @pnl.gov*

$\alpha$ -Amanitin (a specific inhibitor of mRNA synthesis) and Actinomycin D (that blocks primarily rRNA synthesis) were used to inhibit mRNA and rRNA synthesis in sprouting bean seeds. It was demonstrated that prior to completion of the bean seed germination lag-phase (18 hours) with inhibited mRNA and rRNA synthesis following seed upswelling (after 6 hours),

осі процеси біосинтезу білка. На цій підставі нами зроблено висновок, що в ініціації біосинтезу білків у найраніший період постембріогенезу беруть участь відкладені в запас у пізньому ембріогенезі транскрипти мРНК і рРНК, а вже після 18-ї год у біосинтез білка включаються й новосинтезовані мРНК і рРНК.

За допомогою афідиколіну, що вибірково пригнічує реплікативний синтез ДНК, встановлено, що зростаючі потреби в продуктах експресії генів (білках) на стартових стадіях постембріогенезу забезпечуються ампліфікацією і структурних, і рибосомних генів. Стимулювальна дія регуляторів росту рослин пов'язана не з додатковим збільшенням числа копій генів, а з активацією генів шляхом посилення функцій промоторних і енансерних регуляторних послідовностей генів, через активацію трансфакторів білкової природи.

Сформульовано концепцію щодо механізмів дії екзогенних регуляторів росту рослин на генетичному рівні.

**Ключові слова:** зародкова вісь, синтез РНК, ампліфікація генів, регулятори росту.

protein biosynthesis processes are triggered and their duration actively increases in embryonic axis cells. Based on the above, we came to the conclusion that during the earliest stage of postembryogenesis, mRNA and rRNA transcripts stocked during late embryogenesis are involved in the initiation of protein biosynthesis; and newly synthesized mRNA and rRNA are also involved in the biosynthesis before root emergence (after 18 hours).

Aphidicolin that selectively suppresses DNA replication helped to determine that increasing needs in gene expression products (proteins) at early stages of postembryogenesis are satisfied by amplification of both structural and ribosomal genes. Stimulating effect of plant growth regulators is not related to additional amount of gene copies, but rather to gene activation through intensification of promoter and enhancer functions of gene regulatory sequences via activation of protein transactors.

The concept of exogenous plant growth regulators behavior at genetic level has been formulated.

**Key words:** embryonic axis, RNA synthesis, gene amplification, growth regulators.

УДК 573.086.83.002.56

## СУЧАСНІ ПІДХОДИ ДО КОНТРОЛЮ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ДІЮЧИХ КОМПОНЕНТІВ КОМБІНОВАНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Диль О. Д.<sup>1</sup>  
Виноградова К. Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
<sup>2</sup>Лабораторія з контролю якості лікарських засобів ТОВ «Міжна-  
родна об'єднана лабораторна група», Україна, Київ

Мінченко О. Г.<sup>3</sup>

<sup>3</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

*E-mail: bizoshka@yandex.ru*

Важливою умовою контролю якості комбінованих лікарських препаратів з різними діючими речовинами є ідентифікація цих активних компонентів та визначення їх кількості, а також виявлення і аналіз домішок. На основі високоефективної рідинної хроматографії розроблено ефективний метод контролю якості комбінованого лікарського препарату, діючими компонентами якого є леводопа та карбідоба, що мають подібну хімічну структуру і вміст яких у препараті різняться на порядок. Метод внесено в аналітичну нормативну документацію для проведення контролю у процесі виробництва готових форм препарату та вивчення його стабільності під час зберігання.

**Ключові слова:** високоефективна рідинна хроматографія, леводопа, карбідоба, контроль якості.

Для лікування порушень обміну речовин в організмі людини виробляється велика кількість різноманітних фармакологічних препаратів. Останнім часом дедалі ширше застосовують комбіновані лікарські засоби, в яких поєднується дія декількох компонентів з метою підвищення ефективності їхньої дії, а також засвоєння їх організмом. Виготовлення комбінованих, багатокомпонентних лікарських засобів є складним процесом і потребує різноманітних фармакологічних, технологічних та інших досліджень [1].

На цей час широкого застосування набули лікарські препарати, основу яких становлять природні амінокислоти та їх синтетичні аналоги. Саме ці компоненти і зумовлюють високу біологічну активність таких лікарських препаратів.

Досить ефективним препаратом, що його широко використовують у терапії хвороби Паркінсона є комбінований препарат, активними компонентами якого є синтетичні похідні тирозину. Одним із них є леводопа — аналог дофаміну, що являє собою (2S)-2-аміно-3-(3,4-дигідроксифеніл)-пропанову кислоту. Другим компонентом є (-)-L- $\alpha$ -гідразіно- $\alpha$ -метил- $\beta$ -(3,4-діоксифеніл)-пропіонова кислота або карбідоба, яка справляє інгібуючу дію на декарбоксилазу дофаміну [2,3].

Надзвичайно важливою умовою контролю якості комбінованих лікарських препаратів з різними діючими речовинами є ідентифікація активних компонентів та визначення їх кількості, а також виявлення і аналіз домішок.

Досить часто для контролю кількості активних компонентів комбінованих лікарських препаратів неможливо застосувати традиційні методи кількісного та якісного контролю (титрування, фотометрію та ін.) у зв'язку з подібністю хімічної структури діючих речовин цих препаратів. Тому для вирішення цієї проблеми доцільно застосувати нові, більш чутливі методи аналізу, зокрема високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) [4,5].

Метою роботи було розробити ефективний метод контролю якості комбінованого лікарського препарату, компонентами якого є леводопа та карбідоба.

### Метод аналізу леводопи та карбідопи в комбінованому лікарському препараті

Однією з найпоширеніших лікарських форм у сучасній фармакопеї є таблетки. Перелік параметрів, за якими здійснюється контроль цієї лікарської форми, та вимоги до них описані у фармакопеях усіх країн.

Незважаючи на те, що кількість описаних методів надзвичайно велика, при створенні нової продукції щоразу постає питання стосовно розроблення методів контролю безпосередньо для даного лікарського засобу. Це передусім пов'язано як з особливостями складу препарату та технології його виготовлення, так і з можливостями лабораторій, що контролюватимуть процес виробництва та якість готової продукції [6–8].

Обов'язковими параметрами для контролю якості таблеток є: опис, ідентифікація, визначення середньої маси та її однорідність, наявність домішок, розпадання, розчинення, визначення вологості, однорідність дозування, кількісний вміст та мікробіологічна чистота. Залежно від особливостей готового лікарського засобу цей набір параметрів може варіювати з вилученням або додаванням деяких тестів [8–10].

Завдання нашого дослідження полягало в розробленні методів для проведення тестів: «Кількісне визначення», «Однорідність дозування», «Розчинення» та «Супровідні домішки». Беручи до уваги той факт, що діючих компонентів у препараті два: леводопа та карбідоба (з концентраціями, які різняться на порядок), потрібно було розробити такий метод контролю, за яким можна оцінити кількісний вміст кожного із цих компонентів за різних умов. Для цього препарату окрім тесту «Кількісне визначення» необхідно було ввести в аналітичну нормативну документацію (АНД) розділ «Однорідність дозування», що пов'язано з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ) для таблеток із вмістом діючої речовини менше 50 мг. Такою речовиною у препараті є карбідоба. Вміст діючої речовини слід перевіряти не тільки у зразку розтертих таблеток, а й безпосередньо в окремій таблетці (на 10 або 30 одиницях дозованої форми) [8, 11].

Контроль якості таблеток передбачає обов'язкове виконання тесту «Розчинення». Для цього проводять кількісне визначення діючих речовин, які можуть вивільнитись у середовище розчинення в разі використання специфічного обладнання. Цей тест, з одного боку, імітує поведінку препарату в шлунково-кишковому тракті і є показником того, що пацієнт дійсно отримає необхідну речовину після приймання таблетки, а з другого — є підтвердженням відтворення процесу виробництва від серії до серії. Розроблення тесту «Розчинення» потребує встановлення багатьох параметрів та вимог залежно від умов проведення тесту та вимог до

ступеня розчинності (об'єм розчинника, швидкість обертання лопаті чи кошика, час розчинення та регламентований процент вивільнення). У даному разі розробляючи метод розчинення застосовували параметри, зазначені як базові у ДФУ. Оскільки препарату не притаманне пролонговане вивільнення, а також, ґрунтуючись на даних його фармакодинаміки, час розчинення становив 30 хв при швидкості обертання лопаті 50 об/хв. Для більш раціонального проведення контролю якості розраховували концентрацію, яка б збігалася з концентрацією для кількісного визначення діючих речовин та однорідності дозування. Об'єм середовища розчинення становив 750 мл. Провівши тестування розчинення за таких умов на таблетках дослідної серії, визначили, що цей тест є придатним і ступінь вивільнення перевищує 95%, а це вкладається у фармакопейні норми (75–115%). Після проведення серії таких тестів у специфікацію заклали норматив із вужчими межами з метою гарантування якості — не менше 80% діючої речовини має вивільнитись у розчин за 30 хв. Встановлення більш жорстких параметрів не суперечить регламенту фармакопеї [8, 12].

З метою оптимізації робочого часу та зменшення економічних витрат для проведення трьох тестів — «Кількісне визначення», «Однорідність дозування» та «Розчинення» — слід було розробити метод, умови якого гарантують одержання вірогідних результатів для кожного тесту. Для вирішення цього завдання беззаперечним є використання методу високоефективної рідинної хроматографії. Вимоги, що їх належало виконати при цьому, такі: умови проведення хроматографії мають гарантувати чітке розділення леводопи, карбідопи та тирозину, який є продуктом розщеплення перших двох компонентів; на визначення вмісту діючих речовин не повинна впливати присутність інших продуктів розщеплення цих речовин, які можуть утворюватись у процесі кислотного або лужного гідролізу, під впливом окисників та/або ультрафіолетового опромінювання (фотоліз) [13].

Для виконання тесту «Кількісне визначення» використано відомості про контроль якості леводопи та карбідопи, описані в чинних фармакопеях для кожної із цих сполук, і дані, що їх було надано виробниками субстанцій. У процесі вивчення спектрів діючих речовин у 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти виявлена можливість дослідження обох діючих речовин при довжині хвилі 280 нм (рис. 1).

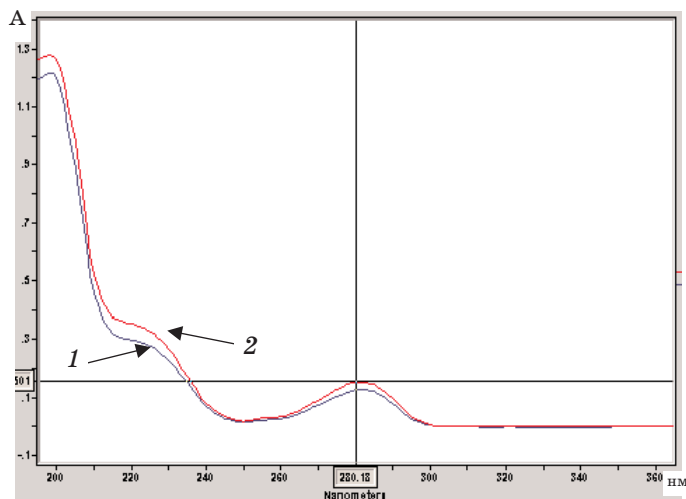


Рис. 1. Спектри поглинання розчинів леводопа та карбідопа в 0,1 М розчині НСІ:  
1 — леводопа; 2 — карбідопа

Дослідження впливу концентрованих розчинів хлористоводневої кислоти, гідроксиду натрію, пероксиду водню та ультрафіолетового випромінювання на леводопу та карбідопу показало, що лужний гідроліз може призвести до повного розщеплення леводопа. Враховуючи той факт, що для виконання тесту «Розчинення» як імітатор шлункового середовища використовували 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти, можна було спрогнозувати, що для виконання хроматографії рН рухомої фази буде нейтральним або кислим. Розпочавши підбір умов із традиційного співвідношення 50:50 органічного та неорганічного компонентів, одержали результати, які не дозволили розділити леводопу та карбідопу. Зменшення кількості органічного компонента рухомої фази сприяло більшому поділу

між піками досліджуваних речовин, однак навіть за 10%-го вмісту органічного компонента не було досягнуто повного розділення піків леводопа та тирозину (рис. 2) [13,14].

Повне вилучення органічного компонента дало змогу досягти коефіцієнта розділення між основними компонентами 24 і відділити пік основної домішки — тирозину від піка леводопа (до коефіцієнта 6). Це уможливило відділення усіх інших домішок від основних компонентів. Дослідження впливу рН рухомої фази на розділення діючих речовин показало, що найкращих результатів можна досягти при рН 2,8. Це пов'язано з тим, що досліджувані компоненти препарату більш стійкі при кислому значенні рН. Зміна швидкості потоку рухомої фази не впливала на ступінь їх розділення, але, як можна побачити з табл. 1, втрачається якість показників кількості теоретичних тарілок (КТТ) та фактора симетрії піка (ФС), оскільки при низьких швидкостях тривалість аналізу була надто велика [14].

Перевіряючи стабільність досліджуваних розчинів та здійснюючи хроматографічний аналіз протягом доби, встановили, що для карбідопа змінюється симетрія піка та час утримування. Для вирішення цієї проблеми до рухомої фази було додано розчин іонпарного реагенту. З даних, наведених у табл. 2, можна зробити висновок, що це помітно стабілізує фактор симетрії та час утримування і, як наслідок, кількість теоретичних тарілок упродовж довготривалого аналізу. Концентрацію іонпарного реагенту в досліджуваних розчинах було обрано рівною 1 мМ у зв'язку з тим, що збільшення його концентрації не змінювало хроматографічні характеристики досліджуваних речовин [15].

Особливе значення для розроблення методу кількісного визначення діючих речовин

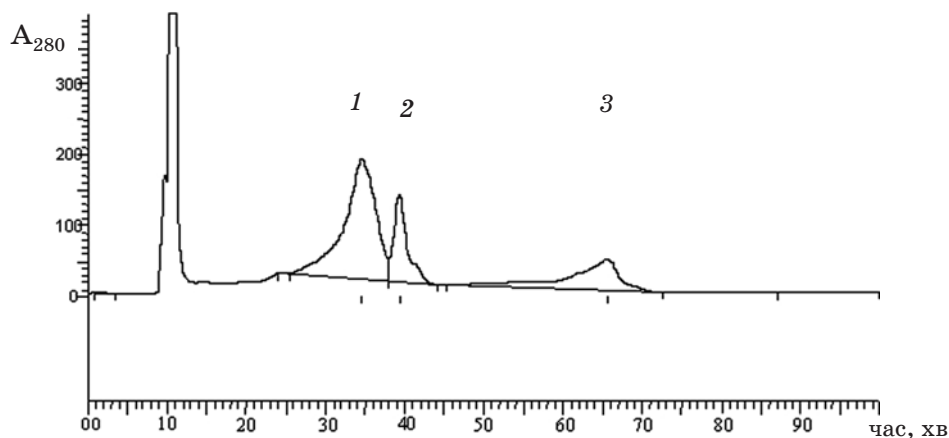


Рис. 2. Профіль елюції розчину, який містить стандартні зразки леводопа, карбідопа та тирозину за 10%-го вмісту органічного компонента в рухомій фазі:  
1 — леводопа; 2 — тирозин; 3 — карбідопа

Таблиця 1. Вплив швидкості рухомої фази на показники хроматографічного аналізу

Швидкість, мл/хв	Леводопа			Карбідоба		
	КТТ	ФС	Час утримування, хв	КТТ	ФС	Час утримування, хв
0,5	1280±12	2,92±0,5	8,3±0,1	523±18	3,5±0,1	30,5±0,8
0,7	2527±14	1,91±0,4	5,1±0,2	1085±29	2,7±0,2	21,3±0,2
1,0	7803±10	1,07±0,3	4,0±0,1	5890±20	1,2±0,1	16,4±0,4
1,3	3005±5	0,68±0,7	3,1±0,3	3040±15	0,9±0,1	15,7±0,3
1,5	3150±17	0,50±0,5	2,8±0,2	2100±12	0,6±0,3	10,1±0,2

Примітка. Тут і в табл 2: КТТ — кількість теоретичних тарілок; ФС — фактор симетрії піка.

Таблиця 2. Вплив наявності в рухомій фазі іонпарного реагенту на показники хроматографічного аналізу

Термін проведення аналізу, год	Без іонпарного реагенту			З іонпарним реагентом		
	КТТ	ФС	Час утримування, хв	КТТ	ФС	Час утримування, хв
0	5930±12	1,2±0,2	16,4±0,3	5950±15	1,2±0,1	16,4±0,1
1	4220±18	1,3±0,1	16,8±0,5	5890±16	1,2±0,2	16,4±0,1
5	3981±24	1,8±0,3	17,3±0,9	5907±19	1,3±0,2	16,5±0,2
10	2550±70	2,0±0,5	18,5±1,4	5753±15	1,3±0,1	16,4±0,3

має встановлення умов приготування проби, зокрема розчинів, які вивчаються. Необхідно було підібрати такі умови, за яких діюча речовина повністю переходить у розчин. Розчинники мають бути такі, що не впливатимуть на умови хроматографії та на хроматографічні характеристики. Для цього, насамперед, варто виходити з хімічних властивостей досліджуваних сполук. Згідно з фармакопейними даними, леводопа малорозчинна у воді, практично нерозчинна у 96% -му спирті та ефірі, легко розчиняється в 1 М хлористоводневій кислоті та помірно — в 0,1 М хлористоводневій кислоті. Карбідоба малорозчинна у воді, ще меншою мірою розчинна в 96% -му етанолі та практично нерозчинна у метиленхлориді. Розчинність, згідно з вимогами ДФУ, визначають так: 1 г сполуки, що є легкорозчинною, має розчинятись у 10–30 мл розчинника (тобто концентрація її в розчині має бути 0,03–0,10 г/мл); 1 г сполуки, яка є помірно розчинною, має розчинятись у 30–100 мл розчинника (тобто концентрація її в розчині має бути 0,01–0,03 г/мл). Концентрація леводопи у розчинах, які вивчали під час розроблення методу, становила 0,0005 г/мл, концентрація карбідопи — відповідно 0,00005 г/мл. У разі приготування таких розчинів у 0,1 М хлористоводневій кислоті

самі сполуки розчинялись повністю, однак у розчинах, які готували з таблеток або з порошку розтертих таблеток, не вся сполука переходить у розчин. Це пов'язано з тим, що до складу таблетки як допоміжні речовини входять різні види крохмалю та мікрокристалічна целюлоза. Саме ці сполуки можуть затримувати вивільнення досліджуваних речовин з твердої лікарської форми. Тому для аналізу було підібрано концентрацію розчину, за якої на першому етапі аналізу у реакційне середовище додавали певну кількість 1 М хлористоводневої кислоти, після оброблення ультразвуком пробу довели до мітки водою, що створювало кінцеву концентрацію кислоти в розчиннику 0,1 М.

Таким чином, розроблено умови контролю якості двокомпонентного препарату з діючими речовинами леводопа та карбідоба з виконанням тестів «Кількісне визначення», «Однорідність дозування», «Розчинення» та «Супровідні домішки» методом високо-ефективної рідинної хроматографії. Розраховано показники придатності хроматографічної системи для тест-аналізів (табл. 3). Метод внесено в аналітичну нормативну документацію для проведення контролю у процесі виробництва готових форм препарату та вивчення його стабільності під час зберігання.



