

61  
С14

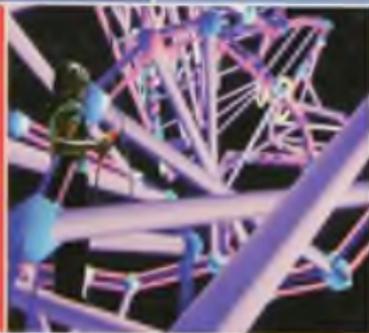
Высшее профессиональное образование

Ю. О. Сазыкин  
С. Н. Орехов  
И. И. Чакалева

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

3-е издание

Учебное пособие



Медицина

ACADEMA

Ю. О. САЗЫКИН, С. Н. ОРЕХОВ, И. И. ЧАКАЛЕВА

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

Под редакцией А. В. КАТЛИНСКОГО

*Рекомендовано*

*Учебно-методическим объединением*

*по медицинскому и фармацевтическому образованию вузов России*

*в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по специальности*

*060108 (040500) «Фармация»*

3-е издание, стереотипное

С. БЕЙСЕМБАЕВ АУЫНДАГЫ ГЫЛЫМИ КИТАПХАНЫ  
ОҚУ ЗАЛЫ



АКАДЕМИЯ

АЛЬНЫЙ ЗАЛ

ТЕКА ИМ. С. БЕЙСЕМБАЕВА

Москва

ИММ УНИВЕРСИТЕТУ

Издательский центр «Академия»

2008

615.1:579.67(075.8)

УДК 615.1(075.8)

ББК 30.16я73

С148

604360



Рецензенты:

канд. мед. наук, доцент *А. В. Казьянин*;

канд. фармац. наук, профессор *Г. И. Олешко*

**Сазыкин Ю. О.**

С148 Биотехнология : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю. О. Сазыкин, С. Н. Орехов, И. И. Чакалева ; под ред. А. В. Катлинского. — 3-е изд., стер. — М. : Издательский центр «Академия», 2008. — 256 с.

ISBN 978-5-7695-5506-0

Рассмотрены основные объекты биотехнологии, способы их создания и совершенствования методами клеточной и генетической инженерии, возможности интенсификации биотехнологического производства методами инженерной энзимологии. Особое внимание уделено проблемам скрининга биотехнологических препаратов на основе данных геномики, протеомики и биоинформатики, перспективам сочетания методов биосинтеза и органического синтеза при создании новых лекарственных средств. Даны сведения о промышленном производстве аминокислот, стероидов, антибиотиков, иммунобиопрепаратов, ферментов медицинского происхождения и других биотехнологических препаратов. Приведен краткий терминологический словарь.

Для студентов высших фармацевтических учебных заведений.

УДК 615.1(075.8)

ББК 30.16я73

*Оригинал-макет данного издания является собственностью Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом без согласия правообладателя запрещается*

© Сазыкин Ю. О., Орехов С. Н., Чакалева И. И., 2006

© Образовательно-издательский центр «Академия», 2006

ISBN 978-5-7695-5506-0

© Оформление. Издательский центр «Академия», 2006

Биотехнология — одна из важнейших современных научных дисциплин, необходимых фармацевту, работающему как в лабораториях и цехах предприятий, выпускающих лекарственные средства, так и в аптеках и контрольных учреждениях. В каждом случае помимо знания общих основ этой науки (и сферы производства) обязательно также глубокое знакомство с теми ее разделами, которые будут наиболее близки профилю работы специалиста. Знакомство с биотехнологией необходимо всем выпускникам медицинских вузов независимо от их специализации: биотехнологические методы все более интенсивно проникают в практику диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний, современные же концепции биотехнологии способствуют формированию мировоззрения человека, адекватного стремительному течению научно-технического прогресса в современном мире.

В общем смысле технология, как правило, связана с производством, целью которого является удовлетворение потребностей человеческого общества. Иногда высказывается мнение, что биотехнология — это осуществление природного процесса в искусственных, созданных человеком условиях. Однако в последнее десятилетие на основе биотехнологических методов в биореакторах (техногенных нишах) воспроизводятся не только природные, но и не протекающие в природе процессы с использованием ферментов (биокатализаторов — бесклеточных ферментных комплексов), одноклеточных и многоклеточных организмов.

В настоящее время биотехнология решает проблемы не только медицины или создания пищевых продуктов путем ферментации (традиционной области ее применения); с ее помощью ведется, например, разработка полезных ископаемых, решается проблема энергоресурсов, ведется борьба с нарушениями экологического равновесия и т. д. В некоторых странах (например, Японии) биотехнология объявлена «стратегической индустрией», а в других (например, Израиле) включена в число научных направлений с указанием «национальный приоритет». В США число биотехнологических фирм за 1985 — 2005 гг. достигло полутора тысяч. В Европе их несколько сотен.

Характерен рост числа специализированных периодических изданий по биотехнологии, выпускаемых в разных странах, международных и региональных биотехнологических конгрессов и конференций.

Биотехнология включена в учебные программы не только медицинских, но и технических вузов, а также университетов.

Общепризнано, что содержанием биотехнологии является использование достижений фундаментальных биологических наук в практических целях. Четверть века назад Европейская федерация по биотехнологии выдвинула следующий тезис: «Биотехнология — применение биологических систем и процессов в промышленности и сфере услуг», не подчеркнув научное содержание биотехнологии; кроме того, слишком широким представляется понятие «сфера услуг». На одном из конгрессов 10 лет спустя было дано более подробное определение: «Биотехнология — это наука об основах реализации процессов получения с помощью биокатализаторов разных продуктов и об использовании таких процессов при защите окружающей среды», все же неоправданно сужающее ее возможности.

В некоторых учебных пособиях биотехнология трактуется как «направление научно-технического прогресса, использующее биологические процессы и агенты для целенаправленного воздействия на природу, а также в интересах промышленного получения полезных для человека продуктов, в частности лекарственных средств».

Из этого и предыдущих определений следует, что биотехнология — и наука, и сфера производства. Она включает разделы энзимологии, промышленной микробиологии, прикладной биохимии, медицинской микробиологии и биохимии, а также разделы, связанные с конструированием заводского оборудования и созданием специализированных поточных линий.

В современных условиях нередко наблюдается тесное переплетение биотехнологии и биоорганической химии. Так, при получении многих лекарственных веществ используются перемежающиеся этапы био- и органического синтеза с последующей трансформацией целевых продуктов, осуществляемой биологическим или химическим методом. При обсуждении перспектив биотехнологии и ее стратегических целей все чаще подчеркивается ее связь с молекулярной биологией и молекулярной генетикой. Широкое распространение получило понятие молекулярной биотехнологии как научной дисциплины, уже в основном сформировавшейся на стыке технологии рекомбинантной ДНК (генетическая или геновая инженерия) и традиционных биологических дисциплин, в первую очередь микробиологии, что объясняется техническими причинами более легкого оперирования микробными клетками. Ведется конструирование новых продуцентов биологически актив-

ных веществ с помощью технологии рекомбинантной ДНК. В настоящее время бурно развивается и такая область молекулярной генетики как геномика, основная цель которой — полное познание генома, т. е. совокупности всех генов любой клетки, включая клетки человека. Путем секвенирования — установления полной последовательности нуклеотидов в каждом без исключения гене создается своеобразное «досье», отражающее не только видовые, но и индивидуальные особенности организма.

В проблемных научных статьях можно встретить рассчитанные на эффект и свободные от каких-либо догм высказывания о биотехнологии некоторых крупных экспериментаторов, носящие своего рода мировоззренческий характер, например: «Биотехнология — это приближение к Богу». Здесь подразумевается, что такая кардинальная цель молекулярной биологии и молекулярной генетики как познание генома человека — это заигрывание с Богом, а последующее оперирование геномом, его совершенствование (область биотехнологии) — попытка человека приблизиться по могуществу к Богу.

В развитии биотехнологии выделяют следующие периоды: эмпирический, научный, современный (молекулярный). Последний специально отделяется от предыдущего, так как биотехнологи уже могут создавать и использовать в производстве неприродные организмы, полученные генно-инженерными методами.

Эмпирическая биотехнология неотделима от цивилизации, преимущественно как сфера производства (с древнейших времен — приготовление теста, получение молочнокислых продуктов, сыро-, виноделие, пивоварение, ферментация табака и чая, выделка кож и обработка растительных волокон). В течение тысячелетий человек применял в своих целях ферментативные процессы, не имея понятия ни о ферментах, ни о клетках с их видовой специфичностью и, тем более, генетическим аппаратом. При этом прогресс точных наук долгое время не влиял на технологические приемы, используемые в эмпирической биотехнологии.

Быстрое развитие биотехнологии как научной дисциплины с середины XIX в. было инициировано работами Л. Пастера (1822—1895).

Именно Л. Пастер ввел понятие биообъекта, не прибегая, впрочем, к такому термину, доказал «живую природу» брожений: каждое осуществлявшееся в производственных условиях брожение (спиртовое, уксусно-, молочнокислое и т. д.) вызывается своим микроорганизмом, а срыв производственного процесса обусловлен несоблюдением чистоты культуры микроорганизма, являющегося в данном случае биообъектом.

Практическое значение этих исследований Л. Пастера сводится к требованию поддержания чистоты культуры, т. е. к проведению производственного процесса с индивидуальным, имеющим точные характеристики биообъектом.

Позднее, приступив к работам в области медицины, Л. Пастер исходил из своей концепции о причине заразных болезней, сводя ее в каждом случае к конкретному, определенному микроорганизму. Хотя техника того времени не позволяла увидеть возбудителя инфекции, как, например, в случае вируса бешенства, однако Л. Пастер считал, что «мы его не видим, но мы им управляем». Целенаправленное воздействие на возбудителя инфекции (в целях ослабления его патогенности) позволяет получать вакцины. Ослабленный патоген и животное, в организм которого он введен, могут рассматриваться как своеобразный биообъект, а получаемая вакцина — как биотехнологический препарат. Л. Пастер создал строго научные основы получения вакцин, тогда как замечательные достижения Э. Дженнера в борьбе с оспой были результатом освоения эмпирического опыта индийской медицины.

Современная биотехнология, основанная на достижениях молекулярной биологии, молекулярной генетики и биоорганической химии (на практическом воплощении этих достижений), выросла из биотехнологии Л. Пастера и, являясь также строго научной, отличается от последней прежде всего тем, что способна создавать и использовать в производстве неприродные биообъекты, что отражается как на производственном процессе в целом, так и на свойствах новых биотехнологических продуктов.

Говоря о биотехнологии, нельзя не упомянуть публикацию в 1953 г. первого сообщения о двуспиральной структуре ДНК, ставшего основополагающим для возникновения указанных фундаментальных дисциплин, достижения которых реализуются в современной биотехнологии. В результате серий публикаций в 1960-х гг. в литературу были внедрены принципиально важные для биотехнолога понятия «оперон» и «структурный ген». В 1973 г. было опубликовано сообщение об успешном переносе генов из одного организма в другой — в сущности, уже о технологии рекомбинантной ДНК, определяющей возникновение генетической инженерии. В 1980 г. Верховный суд США признал, что генно-инженерные микроорганизмы могут быть запатентованы, а развитие биотехнологических методов получило юридический статус. В 1990 г. произошли два принципиально важных события: была разрешена генотерапия (но только применительно к соматическим клеткам человека, т. е. без передачи чужого гена потомству) и утвержден международный проект «Геном человека». Образно говоря, человеку было юридически разрешено познавать свою сущность.

В настоящее время интенсивно растет количество таких успешно применяемых в медицине биотехнологических продуктов, как рекомбинантные белки, вторичные метаболиты микроорганизмов и растений, а также полусинтетических лекарственных агентов, являющихся продуктами одновременно био- и оргсинтеза.

## Глава 1

### БИООБЪЕКТЫ: СПОСОБЫ ИХ СОЗДАНИЯ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

#### 1.1. Понятие «биообъект»

*Биообъект* — центральный и обязательный элемент биотехнологического производства, создающий его специфику.

Биообъектом может быть целостный сохранивший жизнеспособность многоклеточный или одноклеточный организм. Им могут являться изолированные клетки многоклеточного организма, а также вирусы и выделенные из клеток мультиферментные комплексы, включенные в определенный метаболический процесс. Наконец, биообъектом может быть индивидуальный изолированный фермент.

*Функция биообъекта* — полный биосинтез целевого продукта, включающий ряд последовательных ферментативных реакций или катализ лишь одной ферментативной реакции, которая имеет ключевое значение для получения целевого продукта.

Биообъект, осуществляющий полный биосинтез целевого продукта, называется продуцентом. Биообъект, являющийся индивидуальным ферментом или выполняющий функцию одной ферментативной реакции, используемой биотехнологом, называют промышленным биокатализатором.