Таблиця 3. Хроматографічні умови, які увійшли до аналітичної нормативної документації

Показник	Значення показника
Хроматографічна колонка	Заповнена октадецилсилілікагелем для хроматографії, розміром 125x4 мм, розмір частинок 5 мкм, або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту «Перевірка придатності хроматографічної системи»; використано колонку Purospher RP18e виробництва фірми Merck
Детектування	Довжина хвилі 280 нм
Рухома фаза	0,08 М розчин натрію дигідрофосфату моногідрату з іонпарним реагентом, дегазований будь-яким зручним способом; рН рухомої фази 2,8
Швидкість рухомої фази	1,0 мл/хв
Температура колонки	30 °С
Об'єм ін'єкції	20 мкл
Концентрація діючих речовин у розчинах для хроматографування	Леводопа — 0,5 мг/мл; карбідоба — 0,05 мг/мл

### ЛІТЕРАТУРА

1. *Машковський М. Д.* Лекарства двадцатого века. — М.: Новая Волна, 1998. — 320 с.
2. *Технология и стандартизация лекарств:* Сборник научных трудов. — Х.: РИРЕГ, 1996. — 784 с.
3. *Губський Ю. І.* Біоорганічна хімія. — Вінниця: Нова книга, 2004. — 464 с.
4. *Стискин Е. Л., Ицксон Л. Б., Брауде Е. В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. — М.: «Химия», 1986. — 205 с.
5. *Хедтман Е., Кастер Т.* Хроматография: практическое применение метода: В 2 ч. — М.: Мир, 1986. — 335 с.
6. *European Pharmacopoeia 2002.* — 4th edition. — Strasbourg, 2001. — 1287 p.
7. *The United States Pharmacopoeia.* — XXVIII ed. — Convention Inc, 2005. — 2149 p.
8. *Державна Фармакопея України.* — 1-ше вид. — Х.: РИРЕГ, 2001. — 556 с.
9. *Государственная Фармакопея СССР.* — XI изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
10. *Государственная Фармакопея СССР.* — XI изд. — Вып. 2. — М.: Медицина, 1990. — 400 с.
11. *Державна Фармакопея України.* — 1-ше вид. Доповнення 1. — Х.: РИРЕГ, 2004. — 494 с.
12. *Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.* WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparation. Thirty second Report. (WHO technical report series, №823). — Geneva: World Health Organization, 1992. — 14–79 p.
13. *Benson J. R. Woo D.* Chromatographic Methods. // *Chromatogr. Sci* 1984. — V. 22, N 9. — 386–399 p.
14. *Parris N. A.* Instrumental Liquid Chromatography. — 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier: Oxford, 1984. — 267 p.
15. *Daas A. G. J., Miller M. B.* Relationship Between Content Limits System Suitability for Precision and Acceptance/Rejection Criteria for Assays Using Chromatographic Methods // *Pharmeuropa.* — 1999. — V. 11, N4. — P. 571–577.

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ  
К КОНТРОЛЮ КОЛИЧЕСТВЕННОГО  
СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ  
КОМПОНЕНТОВ КОМБИНИРОВАННЫХ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

*А. Д. Дыль<sup>1</sup>  
К. Г. Виноградова<sup>2</sup>  
А. Г. Минченко<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Киевский национальный университет  
имени Тараса Шевченко

<sup>2</sup>Лаборатория контроля качества лекар-  
ственных средств ТОВ «Международная объеди-  
ненная лабораторная группа», Украина, Киев

<sup>3</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина  
НАН Украины, Киев

*E-mail: bizoshka@yandex.ru*

Важным условием контроля качества комбинированных лекарственных препаратов с различными действующими веществами является идентификация этих активных компонентов и определение их количества, а также выявление и анализ примесей. На основе высокоэффективной жидкостной хроматографии разработан эффективный метод контроля качества комбинированного лекарственного препарата, действующими компонентами которого являются леводопа и карбидопа, которые имеют сходную химическую структуру и содержание которых в препарате различается на порядок. Метод внесен в аналитическую нормативную документацию для проведения контроля качества во время производства готовых форм препарата и определения его стабильности при хранении.

**Ключевые слова:** высокоэффективная жидкостная хроматография, леводопа, карбидопа, контроль качества.

**MODERN APPROACHES FOR THE QUAN-  
TITATIVE CONTENTS CONTROL  
OF FUNCTIONAL COMPONENTS  
OF COMBINED MEDICAL DRUGS**

*O. D. Dyl<sup>1</sup>  
K. G. Vinogradova<sup>2</sup>  
O. H. Minchenko<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Taras Shevchenko Kyiv National University

<sup>2</sup>Laboratory for the quality control of medical drugs TOV «International United Laboratory Group», Kyiv

<sup>3</sup>Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences, Kyiv

*E-mail: bizoshka@yandex.ru*

The condition of the quality control of combined medical drugs with different active components was developed. Identification of active components as well as determination of its quantity are important for the quality control. The effective method of the quality control of combined medical drugs was developed using high-performance liquid chromatography. This method was applied for identification of the levodopa and carbidopa which have similar chemical structure as well as impurities (tyrosine). The method was included into the analytical normative documentation for the quality control of combined medical drugs during manufacturing and storage.

**Key words:** high performance liquid chromatography, levodopa, carbidopa, quality control.

УДК 577.213.3

## НОВІ МЕТОДИКИ АНАЛІЗУ МУТАЦІЙ У ДЕЯКИХ ЕКЗОНАХ ГЕНІВ *PAH* ТА *CFTR* ЛЮДИНИ З ВИКОРИСТАННЯМ ДЕНАТУРУЮЧОГО ГРАДІЄНТНОГО ГЕЛЬ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

О. О. Соловійов

Д. О. Голомідов

Л. А. Лівшиць

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Розроблено діагностичні методики для детекції мутантних варіантів деяких екзонів генів *PAH* (фенілкетонурія) та *CFTR* (муковісцидоз) методом денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE). Показано високу ефективність методу для використання у програмах скринінгу цих тяжких спадкових захворювань серед населення України.

**Ключові слова:** DGGE, ген, мутації, ДНК-діагностика, фенілкетонурія, муковісцидоз.

Генетичне тестування муковісцидозу (МВ, *CFTR*) і фенілкетонурії (ФКУ, *PAH*) є актуальною проблемою медичної генетики. В Україні на 8 300 новонароджених одна дитина хвора на ФКУ. Частота носіїв мутантного гена *PAH* серед населення України становить 1:43 [1]. На 2006 рік кількість ідентифікованих мутацій гена *PAH* досягла 513. В Україні й у багатьох країнах Європи аналіз мажорної мутації R408W [2], локалізованої в 12-му екзоні, є вкрай важливим для молекулярно-генетичної діагностики. Також дуже актуальним є аналіз мутацій 7-го ексона гена *PAH*, оскільки в ньому ідентифіковано близько 90 мутацій.

Частота захворювання на муковісцидоз у різних популяціях суттєво варіює і становить у середньому 1:2–2,5 тис. новонароджених серед представників білої раси та 1:9–10 тис. новонароджених серед представників африканської раси (Goodchild, Dodge, 1987). Виходячи із цих показників гетерозиготними носіями патологічного гена є близько 5% населення світу. В Україні частота МВ становила 1:2200 [3].

З огляду на це збільшується потреба в розробленні ефективних методик для масового та селективного скринінгу хворих і гетерозиготних носіїв мутантних алелів, що спричинюють дані захворювання.

Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (DGGE) вважається одним із найефективніших сучасних методів для детекції мутацій. Метод DGGE був розроблений

С. Фішером і Л. Лерманом [4,5]. Він ґрунтується на розділенні дволанцюгових фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в стандартному акриламідному гелі з лінійним градієнтом денатуруючих факторів – сечовини, формаміду або температури. Під час електрофорезу дволанцюгових ДНК у гелі з лінійно зростаючим градієнтом концентрацій денатуруючих агентів плавлення ланцюгів ДНК відбувається у строго специфічній для даної послідовності ділянці, при еквівалентній температурі плавлення. У результаті відбувається поділ фрагментів ДНК, що розрізняються за нуклеотидним складом.

Метою роботи було розробити діагностичні методики детекції мутантних варіантів 7-го та 12-го екзонів гена *PAH* та 20-го ексона гена *CFTR* методом DGGE.

### Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень слугували зразки периферичної крові хворих із різних регіонів України. Виділення та очищення ДНК зі зразків проводили шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією [6]. Для проведення ампліфікації *in vitro* послідовностей 7-го і 12-го екзонів гена *PAH* та 20-го ексона гена *CFTR* нами було розроблено дизайн олігонуклеотидних праймерів. Аналіз послідовності праймерів на специфічність виконували з використанням комп'ютерної бази даних BLAST SEARCH

за умов сканування геномної послідовності ДНК генів *PAH* і *CFTR*. Для оптимізації роздільної здатності методу DGGE до 5'- або 3'-кінця одного з пари праймерів приєднували GC-багатий фрагмент (GC-clamp). Позицію для приєднання GC-фрагмента визначали за допомогою комп'ютерного алгоритму Melt 87 [7, 8]. Аналіз термодинамічних параметрів праймерів здійснювали за програмою Vector NTI Suite 6.

Праймери були синтезовані твердофазним фосфоамідитним методом на олігосинтезаторі Biosset (Росія).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в автоматичному режимі на термоциклері Perkin Elmer (Cetus) за таких умов:

– 20-й екзон гена *CFTR*: ініціувальна денатурація — при 94 °С протягом 5 хв; 39 циклів: денатурація — 1хв, 94 °С, відпалювання праймерів — 1хв, 55 °С, елонгація — 1хв, 72 °С; фінальна елонгація при 72 °С протягом 3 хв; формування гетеродуплексів: денатурація при 94 °С упродовж 5 хв з наступним відпалюванням при температурі 55 °С та швидко охолодження;

– 7-й екзон гена *PAH*: рге PCR : денатурація при 94 °С — 4 хв, відпалювання праймерів — 59 °С, 2 хв, елонгація — 72 °С, 2 хв; 5 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 58 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; 5 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 56 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; 25 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 55 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; фінальна елонгація: 72 °С — 3 хв;

– 12-й екзон гена *PAH*: ініціувальна денатурація — 3 хв, 94 °С; 5 циклів: денатурація ДНК — 45 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 45 с, 53 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; 28 циклів: денатурація ДНК — 30 с, 94 °С, відпалювання праймерів — 30 с, 51 °С, елонгація — 45 с, 72 °С; фінальна елонгація: 72 °С — 2 хв.

Робоча суміш об'ємом 25 мкл містила: Tris-HCl — 67 мМ (рН 8,8, 25 °С); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 16,7 мМ; ЕДТА — 6,7 мкМ; MgCl<sub>2</sub> — 2,5–4 мМ; бичачий сироватковий альбумін — 170 мкг/мл; dNTP — 400 мкМ кожного типу; праймери — 4,5 рмол/мл; ДНК — 1 мкг; Taq-полімераза — 0,5 од. активності на пробу.

Денатуруючий градієнтний гель-електрофорез (DGGE) проводили з використанням методик [9,10] за такими параметрами:

– 20-й екзон гена *CFTR*: 7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 10–60%

сечовини з формамідом, температура 55 °С, постійна напруга 240В, тривалість — 5 год;

– 7-й та 12-й екзони гена *PAH*: 7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 25–55% сечовини з формамідом, температура 60 °С, постійна напруга 180В, тривалість — 3 год.

Забарвлення гелів після DGGE здійснювали водним розчином броміду етидію та барвником Varva NA, синтезованим у відділі комбінаторної хімії Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Для проведення рестрикційного аналізу продуктів ПЛР у зразки додавали 1 од.активності відповідної ендонуклеази рестрикції, 1 мкл специфічного для рестриктази стандартного буфера та інкубували при температурі 55 °С упродовж 2 год або при температурі 37 °С 12 год. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 10%-му поліакриламідному гелі (співвідношення акриламід:бісакриламід — 29:1). Як маркери молекулярної маси використовували 100 Base-Pair Ladder.

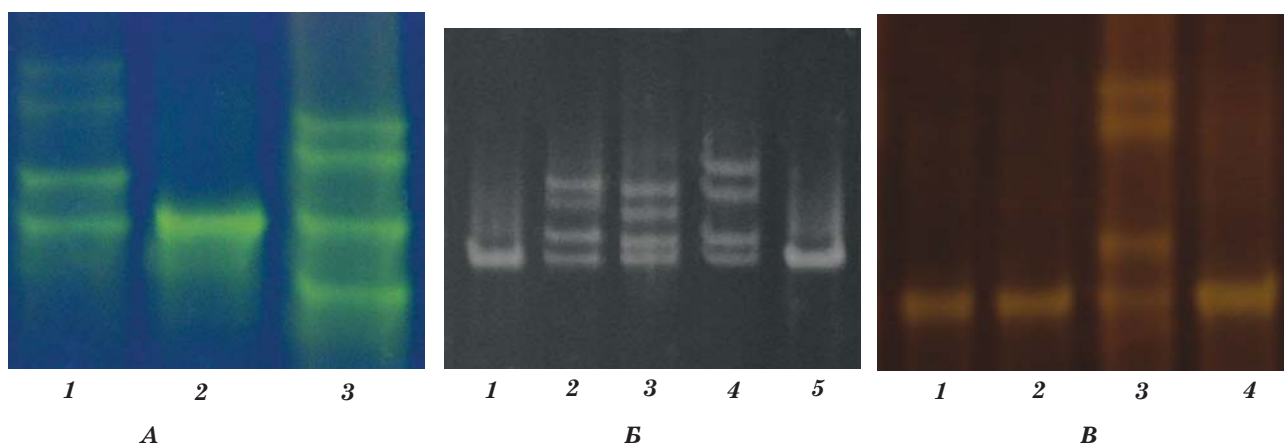
Візуалізацію гелів після фарбування проводили, застосовуючи УФ-трансліюмінатор (λ = 290 нм) та прилад Dark Reader, Clare Chemical Research, США (λ = 470 нм).

## Результати та обговорення

Під час проведення DGGE 12-го та 7-го екзонів гена *PAH* і 20-го екзона гена *CFTR* зразками слугували ДНК носіїв мутацій R408W, Y414C (12-й екзон гена *PAH*), P281L, R252W, R261Q (7-й екзон гена *PAH*), W1282X (20-й екзон гена *CFTR*) із колекції відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Результати експерименту наведено на рис. 1. У разі присутності мутації R408W та Y414C у гетерозиготному стані DGGE-профіль представлений двома гомодуплексами та двома гетеродуплексами, присутність яких збільшує інформативність розділення (рис. 1, А). На рис.1, Б зображено DGGE-профіль мутацій P281L, R252W, R261Q у гетерозиготному стані. DGGE-профіль мутації W1282X у гетерозиготному стані подано на рис. 1, В.

З використанням розроблених методів аналізу мутацій 7-го і 12-го екзонів гена *PAH* та 20-го екзона гена *CFTR* нами було проведено пілотний скринінг цих послідовностей у групі дітей, хворих на фенілкетонурію і муковісцидоз, та їхніх батьків, кров яких надходила з усіх регіонів України. Методом



**Рис. 1. DGGE-електрофореграми послідовностей 12-го екзона гена PAH, 7-го екзона гена PAH та 20-го екзона гена CFTR:**

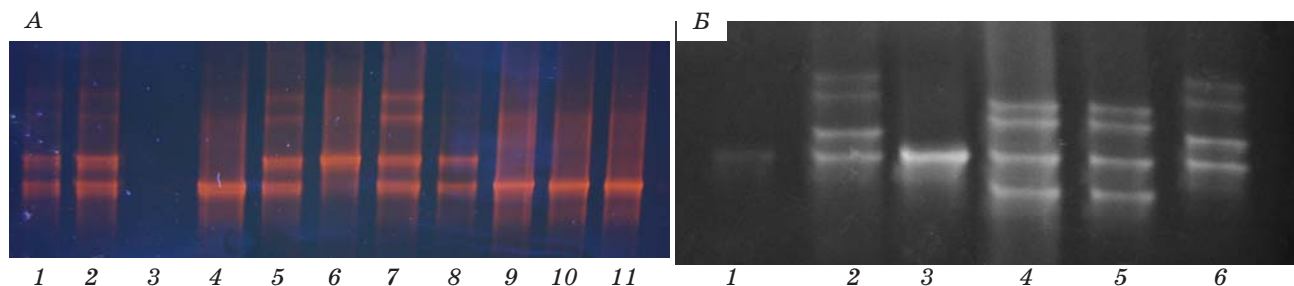
**A** — DGGE-електрофореграма мутацій 12-го екзона гена PAH (7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 25–60%): 1 — R408W/норма; 2 — норма/норма; 3 — Y414C / норма;  
**B** — DGGE-електрофореграма мутацій 7-го екзона гена PAH (7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 25–60%): 1 — норма/норма; 2 — P281L/норма; 3 — R252W/норма; 4 — R261Q/ норма; 5 — норма/норма;  
**B** — DGGE-електрофореграма послідовностей 20-го екзона гена CFTR (7% -й поліакриламідний гель, градієнт денатурантів 10–60%, температура 55°C, напруга 230 В, тривалість 5 год): 1, 2, 4 — норма/норма, 3 — W1282X/норма

DGGE було досліджено 35 пацієнтів на фенілкетонурію та 25 пацієнтів — на муковісцидоз.

Під час аналізу електрофореграм 12-го екзона гена ФАГ виявлено 12 гетерозиготних носіїв мутації R408W та один носій цієї мутації у гомозиготному стані, 2 гетерозиготних носії мутації Y414C (рис. 2, А, В). Ці результати підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу продуктів ПЛР із застосуванням ендонуклеаз рестрикції MnlI, RsaI, відповідно [1,2].

У результаті аналізу 7-го екзона гена PAH методом денатуруючого градієнтного гелелектрофорезу було одержано DGGE-профілі

пацієнтів та контрольних зразків ДНК з мутаціями (електрофореграму наведено на рис. 3); виявлено 5 гетерозиготних носіїв мутації P281L, 3 носії R252W та 2 носії R261Q. Ці результати підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу продуктів ПЛР ендонуклеазами рестрикції MspI, Eco88I, HinfI, відповідно [1, 2]. Було також виявлено 3 мутантні варіанти 7-го екзона гена PAH (рис. 3), які не вдалося ідентифікувати за допомогою рестрикційного аналізу. Планується проведення прямого секвенування послідовностей 7-го екзона з метою визначення знайденої мутації.



**Рис. 2. DGGE-електрофореграма послідовностей 12-го екзона гена PAH хворих на фенілкетонурію та членів їхніх родин:**

**A** — Сім'я I: 1 — мати — носій мутації R408W у гетерозиготному стані; 2 — пробанд — носій мутації R408W у гетерозиготному стані; 3 — негативний контроль ампліфікації; 4 — здоровий індивід; 5 — маркер мутації R408W у гетерозиготному стані. Сім'я II: 5 — пробанд — носій мутації R408W у гомозиготному стані; 6, 7 — мати та батько — носії мутації R408W у гетерозиготному стані; 8, 9, 10 — здорові індивіди;  
**B** — 1 — негативний контроль; 2 — носій мутації R408W у гетерозиготному стані; 3 — здоровий індивід; 4 — носій мутації Y414C у гетерозиготному стані; 5 — позитивний контроль на мутацію Y414C; 6 — позитивний контроль на мутацію R408W

Дослідивши 25 хворих на муковісцидоз пацієнтів методом DGGE, ми виявили трьох гетерозиготних носіїв мутації W1282X (рис. 4). Одержані результати підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу продуктів ПЛР ендонуклеазами рестрикції MnlI [11].

Таким чином, нами було розроблено діагностичні методики детекції мутацій 7-го

і 12-го екзона гена *PAH* та 20-го екзона гена *CFTR* за допомогою методу денатуруючого градієнтного гель-електрофорезу (DGGE).

Ці робочі методики можуть бути використані в тест-системах для ДНК-аналізу у програмах селективного та масового скринінгу з метою профілактики муковісцидозу та фенілкетонурії в Україні.