Таким образом, к биообъектам относятся как макромолекулы, так микро- и макроорганизмы.

В качестве макромолекул в промышленном производстве используются ферменты всех известных классов, но наиболее часто — гидролазы и трансферазы.

Доказано, что использование ферментов в производстве в иммобилизованном виде, т.е. связанных с нерастворимым носителем, наиболее рационально, так как в этом случае обеспечиваются многократность их применения и стандартность повторяющихся производственных циклов.

С некоторой условностью «Лестница живых существ» начинается с вирусов. Последние в качестве биообъектов (с ослабленной патогенностью) используются прежде всего для приготовления вакцин.

Как биообъекты микробные клетки прокариот и эукариот в современном биотехнологическом производстве занимают доминирующее положение. Они являются продуцентами используемых в качестве лекарственных средств первичных метаболитов: аминокислот, азотистых оснований, коферментов, моно- и дисахаров, ферментов медицинского назначения, применяемых в заместительной терапии и т.д.

Микроорганизмы образуют огромное количество вторичных метаболитов, многие из которых также нашли применение, например, антибиотики и другие корректоры гомеостаза клеток млекопитающих.

Пробиотики — препараты на основе биомассы отдельных видов микроорганизмов используются при дисбактериозах для нормализации микрофлоры желудочно-кишечного тракта. Микроорганизмы необходимы также при производстве вакцин. Наконец, микробные клетки методами генной инженерии могут быть превращены в продуценты видоспецифических для человека белковых гормонов, белковых факторов неспецифического иммунитета и т.д.

Высшие растения являются традиционным и к настоящему времени все еще наиболее обширным источником получения лекарственных средств. При использовании растений в качестве биообъектов основное внимание сосредоточено на вопросах культивирования растительных тканей на искусственных средах (каллусные и суспензионные культуры) и открывающихся при этом новых перспективах.

Традиционными поставщиками лекарственных и диагностических средств являются представители животного мира. Довольно часто в качестве биообъектов выступают млекопитающие, птицы, рептилии, амфибии, членистоногие, рыбы, моллюски. Разнообразие образуемых ими биологически активных соединений, нашедших применение в медицине, крайне велико.

В последние годы в связи с развитием технологии рекомбинантной ДНК стремительно возрастает важность такого биообъекта как человек, хотя на первый взгляд это кажется парадоксальным.

В принципе, человек уже давно мог быть отнесен к биообъектам, например, при получении гомологичной антисыворотки или в случае использования тканей и органов человека для их пересадки, например, костного мозга, почек и т.д.

Однако биообъектом с позиций биотехнологии (при использовании биореакторов) человек стал лишь после реализации возможности клонирования его ДНК (точнее ее экзонов) в клетках микроорганизмов. За счет такого подхода был ликвидирован дефицит сырья для получения видоспецифических белков человека.

## 1.2. Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции

Как правило, работающий с биообъектом биотехнолог крайне заинтересован в его совершенствовании независимо от того, на какой ступени «лестницы живых существ» находится этот биообъект. Если организм, выделенный из природной среды («дичок») не будет подвергнут совершенствованию, то производственный процесс образования целевого продукта или экономически нецелесообразен, или технически трудно осуществим. Наиболее четко эта тенденция прослеживается в случае биообъектов, принадлежащих к микроорганизмам. Изменение биообъекта, благоприятное для его использования в производстве, должно передаваться по наследству и, соответственно, вызываться мутацией. На биохимическом уровне мутация — изменение первичной структуры ДНК в конкретном ее участке, что, в конечном счете, приводит к изменению фенотипа биообъекта. Меняется биосинтетическая способность биообъекта: изменяется либо набор его ферментов, либо активность некоторых из них.

Подчеркнем, что мутации — это первоисточник изменчивости организмов, создающий основу для эволюции. Однако во второй половине XIX в. для микроорганизмов был открыт еще один источник изменчивости — перенос чужеродных генов — своего рода «генная инженерия природы».

Долгое время понятие мутации относили только к хромосомам у прокариот и хромосомам (ядру) у эукариот. В настоящее время кроме хромосомных мутаций появилось также понятие мутаций цитоплазматических (плазмидных — у прокариот, митохондриальных и плазмидных — у эукариот).

Мутации могут быть обусловлены как перестройкой репликона (изменением в нем числа и порядка расположения генов), так и изменениями внутри индивидуального гена.

Применительно к любым биообъектам, но особенно часто в случае микроорганизмов, выявляются так называемые спонтанные мутации, обнаруживаемые в популяции клеток без специального воздействия на нее.

По выраженности почти любого признака клетки в микробной популяции составляют вариационный ряд. Большинство клеток имеют среднюю выраженность признака. Отклонения «+» и «-» от среднего значения встречаются в популяции тем реже, чем больше величина отклонения в любую сторону (рис. 1). Первоначальный, самый простой подход к совершенствованию биообъекта заключался в отборе отклонений «+» (предполагая, что именно эти отклонения соответствуют интересам производства). В новом клоне (генетически однородное потомство одной клетки; на твер-



Рис. 1. Вариационный ряд

дой среде — колония), полученном из клетки с отклонением «+» вновь проводился отбор по тому же принципу. Однако такая процедура при ее неоднократном повторении довольно быстро теряет эффективность, т. е. отклонения «+» становятся в новых клонах все меньше и меньше по величине.

Спонтанные мутации встречаются, как правило, довольно редко. Разброс по степени выраженности признаков обычно невелик.

Совершенствование биообъектов путем предварительного мутагенеза и последующей селекции оказалось гораздо более действенным. В этом случае разброс мутантов по выраженности признаков (как «+», так и «-») резко увеличивается. Среди них оказываются мутанты с пониженной способностью к реверсии, т. е. со стабильно измененным признаком. Мутагенез осуществляется при обработке биообъекта физическими или химическими мутагенами. В первом случае, как правило, это ультрафиолетовые, гамма-, рентгеновские лучи; во втором — нитрозометилмочевина, нитрозогуанидин, акридиновые красители, некоторые природные вещества (например, из ДНК-тропных антибиотиков вследствие их токсичности не применяемых в клинике инфекционных заболеваний). Механизм активности как физических, так и химических мутагенов связан с их непосредственным действием на ДНК (прежде всего на азотистые основания ДНК, что выражается в сшивках, димеризации, алкилировании последних, интеркаляции между ними).