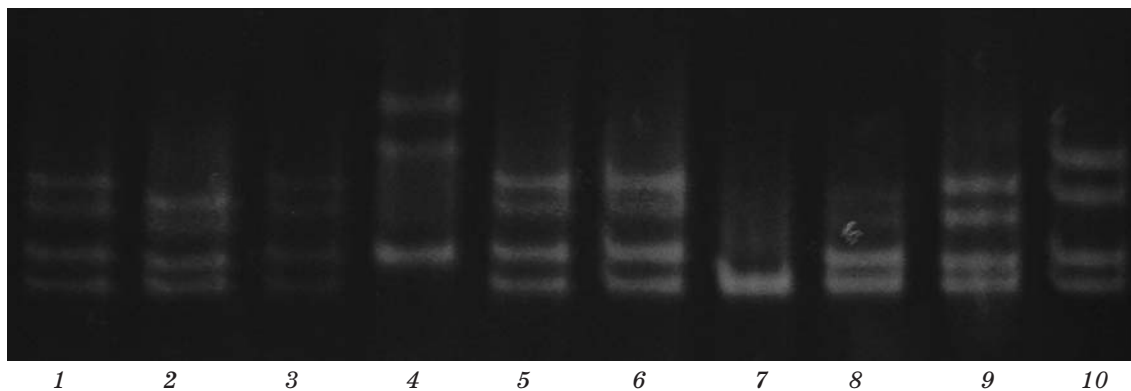


Рис. 3. DGGE-електрофореграма послідовностей 7-го екзона гена *PAH* хворих на фенілкетонурію та членів їхніх родин:

- |  |  |
|--|--|
| 1 — позитивний контроль на мутацію P281L;        | 6 — носій мутації P281L у гетерозиготному стані; |
| 2 — неідентифікований мутантний варіант;         | 7 — здоровий індивід;                            |
| 3 — носій мутації P281L у гетерозиготному стані; | 8 — неідентифікований мутантний варіант;         |
| 4 — неідентифікований мутантний варіант;         | 9 — позитивний контроль на мутацію R252W;        |
| 5 — носій мутації P281L у гетерозиготному стані; | 10 — позитивний контроль на мутацію R261Q        |

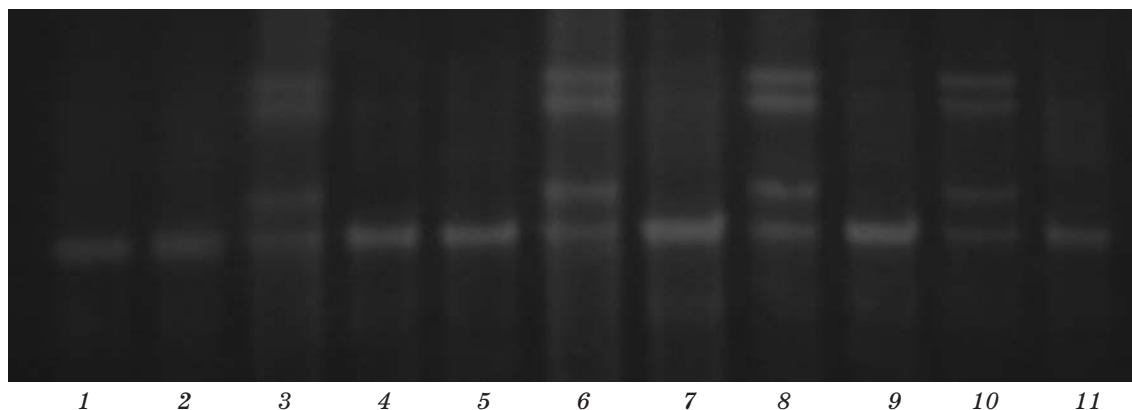


Рис. 4. DGGE - електрофореграма послідовностей 20-го екзона гена *CFTR* хворих на муковісцидоз та членів їхніх родин на носійство мутації W1282X 20-го екзона гена *CFTR*:

- |  |   |
|--|---|
| 1 — негативний контроль;                   | 4, 5, 7, 9, 11 — здорові індивіди;                      |
| 2 — здоровий індивід;                      | 6, 8, 10 — носій мутації W1282X у гетерозиготному стані |
| 3 — позитивний контроль на мутацію W1282X; |   |

## ЛІТЕРАТУРА

1. Нечипоренко М. В., Кравченко С. А., Лившиць Л. А. Аналіз мутацій та VNTR-поліморфізму гена фенілаланінгідроксилази // Укр. біохім. журн. — 2001. — Т. 73, №2. — С. 63–67.
2. Нечипоренко М. В., Лившиць Л. А. Аналіз мутацій гена фенілаланінгідроксилази в семьях високого ризику фенілкетонурии в Україні // Цитология и генетика. — 2000. — Т. 34, №6. — С. 59–63.
3. Резник Б. Я., Бабий И. Л., Лившиць Л. А. Муковисцидоз у дітей і підлітків. — К.: Здоров'я, 1994. — 144 с.
4. Fischer S. G., Lerman L. S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory // Proc. Nat Acad. Sci. USA. — 1983. — V. 80. — P. 1579–1583.
5. Fischer S. G., Lerman L. S. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences // Ibid. — 1980. — V. 77, N 8. — P. 4420–4424.
6. Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1985. — 420 с.
7. Myers R. M., Fischer S. G., Maniatis T. et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis // Nuc. Acid. Res. — 1985. — V. 13, N9. — P. 3131–3145.
8. Lerman L. S., Silverstein K. Computational simulation of DNA melting and its application to DGGE // Meth. Enzymol. — V. 155. — P. 482–501.
9. Guldborg P., Guttler F. A simple method for identification of point mutations using denaturing gradient gel electrophoresis // Nucl. Acid. Res. — 1993. — V. 21, N9. — P. 2261–2262.
10. Fanen P., Ghanem N., Vidaud M. et al. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions // Genomics. — 1992. — V. 13, N 3. — P. 770–776.
11. Kadasi L., Polakova H., Zatkova A. et al. / INCO-BIOMED Workshop for Central and Eastern European Countries «DNA extraction and Cystic Fibrosis Mutation Detection Techniques», Prague, September 13–16, 1997. — P. 15–17.

**НОВЫЕ МЕТОДИКИ АНАЛИЗА  
МУТАЦИЙ В НЕКОТОРЫХ ЭКЗОНАХ  
ГЕНОВ PAH И CFTR ЧЕЛОВЕКА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ДЕНАТУРИРУЮЩЕГО  
ГРАДИЕНТНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

А. А. Соловьев  
Д. А. Голомидов  
Л. А. Лившиць

Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Разработаны диагностические методики для детекции мутантных вариантов некоторых экзонов генов PAH (фенилкетонурия) и CFTR (муковисцидоз) методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (DGGE). Показана высокая эффективность метода для применения в программах скрининга этих тяжелых наследственных заболеваний среди населения Украины.

**Ключевые слова:** DGGE, ген, мутации, ДНК-диагностика, фенилкетонурия, муковисцидоз.

**NEW TECHNIQUES FOR MUTATION  
ANALYSIS IN SOME EXONS OF PAH  
AND CFTR GENE OF MEN USING DENA-  
TURING GRADIENT  
GEL-ELECTROPHORESIS**

O. O. Solovyov  
D. O. Golomidov  
L. A. Livshyts

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

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Diagnostic methods for mutant variants detection of some exons in PAH gene (phenylketonuria) and CFTR gene (cystic fibrosis) using denaturing gradient gel-electrophoresis (DGGE) were developed. High effectiveness method for the application in the screening programs of these severe hereditary diseases among the population of Ukraine was shown.

**Key words:** DGGE, gene, mutations, DNA diagnostics, phenylketonuria, cystic fibrosis.

# СТОРІНКИ ІСТОРІЇ

## ВОЛОДИМИР ПЕТРОВИЧ ВЕНДТ — ФУНДАТОР БІОТЕХНОЛОГІЇ В УКРАЇНІ

*Р. П. Виноградова*

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

А що таке життя? Чи те, що переждалось?  
Чи все-таки життя — це те, що відбулось?

*Ліна Костенко*

За висловом Альберта Ейнштейна, істина — це те, що витримує перевірку дослідом. Цей вислів повною мірою відповідає науковому життю Володимира Петровича Вендта, доктора біологічних наук, професора, лауреата Державної премії УРСР у галузі науки і техніки. Вчений-подвижник, він усе своє життя присвятив не лише дослідженню жиророзчинних вітамінів стероїдної природи, але й упровадженню наукових розробок у виробництво. Він був одним із перших серед тих, хто започаткував науку біотехнологію в Радянському Союзі, використавши потужні можливості цієї великої держави, створивши школу однодумців і послідовників. «Мало знати, треба і використовувати», — вважав Й. В. Гете, саме так і вчиняв Володимир Петрович.

Володимир Петрович Вендт народився 30 листопада 1906 р. у м. Кременчуці Полтавської губернії. Його батько, Петро Володимирович, був тоді студентом Харківського університету, а мати, Валентина Семенівна, працювала в залізничній конторі станції Кременчук.

У 1930 р. В. П. Вендт закінчив Одеський хіміко-фармацевтичний інститут МОЗ УРСР за спеціальністю «хімік-аналітик». Після закінчення інституту отримав призначення на роботу до Всеукраїнського державного (згодом Центрального) інституту патології і гігієни праці в Харкові, де працював спочатку старшим лаборантом, потім молодшим науковим співробітником, а з 1931 р. — хіміком-асистентом фізико-хімічного відділу. У 1934–1936 рр. навчався в заочній аспірантурі на фізико-хімічному відділенні Українського інституту експериментальної медицини (Харків), в якому згодом (1935–1938 рр.) обіймав посаду наукового співробітника. На



вченій раді цього інституту В. П. Вендт успішно захистив дисертацію на тему: «Применение фотоэлементов в колориметрии и нефелометрии», здобувши учений ступінь кандидата хімічних наук (1939 р.). У тому ж році йому було надано вчене звання старшого наукового співробітника за

спеціальністю «аналітична хімія», а в 1940 р. — доцента.

Наукові інтереси вченого в цей період пов'язані з розробленням простих експрес-методів для кількісного визначення таких хімічних речовин, як бензол, толуол, сірчистий газ та хімічні отрути. Він також публікує посібники-рекомендації для сільського господарства: «Простейшие методы качественного анализа сельскохозяйственных ядов» (1934 р.); «Простейшие методы количественного анализа сельскохозяйственных ядов» (1934 р.); «Пособие для простейшего качественного анализа ядов и удобрений» (1937 р.). У збірнику інструкцій для визначення вмісту шкідливих речовин у повітрі промислових підприємств, розроблених або уточнених у фізико-хімічній лабораторії Українського центрального інституту гігієни праці і профзахворювань, 10 належать В. П. Вендту (В. Г. Гуревич, 1937 р.). Окрім того, він удосконалює фотоелектричні методи дослідження і пропонує новий тип фотоелектроколориметра-нефелометра.

У 1938 р. Володимир Петрович за конкурсом обіймає посаду доцента кафедри хімії Інтендантської академії Робітничо-Селянської Червоної Армії (РСЧА, Харків), де працює до евакуації з Харкова до Фрунзе (жовтень 1941 р.). Продовжуючи розробляти нові методи фотоколориметрії та фотонфелометрії, вчений видає посібник для студентів — «Руководство к практическим занятиям по неорганической химии» (1938 р.).

У липні 1944 р. В. П. Вендта мобілізували до лав Радянської Армії. У складі 1-го Українського фронту він брав участь у звільненні від гітлерівських військ Польщі й Ні-



меччини, був нагороджений медалями «За бойові заслуги» та «За перемогу над Німеччиною у Великій Вітчизняній війні 1941–45 рр.».

Після демобілізації у травні 1946 р. В. П. Вендт повертається до наукової роботи і починає працювати старшим науковим співробітником в Інституті біохімії АН УРСР (Київ). Усе подальше наукове життя вченого впродовж 47 років пов'язано саме із цим інститутом. У 1947 р. він очолює групу фізико-хімічних методів досліджень. Спочатку Володимир Петрович працює над розробленням фотометричних методів дослідження та експрес-методів для визначення різних хімічних речовин. Уже в 1948–1949 рр. ним було запропоновано простий фотоелектроколориметр для біохімічних лабораторій, виробництво якого планувалось на експериментальному заводі Міністерства охорони здоров'я України в Харкові, де він постійно консультував своїх колег із методичних питань.

Акад. Р. В. Чаговець цінував В. П. Вендта «... как высококвалифицированного специалиста, хорошо владеющего методами химических и биохимических исследований, как прекрасного экспериментатора, умеющего ставить самостоятельно и разрешать на высоком уровне сложные научные вопросы». А акад. В. О. Беліцер особливо відзначав «практическую ценность исследований В. П. Вендта и его новаторский стиль в работе» (1957 р.).

З липня 1946 р. вчений вдало поєднував роботу в Інституті біохімії та Київському науково-дослідному інституті гігієни праці і профзахворювань, де очолював хімічну лабораторію. Під керівництвом В. П. Вендта в лабораторії розроблено нові методи визначення в навколишньому середовищі вмісту шкідливих речовин, а саме: оксиду вуглецю, сірчистого газу, миш'яковистого водню, сірковуглецю, кремнію, а також отрутохімікатів, які досить широко використовувались у сільському господарстві (хлорорганічних, фосфорорганічних, мідьвмісних, ртутьорганічних тощо). Значну увагу в цей період учений приділяв удосконаленню та конструюванню приладів для відбору проб повітря з метою аналізу в ньому токсичних речовин. Саме тоді Володимир Петрович створив фотоелектричний абсорбціометр ФА-52, портативний газовий аналізатор для визначення оксиду- та діоксиду вуглецю, прилад для тестування хлорорганічних отрутохімікатів, розробив нові типи твердих сорбентів для відбору проб повітря. Ці роботи мали велике практичне значення і набу-

ли широкого застосування у виробництві.

Поступово В. П. Вендт зосереджує увагу на вивченні жиророзчинних вітамінів. Він привозить і досліджує сировину для одержання вітамінів із біостанції в Карадазі (Крим, 1949 р.). Унаслідок цієї роботи було запропоновано спосіб одержання препарату вітаміну D<sub>3</sub> з моллюсків (1952, 1953 рр.) та використання хроматографічного методу для встановлення концентрації вітамінів (1952, 1955 рр.). У 1955–58 рр. Володимир Петрович почав досліджувати комплекси білків із вітамінами А, Е та D; комплекси білків зі стеролами; вплив штучного комплексу білка з вітаміном D на лікування рахіту; біологічні властивості комплексу каротину з білками.

Співробітники групи фізико-хімічних методів досліджень, якою керував В. П. Вендт, у 1953 р. почали розробляти технологію промислового виробництва вітчизняних препаратів вітаміну D<sub>3</sub>, яку згодом було впроваджено у виробництво на Київському вітамінному заводі (1954–1955 рр.). Технологію процесу весь час удосконалювали, а якість препаратів підвищували. У 1973 р. виробництво вітаміну D<sub>3</sub> було налагоджено на Среванському вітамінному комбінаті. У стандартних кормах птахів холекальциферол практично відсутній і тому його треба додавати до кормів у вигляді преміксів. Без вітаміну D<sub>3</sub> інтенсивне птахівництво неможливе. Однак тоді вітчизняних препаратів не було, їх купували у США та Голландії.



Одним із перших у світі В. П. Вендт установив можливість утворення комплексів вітамінів із білками та експериментально обґрунтував перспективу використання їх для лікування різних захворювань, а також акцентував увагу на можливості виникнення гіпервітамінозу в разі надходження в організм високих доз вітаміну D (1960, 1961 рр.). Головний комітет Виставки передового досвіду в народному господарстві УРСР за створення штучного комплексу синтетичного вітаміну D<sub>3</sub> з білком молока казеїном відзначив В.П. Вендта дипломом III ступеня та грошовою премією.

У 1961 р. Володимир Петрович захистив докторську дисертацію на тему: «Провітамін и витамин D<sub>3</sub>».

У 1963 р. на базі структурного підрозділу групи фізико-хімічних методів досліджень в Інституті було створено лабораторію фотобіохімії, яку в 1966 р. реорганізували у відділ фотобіохімії. Її очолював д-р біол. наук, а згодом і професор В. П. Вендт. Учене звання професора за спеціальністю «хімія природних і фізіологічно активних речовин» йому надано в 1969 р. У 1976 р. відділ фотобіохімії реорганізовано у відділ біохімії стеринів, який Володимир Петрович очолював до 1980 р.

У цьому відділі він зосередив увагу на науковому напрямі, який, на його думку, в недалекому майбутньому міг стати ефективним у теоретичному і практичному аспектах, — дослідження хімії, біохімії та фотохімії стеролів. Інтенсивне вивчення їх, що було розпочато в 60-ті роки минулого століття, залишається актуальним і дотепер.

Стероли є ключовими сполуками стероїдів, до складу яких входять такі біологічно активні речовини, як адренокортикоїдні і статеві гормони, жовчні кислоти, антирахітичні речовини, алкалоїди та антибіотики, гормони метаморфозу комах — екдизони, деякі отрути тощо. Відомо, що безпосереднім попередником холестеролу (важливого стеролу в організмі тварин, який міститься в усіх органах та субклітинних структурах) є 7-дегідрохолестерол. За хімічними та структурними властивостями останній, як й інші стероли, здатен утворювати похідні, яким притаманні особливі фізіологічні функції.

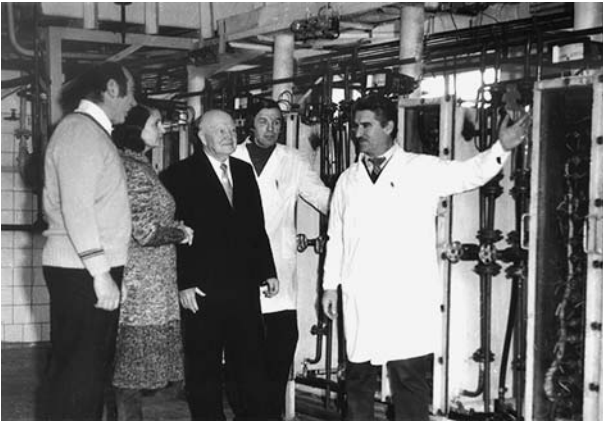
Першою великою роботою, в якій Володимир Петрович навів результати своїх досліджень 7-дегідрохолестеролу (природних ресурсів, вмісту в біологічних об'єктах, особливостей нативних і штучних комплексів із білками та синтезу й біосинтезу),

була його докторська дисертація. Доцільність проведення цих досліджень визначалась важливістю скринінгу вітчизняних ресурсів вітаміну D для тваринництва та медицини. Окрім того, тоді ще не було з'ясовано питання щодо накопичення і метаболізму вітамінів групи D живими організмами, не розроблено задовільного методу кількісного визначення їх у біологічних об'єктах, що негативно впливало на дослідження механізму дії цих сполук. Дуже обмеженими були публікації стосовно шляхів біосинтезу 7-дегідрохолестеролу та його метаболізму в організмі тварин, а також щодо властивостей комплексів 7-дегідрохолестеролу та вітаміну D<sub>3</sub> з білками. Варто зазначити, що тоді ані провітамін D, ані вітамінів D<sub>3</sub> вітчизняна промисловість України й інших республік Радянського Союзу не виробляла, хоча було відомо, що активність вітаміну D<sub>3</sub> значно вища, ніж інших вітамінів цієї групи, перевершуючи, зокрема в 1,5–2 рази активність вітаміну D<sub>2</sub> в людини і тварин та у 30 разів — у птахів.

Скринінг основних природних джерел провітаміну D<sub>3</sub> на території України показав, що найперспективнішими в цьому аспекті для практичного використання є морські (*Mytilus galloprovincialis* і *Modiolo adriatica*) та прісноводні (*Unio pictorum* і *Anodonta*) молюски.

Розроблення технології одержання вітамінів, передусім жиророзчинних, розвивалось у двох напрямках. З одного боку, досліджували можливість одержання вітамінних препаратів із природних джерел, а з другого — працювали над технологією їх синтезу.

Так, за безпосередньою участю вченого було розроблено і апробовано у напіввиробничих умовах метод одержання білкового і мінерального препаратів із молюсків для використання у тваринництві та птахівництві. Запропоновану технологію виробництва вітамінізованого білкового корму з молюсків було рекомендовано Держпланом України для проектування дослідного (пілотного) заводу. Завдяки поєднанню зусиль В. П. Вендта і співробітників Інституту ботаніки АН України розроблено технологію одержання каротину з водоростей *Dunaliella salina* із солоних водоймищ Криму, на що було отримано два авторських свідоцтва. На основі цієї технології в 1965 р. на Сакському хімічному заводі було побудовано цех виробництва каротину для тваринництва і харчової промисловості з водоростей солоних водойм Криму. Володимир Петрович прагнув використовувати в промисловості



недефіцитні природні ресурси й наявну в Україні дешево сировину.

Застосування вітамінів у тваринництві, медицині і промисловості завжди породжує проблему стабілізації жиророзчинних вітамінів під час довготривалого їх зберігання. Оригінальним у цьому аспекті виявився запропонований В. П. Вендтом метод одержання стійких штучних білково-вітамінних комплексів. З використанням казеїну та інших білків було створено високоактивні препарати вітамінів  $D_3$ ,  $D_2$ , каротину та вітаміну Е — як моновітамінні, так і полівітамінні, що не втрачали початкової активності понад півроку, навіть у складі комбікормів. При цьому препарати легко суспендувалися в молоці та воді, до якої попередньо додавали нешкідливі поверхнево-активні речовини.

Таким чином, запропонована В. П. Вендтом нова форма препарату вітаміну  $D_3$  (штучний комплекс ергокальциферолу або холекальциферолу з білком) була стійкою до деградації під час зберігання. Дослідження властивостей штучних комплексів ергокальциферолу з казеїном, проведені на щурах та курчатах, свідчать, що біологічна активність цих комплексів не менша, ніж у незв'язаних форм вітаміну D (1956–1958 рр.). Клінічні випробування ефективності новоствореного препарату для лікування рахіту у дітей засвідчили його високу ефективність. Фармакологічний комітет МОЗ СРСР дозволив застосовувати препарат під назвою «Відеїн» у медичній практиці. Випробування препарату у педіатричній клініці та дитячих установах Києва і Київської області показали, що «Відеїну» притаманні виражені антирахітичні властивості (обстежено понад 700 дітей, хворих на рахіт). Ефективність препарату виявилась також високою для лікування супровідних захворювань (пневмонії, диспепсії, отиту тощо), що підтверджує його більшу ефективність порівняно зі спиртовими або олійними препаратами вітаміну  $D_2$ .

В. П. Вендт запропонував модифікований хімічний метод одержання 7-дегідрохолестеролу з холестеролу, який можна використовувати у промисловому виробництві, а також простий новий метод фотохімічного перетворення провітаміну на превітамін, а після термічного оброблення — на вітамін  $D_3$ .

Широкі дослідження біологічної активності синтетичного вітаміну  $D_3$  на курчатах показали, що вона істотно перевищує активність вітаміну  $D_2$  (більш ніж у 30 разів), інтенсивніше стимулюючи при цьому мінералізацію кісток, сприяючи кращому розвитку птиці, підвищуючи її несучість і щільність шкаралупи яєць. Ці експерименти проводили в Інституті біохімії АН України (Київ), Інституті біології АМН Латвії (Рига), Інституті птахівництва ВАСГНІЛ СРСР (Москва) і на Томилінській птахофабриці (Московська обл., Росія). Розроблену Володимиром Петровичем технологію одержання вітаміну  $D_3$  у 1953 р. було впроваджено у виробництво.

Штучне одержання вітамінів групи D із відповідних провітамінів було складним через відсутність необхідних джерел УФ-радіації. У цей період у відділі фотобіохімії було зроблено важливе відкриття: можливість використовувати для фотоізомеризації провітамінів D люмінесцентні еритемні лампи, оскільки їхня спектральна характеристика найбільше відповідає спектральному поглинанню провітамінів. Короткохвильове випромінювання еритемних ламп практично відсутнє, а тому опромінювальні розчини можуть безпосередньо контактувати з їхньою холодною поверхнею. Як додатковий продукт у процесі опромінення утворюється люмістерол, якому також притаманні антирахітичні властивості та здатність стимулювати дію вітаміну  $D_3$ . При цьому не виявлено токсичних продуктів в опромінених розчинах. Вихід вітаміну  $D_3$  з використанням еритемних ламп високий — 65–70%, що перевищує ефективність інших методів.

На основі еритемних ламп Володимир Петрович у 60-ті роки минулого століття створив опромінювальний апарат безперервної дії для проведення фотохімічних реакцій, який успішно застосовувався у промисловості СРСР. Побудований на новому принципі, цей опромінювальний апарат виявився ефективнішим порівняно із зарубіжними аналогами у 5–6 разів. Його використовували на Московському вітамінному заводі, Таллінському целюлозно-паперовому комбінаті та Карткалінському біохімічному заводі.



Дослідження процесів фотохімічної ізомеризації і створення нового опромінювального апарату дозволили співробітникам відділу вирішити технологічне завдання, пов'язане з виробництвом кристалічного вітаміну D<sub>3</sub>, завдяки здатності останнього утворювати комплекси з холестерином. Метод одержання такого комплексу, який дістав назву «Відехол», було розроблено і впроваджено у напіввиробничих умовах на експериментальній ділянці Київського вітамінного заводу.

Таким чином, співробітникам відділу фотобіохімії після напруженої довготривалої роботи вдалося вирішити проблему синтезу вітаміну D<sub>3</sub> на теренах нашої держави. За опрацьованою технологією препарати вітаміну D<sub>3</sub> для застосування у тваринництві, вироблені на Київському вітамінному заводі і на Єреванському вітамінному комбінаті, повністю задовольнили потреби тваринництва країни. Оскільки ефективність вітаміну D<sub>3</sub> істотно перевищує ефективність вітаміну D<sub>2</sub>, який раніше застосовували у птахівництві, використання його на птахівниках дає значний економічний ефект.

У роботах В. П. Вендта вперше було показано, що в разі одержання препарату D<sub>3</sub> із застосуванням фотолізу утворюються проміжні продукти, які також є цінним антирахітичним комплексом у птахівництві.

Якщо механізм утворення вітаміну D<sub>3</sub> *in vitro* В. П. Вендт з'ясував детально, то синтез його в організмі тварин було вивчено недостатньо. Зокрема, не було впевненості в ідентичності природного вітаміну D ссавців і холекальциферолу. Той факт, що у шкірі тварин після УФ-опромінювання утворюються антирахітичні сполуки за відсутності 7-дегідрохолестеролу, ще не давав підстави стверджувати про зв'язок антирахітичної активності з утворенням *in vivo* саме холекальциферолу, а не іншої речовини з подібною до нього структурою.

На жаль, хімічну природу активного похідного вітаміну D<sub>3</sub> співробітникам Володимира Петровича не вдалося встановити, однак вони одними з перших виявили, що вітамін D<sub>3</sub> не має безпосередньої біологічної активності, і впритул наблизились до з'ясування механізму дії цього вітаміну. Поряд із цим було показано, що печінка, окрім депонування вітаміну D, утворює його активні деривати і транспортувальні форми. На сьогодні встановлено, що вітамін D<sub>3</sub>, який синтезується у шкірі людини і тварин під час дії сонячної радіації або УФ-опромінювання із 7-дегідрохолестеролу, не належить до біологічно активних речовин. Він є попередником 1,25-дигідрохолекальциферолу, що синтезується з холекальциферолу гідроксилюванням спочатку в печінці, а потім у нирках. Саме він і є активною гормоноподібною речовиною.

Результати досліджень, проведених у 70-х роках минулого століття у відділі фотобіохімії, з пошуку природних сполук, яким притаманна D-вітамінна активність, свідчать, що існує декілька форм природних вітамінів D, які за хімічною природою відрізняються від холекальциферолу. Не виключено, що вони є проміжними метаболітами холекальциферолу.

Значну увагу у відділі фотобіохімії завжди приділяли з'ясуванню механізму комплексоутворення білків із речовинами ліпідної природи. Теоретичні дослідження в цьому напрямі сприяли створенню нових форм високоактивних препаратів жиророзчинних вітамінів для використання в медицині та тваринництві. Білковий компонент вітамінних комплексів має відповідати таким вимогам:

- легко засвоюватись в організмі людини і тварин; добре розчиняється у слабких розчинах лугів та солей; різко змінювати ізоелектричну точку, що важливо як для попереднього очищення комплексу, так і для комплексоутворення; утворювати стійкі хімічні зв'язки з небілковим компонентом;
- білок має бути доступним як сировина для виробництва вітамінно-білкового препарату і мати низьку собівартість.

До білків, що відповідають вищезазначеним вимогам, належить білок молока — казеїн. Його доцільно використовувати в денатурованому стані, оскільки тоді він добре розщеплюється протеолітичними ферментами. Крім того, одним із важливих виявів денатурації є підвищення хімічної активності деяких функціональних груп білка, що зумовлює утворення стійкого зв'язку між білком та іншими компонентами комплексу.

Як небілкові компоненти в комплексах використовували вітаміни  $D_2$  і  $D_3$  у кристалічному стані, а також концентрат вітаміну  $D_3$  (фотосмолки). Штучний комплекс вітаміну  $D_2$  з казеїном було названо «Відеїн-2», із кристалічним вітаміном  $D_3$  — «Відеїн-3» (для використання в медичній практиці), а казеїну з вітаміном  $D_3$  у фотосмолці — «Відеїн- $D_3$ » (для застосування лише у тваринництві, переважно птахівництві).

У виробництві «Відеїну-3» застосовували кристалічний холекальциферол або його кристалічний комплекс із холестеролом («Відехол»), який містить до 40% вітаміну  $D_3$  і 60% холестеролу. Біологічна активність цього препарату висока, через що профілактична лікувальна доза його є низькою.

Дослідження показали, що комплексні сполуки сироваткового і яєчного альбуміну та казеїну з вітамінами А,  $D_2$ ,  $D_3$  і Е, а також каротином, ергостеролом, 7-дегідрохолестеролом і деякими неприродними стеролами набувають нових властивостей. Зокрема, у нестійких до кисню повітря 7-дегідрохолестеролу, ергостеролу, вітамінів А,  $D_3$  і Е під час зберігання в комплексах істотно підвищується стійкість до зниження активності. Значно збільшується розчинність цих комплексів у водних розчинах.

Каротин у комплексі з яєчним альбуміном не руйнується навіть під час тривалої експозиції на прямому сонячному світлі. У дослідях на курчатах установлено, що каротинбілковий препарат (каротеїн) порівняно з олійним препаратом каротину ефективніший і краще засвоюється та перетворюється в організмі на вітамін А. Клінічні дослідження в Інституті харчування та Інституті педіатрії, акушерства і гінекології МОЗ України свідчили про позитивний результат використання каротеїну для лікування хворих із виразкою шлунку, дванадцятипалої кишки, а також при гострих кишкових захворюваннях у дітей.



Метод одержання комплексів ґрунтується на одночасному процесі осадження білків в ізоелектричному стані з утворенням тонкого колоїдного розчину стеролів. Обидва процеси пов'язані зі стрибкоподібними змінами вільної енергії поверхні та реактивних центрів молекул білка і ліпиду.

Після успішних біологічних випробувань комплексів казеїну з вітамінами А,  $D_2$ ,  $D_3$  і Е, а також комплексу каротину з вітаміном  $D_3$  було розроблено технологію їх промислового виробництва. Комплекс вітаміну  $D_3$  (фотосмолки) з казеїном — «Відеїн  $D_3$ » — було впроваджено у виробництво на Київському вітамінному заводі. Казеїновий комплекс холекальциферолу «Відеїн-3» виявився ефективним для лікування дітей, хворих на рахіт. Цей препарат не має побічної дії навіть у разі використання у великих дозах і не зумовлює гіпервітамінозу. Результати теоретичних і практичних досліджень вітаміну D досить детально висвітлено в монографії В. П. Вендта, О. М. Лук'янової і І. М. Хохол «Видеин-3 — новый антирахитический препарат холекальциферола, его свойства и его применение для профилактики лечения рахита у детей» (К.: Наук. думка, 1974).

Велику увагу Володимир Петрович завжди приділяв методичному забезпеченню експериментів, оцінці застарілих методів аналітичної хімії стеролів і створенню сучасних найдосконаліших методів. Під його безпосереднім керівництвом у відділі було розроблено сучасні оригінальні методи для якісного і кількісного аналізу стеролів та їхніх похідних у тканинах тварин (із використанням у дослідях тонкошарової хроматографії, ультрафіолетової й інфрачервоної спектроскопії), а також модернізовано відомі раніше. Окрім зазначених методів, було розроблено хроматографічні методи експресного аналізу препаратів вітамінів D, А, Е та каротину; біохімічні методи вивчення процесів кальцифікації і декальцифікації кісткової тканини, способи кількісного визначення кальційзв'язувального білка в біологічних об'єктах та ступеня реабсорбції фосфатів.

За участю Володимира Петровича в Києві (1972 р.) було проведено Другий симпозіум з хімії, біохімії, технології вітамінів D та їх використання в медицині і тваринництві. Досягнення в технології виробництва вітамінів D експонувалися на міжнародній виставці ЕКСПО-67 у Канаді (вересень, 1967 р.). На міжнародній конференції в Софії, присвяченій вивченню вітамінів (1963 р.), репрезентовано результати роботи з одержання

штучних комплексів жиророзчинних вітамінів із білками; у Будапешті (1965 р.) — з перетворення вітаміну D<sub>3</sub> в організмі.

Подальші дослідження (1976–83 рр.), що їх проведено вже у відділі біохімії стеролів, було присвячено вивченню біохімічних та фізіологічних властивостей різних груп стеролів, їх локалізації та ролі в органах, тканинах і клітинних органелах при різних патологічних станах організму. Вони були спрямовані на розроблення й наукове обґрунтування способів одержання нових препаратів на основі стеролів з метою використання їх у медицині та сільському господарстві.

Успіхи з ідентифікації та вивчення механізму дії активних метаболітів вітаміну D, що їх було досягнуто у відділі, спонукали вчених переглянути свої погляди на проблему фізіологічної активності й будови вітамінів групи D та речовин із подібною дією як ендогенного, так і екзогенного походження. Володимир Петрович вважав, що з'явилася можливість спрямованого синтезу нових аналогів вітаміну D зі специфічними властивостями активаторів транспортування кальцію в кишечнику, а також сполук, які мобілізують цей вітамін у кістковій тканині і регулюють процес кальцифікації останньої.

З 1971 р. у відділі фотобіохімії розробляли методи одержання препаратів-атрактантів для боротьби зі шкідниками сільського господарства. Із рослинної сировини одержано атрактанти до американського білого метелика та яблунової плодожерки, підбрано ефективні антиоксиданти-стабілізатори для цих препаратів, які згодом було передано до Інституту органічної хімії АН УРСР з метою встановлення структури та розроблення технології їх синтезу.



У 1973 р. увагу В. П. Вендта привернули питання, пов'язані з розробленням методів виділення із рослинної сировини гормонів-інсектицидів типу екдизонів для боротьби зі шкідниками сільського господарства. Передусім потрібно було провести скринінг природних джерел фітоекдизонів та розробити методи їх виділення й ідентифікації. Унаслідок проведеного пошуку диких рослин у заповіднику Асканія-Нова, виявлено рослини родини *Serratula* (*Серпухових*), у яких вміст фітоекдизонів (речовин стероїдної природи) був навіть значно вищим (4–5% 20-гідроксіекдизону), ніж у комах (~1%) у період їхнього линяння та метаморфозу. Один із видів цієї родини — *Serratula coronata* — було окультурено в Олександрійському дендропарку (Біла Церква). Фітоекдизони виділили також із листя подокарпусу (Крим) та ягідного тису (Асканія-Нова). Вплив на гормональну активність фітоекдизонів вивчали на личинках кімнатної мухи та гусені яблунової плодожерки (Ю. Д. Холодова, 1978 р.).

У 1980–1983 рр. В. П. Вендт працював у відділі біохімії стеролів науковим співробітником-консультантом.

Володимир Петрович любив життя у всіх його проявах. Завжди багато і натхненно працював, але вмів і змістовно відпочивати. Кожної відпустки він разом із дружиною Галиною Дмитрівною Єлісеєвою подорожував. Любив природу і з радістю спілкувався з нею. Отримавши садову ділянку, із задоволенням працював на ній і дуже пишався особисто вирощеними квітами. А ще дуже подобалося йому ловити рибу.

Володимир Петрович був надзвичайно доброю людиною, любив свою доньку Майю, багато уваги приділяв синові другої дружини Галини Дмитрівни — Вадимові. Щедро

ділився теплом своєї душі з учнями, колегами та друзями.

В. П. Вендт пішов із життя 22 листопада 1993 р., його поховано в Києві на Берковецькому цвинтарі.

Володимир Петрович Вендт за своє довге і плідне наукове життя встиг багато зробити для розвитку та з'ясування фундаментальних і прикладних проблем біохімічної науки — біотехнології. Він був висококваліфікованим фахівцем. Для його наукової діяльності характерно органічне поєднання актуальних теоретичних досліджень із наполегливим пошуком шляхів практичної реалізації одержаних наукових результатів, постійне прагнення до зв'язку між фундаментальними дослідженнями і вирішенням практичних потреб медицини та сільського господарства.

Першим на теренах Радянського Союзу Володимир Петрович створив відділ фотобіохімії в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна і першим широко узагальнив дослідження з хімії та біохімії стеролів та вітамінів групи D. Одним із перших у вітамінології показав можливість утворення комплексів вітамінів стеролового ряду з білками і довів наявність між ними ковалентного зв'язку. Ці дослідження дали змогу розробити методи одержання штучних високоактивних білково-вітамінних комплексів на основі казеїну (або інших білків) із препаратами вітамінів D<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>, каротину та вітаміну E (як моно-, так і полівітамінних). Вітамінна промисловість України, а згодом Вірменії використала розроблену В. П. Вендтом технологію промислового виробництва вітаміну D<sub>3</sub> у вигляді олійного розчину та порошку «Відеїну D<sub>3</sub>» для потреб птахівництва, а також «Відеїну-3» — для медицини.

Вивчаючи процеси кальцифікації кісткової тканини за нестачі в кормах вітаміну D, Володимир Петрович запропонував метод ранньої діагностики D-гіповітамінозу у курчат, який відкрив



шляхи виробничого контролю для нормального вирощування бройлерів у птахівничих господарствах. Ним також було розроблено і впроваджено у медичну практику метод ранньої діагностики D-гіповітамінозу у дітей молодшого віку та метод визна-

чення ступеня ризику захворювання на рахіт у немовлят на основі даних аналізу пуловинної крові.

Уперше в нашій країні В. П. Вендт і Р. І. Яхимович одержали кристалічний вітамін D<sub>3</sub> та його комплекс із холестеролом, що отримав назву «Відехол». Цей препарат виробництва хіміко-фармацевтичного об'єднання «Дарниця» (Київ) успішно застосовувався для профілактики й лікування рахіту у дітей.

Свідченням високої наукової та практичної цінності зазначених робіт було присудження у 1980 р. В. П. Вендту і Р. І. Яхимович Державної премії України в галузі науки і техніки «За дослідження з хімії та біохімії вітаміну D<sub>3</sub>, створення промислової технології його виробництва і впровадження в медицину та сільське господарство». Володимир Петровичу належить 200 наукових праць; його винахідницьку діяльність підтверджено 17 авторськими свідоцтвами; він розробив значну кількість методичних рекомендацій для використання в медичній практиці ранньої діагностики атеросклерозу, рахіту, лейкозу та інших захворювань.

В. П. Вендт був членом редколегії дев'яти видань збірника «Вітаміны», випуск VI якого повністю присвячений хімії і біохімії вітаміну D та його використанню в медицині й сільському господарстві (1971 р.). Він також був членом редакційної колегії збірника «Биохимия человека и животных». Проводив велику науково-популяризаційну роботу, виступаючи з доповідями про досягнення біохімічної науки для інженерно-технічного персоналу та робітників заводів Києва, Таллінна та інших міст, громадськості Кримської і Житомирської областей.

Володимир Петровичу Вендту були притаманні глибока відданість справі, принциповість, порядність, скромність та чемність як у науці, так і в житті. Усе його життя було подвигом: і під час війни на фронті, і в мирний час у науці.

Нині навряд чи хто сумнівається, що за біотехнологіями майбутнє. Вони набули широкого застосування у медицині, сільському господарстві, харчовій та хімічній промисловості, в охороні довкілля та на транспорті. І дуже важливо пам'ятати, що свій вагомий внесок у розвиток і впровадження біотехнології зробили й українські вчені-ентузіасти, серед яких почесне місце посідає Володимир Петрович Вендт.

Відбілює душа свою велику правду  
У лузі споминів над річкою Буття.

Ліна Костенко

## Тварин буде врятовано

Фахівці Массачусетського технологічного інституту й Інституту біомедичних досліджень Уайтгеда створили на основі клітин-попередників еритроцитів нову культуральну систему для реєстрації ушкоджень ДНК, застосування якої для оцінювання токсичності нових хімічних сполук дозволить зберегти життя тисячам безневинних тварин. Така система дозволяє проводити сотні або навіть тисячі тестів за допомогою кісткового мозку однієї тварини. Дослідники сподіваються, що методику вдасться адаптувати і застосовувати для оцінювання ДНК-токсичності нових препаратів з використанням клітин кісткового мозку людини. Попередники еритроцитів є зручним об'єктом для подібних досліджень, оскільки на останньому етапі дозрівання в кістковому мозку вони втрачають ядро. У разі ушкоджень ДНК клітини-попередника у зрілому еритроциті залишаються мікроядерця, які можна легко виявити і які складаються із фрагментів дефектної ДНК. На сьогодні для оцінювання впливу на ДНК тестований препарат вводять у кістковий мозок живих мишей.

Нову систему розроблено на основі існуючої технології культивування клітин ембріональної печінки мишей. Вона дозволяє культивуваним у ній клітинам-попередникам червоного паростка кровотворення проліферувати і проходити 4–5 циклів поділу до перетворення на зрілі еритроцити. Результати вивчення реакції таких клітин на дію трьох токсичних для ДНК сполук повністю відповідали даним, отриманим під час проведення традиційних тестів на живих мишах. Подальше підтвердження адекватності методу було одержано в експериментах на мутантних тваринах, які не мають систем репарації ДНК і, відповідно, чутливіші до дії ДНК-токсичних агентів, та на клітинах їхнього кісткового мозку.

Автори планують протестувати (можливо, у співпраці з промисловими партнерами) нову систему з використанням клітин щурів та інших тварин, а також широкого спектра токсичних сполук. Упровадження цієї системи також, безумовно, порадує всіх членів товариств захисту тварин.

*За матеріалами сайту Інституту біомедичних досліджень Уайтгеда (Whitehead Institute for Biomedical Research) та інформаційного веб-порталу ScienceDaily*

## Ліки проти сліпоти

Спеціалісти університету Каліфорнії, які працюють під керівництвом професора Уїнстона Вей-Янг Као (Winston Whei-Yang Kao), встановили, що стовбурові клітини кісткового мозку відновлюють рогівку при спадкових захворюваннях очей. В експериментах на мишах стовбурові клітини кісткового мозку продемонстрували здатність диференціюватися у клітини, що синтезують кератокан — білок, необхідний для формування рогівки ока.