Подразумевается, естественно, что повреждения не приводят к летальному исходу. Таким образом, после обработки биообъекта мутагенами (физическими или химическими) их воздействие на ДНК приводит к частому наследственному изменению уже на уровне фенотипа (тех или иных его свойств). Последующей задачей является отбор и оценка именно нужных биотехнологу мутаций. Для их выявления обработанную культуру высеивают на твер-

дые питательные среды разных составов, предварительно разведя ее с таким расчетом, чтобы на твердой среде не было сплошного роста, а формировались отдельные колонии, образуемые при размножении именно отдельных клеток. Затем каждую колонию пересеивают и полученную культуру (клон) проверяют по тем или иным признакам в сравнении с исходной. Эта селекционная часть работы в целом весьма трудоемка, хотя приемы, позволяющие повысить ее эффективность, постоянно совершенствуются.

Так, изменяя состав твердых питательных сред, на которых вырастают колонии, можно сразу получить первоначальные сведения о свойствах клеток этой колонии в сравнении с клетками исходной культуры. Для высевания клонов с разными особенностями метаболизма используют так называемый «метод отпечатков», разработанный Дж. Ледербергом и Э. Ледерберг. Популяцию микробных клеток разводят так, чтобы на чашке Петри с питательной средой выросло около ста колоний и они были бы четко разделены. На металлический цилиндр диаметром, близким к диаметру чашки Петри, надевают бархат; затем все стерилизуют, создавая, таким образом, «стерильное бархатное дно» цилиндра. Далее прикладывают это дно к поверхности среды в чашке с выросшими на ней колониями. При этом колонии как бы «отпечатываются» на бархате. Затем этот бархат прикладывают к поверхности сред разного состава. Таким образом можно установить: какая из колоний в исходной чашке (на бархате) расположена колоний отражает их расположение на поверхности твердой среды в исходной чашке) соответствует, например, мутанту, нуждающемуся в конкретном витамине, или конкретной аминокислоте; или какая колония состоит из мутантных клеток, способных к образованию фермента, окисляющего определенный субстрат; или какая колония состоит из клеток, получивших резистентность к тому или иному антибиотику и т. п.

В первую очередь биотехнолога интересуют мутантные культуры, обладающие повышенной способностью к образованию целевого продукта. Продукт целевого вещества, наиболее перспективный в практическом отношении, может многократно обрабатываться разными мутагенами. Новые мутантные штаммы, получаемые в научных лабораториях разных стран мира, служат предметом обмена при творческом сотрудничестве, лицензионной продаже и т. п.

Потенциальные возможности мутагенеза (с последующей селекцией) обусловлены зависимостью биосинтеза целевого продукта от многих метаболических процессов в организме продуцента. Например, повышенную активность организма, образующего целевой продукт, можно ожидать, если мутация привела к дупликации (удвоению) или амплификации (умножению) структурных генов, включенных в систему синтеза целевого продукта. Да-

лее активность можно повысить, если за счет разных типов мутаций будут подавлены функции репрессорных генов, регулирующих синтез целевого продукта. Весьма эффективный путь увеличения образования целевого продукта — нарушение системы ретроингибирования. Повысить активность продуцента можно также, изменив (за счет мутаций) систему транспорта предшественников целевого продукта в клетку. Наконец, иногда целевой продукт при резком увеличении его образования отрицательно влияет на жизнеспособность собственного продуцента (так называемый суицидный эффект). Повышение резистентности продуцента к образуемому им же веществу часто необходимо для получения, например, суперпродуцентов антибиотиков.

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

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

Одним из самых блестящих примеров эффективности мутагенеза с последующей селекцией по признаку увеличения образования целевого продукта является история создания современных суперпродуцентов пенициллина. Работа с исходными биообъектами — штаммами (штамм — клоновая культура, однородность которой по определенным признакам поддерживается отбором) гриба

*Penicillium chrysogenum*, выделенными из природных источников, велась с 1940-х гг. в течение нескольких десятилетий во многих лабораториях. Вначале некоторый успех был достигнут при отборе мутантов, появившихся в результате спонтанных мутаций. Затем перешли к индуцированию мутаций физическими и химическими мутагенами. В результате ряда удачных мутаций и ступенчатого отбора все более продуктивных мутантов активность штаммов *Penicillium chrysogenum*, используемых в промышленности стран, где производят пенициллин, сейчас в 100 тыс. раз выше, чем у обнаруженного А. Флемингом исходного штамма, с которого и началась история открытия пенициллина.

Производственные штаммы (применительно к биотехнологическому производству) с такой высокой продуктивностью (это относится не только к пенициллину, но и к другим целевым продуктам) крайне нестабильны вследствие того, что многочисленные искусственные изменения в геноме клеток штамма сами по себе для жизнеспособности этих клеток положительного значения не имеют. Поэтому мутантные штаммы требуют постоянного контроля при хранении: популяцию клеток высеивают на твердую среду и полученные из отдельных колоний культуры проверяют на продуктивность. При этом ревертаны — культуры с пониженной активностью отбрасывают. Реверсия объясняется обратными спонтанными мутациями, ведущими к возвращению участка генома (конкретного фрагмента ДНК) в его первоначальное состояние. Специальные ферментные системы репарации участвуют в реверсии к норме — в эволюционном механизме поддержания постоянства вида.

Совершенствование биообъектов применительно к производству не исчерпывается только повышением их продуктивности. Хотя это направление, несомненно, является главным, но оно не может быть единственным: успешная работа биотехнологического производства определяется многими факторами. С экономической точки зрения весьма важно получение мутантов, способных использовать более дешевые и менее дефицитные питательные среды. Если для работы в исследовательской лаборатории дорогие среды не создают особых финансовых проблем, то при крупнотоннажном производстве понижение их стоимости (хотя и без увеличения уровня активности продуцента) крайне важно.

Другой пример: в случае некоторых биообъектов культуральная жидкость после окончания ферментации имеет неблагоприятные в технологическом отношении реологические свойства. Поэтому в цехе выделения и очистки целевого продукта, работая с культуральной жидкостью повышенной вязкости, сталкиваются с трудностями при использовании сепараторов, фильтр-прессов и т. д. Мутации, соответствующим образом меняющие метаболизм биообъекта, в значительной мере снимают эти трудности.

Большое значение в отношении гарантии надежности производства приобретает получение фагоустойчивых биообъектов. Соблюдение асептических условий при проведении ферментации прежде всего касается предотвращения попадания в посевной материал (а также в ферментационный аппарат) клеток и спор посторонних бактерий и грибов (в более редких случаях водорослей и простейших). Предотвратить проникновение в ферментер фагов вместе с технологическим воздухом, стерилизуемым путем фильтрации, крайне трудно. Не случайно вирусы в первые годы после их открытия именовали «фильтрующимися». Поэтому основной путь борьбы с бактериофагами, актинофагами и фагами, поражающими грибы, — получение устойчивых к ним мутантных форм биообъектов.

Не касаясь специальных случаев работы с биообъектами-патогенами, следует подчеркнуть, что иногда задача совершенствования биообъектов исходит из требований промышленной гигиены. Например, выделенный из природного источника продуцент одного из важных беталактамных антибиотиков в значительном количестве образовывал летучие вещества с неприятным запахом гниющих овощей.

Мутации, ведущие к удалению генов, кодирующих ферменты, участвующие в синтезе этих летучих веществ, приобрели в данном случае практическое значение для производства.

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

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

### **1.3. Совершенствование биообъектов методами клеточной инженерии**

В течение многих лет мутагенез и селекция успешно применялись и будут широко применяться при совершенствовании биообъектов в дальнейшем.

Однако постепенно были выявлены существенные ограничения в достижении ставящихся биотехнологами целей. И, хотя главный путь снятия таких ограничений связан с применением методов генетической инженерии, определенные перспективы имеет и клеточная инженерия — «насильственный» обмен участками хромосом у прокариот или участками и даже целыми хромосомами у эукариот. В результате создаются неприродные биообъекты, среди которых могут быть отобраны продуценты новых веществ или организмы с ценными в практическом отношении свойствами.

Перспективы клеточной инженерии заключаются прежде всего в том, что с ее помощью возможно получение межвидовых и межродовых гибридных культур микроорганизмов, а также гибридных клеток между отдаленными в эволюционном отношении многоклеточными организмами. Далее необходимо сделать оговорку, что материал, относящийся к получению гибридов между лимфоцитами и опухолевыми клетками излагается в гл. 10. В данной главе техника клеточной инженерии рассматривается применительно к микроорганизмам и в соответствии с теми целями, которые ставятся перед ними как биообъектами. В качестве наиболее простого примера можно взять микроорганизмы прокариот (с одной хромосомой в клетке).

Для обмена фрагментами хромосомы у прокариот необходимо предварительно получить из их клеток лишённые клеточной стенки протопласты; затем осуществить слияние (фузию) протопластов с образованием диплоидов; полученные диплоиды инкубировать в течение нескольких часов для «ломки» и воссоединения кольцевых хромосомных нитей в разных вариантах. Затем суспензию протопластов высевают на твердую питательную среду, при этом часть диплоидов превращается в гаплоиды — способные к размножению клетки, которые образуют соответственно колонии. Их изучают и отбирают культуры, приобретающие новые качества, представляющие интерес для биотехнолога (рис. 2).

Таким образом, первый этап работы связан с удалением у микроорганизмов клеточной стенки. У прокариот — эубактерий и актиномицетов — многоклеточных бактерий клеточная стенка состоит из жесткого полимера пептидогликана, поддерживающего форму клетки и обеспечивающего защиту цитоплазматической мембраны от перепада осмотического давления между внешней средой и цитоплазмой.

Пептидогликан может быть расщеплен с помощью ферментов (гидролаз пептидогликана), из которых самым известным является лизоцим, расщепляющий полисахаридные нити пептидогликана. Источником лизоцима как лабораторного реагента является белок куриного яйца.

Ферментативная деградация клеточной стенки в обычных условиях культивирования бактерий сразу же ведет к их лизису из-за

разницы в осмотическом давлении. При этом ни цитоплазматическая, ни внешняя (у грамотрицательных бактерий) мембраны не выдерживают целостности. Этим давно известным явлением объясняется, например, литический эффект пенициллина, который, подавляя синтез пептидогликана, нарушает баланс между действием его синтетаз и гидролаз.

Из изложенного следует, что удалить клеточную стенку и в то же время сохранить целостность мембраны протопласта можно, лишь выровняв осмотическое давление внутри клетки и в среде. Этот простой путь тем не менее долгое время оставался неизвестным, пока Дж. Ледерберг не показал его реальность. С тех пор работы по клеточной инженерии микроорганизмов базируются на протопластировании: для получения протопластов клеточную стенку

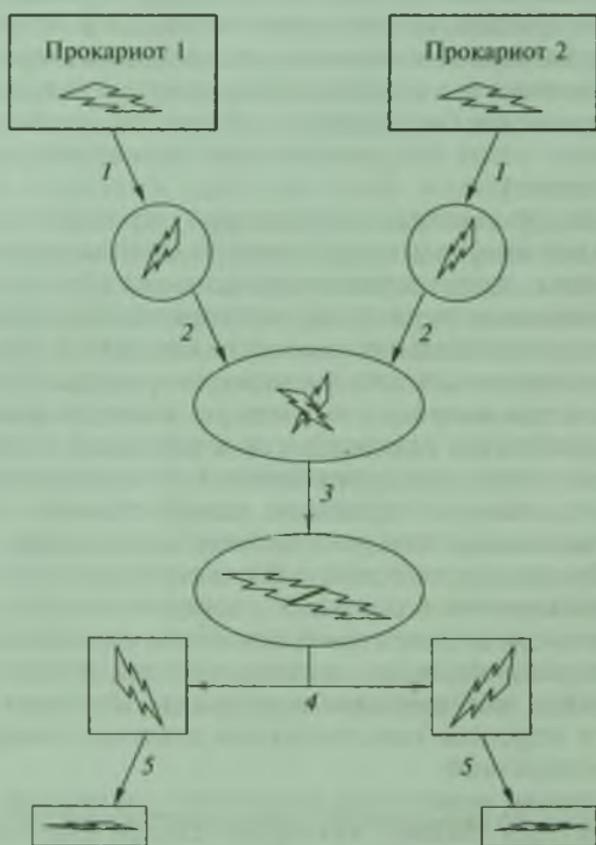


Рис. 2. Формирование протопластов у прокариот:

1 — ферментативная деградация клеточной стенки; 2 — слияние протопластов; 3 — ломка и рекомбинация хромосом, образование диплоидов; 4 — образование гаплоидов с рекомбинантной хромосомой; 5 — регенерация протопластов

ку удаляют ферментативной обработкой в «гипертонической» среде с 20 % раствором сахарозы или маннита, иногда с 10 % раствором натрия хлорида в зависимости от определенных особенностей биообъекта и преследуемых целей. Превращение суспензии клеток в суспензию протопластов обычно контролируют методом фазово-контрастной микроскопии.