Учені індукували у мишей патологічні стани рогової оболонки ока, аналогічні аномаліям, що розвиваються в результаті певних мутацій, після чого вводили в рогівку стовбурові клітини кісткового мозку. Вже протягом тижня після введення таких клітин патологічно змінені рогівки тварин починали відновлюватися і набирати нормальної форми.



Автори вважають, що введення клітин кісткового мозку в людську рогівку може сприяти поліпшенню гостроти зору, зниженої внаслідок мутацій. Вони вже планують клінічні випробування і стверджують, що в разі отримання позитивних результатів розроблену ними процедуру в майбутньому можна буде використовувати для запобігання розвиткові генетично обумовленої сліпоти.

На цей час для лікування таких станів вдаються до трансплантації рогівки. Ця процедура дає позитивні результати, проте після декількох років донорські клітини часто зникають і хвороба рецидивує. Можливо, цю проблему вдасться вирішити, використовуючи стовбурові клітини, здатні до тривалого самопідтримування популяції.

*За матеріалами інформаційних веб-порталів ScienceDaily і «Коммерческая биотехнология»*



## Щеплення проти... гіпертонії

Захворюваність на гіпертонію без перебільшення можна назвати пандемічною — вона трапляється у кожного третього представника дорослого населення і подвоює ризик померти від проблем із серцем. Традиційне лікування для людей із підвищеним тиском — таблетки, проте вони мають численні побічні ефекти. Крім того, оскільки ці ліки розраховані на тривале приймання, люди іноді просто забувають їх вжити. Тому вкрай важливим є повідомлення спеціалістів британської компанії Protherics про розроблення вакцини проти гіпертонії.

Вакцинація може стати ефективнішою методикою лікування, вважають розробники. Вона здійснюватиметься один раз на півроку. В ідеалі ліки вводитимуться за три ін'єкції з проміжком у тиждень–два. Новий препарат запускає імунну реакцію, примушуючи організм продукувати антитіла до гормону ангіотензину, який виробляє печінка. Ангіотензин викликає звуження артерій, підвищуючи тим самим кров'яний тиск.



Нині компанія розпочинає останній етап клінічних випробувань удосконаленої вакцини. Ця вакцина здатна спричинити імунну реакцію, у 10 разів більшу, ніж її оригінальний варіант. Під час клінічних випробувань препарату було виявлено незначні побічні ефекти, у 10% хворих спостерігалися короткочасні реакції, схожі на грип.

*За матеріалами веб-сайтів Daily Mail та «Вокруг света»*

## Біомолекули в магнітних руках

Електромагнітні перемикачі на зразок MRAM (magnetic random-access memory), які використовуються в оперативній пам'яті комп'ютерів, можна застосовувати для маніпуляцій над індивідуальними молекулами нуклеїнових кислот і білків, що полегшить і прискорить процедуру секвенування генів та інших маніпуляцій з біомолекулами.

Учені Національного інституту стандартів і технологій США (National Institute of Standards and Technology) продемонстру-

вали, що набори перемикачів — так звані спінові клапани, які набули широкого застосування як магнітні датчики зчитувальних головок комп'ютерних дисків з високою щільністю запису, можна використовувати для роботи з індивідуальними біомолекулами. На їх основі можна проводити малопотужні мікрорідинні чипи для одночасного випрямлення і розкручування або уловлювання та сортування великої кількості біологічних молекул. Такі прилади здатні полегшити проведення масштабних медичних і судових досліджень.

Спінові клапани виготовляють за допомогою чергування тонких шарів матеріалів, що відрізняються за своїми магнітними властивостями. Їхня результуюча намагніченість може створюватись або обнулятись прикладенням зовнішнього магнітного поля, напруги якого достатньо для шиккування спинів електронів у магнітних шарах в одному й тому самому або у протилежних напрямках відповідно.

Автори створили прилад, що складається зі спінових клапанів (розміром близько 1–4 нм кожен), нанесених на розміщену в рідині мембрану з нітриду кремнію завтовшки 200 нм. У разі активації такого клапана створюється локальне магнітне поле, напруги якого достатньо для уловлювання магнітних наночастинок. А за допомогою магнітного поля, що обертається, спінові клапани можна використовувати і для розгортання ланцюжків частинок.

Подивитися, як магнітні наночастинокки обертаються навколо магнітного клапана, можна на сайті Інституту стандартів і технологій ([http://www.nist.gov/public\\_affairs/images/spin\\_valve\\_array.avi](http://www.nist.gov/public_affairs/images/spin_valve_array.avi)).

Грунтуючись на отриманих експериментальних даних і результатах комп'ютерного моделювання, автори стверджують, що за допомогою спінових клапанів можна домогтися створення сил скручування, здатних змінювати структуру і форму біомолекул (білків або ДНК), сполучених із магнітними частинками.

Паралельна обробка індивідуальних біомолекул має істотні переваги перед існуючими методиками, що дозволяють одночасно проводити маніпуляції лише над однією молекулою. Оптичні щипці, що використовують лазер для уловлювання і маніпуляцій з біомолекулами, функціонують повільно, обмежені в потужності і працюють тільки зі зразками розміром не менше 1 мкм. Існуючі магнітні щипці можуть уловлювати дрібніші молекули і прикладати до них

скручувальне зусилля, проте для їх функціонування потрібна іммобілізація біомолекул, що потребує суттєвих витрат часу і унеможлиблює їх подальший аналіз. Таким чином, одержані результати можуть виявитись революційними для подальшого розвитку біотехнології загалом.

За матеріалами веб-сайту Національного інституту стандартів і технологій США (National Institute of Standards and Technology) та журналу *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*

### Бактерійні наноконтейнери — доставлення ліків за адресою

Наноконтейнери з мікроскопічних фрагментів бактерій здатні стати новим ефективним засобом адресного доставлення ліків для боротьби зі злоякісними пухлинами. На думку розробників, новий метод лікування дозволить знизити дозування ліків і звести до мінімуму побічні ефекти хіміотерапії.

Співробітники австралійської компанії EnGeneIC знайшли спосіб модифікувати процес поділу бактерій, змістивши зону поділу з центру на кінцеві ділянки мікроба. У результаті кожна бактерія продукувала велику кількість позбавлених спадкового матеріалу мікроскопічних фрагментів цитоплазми, оточених щільною полісахаридною оболонкою.

Учені вважають, що отримані фрагменти бактерій можна легко і швидко заповнити практично будь-якими ліками. Щільна оболонка дозволяє капсулам з ліками зберігати цілісність і вільно пересуватися з током крові, не заподіюючи шкоди здоровим тканинам і клітинам. Водночас специфічні антигени, розміщені на поверхні капсул, забезпечують їх швидке скупчення в уражених злоякісною пухлиною тканинах. Наприклад, щоб використовувати капсули з препаратом для лікування раку грудей герцептином, їх необхідно забезпечити антитілом до рецептора Her2, розташованого на поверхні ракових клітин. Зв'язавшись із цим рецептором, капсула проникає в ракову клітину, а потім руйнується, вивільняючи ліки.

На думку розробників, нова методика дозволяє знизити необхідну дозу ліків у тисячі разів, що є вкрай важливим з огляду на високу токсичність препаратів для хіміотерапії раку.

На сьогодні дослідники EnGeneIC успішно випробували нову методику лікування на лабораторних тваринах із ксенотрансплантами злоякісних пухлин людини. За їхніми даними, у разі внутрішньовенного введення 30% від дози препарату досягало пухлини упродовж 2 год, що сприяло значному зменшенню її розмірів. У ході дослідів не було виявлено жодних ознак токсичної дії препаратів, а алергічні реакції на бактеріальні антигени були незначними.

Розробники мали намір розпочати клінічні випробування нової техніки антиракової терапії наприкінці 2007 року.

За матеріалами веб-порталів *New Scientist* та *Медпортал*

### Біопестицид проти вогнених мурашок

Червона вогненна мурашка *Solenopsis invicta* (лат. *invicta* — непереможний) — справжнє стихійне лихо для Північної та Південної Америки. Лише в Сполучених Штатах сума збитку від цієї симпатичної тваринки становить 6 млрд. дол. на рік. Війна з мурашкою без особливих успіхів ведеться протягом багатьох десятиліть, хоча на знищення цих шкідників витрачається близько 2,7 млрд. дол. щорічно.

Дослідники Міністерства сільського господарства Сполучених Штатів (USDA) вважають, що нарешті їм вдалося одержати ефективну зброю проти шкідни-



ка — вірус природного походження, що вбиває мурашок. У Південній Америці з вогненими мурашками досить успішно борються, випускаючи в джунглі мух-горбаток (*Phoridae*), які хитрим способом обезголовлюють мурашок. Проте ефективність мух, що чудово показали себе в Південній Америці, викликає сумнів щодо Північної Америки. Тому фахівці USDA пішли іншим шляхом: з 2002 р. вони ретельно вивчали вірус SINV-1, що спричинює повільну смерть заражених колоній протягом трьох місяців. Ученим вдалось навчитися розмножувати SINV-1 в лабораторії, і, на їхню думку, цей вірус має великий потенціал як біопестицид, який може бути створено за наявності комерційних партнерів. Пошуком цих партнерів USDA тепер і займається.

За матеріалами веб-порталу *Yahoo!News* та веб-сайту Американського товариства споживачів *eXtension*

## Стовбурові клітини-«підлітки» відновлюють кровопостачання

«Напівдорослі» стовбурові клітини, одержані з ембріональних клітин за допомогою нового методу диференціювання, здатні формувати кровоносні судини. Уведення таких клітин тваринам сприяло відновленню післяінфарктних уражень і діабетичної патології сітківки.

Причиною розвитку дефектів тканин, зокрема діабетичних виразок і ушкоджень серцевого м'яза при серцево-судинних захворюваннях, часто є недостатнє кровопостачання. Нині у більшості досліджень і клінічних експериментів для стимуляції відновлення судин використовують дорослі стовбурові клітини кісткового мозку.

Учені американської компанії Advanced Cell Technologies, які працюють під керівництвом Роберта Ланца (Robert Lanza), розробили метод перетворення ембріональних стовбурових клітин на клітини, які є більш пластичними, аніж дорослі стовбурові клітини кісткового мозку. Автори вводили одержані ними клітини тваринам з різними ушкодженнями тканин: діабетичною ретинопатією, штучно індукованим інфарктом міокарда і порушенням кровопостачання кінцівок. Уведені клітини з током крові просувалися до уражених ділянок і протягом 24–48 год відновлювали ушкоджені кровоносні судини.

Фахівці стверджують, що клітини, одержані в результаті диференціювання існуючих ліній ембріональних стовбурових клітин, можна вирощувати у великих кількостях протягом нетривалого часу. Це вигідно відрізняє їх від донорських дорослих стовбурових клітин, одержання достатньої кількості яких пов'язано з певними труднощами. Окрім цього, для культивування нового типу клітин не потрібна людська або тваринна сироватка. Зараз автори вивчають можливість використання таких клітин для запобігання прогресуванню атеросклерозу, лікування інсульту, а також створення на їх основі універсальних донорських клітин крові, придатних для переливання.

Вочевидь, ученим належить вирішити ще чимало проблем. Одним з основних питань є визначення здатності клітин уникати імунологічного відторгнення, оскільки в цій технології використовують «нерідні» клітини пацієнтів. До того ж, будь-яка робота з ембріональними стовбуровими клітинами порушує велику кількість складних

політичних і особливо етичних питань, на яких ми акцентували увагу в наших попередніх публікаціях.

*За матеріалами сайту TechnologyReview та журналу Nature Methods*

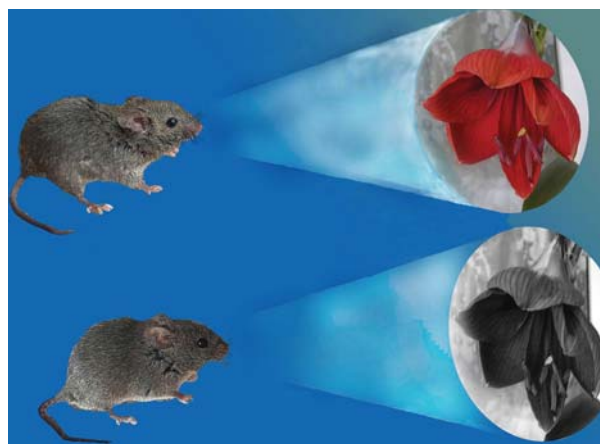
## Миші побачать веселку «людськими очима», або Крок до евгеніки

Ббудований у мишачий геном фрагмент ДНК людини, що кодує світлочутливий пігмент людського ока, замінив звичний для тварин тьмянний жовто-синьо-сірий на новий, що грає всіма барвами веселки.

Вчені Каліфорнійського університету під керівництвом Джеральда Якобса (Gerald Jacobs) створили генетично модифікованих мишей, очі яких містять не тільки мишачий, але й людський світлочутливий пігмент. Це дало змогу трансгенним тваринам розрізняти кольори, яких не бачать звичайні миші.

Сітківка ока більшості ссавців містить два типи пігментів: перший закодований в одному з генів Х-хромосоми, а другий — в одній із соматичних (нестатевих) хромосом. Проте у багатьох приматів, зокрема і в людини, є третій світлочутливий пігмент, який також кодується Х-хромосою і дає змогу розрізняти набагато ширший спектр кольорів.

Під час вивчення еволюції трибарвного зору більшість дослідників вказують на приклад південноамериканських мавп, зір яких є чимось середнім між дво- і трипігментними системами. У цих мавп Х-хромосома містить ген лише одного світлочутливого пігменту, проте існують декілька версій гена, що забезпечують синтез різних світлочутливих пігментів. У результаті в очах самок мавп (що мають по дві Х-хромосоми) можуть бути три різних пігменти.



Для того щоб отримати відповідь на запитання: «Чи достатньо для трибарвного зору додаткового пігменту, чи необхідним є також більший розвиток мозку?», вчені створили самок мишей, одна із Х-хромосом яких містить ген нормального мишачого пігменту, а інша — людського. Як і в очах самок мавп, в очах таких мишей містилися три різних пігменти.

Для з'ясування здатності трансгенних тварин розрізняти кольори їх піддавали тесту на дальтонізм з використанням трьох круглих панелей, що спалахували зеленим, жовтим або червоним кольором. Одна з панелей спалахувала кольором, відмінним від кольору двох інших, і тварини, що натискали на неї лапами або носом, отримували в нагороду соєве молоко. Трое з п'яти мишей у 80% випадків натискали правильну панель протягом 10 000 підходів. Дві миші продемонстрували гірші результати, що, найімовірніше, зумовлено неповноцінною комбінацією трьох пігментів у їхніх сітківках.

Одержані результати свідчать, що мозок мишей здатен розшифровувати потік нової зорової інформації. Крім того, висловлюються припущення, що модифікації людських очей за допомогою четвертого, правильно підбраного, пігменту достатньо для того, аби людина почала бачити у темряві або розрізняти ультрафіолетову ділянку спектра. Щоправда, генетичні модифікації людини — справа віддаленого майбутнього.

*За матеріалами журналів  
Nature, Science, PNAS*

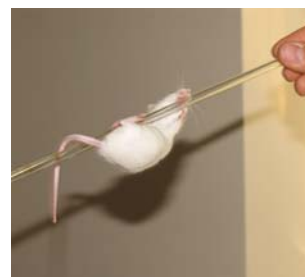
### **На шляху до штучного імунітету. Біоінженерія починає і виграє**

Японські вчені пересадили миші штучний лімфатичний вузол, і він успішно почав проводити імунні клітини. Як стверджують дослідники, нова форма біоінженерії є значним кроком на шляху до перенесення цілої імунної системи пацієнтові, який хворий на СНІД або рак.

Штучний лімфатичний вузол, який використовує Такеші Ватанабі (Takeshi Watanabe) з інституту фізичних і хімічних досліджень RIKEN в Японії, складається з колагенового каркаса, заселеного стромальними і дендритними клітинами, одержаними з тимуса новонароджених мишей.

Цю конструкцію (колагенова «губка» діаметром 3–4 мм, заселена клітинами) спочатку імплантували миші зі здоровою імун-

ною системою, яку вакцинували нешкідливим антигеном, що викликає імунну відповідь. У природному лімфатичному вузлі стромальні клітини виконують роль структурного організатора, завдячуючи якому різні компоненти відповідним чином впорядковуються і їхня робота стимулюється. Те саме відбувається і в штучному вузлі — стромальні клітини притягують клітини імунної системи, що циркулюють у крові (Т- і В-лімфоцити), і організовують їх в окремі структури, як у природному лімфовузлі. Потім цей заселений лімфоцитами штучний лімфовузол перенесли до тварин з нефункціонуючою імунною системою. Лімфоцити швидко розповсюдилися зі штучного вузла у власні лімфатичні вузли тварин, які були «порожніми» через відсутність імунної активності.



Коли Ватанабі ввів ті самі нешкідливі антигени мишам з імунною недостатністю, пересаджена їм імунна система активно відгукнулася виробленням великої кількості лімфоцитів для нейтралізації чужорідних молекул, причому ця клітинна «пам'ять» зберігалася і через місяць.

Це тільки перший крок до застосування методу для лікування людей, а наступним має бути використання людських клітин для «гуманізованої» миші. Можливо, через 4–5 років подібні дослідження буде проведено й на людях. Імплантуючи хворим на СНІД лімфатичні вузли, населені здоровими Т- і В-лімфоцитами, Ватанабі сподівається відновити їхню зруйновану імунну систему. Для боротьби з раком дослідник має намір застосувати аналогічний підхід, за яким пересажені лімфатичні вузли міститимуть клітини, «навчені» відшукувати антигени пухлинних клітин і знищувати їх.

*За матеріалами журналу Journal of Clinical Investigation та сайту Центру медико-біологічних технологій*

### **Ех, не рости трансгенним травам!**

Суддя Вашингтонського окружного суду Генрі Кеннеді виніс рішення у справі, порушеній низкою організацій із захисту довкілля проти керівництва Сільськогосподарського департаменту США та компанії Scotts, яке забороняє подальші польові випробу-



вання генетично модифікованих дернових злаків, включаючи тонконіг лучний та мітлицю повзучу, що зазвичай використовуються як покриття полів для гольфу. Ці злакові було трансформовано за допомогою генів, відповідальних за стійкість до гербіцидів, діючою речовиною яких є гліфосат. Спираючись на результати, отримані дослідниками Агентства із захисту навколишнього середовища (Environmental Protection Agency) у 2004 році, які чітко показали наявність перенесення цих генів із модифікованих рослин до диких видів трав, суддя погодився з позивачами, що використання трансформованих рослин є вельми ризикованим. Зробивши висновок, що позиції керівництва USDA щодо їхньої відповідальності за оцінку потенційно шкідливих бур'янів були довільними, мінливими і в багатьох випадках суперечили закону, він наказав зупинити випробування генетично модифікованих злаків до повної екологічної перевірки Сільськогосподарським департаментом території, на якій проводились випробування, згідно із Законом про політику у сфері довкілля.

За матеріалами журналу  
*Nature Biotechnology*

### А з гібридними зародками ми трішечки зачекаємо

На відміну від американської Феміди, британські можновладці займають очікувальну позицію у справі регламентації створення та використання так званих людино-тваринних гібридних зародків. Британська адміністрація з питань запліднення та ембріології людини (Human Fertilization and

Embryology Authority — HFEA) вирішила відкласти до осені прийняття рішення стосовно двох наукових пропозицій, в яких ідеться про одержання таких гібридних ембріонів. У зазначений період планується проведення додаткових консультацій стосовно цієї «сумнівної» технології. Рішення HFEA суперечить нещодавно виданій урядовій «Білій книзі», що пропонує заборонити подібні дослідження в новій редакції Закону про запліднення та ембріологію людини.



Гібридні зародки є варіантом клонованих людських ембріонів, що їх одержують внесенням генетичного матеріалу людини в порожні яйцеклітини корів або кроликів, і слугують джерелом людських ембріональних стовбурових клітин для наукових або терапевтичних потреб, покриваючи, таким чином, нестачу людських яйцеклітин, які використовуються у таких дослідженнях.

За матеріалами офіційного сайту  
*Human Fertilization and Embryology Authority*

### З усіх стволів — по імунній системі

Біотехнологічна компанія Medistem Laboratories, Inc., що розробляє методи лікування неврологічних, серцево-судинних, ортопедичних та інших захворювань на основі дорослих стовбурових клітин, одержаних із пуповинної крові, жирової і м'язової тканин або з кісткового мозку, повідомила про створення її фахівцями препарату толеростем (Tolerostem, TM), призначеного для контролю над небажаними імунними реакціями.

Якщо після всіх належних випробувань толеростем буде схвалено для клінічного застосування, його можна використовувати для лікування ревматоїдного артриту, розсіяного склерозу і діабету типу I. Окрім того, застосування толеростему під час трансплантації донорських органів чи клітин дасть можливість «обдурити» імунну систему реципієнта, що дозволить обійтися без тривалої імуносупресії, яка дає вкрай небажані побічні ефекти.