Если биообъект принадлежит к микроскопическим (плесневым и дрожжевым) грибам, то для получения протопластов используют, как правило, не лизоцим, а комплексный ферментный препарат, выделенный из пищеварительного тракта виноградной улитки *Helix pomatia*. Связано это с тем, что состав клеточной стенки у грибов более сложен, чем у бактерий. Она состоит из таких полимеров, как хитин, глюканы, маннопротеин, для каждого из которых необходим свой, деградирующий его фермент. Известно, что по набору ферментов и их каталитической активности наиболее эффективен желудочный сок виноградной улитки в ранний весенний сезон, когда улитки появляются на виноградных плантациях, но их желудок еще не заполнен перевариваемыми виноградными листьями. Неочищенный экстракт из пищеварительного тракта виноградной улитки лиофильно высушивают и используют как комплексный ферментный препарат для получения протопластов из клеток грибов.

Следующий этап работы состоит в объединении суспензий двух образцов протопластов, принадлежащих разным штаммам или разным видам, в более редких случаях — даже разным родам. Добиться слияния двух протопластов разного происхождения — довольно сложная задача. Частота слияния резко повышается при добавлении к протопластам полиэтиленгликоля, обладающего свойствами детергента. В случае прокариот образующиеся протопласты имеют двойной набор хромосомного материала, т.е. это протопласты с двумя хромосомами. В гипертонической среде такие протопласты сохраняют свою целостность.

После промывания гипертонической средой, но уже не содержащей гидролизующего клеточную стенку ферментного препарата, протопласты высеиваются на твердую питательную среду. При этом у определенной части протопластов диплоидные формы переходят в гаплоидные; в результате образуются способные к размножению нормальные клетки с клеточной стенкой. Эти клетки формируют на твердой среде колонии. Однако во время нахождения протопластов в диплоидной форме в некоторых из них происходит «ломка» и воссоединение хромосомных нитей, при котором в одну хромосому может включиться фрагмент другой. Таким образом, при регенерации протопластов формируются нормальные клетки, часть которых имеет гибридные хромосомы. Культуры таких клеток обладают новыми свойствами. В качестве примера можно привести получение «гибридных» антибиотиков.

атындағы ғылыми

КІТАПХАНАСЫ

Известно, что среди актиномицетов есть принадлежащие к разным видам продуценты антибиотиков гликозидной структуры с варьирующими агликонами и сахарами. Так, антибиотик эритромицин имеет 14-членный макроциклический агликон и два сахара (дезозамин и кладинозу), присоединенных к нему гликозидной связью (см. с. 110); а у антибиотиков — антрациклинов агликон состоит из четырех сконденсированных углеродных шестичленных колец, соединенных с аминсахаром (см. с. 112).

С помощью клеточной инженерии были получены продуценты таких антибиотиков, у которых макролидный агликон эритромицина был связан с углеводной частью, соответствующей антрациклинам, и наоборот, антрациклиновый агликон с сахарами, свойственными эритромицину. Аналогичные работы ведутся по получению гибридных беталактамных антибиотиков.

Оценивая перспективы использования процедуры протопластирования в биотехнологии, следует отметить, что слияние даже принадлежащих к одной популяции протопластов и последующая их регенерация могут привести к тому, что гены биосинтеза целевого продукта окажутся в одном гаплоиде в удвоенном состоянии (его хромосома будет обогащена двумя кластерами генов биосинтеза). Иными словами, в одной хромосоме сосредоточится биосинтетический потенциал (применительно к целевому продукту) двух хромосом. Разумеется, такой особенностью может обладать лишь небольшая часть полученных после регенерации культур. Поэтому после протопластирования выявляются «плюс»- и «минус»-варианты продуцента по сравнению с производительностью исходной культуры.

Отбор «плюс»-вариантов затруднений не вызывает, однако добиться их длительного использования в производстве далеко не просто. После нескольких пересевов их производительность, постепенно снижаясь, приближается к производительности исходной культуры. Причины этого явления недостаточно ясны. Повидимому, репарационные системы культуры приближают ее биосинтетические показатели к естественным. Для замедления возвращения «плюс»-вариантов к исходным показателям предлагаются два пути.

Первый — обработка «плюс»-вариантов мутагенами и отбор мутантов с пониженной способностью к возвращению измененных участков ДНК к норме. Второй связан с возможностью использования инженерной энзимологии, точнее, иммобилизованных биообъектов. Можно иммобилизовывать клетки «плюс»-варианта, т.е. связывать их с нерастворимым носителем и использовать в производстве, не прибегая к пересевам в течение определенного времени (от нескольких недель до нескольких месяцев). Технически это довольно непросто, однако такой путь представляет интерес как новое направление в биотехнологии — сочета-

ние клеточной инженерии с инженерной энзимологией непосредственно в производстве.

В заключение отметим, что протопласты — основной объект, которым оперирует клеточная инженерия, довольно широко используются и в генетической инженерии. При этом обмен молекулами и фрагментами молекул ДНК у протопластов достигается легче, чем при трансформации клеток с их более сложной оболочкой.

## **1.4. Создание биообъектов методами генетической инженерии**

### **1.4.1. Общая характеристика**

Генетическая инженерия гораздо конкретнее и точнее клеточной по характеристике используемых объектов и оперирует в основном с разными по форме и размерам фрагментами клетки. Отметим, что термины «генетическая инженерия», «генная инженерия», «рекомбинантная ДНК» — равноценны.

Понятие генетической инженерии имеет очень широкий спектр и поэтому не может быть сформулировано кратко. В качестве одного из вариантов генетическую инженерию можно представить как соединение фрагментов ДНК природного и синтетического происхождения или их комбинацию *in vitro* с последующим введением полученных рекомбинантных структур в живую клетку для того, чтобы введенный фрагмент ДНК после включения его в хромосому либо реплицировался, либо автономно экспрессировался. Следовательно, вводимый генетический материал становится частью генома клетки.

До перечисления этапов работы генного инженера укажем, что он должен иметь в своем распоряжении:

- а) генетический материал (клетку-хозяина);
- б) транспортное устройство — вектор, переносящий генетический материал в клетку;
- в) набор специфических ферментов — «инструментов» генной инженерии.

Принципы и методы генетической инженерии отработаны, прежде всего, на микроорганизмах; бактериях — прокариотах и дрожжах — эукариотах.

Наибольшие практические успехи генетической инженерии применительно к биотехнологии лекарственных средств достигнуты в настоящее время в области создания штаммов микроорганизмов — продуцентов видоспецифичных для человека белков. Такие белки для микробной клетки являются чужеродными, в организме же человека одни из них играют роль биорегуляторов (бел-

ковые гормоны), другие — факторов врожденного иммунитета (интерфероны и т.д.)

Стратегическая цель генного инженера — создание принципиально нового биообъекта для биотехнологического производства — микроорганизма с человеческим геном.

При выборе микроорганизма как потенциального продуцента учитывается ряд обстоятельств.

1. Поскольку микроорганизм будет выращиваться в производственных условиях в большом количестве и с ним будут контактировать многие работники предприятия (биологи, химики и др.), желательно, чтобы он не был патогенным. Кроме того, целевой генно-инженерный продукт, выделяемый из микроорганизма, должен иметь гарантии отсутствия даже следов микробных токсинов.

2. Проникший в клетку микроорганизма вектор с чужеродным для нее геном (или кластером генов) не должен расщепляться эндонуклеазами этой клетки, т.е. генетический материал должен сохраняться. При этом рибосомы потенциального продуцента должны воспринимать информационную РНК, соответствующую чужеродному материалу.

3. Образовавшийся чужеродный для клетки белок (для биотехнолога — целевой продукт) не должен расщепляться ее протеазами, т.е. не подвергаться воздействию систем репарации клетки, гидролизующих чужеродные белки. Ослабление действия таких систем также является одним из предварительных этапов работы генного инженера с продуцентом.

4. Желательно, чтобы у потенциального продуцента чужеродного белка (целевого продукта) последний выводился из клетки в питательную среду, что значительно облегчит его последующее выделение и очистку.

Предварительная работа генного инженера начинается с самого гена, кодирующего целевой белок. К этому гену присоединяется нуклеотидная последовательность, в свою очередь кодирующая так называемую лидерную последовательность аминокислот (преимущественно гидрофобных). Синтезированный в клетке целевой продукт с такой лидерной последовательностью аминокислот с их помощью проходит через липидные слои цитоплазматической мембраны из клетки наружу. Однако в этом случае клетка продуцента должна быть изменена генным инженером. В частности, в мембране должна находиться «сигнальная протеаза», отщепляющая от генного продукта лидерную последовательность аминокислот перед его выходом в среду.

Для того чтобы вектор с чужеродным геном проник в клетку, ее подвергают специальной обработке солями лития или кальция в зависимости от вида микроорганизма. В результате в стенке оболочки клетки формируются небольшого диаметра отверстия, че-

рез которые в нее проникают молекулы вектора. Обработанные таким путем клетки получили название компетентных: они способны воспринимать переносимую вектором информацию.

Важным предварительным этапом работы генного инженера является подбор вектора. Векторы, используемые при работе с микроорганизмами, конструируются чаще всего на основе умеренных фагов или плазмид. Преимущество плазмид перед фагами заключается в отсутствии лизиса клетки, возможного при работе с умеренными фагами.

При создании нового рекомбинантного продуцента ключевым моментом в работе генного инженера является встраивание гена (кластера генов) в вектор, точнее в ДНК векторной молекулы, например в плазмиду. Это становится возможным благодаря тому, что в распоряжении генных инженеров имеется большой набор разных по субстратной специфичности эндонуклеаз, получивших рабочий термин рестриктазы (от англ. *restriction* — разрезание). В настоящее время известны многие десятки разных рестриктаз, дифференцируемые на рестриктазы, разрезающие либо одну из двух комплементарных нитей ДНК, либо сразу обе нити.

Для биотехнолога в первую очередь представляют интерес рестриктазы, катализирующие разрез только одной нити в углеводно-фосфатной цепи ДНК. Помимо этого важно, чтобы рестриктаза, которая будет разрезать эту нить, была достаточно высоко специфична. Это значит, что последовательность нуклеотидов, обязательная для выбора данной рестриктазой места разреза углеводно-фосфатного каркаса ДНК, должна быть относительно велика. Например, часто используемая в генно-инженерных исследованиях рестриктаза EcoRI, выделенная из *E. coli* (*Escherichia coli* — кишечная палочка) распознает нуклеотидную последовательность, если азотистые основания располагаются в ней в таком порядке: —GAATTC—; разрез (разрыв) углеводно-фосфатного каркаса одной из двух комплементарных нитей ДНК происходит между G и A. Однако вторая комплементарная нить имеет фактически одинаковую последовательность: —CTTAAG—. Поэтому рестриктаза расщепляет и вторую нить, также между G и A. Как видно из рис. 3, разрезы отстоят один от другого на четыре пары нуклеотидов.

Таким образом, сохраняя свою субстратную специфичность, рестриктаза, способная к расщеплению одной нити, разрезает фактически обе, при этом разрезы находятся не напротив, а на некотором расстоянии один от другого. В результате комплементарные нити расходятся вследствие непрочности водородных связей между основаниями в каждой нуклеотидной паре и создаются одностранные участки — согласно рабочей терминологии «липкие концы». Образно говоря, в двухнитевой ДНК появляется щель, с двух сторон которой находится по липкому концу. В эту щель может быть встроен ген — фрагмент ДНК, если он фланкирован

Место действия рестриктаз



Место действия рестриктаз

Рис. 3. Схема расщепления рестриктазой двухцепочной ДНК:

А — аденин; С — цитозин; G — гуанидин; Т — тимидин

(четко обозначен) одонитевыми участками, комплементарными одонитевым липким концам, сформированным в результате действия рестриктазы на вектор.

Чтобы подготовить включение гена в вектор, надо использовать рестриктазу той же специфичности. Если для образования липких концов в векторе применялась рестриктаза EcoRI, то ее и следует применять для образования липких концов во встраиваемом фрагменте. Разумеется, липкие концы не должны образовываться в самом гене. Здесь выявляется преимущество рестриктаз, распознающих длинные последовательности по порядку расположения пар нуклеотидов.

Количество таких последовательностей в молекуле ДНК, которые обнаруживает рестриктаза, резко уменьшается по мере возрастания в них числа пар нуклеотидов. Следовательно, уменьшается возможность повредить рестриктазой сам ген, который, оказываясь между местами «посадки» молекул рестриктазы на ее субстрат — ДНК, включается в вектор в неповрежденном виде.

Другой прием, который может быть использован генным инженером — фланкирование гена синтетическими последовательностями нуклеотидов, т.е. получение методами биоорганической химии липких концов с заданным порядком нуклеотидов.