Принцип роботи препарату заснований на відомій властивості деяких ліній стовбурових клітин активувати регуляторні Т-лімфоцити, що відіграють роль антизапальних клітин імунної системи. Потім регуляторні клітини спрямовуються до місця запалення і «навчають» запалені клітини не «нападати» на власні тканини організму. Підтвердження ефективності толеростему уможливить новий підхід до регулювання імунної відповіді, що не вимагатиме медичного втручання.

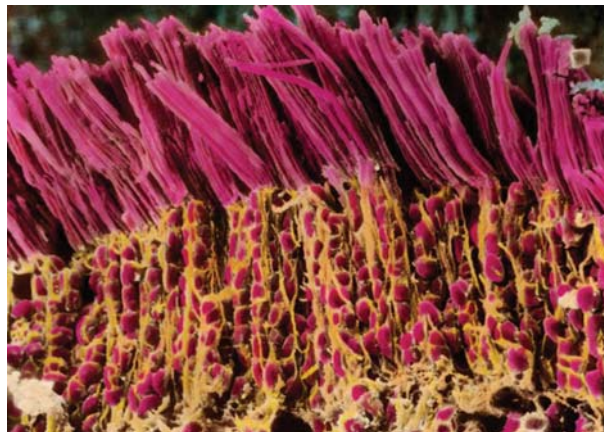
Зараз компанія веде переговори з імунологічними лабораторіями щодо здійснення доклінічних випробувань свого препарату, а в найближчому майбутньому сподівається отримати дозвіл FDA на проведення клінічних експериментів.

*За матеріалами сайтів компанії  
Medistem Laboratories, Inc. та  
Центру медико-біологічних  
технологій (Москва)*

### **Ваші клітини ще не підстрижені? Тоді ми йдемо до вас**

Крихітні наноножиці, що відкриваються і закриваються під впливом променів ультрафіолетового та видимого діапазону світла, є першим молекулярним пристроєм, що дозволяє виконувати маніпуляції з клітинами і молекулами за допомогою освітлення. Ці ножиці, створені фахівцями Токійського університету під керівництвом професора Такузо Аїда (Takuzo Aida), завдовжки 3 нм, можуть доставляти лікарські препарати всередину клітин та проводити маніпуляції над біологічними молекулами, зокрема з високим ступенем точності контролювати активність білків.

Дослідники давно працюють над створенням нанопристроїв, які б функціонували під впливом специфічних стимулів, таких як звук або світло. Особливо зацікавлені в таких приладах біологи і лікарі, оскільки це дасть змогу проводити різні маніпуляції



з генами і молекулами всередині організму. Наприклад, відомо, що світло ближчої інфрачервоної ділянки спектра може проникати глибоко у тканини. Тому наноножиці, регульовані за допомогою методу мультифотонного збудження, можна використовувати для таких медичних потреб, як генна терапія.

Молекулярні ножиці, як, власне, і звичайні, складаються із шарніра, лез і рукоятей. Механізм шарніра є двоярусною молекулярною структурою, у центрі якої міститься атом заліза, затиснутий між двома вуглецевими пластинками. Ця трикомпонентна структура забезпечує рухливість наноножиць. Керують рухом дві рукояті, що містять світлочутливі молекули азобензолу, який під впливом світлової енергії різних ділянок спектра переходить з однієї ізоформи в іншу. Дія ультрафіолету перетворює довгу ізоформу азобензолу на коротку. Світло видимої ділянки спектра має зворотню дію.

Навперемінна дія ультрафіолетового і видимого світла зумовлює періодичний перехід молекул азобензолу з однієї ізоформи до іншої, що рухає рукояті. Рух передається на механізм, який, у свою чергу, створює «ріжучі» рухи лез. До лез наноножиць кріпиться органометалевий комплекс — цинкопорфірин. Атом цинку, що входить до його складу, здатен міцно зв'язуватися з молекулами азотовмісних сполук і, зокрема, з ДНК. Під час відкриття і закриття лез молекула, що прикріплюється до них, згинається і розгинається.

Зараз автори розробляють більші «ножиці», якими можна буде управляти дистанційно, проте до застосування таких систем на практиці ще дуже далеко.

*За матеріалами сайтів  
Американського хімічного товариства  
(American Chemical Society) та ScienceDaily*

## Черговий доказ зв'язку куріння і раку легенів

Дослідники з Інституту Раку при Університеті здоров'я і науки, Орегона (Oregon Health & Science University Cancer Institute) виявили білок, порушення структури і функції якого під дією речовин, що містяться в сигаретному димі, провокують розвиток раку легенів.

Було показано, що під час куріння зменшується продукування білка FANCD2. Зниження рівня цього білка в клітині призводить до ушкоджень ДНК, хромосомних аберацій і, як наслідок, до неоплазії. FANCD2 належить до білків, що входять до складу репараційних комплексів, які виправляють порушення в структурі молекули ДНК і запускають апоптоз у клітинах, чия ДНК не підлягає відновленню.

Це є черговим доказом того, що куріння потенційно може спричинити рак легенів, проте результати цієї роботи у майбутньому можуть знайти застосування в розробленні терапії раку легенів. По суті, речовини, що містяться в сигаретному димі, порушують природні механізми захисту клітин від ушкодження і аномальної функції.

Автори роботи проаналізували вплив сигаретного диму на декілька відомих білків, відповідальних за репарацію ДНК, і виявили, що істотний ефект виявляється саме стосовно білка FANCD2. Рівень цього білка також знижений при деяких патологічних станах, жодним чином не пов'язаних з курінням, наприклад, при так званій анемії Фанконі — спадковому захворюванні, за якого різко підвищується ризик розвитку пухлин в організмі пацієнта. Що стосується раку легенів, то щороку в світі реєструється до 1,3 млн. нових випадків цієї патології, і більшість із них клініцисти пов'язують саме з курінням.

Значення цього відкриття полягає також у можливості застосування біоінженерних технологій до гена білка FANCD2, що уможливить медикаментозне та безмедикаментозне втручання в його роботу з метою посилення репаративних функцій.

*За матеріалами сайту  
Oregon Health & Science University*

## Генетична схильність до алкогольної і кокаїнової залежності

Ранні дослідження, що ґрунтувалися на аналізі геномів цілих сімей, показали, що гени, відповідальні за розвиток алкогольної залежності, розташовуються в межах досить великої ділянки на хромосомі 4q. Нова робота дозволила уточнити, що існує кореляція розвитку алкогольної залежності та варіабельності дев'яти послідовностей ДНК в 3'-ділянці одного з генів рецептора тахікініну (TACR3).

Дослідження було проведено під керівництвом Тетяни М. Форауд (Tatiana M. Fogoud) у лабораторії спадковості Медичного інституту при Університеті Індіани (Indiana University School of Medicine). Вона впевнена, що результати цього дослідження зможуть допомогти в ранній молекулярній діагностиці алкогольної залежності, що розвивається, визначенні схильності пацієнтів до цього захворювання і розробленні найбільш ефективних методів лікування за допомогою, передусім, новітніх технологій.



Дійсно, розвиток алкогольної та наркотичної залежності у різних індивідуумів відбувається по-різному, і деякі люди є стійкішими як до розвитку, так і до симптомів захворювання. У дослідження було залучено 219 сімей, серед членів яких відзначалась алкогольна або кокаїнова залежність (проведено генотипування 1 923 осіб). Аналізували кореляцію вираженості захворювання, тривалості його розвитку та ефективності лікування з поліморфізмом гена TACR3. Ця робота вже вкотре підтверджує теорію про

те, що схильність до різних видів залежності пов'язана з генетичними чинниками і тому перспективним є лікування їх з допомогою методів молекулярної медицини.

*За матеріалами журналу Alcoholism: Clinical & Experimental Research*

### **Створено штучний трансплантат підшлункової залози**

Штучна підшлункова залоза, створена в університеті американського міста Акрон (штат Огайо), як передбачається, дозволить хворим на діабет обійтися без постійних ін'єкцій інсуліну, повідомляє РІА «Новини» з посиланням на сайт журналу Chemical & Engineering News.

Прилад, який його творець, професор Джозеф Кеннеді (Joseph Kennedy), продемонстрував на конгресі Американського хімічного товариства (American Chemical Society) в Новому Орлеані, є трубкою зі сплаву нікелю і титану розміром як сигарета. За допомогою лазера в ній зроблено отвори. Зовні трубка вкрита напівпроникною полімерною мембраною, а всередині її розміщені клітини підшлункової залози свині.

«Полімерну мембрану сконструйовано так, що вона забезпечує якнайкращі умови для розміщених усередині клітин і вільне переміщення інсуліну та глюкози, однак, з другого боку не дає клітинам імунної системи атакувати ці клітини», — пояснив співавтор приладу професор Кен Розенталь (Ken Rosenthal). За його словами, мембрана також захищає клітини від вірусів і не перешкоджає надходженню до них кисню.

Ще однією особливістю приладу є простота його розміщення в організмі пацієнта. На думку Д. Кеннеді, штучну підшлункову залозу можна розмістити скрізь, де є кровотік, навіть просто під шкіру. «Кров приносить кисень і живильні речовини для клітин і видаляє продукти їхньої життєдіяльності, такі як вуглекислота», — говорять автори проекту. Окрім того, пристрій, який він назвав біоштучною підшлунковою залозою (bio-artificial pancreas), працює і як індикатор рівня цукру в крові, і як джерело інсуліну.

Доклінічні випробування на собаках і щурах дали позитивні результати. Учені розраховують продовжити їх на тваринах, а потім згодом до клінічних випробувань за участю добровольців.

Діабет — метаболічне захворювання, спричинене порушенням функції підшлун-

кової залози, яка, продукуючи інсулін, контролює рівень цукру в крові. Хворі на діабет змушені кілька разів на день робити ін'єкції інсуліну та перевіряти рівень цукру.

За даними ВООЗ, у світі налічується 180 млн. людей, які хворіють на діабет. За прогнозами фахівців, до 2030 року це число подвоїться.

Нагадаємо, що недавно британські вчені виявили ген, який зумовлює ожиріння і пов'язаний з ризиком розвитку діабету. За даними дослідників, цей ген присутній у 50% жителів Великобританії. Як зазначено у прес-релізі Імперського коледжу Лондона (Imperial College London), його співробітники спільно з колегами із кількох зарубіжних наукових центрів знайшли відповідальну за ожиріння і діабет генетичну послідовність. Вона розташована поряд з геном MC4R, який впливає на енергетичний баланс нашого тіла, тобто на те, як багато ми їмо, і скільки живильних речовин організм витрачає та відкладає «про запас». «Виявлення такого тісного зв'язку між генетичною послідовністю і фізичними властивостями організму має дуже важливе значення, особливо якщо врахувати, що ця послідовність є у половини нашого населення», — наголошує Джаспел Кунер (Jaspal Kooner), провідний автор статті, опублікованої в журналі Nature Genetics.

Згідно з результатами дослідження, ген, що спричинює ожиріння, пов'язаний з походженням людини — ця послідовність утричі частіше трапляється у тих, чії предки — вихідці з Південної Азії, ніж у тих, чії предки — європейці. Цим можна пояснити відносно високий рівень ожиріння й інсулінової залежності серед індійців, що на 25% перевищує середньосвітові показники.

*За матеріалами порталу STRF*

### **У Швеції розпочинаються випробування вакцини проти куріння**

Скандинавські вчені почали випробування антинікотинової вакцини, яка має допомогти курцям відмовитися від цієї шкідливої звички. Приватна шведська фармацевтична компанія Independent Pharmaceutica, що заснована в 1997 р. і працює в Стокгольмі в Каролінському інституті, поповнила ряди біотехнологічних компаній, які прагнуть розробити антинікотиніву вакцину.

Дослідники стверджують, що створена ними вакцина позбавляє курців швидкого



задоволення від куріння, оскільки містить антитіла, які прикріплюються до молекул нікотину, роблячи їх завеликими для проникнення через гематоенцефалічний бар'єр у мозок людини, — повідомляє «Інопреса» з посиланням на Reuters. У результаті немає задоволення від куріння, а це означає, що прагнення палити теж зникає.

У другій фазі випробувань за участю 400 добровольців із трьох скандинавських країн дослідники планують виміряти ефект вакцини і на тих, хто вже відмовився від куріння, але боїться знову повернутися до цієї звички. Проте, як заявляє Independent Pharmaceutica, вакцину можуть використовувати і активні курці, які мають бажання кинути палити.

На стадії дослідження перебувають ще декілька вакцин від нікотинової залежності, проте виконавчий директор Independent Pharmaceutica Олена Деглінг Вікінгссон заявила, що її компанія сподівається створити більш дієві ліки з меншою кількістю побічних ефектів, ніж їхні конкуренти.

«Після завершення другої фази експериментів ми хочемо розпочати співпрацю з більшою фармацевтичною компанією, щоб продовжувати дослідження», — зазначила Вікінгссон в інтерв'ю журналістам.

У свою чергу, швейцарська біотехнологічна компанія Cytos Biotechnology опублікувала результати другої фази своїх експериментів, що було виконано в 2005 р., згідно з якими 42% пацієнтів, котрим вводили в кров високі рівні антитіл, кинули палити і через 12 місяців не повернулися до цієї звички. Водночас у контрольній групі, що отримувала плацебо, палити кинув 21%.

Приватна інвестиційна компанія Celtic Pharma, зареєстрована на Бермудських островах, заявила, що вона опублікує результати другої фази свого дослідження в поточному кварталі, а американська компанія Nabi Pharmaceuticals повідомила, що також розробляє ліки від куріння.

*За матеріалами порталу STRF*

### **Відновлення нервової тканини після ушкодження**

Більшість клітин головного мозку представлена не нейронами, а допоміжними клітинами (так званою глією). Вони формують мікрооточення нейронів і утворюють гліальні рубці у разі ушкодження мозку. Проте досі не було відомо про походження певних клітин глії, що реагують на ушкодження.

Дослідження, проведені під керівництвом професора Магдалени Гетц (Magdalena Goetz) показали, що в мозку ссавців (експерименти було виконано на мишах) після ушкодження відбувається активація проліферації частини гліальних клітин. Ці клітини у відповідних умовах *in vitro* можуть також утворювати нейрони.



Професор Магдалена Гетц в своїй лабораторії

Результати цієї роботи є ще одним доказом існування популяції стовбурових клітин нервової тканини, які за певних умов активуються. Гетц у своїх раніших дослідженнях показала, що нейрони можуть утворюватися з елементів глії. Вона також з'ясувала, які чинники впливають на репрограмування клітин глії, що в майбутньому може стати основою генної терапії нейродегенеративних захворювань різної етіології.

*За матеріалами  
German Research Center  
for Environmental Health*

## РЕЦЕНЗІЯ

на монографію В.А. Кунаха  
**«Біотехнологія лікарських рослин.  
 Генетичні та фізіолого-біохімічні основи»**  
 (Київ: Логос, 2005)

У сучасній фармакології дедалі більшу увагу приділяють створенню лікарських засобів на основі рослинної сировини. Для цього є декілька підстав. По-перше, лікарські рослини містять унікальні за своїм складом та фармакологічною активністю компоненти, комбінація яких у багатьох випадках істотно перевищує ефект окремих складових частин, тобто їм притаманна синергічна дія. По-друге, побічні ефекти препаратів на основі лікарських рослин, на відміну від синтетичних ліків, або незначні, або взагалі відсутні. По-третє, хімічний синтез фізіологічно активних сполук часто є економічно не вигідним і тому більш доцільно одержувати їх із готової, до того ж екологічно чистої, рослинної лікарської сировини. Але, як правило, концентрація цих сполук у рослинах є незначною і для одержання їх у промислових масштабах потрібно обробляти велику кількість рослинної сировини. Тому для вирішення цієї проблеми дедалі частіше використовують біотехнологічні підходи, за допомогою яких концентрація фізіологічно активних речовин із заданою фармакологічною активністю у рослинній сировині значно підвищується. Для цього застосовують методи генетичної інженерії з подальшим культивуванням клітин рослин у промислових масштабах.

Виходячи з вищевикладеного, вкрай актуальною є монографія чл.-кор. НАН України В.А. Кунаха **«Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи»** (Київ: Логос, 2005). В. А. Кунах — визнаний авторитет у даній галузі біотехнології, автор понад 300 наукових праць із генетики, клітинної біології та фізіології рослин, зокрема є співавтором чотирьох монографій видавництва «Шпрінгер» і першого в Україні підручника «Біотехнологія рослин», а також 29 патентів із клітинної селекції та біотехнології рослин.

Монографія складається з двох основних частин: загальної та спеціальної.

У загальній частині розглянуто такі важливі для сучасної біотехнології лікарських рослин питання, як основні напрями біотехнології рослин, біологічно активні речовини рослин, мінливість генома соматичних клітин рослин у природі, культура клітин і тканин як біологічна система, особливості їхнього формування та функціонування, вплив регуляторів росту і вірусів на процеси мінливості й добору у клітинних популяціях та ін.

У розділі «Біологічно активні речовини рослин» послідовно розглянуто основні фізіологічно активні речовини рослин: вуглеводи, пептиди та білки, ліпіди, а також речовини спеціалізованого (вторинного) обміну: гідроароматичні та фенольні сполуки, глікозиди, ефірні сполуки і смоли, алкалоїди та регулятори росту. Детально описано хімічну будову цих речовин та механізми їхньої фармакологічної дії.

У наступному розділі висвітлено питання мінливості генома соматичних клітин рослин у природі. Для цілеспрямованого одержання певних фізіологічно активних речовин із лікарських рослин ці аспекти мають першочергове значення. На підставі даних літератури та власних досліджень автор робить висновок про особливе значення для регуляції мінливості генома рослин їхньої гормональної системи. Констатується, що «гормональна система, яка є одним із найчутливіших рецепторів зміни умов життєдіяльності клітин і організму в цілому, шляхом регуляції клітинного і тканинного гомеостазу, контролює генетичну структуру клітинних популяцій організму. Експресія генів, що відповідають за геномну мінливість, відбувається гормонозалежно. Синтез гормонів та їхній перехід в активну форму перебуває під контролем генів, які регулюються як зовнішніми, так і внутрішніми факторами. Подальші дослідження в цій галузі, в тому числі вивчення на молекулярному рівні генетичного контролю біосинтезу рослинних гормонів та гормонозалежної експресії генів, що входять до так званої мутаторної системи організму, можуть дати в руки дослідників могутній інструмент для керування геномною мінливістю клітин».

У наступних розділах монографії автор аналізує методичні підходи, за допомогою яких відбувається вирощування клітин, тканин або органів рослин *in vitro* на штуч-

них живильних середовищах для потреб біотехнологічного одержання заданих фізіологічно активних речовин із лікарських рослин у промислових масштабах. Культура тканин і клітин *in vitro* розглядається як біологічна система, для якої детально описано особливості формування та функціонування. Зокрема, наведено такі параметри даної біотехнологічної системи, як добір клітинних популяцій, динаміка генетичної структури, фенотипна гетерогенність та успадкованість, мінливість росту і мітотичного режиму у процесі адаптації клітин, геномна мінливість та добір у клітинних популяціях. За результатами даних літератури та власних досліджень автор дійшов висновку, що культура клітин *in vitro* є динамічною біологічною системою (а це вкрай важливо для вирішення біотехнологічних завдань), клоновою популяцією, що розвивається (еволюціонує) в результаті дії основних рушійних чинників еволюції — мінливості, спадковості, добору і дрейфу генів (генотипів). Взаємодія цих процесів зумовлює біологічні особливості кожної конкретної клітинної лінії, яка вирощується в конкретних умовах (для одержання певних фармакологічно активних сполук). Процес адаптації клітин до умов тривалого культивування *in vitro* є складним і багатоступінчастим, упродовж якого діють різні типи природного добору — дестабілізуючий, рушійний (спрямований) чи, переважно, стабілізуючий. Індукція процесів дедиференціювання і подальшої проліферації клітин передбачає перепрограмування генома, ювенілізацію його стану. Одержані під час культивування сформовані штами є генетично гетерогенними клітинними популяціями, розмах мінливості яких за багатьма ознаками, як правило, перевищує міжвидову мінливість у природі (що само по собі є необхідною умовою біотехнологічного одержання певних фармакологічно активних сполук або їхніх попередників). Особливо вагомим з погляду біотехнології є висновок про те, що виявлення основних чинників та рушійних сил геномної мінливості клітинних популяцій *in vitro*, встановлення провідної ролі в цьому процесі гормональної системи дає змогу регулювати у певних межах не лише генетичну структуру клітинних популяцій, а й функціонування генома, зокрема біосинтез вторинних метаболітів. Завдяки цьому створено високопродуктивні клітинні штами рідкісних і особливо цінних лікарських рослин — альтернативне джерело екологічно чистої лікарської сировини.

В останньому розділі загальної частини монографії аналізується вплив регуляторів росту та вірусів на процеси мінливості й добору у клітинних популяціях. На основі власних досліджень автором розроблена схема одержання штамів культивованих клітин рослин заданих рівнів плоідності. Суть її полягає в тому, що для одержання диплоїдних штамів необхідно брати вихідний експлантат з найнижчою частотою недиплоїдних клітин. Одержувати культуру тканин і вирощувати її слід на живильному середовищі з якомога нижчим вмістом регуляторів росту. При цьому бажано використовувати природні фітогормони та виключати із вмісту живильного середовища складні добавки типу дріжджового екстракту, кокосового молока тощо. Для отримання поліплоїдних штамів слід вирощувати тканини на середовищі з підвищеним складом стимуляторів росту. З метою одержання гаплоїдних штамів та запобігання їх поліплоїдації достатньо ефективним у багатьох випадках є введення в середовище фторфеніланіну. Можливі також й інші шляхи одержання штамів заданих рівнів плоідності. Одним з них може бути заміна (підбір) усіх компонентів живильного середовища, як органічних, так і неорганічних, що може сприяти селективному розмноженню клітин певного рівня плоідності. Проте цей шлях є більш трудомістким.

Цікавою з точки зору біотехнології лікарських рослин є спеціальна частина монографії. Вона складається з розділів, в яких описано такі важливі для сучасної фітофармакології види лікарських рослин, як раувольфія зміїна, арнебія барвна, мак снодійний, женьшень справжній, елеутерокок колючий, поліцистіас папоротелистий, родіола рожева, унгернія Віктора, рута запашна.

Для кожного виду зазначених лікарських рослин детально описані такі важливі параметри створеної на їхній основі біотехнологічної системи, як характерні особливості клітинного штаму, умови вирощування і продуктивність одержаних суспензійних культур і клітинних клонів, фармакологічна дія кожної з фармакологічно активних речовин, а також геномна мінливість культивованих клітин.

З особливо важливих фармакологічно активних речовин цих видів лікарських рослин — сировини для фармацевтичних препаратів — варто відзначити речовини маку снодійного та приквітникового, женьшеню справжнього та елеутерокока колючого.

Такими для перших двох видів є морфін, сангвінарин, тебайн та ін. Лікарські властивості представників макових, які містять численні й різноманітні алкалоїди — похідні ізохіноліну, відомі здавна. Першим видом макових, що його було введено в культуру, був мак снодійний *Papaver somniferum*. Серед ізохінолінових алкалоїдів, які накопичують представники макових, особливу увагу привертають морфінанові алкалоїди. Ці алкалоїди унікальні, вони трапляються лише в маку, мають відому терапевтичну дію і, крім того, зумовлюють низку соціальних проблем (перш за все наркоманію), пов'язаних із недостатньо контрольованим виробництвом морфіну та його похідних із природної сировини. Для вирішення цих проблем дедалі більшого значення набувають пошуки альтернативних шляхів одержання важливих для медицини морфінів: використання культури тканин та пошук і ведення в культуру видів маку, які синтезують попередники морфіну без наркотичної дії.

В опії маку знайдено понад 100 сполук, що належать до різних груп ізохінолінових алкалоїдів: фенатренові (морфінанові), бензілізохінолінові, фталілізохінолінові, апорфінові, протопінові, бензофенантрединові, протоберберинові. Тому стає зрозумілим, яке важливе значення для сучасної фармакотерапії має біотехнологічне одержання культур клітин видів маку, що синтезують ці фізіологічно активні речовини, в яких, до того ж, відсутня наркологічна активність. У цьому зв'язку в монографії спеціально розглянуто такі питання, як особливості культивування культури клітин маку снодійного, а також маку приквітникового, зокрема регуляція біосинтезу попередників лікарських речовин, що входять до складу цих рослин.

Досить докладно висвітлено також подібні питання й для інших видів лікарських рослин, що були зазначені вище.

Зокрема, для елеутерокока колючого описано фармакологічну дію його екстракту, одержання калюсної і суспензійної культур, біосинтез фенольних глікозидів, наведено загальну характеристику культури тканин, продуктивність та умови вирощування клітин на різних живильних середовищах (вплив сахарози, мінеральної основи, регуляторів росту).

В окремому розділі описано антимуtagenну та протекторну активність екстрактів культури тканин деяких лікарських рослин. Проаналізовано тестування цих ефектів

у різних тест-системах: бактеріальній, *Escherichia coli* — бактеріофаг лямбда, а також у системах вищих еукаріотів. Також в окремому розділі аналізуються закономірності біотехнологічного одержання фармакологічно активних речовин та регуляція їх синтезу в культурі тканин. Зокрема при цьому констатується, що виробництво відповідного вторинного продукту в потрібній кількості часто пов'язано з індукцією органогенезу клітинної культури. Наприклад, для женьшеню одержано клони, що мають високий вміст глікозидів під час переходу до ризогенезу, а в маку біосинтез морфінів відбувається лише в органогенній культурі. Що стосується підвищення продуктивності культивованих клітин, то в цьому аспекті широко і в багатьох випадках успішно застосовують такі методи, як клітинна селекція, що ґрунтується як на спонтанній, так і на індукованій різними мутагенами мінливості культивованих клітин, оптимізація умов вирощування та вмісту ростових і продукційних живильних середовищ, культивування диференційованих культур і клітин, або індукція диференціювання, використання елісаторів. Слід наголосити, що останнім часом із цією метою дедалі частіше застосовують методи генетичної інженерії. Підвищують синтез вторинних метаболітів також підсилюючи активність відповідного ферменту. Цього досягають уведенням гетерологічного гена з тією самою функцією від мікроорганізмів чи інших видів рослин; підставленням власного гена під сильніший промотор; уведенням гена, що кодує ферменти, нечутливі до ретроінгібування, чи гена, що кодує антитіла проти ензиму, який є конкурентом за той самий субстрат, що й бажаний ген; зниженням катаболізму цільових вторинних сполук.

З урахуванням цих закономірностей створюють клітинні штами шляхом одержання адекватного генотипу (генофонду) клітинних популяцій, здатних до високо-ефективного синтезу бажаних сполук і повної реалізації цієї здатності. Подібна технологія включає такі етапи: добирання виду рослини-донора, генетичні маніпуляції з культурою тканин, зокрема одержання мутантів, соматоклонів та інші підходи клітинної селекції, спрямовані на одержання генетично змінених високопродуктивних штамів, розроблення складу живильних середовищ, умов і способів вирощування, оптимальних для стабільної реалізації генетично зумовленої здатності до синтезу цільових речовин, вплив на ріст (проліферацію) клітин у куль-

турі з метою зупинення або уповільнення росту, що змінює метаболізм клітини в напрямі синтезу речовин спеціалізованого обміну, для цього, наприклад, успішно застосовують інгібітори транскрипції і трансляції, пошук сигналів, за допомогою яких в інтактних рослинах відбувається регуляція синтезу вторинних метаболітів у клітинах (елісаторів, неспецифічних стресових факторів тощо), одержання трансформованих культур, зокрема «бородатих коренів», що в багатьох випадках спрощує умови культивування і підвищує вміст вторинних метаболітів, трансгенних культур з метою синтезу цільового продукту (молекулярне фермерство).

Остання (прикінцева) частина монографії присвячена аналізу впливу біотехнології рослин на тривалість життя людини. Автор всебічно аналізує фактори, що спричинюють негативний ефект на тривалість життя в сучасній Україні. Серед них він виділяє передусім такі поширені захворювання, як серцево-судинні, онкологічні, захворювання органів кровообігу, а також постійні стреси, депресивні стани тощо. Наведено дані про те, що як лікарські засоби для лікування та профілактики перелічених вище хвороб, а також антистресові препарати та адаптогени використовують переважно препарати рослинного походження. Сьогодні, а надто у майбутньому, чи не єдиним джерелом екологічно чистої сировини для виробництва

рослинних лікарських засобів може бути біомаса культивованих клітин. Вона може також бути і джерелом харчової сировини контрольованої високої якості, за необхідності збагаченої мікроелементами, вітамінами, іншими біологічно активними речовинами. На основі досягнень сучасної біотехнології рослин розробляються альтернативні джерела енергії, поліпшується довкілля, зберігаються зникаючі і створюються нові декоративні та сільськогосподарські рослини, розробляються нові форми ліків, удосконалюється дієтичне харчування тощо. Зрозуміло, що всі ці чинники справляють позитивний вплив на тривалість життя населення в умовах сучасної України.

Підсумовуючи, варто ще раз наголосити, що монографія **В. А. Кунаха «Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи»** є визначним кроком у розвитку сучасної біотехнології рослин в Україні, що дозволяє по-новому оцінити шляхи реформування багатьох галузей біологічної та медичної науки в нашій державі.

*Доктор біологічних наук  
Є. Л. Левицький*

**Міжнародний курс семінарів-лекцій  
«Біобезпека та біозахист при проведенні  
медико-біологічних досліджень»**

11–12 червня 2007 р. під егідою Національної академії наук України (Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології НАН України) та за підтримки Міністерства закордонних справ України, Академії медичних наук України, Комісії з питань генетичної та біологічної безпеки при РНБО України, Університету Ексетер (Сполучене Королівство) та за особистою ініціативою акад. С. В. Комісаренка проводився Міжнародний курс семінарів-лекцій «*Біобезпека та біозахист під час проведення медико-біологічних досліджень*».

Мета проведення семінарів-лекцій в Україні, яка є учасником «Конвенції про заборону біологічної і токсичної зброї» (КБТЗ), — створення, згідно з положеннями КБТЗ, національних ефективних механізмів контролю за дотриманням правил біобезпеки, а також національної системи біологічного захисту і мінімізації всіх загроз біологічного походження, що існують або можуть виникнути в нашій країні.

Останнім часом питання біобезпеки у світі стали розглядатися значно ширше і стосуються не лише створення чи використання біологічної зброї та захисту від неї. Зокрема, серед іншого, це поняття охоплює боротьбу з біотероризмом, з інфекціями — як особливо небезпечними, так і такими, що спричинені «звичайними» патогенними мікроорганізмами, однак несуть загрозу економічного та соціального характеру, цілеспрямоване чи випадкове створення агентів, які можуть суттєво впливати на імунітет, викликаючи захворювання людей чи змінюючи їхню поведінку, на розмноження тварин та рослин тощо. Проблема біобезпеки включає також біоетику та правила поведінки з агентами, що можуть мати «подвійне» використання. Окрім того, конче необхідним є відстеження появи нових загроз у зв'язку з бурхливим розвитком сучасних біотехнологій та наук про життя.

Читали лекції і проводили семінари відомі у світі фахівці з проблем біобезпеки та біозахисту: проф. Малколм Дандо з Брадфордського університету, Сполучене Королівство (Prof. Malkolm Dando, University of Bradford, UK); д-р Брайян Реперт з Університету Ексетер, Сполучене Королівство (Dr. Brian Rappert, University of Exeter, UK); проф. Катрін Ніксдорф з Університету в Дармштадті, Німеччина (Prof. Kathryn Nixdorff, University of Darmstadt, Germany); д-р Пола Остін, Сандія національні лабораторії, США (Dr. Paula Austin, Sandia National Laboratories, USA). Семінар-лекторій складався з двох частин і проводився англійською мовою без перекладу.

11 червня відбулися три півторагодинні семінари під керівництвом д-ра Б. Реперта та проф. М. Дандо для трьох груп у складі 20–30 фахівців кожна з установ НАН, АМН, МОЗ, МОН України, університетів та науково-дослідних інститутів; два семінари — на базі Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України і один — в Національному медичному університеті імені О. О. Богомольця. Семінари проходили в режимі відкритої співбесіди, в ході якої перед учасниками було поставлено низку запитань, на які вони мали відповісти, висловивши своє розуміння проблеми, зокрема:

1. Доцільність публікування у спеціальному науковому журналі результатів досліджень австралійських учених щодо застосування рекомбінантного вірусу з метою боротьби з надмірним розмноженням мишей в Австралії.
2. Доцільність попереднього опублікування цих результатів у науково-популярному журналі *New Scientist* під вражаючою назвою «Катастрофа в дії», оскільки створений методами генної інженерії вірус може бути кроком до створення біологічної зброї.
3. Британські дослідники провели подібні дослідження, проінформували комітет з біозахисту та здоров'я людини, уникнувши публічної дискусії щодо можливості використання цих результатів для створення біозброї.
4. Яка з форм публікації є більш коректною та правомірною, чи варто було залучати широку громадськість до дискусії з цих питань?
5. Чи можна вважати доцільним виділення великих коштів, зокрема 3,4 млрд. доларів США у 2006 р. для фінансування наукової програми «Біозахист у 21 сторіччі»?

6. Чи є біозахист шляхом вирішення проблем, пов'язаних з біонебезпекою, і наскільки ризик роботи з біотрансформованими патогенами перевищує очікувані вигоди?

Активну участь в обговоренні зазначених проблем взяли: акад. С. В. Комісаренко, акад. В. П. Кухар, д-р біол. наук Т. М. Кучмеровська, д-р біол. наук Л. Б. Дробот, канд. біол. наук Т. О. Борисова та інші учасники семінару.

12 червня було прочитано чотири відкриті лекції з питань біозахисту та біобезпеки для широкого загалу наукової спільноти.

Проф. К. Ніксдорф у своїй доповіді зупинилась на проблемі біозахисту та біобезпеки в мікробіологічних і біомедичних лабораторіях. Доповідачка висвітлила принципи і навела практичні рекомендації щодо використання патогенів та токсинів. Було охарактеризовано чотири групи ризику під час роботи з патогенними агентами для тих, хто працює в лабораторії, та оточення, а також наведено конкретні приклади застосування заходів біобезпеки залежно від рівнів ризику. Наголошувалось, що лабораторія повинна відповідати вимогам роботи й мати відповідне устаткування, зокрема важливими є безпечна вентиляційна система та спеціально облаштовані бокси різної градації захисту. Розглянуто категорії груп вірусів, бактерій та інших патогенів за ступенем ризику зараження. Продемонстровано, що в різних країнах світу пороги ризику зараження одними й тими самими патогенами є різними. Значну увагу було приділено оцінці ризику в разі застосування генної інженерії, особливо питанням можливої патогенності рекомбінантних протейнів. Репрезентовано основні організації з нагляду та контролю за роботою з рекомбінантними протейнами. Наведено рекомендації комітету з біобезпеки при ВООЗ. Особливий акцент зроблено на необхідності підготовки та навчання наукового персоналу з проблем біобезпеки і біозахисту.

Доповідь д-ра П. Остін було присвячено висвітленню питань біозахисту та біобезпеки під час роботи у науково-дослідних лабораторіях. Чітко сформульовано основні положення, які охоплюють поняття «біозахист» та «біобезпека», продемонстровано, що для цих понять є спільним, а що відмінним, а також окреслено загальну та спеціальну стратегію контролю стосовно потенційно небезпечних біологічних матеріалів. Охарактеризовано різні рівні ризику в разі роботи з патогенними організмами та заходи захисту, оскільки недотримання правил біобезпеки призводить до уражень персоналу. Наведено конкретні приклади уражень патогенними організмами в лабораторних умовах. Продемонстровано на конкретних прикладах, що лабораторні матеріали можуть слугувати засобами біотероризму. Оцінено п'ять ступенів ризику за контакту з непатогенними, низько-, середньо-, високо- та надзвичайно патогенними організмами. Висвітлено основні компоненти системи біозахисту: захист території, персональний захист, засоби збереження матеріалів, захист під час транспортування, інформаційний захист та захист програмного забезпечення. Окремо наведено перелік правил та інструкцій з біозахисту та біобезпеки в умовах лабораторії. Залежно від ступеня ризику охарактеризовано агенти за їхньою токсичністю, шляхами ураження організму та середовища, а також стійкістю їх до знезараження.

Д-р Б. Реперт у своїй доповіді продемонстрував на конкретних прикладах в історичному аспекті, починаючи з 14 ст. до наших днів, застосування біологічної та хімічної зброї і зупинився на міжнародних документах, які забороняють використання цієї зброї (Женевський протокол 1925 р., Конвенція про заборону біологічної та токсичної зброї 1972 р.). Було наведено чинні інституції з контролю та протидії застосуванню біологічної зброї.

Проф. М. Дандо присвятив свою доповідь розвитку біотехнології у 21 ст., визначивши його як постгеномну еру. Він наголосив, що з 2003 р., коли було розшифровано геном людини, почалась ера геноміки — вік біотехнології. У доповіді зроблено акцент на сучасному стані розвитку біотехнології, важливості міжнародного контролю та безпеки в галузі біотехнології згідно з міжнародною Конвенцією. Доповідач висвітлив перспективні напрями розвитку біотехнології, зокрема такі: молекулярна біотрансформація, управління біологічними системами, синергізм з інфо- та нанотехнологіями, генна терапія. Особливо було наголошено на тому, що наукові працівники в галузі біотехнології мають оцінювати та глибоко розуміти проблеми біобезпеки, пов'язані з їхньою діяльністю. За відсутності обмежень у проведенні експериментів у галузі біотехнології та висвітленні результатів досліджень у наукових публікаціях має бути усвідомлення відповідальності дослідників за наслідки їхньої роботи. Назріла нагальна потреба у створенні національних комітетів з контролю біозахисту та біобезпеки з метою запобігання біотероризму, пов'язаному з новітніми біотехнологіями. У доповіді наведено багаторівневі системи контролю та захисту.

Усі учасники семінару отримали CD-диски з електронним варіантом зібрання публікацій Національної академії США, її міжнародних партнерів та інших міжнародних організацій з проблеми біологічної безпеки станом на 2007р.

Вони, зокрема, містять:

1. *Biotechnology Research in an Age of Terrorism*. National Research Council. — Washington: National Academic Press, 2004. — 146 p.
2. *Globalization, Biosecurity, and the Future of the Life Sciences*. National Research Council / Institute of Medicine . — Washington: National Academic Press, 2006. — 299 p.
3. *An International Perspective on Advancing Technologies and Strategies for Managing Dual-Use Risks: Report of Workshop*. National Research Council / Institute of Medicine . — Washington: National Academic Press, 2005. — 140 p.
4. *Seeking Security: Pathogens, Open Access, and Genome Databases*. National Research Council. — Washington: National Academic Press, 2004. — 74 p.
5. *Treating Infectious Diseases in a Microbial World: Report of Two Workshops on Novel Antimicrobial Therapeutics*. National Research Council. — Washington: National Academic Press, 2006. — 94 p.
6. *Biological Science and Biotechnology in Russia: Controlling Diseases and Enhancing Security*. National Research Council . — Washington: National Academic Press, 2005. — 146 p.
7. *Microbial Threats: The Treat of Pandemic Influenza*. Institute of Medicine . — Washington: National Academic Press, 2005. — 35 p.
8. *Microbial Threats to Health: Emergence, Detection, and Response*. Institute of Medicine . — Washington: National Academic Press, 2003. — 367 p.
9. *Overcoming Challenges to Develop Countermeasures Against Aerosolized Bioterrorism Agents: Appropriate Use of Animal Models*. National Research Council. — Washington: National Academic Press, 2006. — 71 p.
10. *Reopening Public Facilities After a Biological Attack: A Decision Making Framework*. National Research Council . — Washington: National Academic Press, 2005. — 210 p.

Активну участь наукових працівників у роботі семінару-лекторію відзначено міжнародним сертифікатом — International Courses «Biosafety and Biosecurity in Life Science Research», Kyiv, June 11–12, 2007.

Докладніше ознайомитися з матеріалами цих та інших семінарів і доповідей можна на сайті <http://international.nationalacademies.org/gateway/international/recourc>.



# НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН

## ГЕННА ТЕРАПІЯ



### L/N ON MOLECULAR MEDICINE. IЕ

#### Лекції. Нотатки з молекулярної медицини

*John Bradley  
David Johnson  
David Rubenstein*

У монографії розглянуто основні питання доклінічної медицини та молекулярної біології. Наведені лекції з молекулярної медицини забезпечують лаконічний і безпосередній вступ до молекулярної біології та розуміння того, як вона застосовується для лікування хвороб людини. Нову редакцію книги було здійснено у відповідь на величезні зміни, що відбулись у цій науці в останні роки. Повністю адаптована, вона пояснює, як було реалізовано проєкт «Геном людини», а також ті наслідки, які він матиме для розвитку медицини, містить опис нових методів, що їх було розроблено після першого видання книги. Буде корисною як для студентів старших курсів, які спеціалізуються з молекулярної біології та медицини, так і для фахівців відповідних галузей молекулярної біології та генетики.

**Друк: Blackwell Publishers**  
**Дата публікації: серпень 2001 р.**  
**152 стор.**



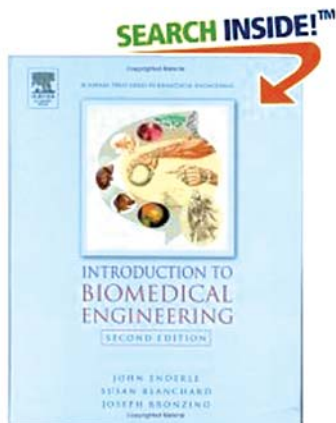
### ГЕНОМ, КЛОНИРОВАНИЕ, ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЧЕЛОВЕКА

#### Геном, клонування, походження людини

*Л. И. Корочкин*

У монографії на високому науковому рівні та в доступній для широкого кола читачів формі викладено такі питання: що являє собою геном людини; чим відрізняється клонування від копіювання; як гени визначають розвиток організму та соціальну поведінку людини; що таке генна інженерія та як її застосовують у виробництві продуктів і ліків. Висвітлено також останні досягнення генетики, зокрема сенсаційні результати у вирішенні проблеми походження та міграції людини.

**Друк: Век-2**  
**Дата публікації: 2004 р.**  
**224 стор.**



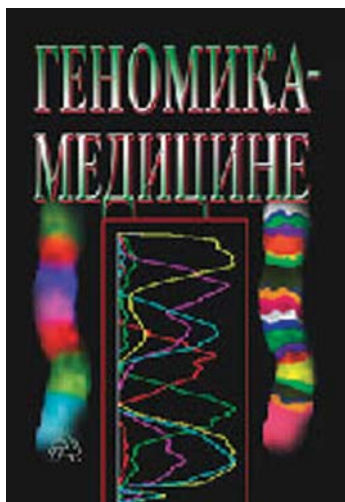
## INTRODUCTION TO BIOMEDICAL ENGINEERING. SECOND EDITION

**Вступ до біомедичної інженерії. Друге видання**

*John Enderle, Susan M. Blanchard, Joseph Bronzino*

Автори монографії є провідними фахівцями у галузі біомедичної інженерії. Наведено опис розвитку цієї науки за останні 50 років. За цей час вона перетворилась на самостійну галузь знань, що охоплює такі розділи, як біомеханіка, біоматеріали, біоінструментарій для медичної візуалізації, реабілітація, інженерія, а також біосенсори та тканинна інженерія. Розділи книги збігаються з програмою курсу з біомедичної інженерії і можуть бути використані для читання лекцій. Подано історичний екскурс у найважливіші галузі біомедичної науки, а також викладено найважливіші принципи дизайну, аналізу та процедур моделювання у галузі біомедичної інженерії. Численні приклади складних проблем та вправи, що призначені для їх вирішення, роблять книгу особливо корисною для студентів біомедичних спеціальностей та інженерів.

**Друк: Academic Press**  
**Дата публікації: 2005 р.**  
**1118 стор.**



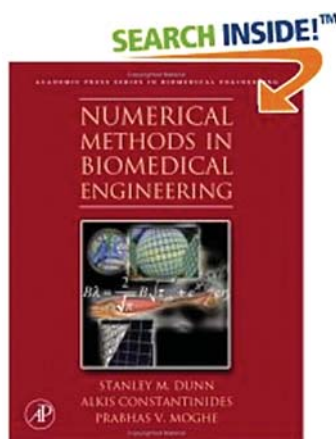
## ГЕНОМИКА МЕДИЦИНЕ

**Геноміка медицині**

*За редакцією В. І. Іванова, Л. Л. Кисельова*

Авторами книги є видатні російські вчені, фахівці у галузі медичної генетики, геноміки, молекулярної біології та молекулярної медицини. Серед основних тем: стратегія ідентифікації генів спадкових захворювань; молекулярні основи моногенних хвороб; сучасні методи цитогенетичного аналізу та діагностики хромосомних хвороб, а також вужчі питання, зокрема онкогеноміка та генетика цукрового діабету. Спеціальну увагу приділено розгляду такого актуального питання, як геномний імпринтинг та спадкова патологія людини. Великий інтерес становлять розділи, у яких розглядається значення поліморфізму ДНК для вивчення історії походження народів та генома людини як основи предикативної медицини. Призначена для лікарів, студентів та аспірантів медичних вузів і біологічних факультетів університетів.

**Друк: Академкнига**  
**Дата публікації: 2005 р.**  
**392 стор.**



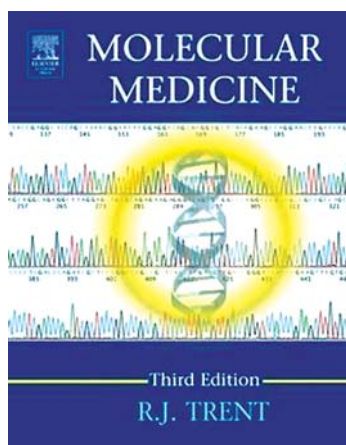
## NUMERICAL METHODS IN BIOMEDICAL ENGINEERING

### Чисельні методи у біомедичній інженерії

*Stanley Dunn, Alkis Constantinides, Prabhas V. Moghe*

Монографія охоплює й узагальнює сукупність проблем чисельного моделювання, що є важливими для біомедичної інженерії. За допомогою вирішення поданих домашніх завдань, відповідних прикладів та докладного розгляду конкретних випадків інтегрує принципи і методи чисельного аналізу. Висвітлюючи біомедичні феномени, фізіологічні, клітинні й молекулярні системи, книга є корисним посібником для студентів і фахівців у галузі досліджень біомедичних застосувань транспорту, термодинаміки, кінетики та біомеханіки.

**Друк: Academic Press**  
**Дата публікації: 2005 р.**  
**632 стор.**



## MOLECULAR MEDICINE

### Молекулярна медицина Третє видання

*R. J. Trent*

Догму про те, що генетична інформація передається тільки в одному напрямку: з ДНК на РНК і потім на білок, було визнано некоректною у 1970 році Н. Temin та D. Baltimore.

Монографія містить вичерпну інформацію з питань, які стосуються впливу генетичної революції на медичне мислення та широкомасштабну практику клінічної медицини, передової терапії та судової медицини. Максимально виправлена після завершення програми «Геном людини», вона подає останні дані стосовно сучасного стану та перспектив розвитку молекулярної медицини. Це єдиний довідник з молекулярної медицини, що витримав три видання. Містить багато таблиць та ілюстрацій, що спрощують розуміння складних питань.

розуміння складних питань.

#### **Розділи:**

Природничі науки (біохімія, метаболізм, молекулярна біологія).

Природничі науки (мікробіологія).

Медицина (фундаментальна медицина, генетика).

**Друк: Academic Press**  
**Дата публікації: 29 квітня 2005 р.**  
**320 стор.**



## BASIC TRANSPORT PHENOMENA IN BIOMEDICAL ENGINEERING

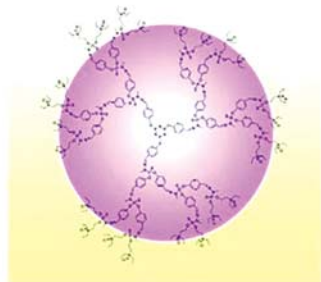
### Основні феномени транспорту в біомедичній інженерії

*Ronald Fournier*

У монографії поєднано фундаментальні принципи інженерії та біології для визначення основних концепцій феноменів транспорту у біомедичній інженерії, до яких належать: головні принципи термодинаміки рідин, дифузії та транспорту розчинних речовин, фізичних властивостей і плинності рідин організму та крові, транспорту кисню у тканинах, а також фармакокінетика. Розділи адаптовано з додаванням нових матеріалів з механіки рідин, дифузії та масопереносу на межі шарів. Описано застосування цих принципів до розвитку та дизайну системи створення ліків, штучних органів, біоштучних органів, а також тканинної інженерії. Значну увагу приділено розвиткові кількісного розуміння основних феноменів фізики, хімії та біології. Математичні моделі розроблено з використанням концептуально простих підходів «shell balance» або компартментного з метою отримання диференціальних рівнянь, які описують окрему специфічну ситуацію. Результати, що їх одержано за допомогою математичних і чисельних методів, подано у порівнянні з реальними експериментальними даними. Кожен розділ закінчується письмовими завданнями, що мають на меті допомогти студентам засвоїти й навчитися розробляти математичні моделі для вирішення багатьох проблем різного ступеня складності. Наведено також коротке обговорення чисельних методів. Структура книги є ідеальною для учнів старших класів та студентів перших років навчання, які слухають курс із біологічного транспорту. Значний інтерес становить монографія також для студентів старших курсів та фахівців з біо- і біомедичної інженерії та інших дисциплін, зокрема хімічної та механічної інженерії, фізіології, біофізики та клітинної біології. Перелік рішень буде корисним для кваліфікованих інструкторів.

**Друк: Taylor & Francis**  
**Дата публікації: 2006 р.**  
**450 стор.**

U. Boas, J. B. Christensen and P. M. H. Heegaard

Dendrimers in Medicine and  
Biotechnology  
New Molecular Tools

RSC Publishing

## DENDRIMERS IN MEDICINE AND BIOTECHNOLOGY: NEW MOLECULAR TOOLS

### Дендримери у медицині та біотехнології: новий молекулярний підхід

*U. Boas, J. B. Christensen, P. M. H. Heegaard*

Дендримери — це новий клас макромолекул, які набувають дедалі ширшого застосування у галузі синтетичної органічної хімії, біології, медицини та біотехнології. У монографії подано загальне визначення дендримерів, особливу увагу звернено на взаємозв'язок між їхньою молекулярною структурою та біологічними властивостями. Докладно розглянуто використання дендримерів у біологічних системах, у процесі розроблення та виробництва ліків, у молекулярній діагностиці низки захворювань з наведенням конкретних

прикладів. Книга буде корисною для науковців, включаючи фахівців, які не працюють у цій галузі знань і для яких є необхідним входження у проблему, у також для тих, хто цікавиться поглибленою інформацією про використання дендримерів у біології та медицині.

**Друк: Royal Society of Chemistry**

**Дата публікації: 2006 р.**

**182 стор.**

## ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА. БЫЛОЕ И ГРЯДУЩЕЕ

### Генетика людини. Минуле та майбутнє

*Е. Н. Гнатик*



Суттєві характеристики сучасної генетики людини — динамізм розвитку, зростання її ролі та значущості у житті кожної людини і всього людства – свідчать про необхідність та своєчасність обговорення методологічних і світоглядних питань, пов'язаних з розвитком фундаментальних та прикладних аспектів цієї галузі знань. У монографії зроблено спробу розглянути деякі з них. Читач отримує уявлення про наймасштабніший біологічний проект «Геном людини», про виникнення, долю та можливості «другого пришестя» евгеніки, біотехнології, про генетичну інженерію, молекулярну медицину та фармакогенетику, клонування людини і генетичну зброю, новий погляд на ембріогенез та проблеми, пов'язані з біологічною еволюцією людини.

Призначена для викладачів, аспірантів і студентів природничо-наукових спеціальностей, а також широкого кола читачів, які цікавляться історією та сучасними досягненнями і проблемами генетики людини.

**Друк: ЛКІ**

**Дата публікації: 2007 р.**

**280 стор.**

## ЮВІЛЕЇ

### АНАТОЛІЙ ЛЕОНІДОВИЧ БОЙКО:

#### ВІДОМИЙ УКРАЇНСЬКИЙ ВЧЕНИЙ-ВІРУСОЛОГ, ЕКОЛОГ, БІОТЕХНОЛОГ



11 березня 2008 р. виповнилося 70 років доктору біологічних наук, академіку Української академії аграрних наук і Академії наук вищої школи України, заслуженому діячеві науки і техніки України, лауреату Державної премії України у галузі науки і техніки та премії імені Д. К. Заболотного НАН України, професору кафедри вірусології і, водночас, заслуженому професору Київського національного університету імені Тараса Шевченка Анатолію Леонідовичу Бойку.

А. Л. Бойко народився у смт Корнин Попільнянського району Житомирської області в сім'ї робітника. У родині було четверо дітей, із них Анатолій найстарший. На долю маленького Анатолія випали і страшна війна, і гестапівські катівні, куди він потрапив разом із матір'ю, і звідки їм лише випадково вдалося врятуватись.

Після закінчення школи Анатолій Леонідович розпочав свою трудову діяльність у рідному Корнині, однак відчуваючи потяг до науки, згодом вступив до Житомирського сільськогосподарського інституту на агрономічний факультет. У 1962 р. після закінчення інституту він влаштовується на роботу помічником завідувача Держсортдільниці Черняхівського району Житомирської області. Тоді ж публікує свої перші наукові праці з вірусології рослин і продовжує захоплюватися таємницями вірусів, зокрема його цікавили віруси людини, тварин, риб, земноводних, грибів, водоростей, вищих рослин.

У 1963 році А. Л. Бойко вступає до аспірантури з відривом від виробництва у відділ вірусів рослин Інституту мікробіології і вірусології АН УРСР, очолюваний на той час видатним українським ученим-вірусологом, доктором біологічних наук, членом-кореспондентом АН УРСР, професором С. М. Московцем. Навчання в аспірантурі було престижним, але вимагало щоденної наполегливої праці в лабораторії, у полі, в бібліотеках. Однак це були незабутні, сповнені наукового пошуку роки, які увінчались успіхом. У 1967 р. А. Л. Бойко під науковим керівництвом професора С. М. Московця, який вчасно розгледів природні здібності й потяг до науки колишнього студента із Полісся України, успішно захищає дисертацію на тему: «Вирусный хлороз хмеля на Украине» і здобуває науковий ступінь кандидата біологічних наук за спеціальністю «загальна вірусологія». В аспірантські роки молодий учений з'ясував природу вірусних захворювань рослин хмелю звичайного і розробив практичні заходи боротьби з ними, описав ряд ізолятів хмельових вірусів, запропонував нові технології культивування та розмноження безвірусних рослин хмелю.

З 1963 до 1978 р. Анатолій Леонідович працював в Інституті мікробіології і вірусології АН УРСР спочатку молодшим, а потім старшим науковим співробітником, виконав важливі дослідження біології вірусів рослин в різних ґрунтово-кліматичних зонах України. Уже маючи вагомий теоретичний і практичний досвід наукової роботи, у 1978 р. він отримує запрошення очолити кафедру вірусології біологічного факультету Київського державного університету імені Тараса Шевченка.

Саме в Академії наук УРСР в Інституті мікробіології і вірусології у 1983 р. Анатолій Бойко блискуче захищає докторську дисертацію на тему: «Биологические свойства вирусов и вирусные болезни хмеля и розы эфиромасличной» і отримує науковий ступінь доктора біологічних наук за спеціальністю «загальна вірусологія». Саме в цей період за його ініціативою і безпосередньою участю створюються лабораторії фітовірусології, бактеріофагії та космічної вірусології.

У 1984–1995 рр. А. Л. Бойко був науковим керівником лабораторії екології і токсикології біологічного факультету Київського університету імені Тараса Шевченка. Упродовж 26 років

(1978–2004) завідував кафедрою вірусології біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка. У 1984 р. йому присвоєно вчене звання професора кафедри вірусології, 1991 — обрано членом-кореспондентом, 1993 — академіком Української академії аграрних наук, Відділення землеробства, за спеціальностями «вірусологія, агроекологія».

А. Л. Бойко — фундатор вітчизняної школи фітовірусології нового покоління, учений зі світовим ім'ям. Науковій спільноті широко відомі його фундаментальні й прикладні дослідження етіології та розповсюдження вірусних захворювань культурних рослин на різних системних рівнях їхньої організації. Завдяки його розробкам уперше ґрунтовно вивчено структурно-функціональні особливості вірусів рослин у різних екологічних умовах. Ученим одержано також нові експериментальні результати, які розкривають седиментаційні властивості, морфологічну й анатомічну будову, локалізацію вірусів у клітинах, бактеріях, грибах та рибах, що покладено в основу створення новітніх біотехнологій. Водночас сформульовано концептуальні основи поведінки вірусів у біологічних об'єктах у разі дії на них радіації, геліокосмофізичних факторів. Електронно-мікроскопічними дослідженнями уперше виявлено нові віруси і їхні штами в рослинах хмелю, соняшнику, цукрового буряку, пшениці та інших культур.

Професор А. Л. Бойко зробив вагомий внесок у розвиток науки, зокрема здійснив перенесення генів рослинних вірусів у клітини пухлин деяких ссавців (Mammalia). Виявив явище чутливості фітовірусів та їхніх РНК до постійного магнітного поля, що розширює уявлення стосовно їх еволюції. Основним науковим здобутком ученого є створення новітніх біотехнологій оздоровлення від вірусів понад 500 сортів, клонів і форм рослин, які впроваджено в АПК України.

Анатолій Леонідович — блискучий педагог з яскравим хистом лектора, який упродовж багатьох років на високому науково-педагогічному рівні викладає загальний курс вірусології й екології студентам Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Національного аграрного університету та інших вузів України. Фундаментальні енциклопедичні знання галузей біології дали йому можливість передбачити, які саме домінуючі наукові напрями досліджень актуально розвивати на перспективу.

Академік УААН А. Л. Бойко збагатив світову біологічну науку працями першорядного значення, самостійно й у співавторстві опублікував понад 400 наукових праць, серед яких 12 монографій і підручників, 27 брошур, 11 авторських свідоцтв та 4 патенти на винаходи. Водночас він є фундатором вітчизняної наукової школи вірусологів та біотехнологів рослин в Україні. Серед його учнів — член-кореспондент УААН, 5 докторів біологічних наук і 25 кандидатів наук. Наукові інтереси ученого формувалися десятиріччями тернистих сходжень і випробувань, ідей і узагальнень власних здобутків, які дістали високу оцінку та заслужене визнання. Його нагороджено медалями «В пам'ять 1500-летия Киева», «Ветеран труда», «За трудовую доблесть», бронзовою медаллю ВДНГ СРСР, срібною й бронзовими медалями ВДНГ УРСР, почесними грамотами Президії АН УРСР, УААН, Міністерства освіти і науки України. У 2005 р. за цикл наукових праць «Моніторинг вірусних інфекцій: діагностика, профілактика» Анатолію Леонідовичу присуджено Державну премію України в галузі науки і техніки, а в 2004 р. його удостоєно почесного звання «Заслужений діяч науки і техніки України» та Нагороди Ярослава Мудрого в галузі науки і техніки Академії наук вищої школи України.

А. Л. Бойка обрано академіком Академії наук вищої школи України (1995), заслуженим професором Київського національного університету імені Тараса Шевченка (2006), почесним доктором наук Інституту агроекології УААН (2007). Ювіляр веде вагому науково-організаційну і громадську роботу, неодноразово репрезентував українську вірусологічну науку на міжнародних форумах у Росії, США, Польщі, Бельгії, Шотландії, В'єтнамі та інших країнах. Він є фундатором і організатором міжнародних конференцій «Біоресурси і віруси», лабораторії екології вірусів та вірусологічного центру в Інституті агроекології УААН. Обирався членом Об'єднаного комітету профспілки АН УРСР, головою спеціалізованої вченої ради біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка із захисту докторських (кандидатських) дисертацій за спеціальностями «Вірусологія», «Імунологія», «Ботаніка», членом експертної ради з біологічних наук ВАК України.

Нині А. Л. Бойко є членом спеціалізованих вчених рад біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка із захисту докторських (кандидатських) дисертацій за спеціальностями «Вірусологія», «Імунологія», «Біохімія», «Радіобіологія» і «Екологія», Товариства мікробіологів України, членом Президії й академіком-секретарем Відділення біології, хімії та медицини Академії наук вищої школи України (2004), експертом

Європейської комісії «Інкокопернікус», членом редколегій фахових наукових журналів «Мікробіологічний журнал», «Агроекологічний журнал», «Захист рослин», «Інтродукція і акліматизація».

У Анатолія Леонідовича чудова і велика сім'я, багато друзів в Україні й поза її межами, з якими звела його доля в житті та науці. Головні риси ученого — величезна працездатність, вірність служінню науці й Україні, творча активність, тверда громадянська позиція. З належною повагою ставиться він до минулого і водночас сповнений надій на майбутнє, великий патріот і України, і науки, винятково приємна, чуйна й доброзичлива людина, захоплюється спортом, поезією, історією, любить природу, чарівні українські пісні, любить мандрувати історичними й заповідними місцями України.

Від щирого серця вітаємо Анатолія Леонідовича зі славним ювілеєм, зичимо йому міцного здоров'я, довголіття, щастя, бадьорості духу, здійснення творчих задумів на благо України!

Академік НАН України і УААН  
Член-кореспондент УААН  
Член-кореспондент НАН України



*Д. О. Мельничук  
М. Д. Мельничук  
І. П. Григорюк*