Ген (или кластер генов), встроившийся в вектор, удерживается в нем вначале только за счет водородных связей между комплементарными липкими концами. Эта стадия получила название «отжиг». Для того чтобы ген оказался прочно встроенным в вектор, необходимо его закрепление ковалентными связями. Для этих целей служат ферменты-лигазы (от «лиговать» — сшивать), замыкающие разрывы в углеводно-фосфатном каркасе ДНК. После этой стадии работы генного инженера вектор с прочно закрепленным в нем геном может вводиться в микробную клетку. Однако процент успешного включения вектора в клетку, как правило, крайне невелик.

Суспензия клеток микроорганизма с вектором после инкубации высевается на твердую питательную среду, а затем выросшие колонии переносятся на агаровый косяк. Полученные культуры

(клоны) должны быть проверены на содержание в их клетках вектора с геном (кластером генов), кодирующим целевой продукт, например, видоспецифичный для человека белковый гормон или видоспецифичный фактор врожденного иммунитета и т. п.

Если малая частота включения в клетку вектора означает, что вектор воспринимают лишь 0,01—0,1% клеток, то легко представить, какое огромное количество культур надо проверить, чтобы обнаружить культуру, синтезирующую целевой продукт. Для обнаружения этого продукта по его функции надо предварительно его выявить, выделить, очистить и испытать *in vitro* или в опытах на животных. Однако анализировать таким образом тысячи культур практически невозможно. В связи с этим разработан метод предварительного отбора клонов, содержащих вектор.

Вводится понятие гена-маркера. Такой ген легко «заявляет о себе», т. е. маркирует клетку и, соответственно, клон. Ген-маркер также встраивается в вектор, но, разумеется, с помощью другой рестриктазы, выбирающей другую последовательность нуклеотидов, так что встраивание его в «рабочий» ген заранее исключено. Ген-маркер занимает «свое» место в векторе. Этот ген не будет иметь никакого значения в будущем биотехнологическом процессе, но он нужен для отбора продуцента целевого продукта, кодируемого «рабочим» геном. Примером маркера может быть ген, кодирующий фермент беталактамазу. Этот фермент инактивирует беталактамы антибиотика, катализируя гидролиз их беталактаманного кольца.

Клетки *E. coli* микроорганизма, часто используемого при производстве белков человека генно-инженерным путем, проверяются на проникновение в них вектора с двумя генами — «рабочим» и «маркером»; затем их высевают на твердую питательную среду с ампициллином (антибиотиком широкого спектра действия). Так как исходная культура *E. coli* чувствительна к ампициллину, то ее появление на среде в виде выросшей колонии означает, что ампициллин был разрушен беталактамазой; в свою очередь эта беталактамаза может кодироваться только геном, находящимся в векторе, так как в исходных клетках такого гена нет. Это означает, что в вектор помимо гена-маркера был включен и ген, кодирующий целевой продукт.

Далее культуру проверяют на наличие способности образовывать человеческий видоспецифический белок. Количество культур, подлежащих прямой, длительной и трудоемкой проверке, уменьшается с помощью гена-маркера в сотни раз. В результате вся работа по отбору рекомбинантных продуцентов значительно упрощается. Иногда в вектор вводятся два разных гена-маркера. Это еще более повышает результативность и точность отбора клонов с геном, кодирующим целевой продукт.

Гены у микроорганизмов соответствуют «первоначальному» или классическому представлению о гене, т. е. структурный ген — участок ДНК, переписывающийся на информационную РНК. Последняя по порядку расположения кодонов отражается на аминокислотной последовательности белка.

У эукариот большинство структурных генов в плане передачи информации функционируют иначе. Сравнительно недавно была открыта прерывистость или дискретность генов у млекопитающих и, соответственно, у человека. Эти гены содержат перемежающиеся экзоны и интроны. И те, и другие переписываются, т. е. в информационной РНК как первичном транскрипте отражены и экзоны, и интроны. Интроны из первичного транскрипта выбрасываются, а экзоны «стыкуются» один с другим. Возникает зрелая информационная РНК, которая и становится компонентом рибосомальной матричной системы. Это явление, свойственное только эукариотам, называется сплайсинг.

Таким образом, нуклеотидные последовательности интронов информации на белки не передают. Поскольку сплайсинга в микробных клетках прокариот нет, то генные инженеры, чтобы добиться синтеза человеческого белка в клетках прокариот, должны переписать зрелую информационную РНК человеческого гена с помощью фермента обратной транскриптазы на ДНК. После этого такую укороченную ДНК (без интронов) можно использовать для включения в вектор.

Даже отдельные направления генетической инженерии составляют в настоящее время содержание фундаментальных монографий. Объем знаний в этой отрасли стремительно растет, а ее возможности быстро расширяются.

#### **1.4.2. Рекомбинантные белки как лекарственные средства**

Успехи генетической инженерии привели к тому, что свыше 100 белков человека (биорегуляторов, корректоров гомеостаза, факторов врожденного и приобретенного иммунитета) могут сохранять свою видоспецифичность. Они нарабатываются как лекарственные средства путем микробиологического синтеза. При этом технология рекомбинантной ДНК позволяет их совершенствовать: повышать физиологическую активность, снижать вероятность побочных реакций после введения и т. д. Основным при получении рекомбинантных белков является решение проблемы дефицита сырья, так как из человеческих тканей в промышленном масштабе получать их, естественно, невозможно.

При выборе микроорганизма (как продуцента чужеродного белка предполагаемого лекарственного препарата) необходимо:

- наиболее полно изучить геном;
- подробно исследовать метаболизм на уровне вида;
- чтобы микроорганизм обладал умеренной патогенностью (в идеале предполагается ее полное отсутствие);
- чтобы микроорганизм был способен расти в условиях производства на недефицитных и экономически доступных средах.

Избранные в качестве предполагаемых продуцентов микроорганизмы оцениваются и изучаются уже на уровне конкретных штаммов. При необходимости штаммы-биообъекты (как носители чужеродного генетического материала и продуценты чужеродного белка) могут быть усовершенствованы методами генетической инженерии, что позволяет свести к минимуму вероятность протеолиза чужеродных белков, гидролиза чужеродной информационной РНК и «исключения» чужеродных генов из генома. Таким образом, в данном случае общей целью является ограничение активности способствующих гомеостазу клетки систем репарации, включающих нуклеазы и протеазы.

Иногда чужеродный белок может откладываться в клетке продуцента в виде белковых гранул (в недоступной для протеаз форме), что характерно, например, для *E. coli*.

Особое внимание привлекает проблема секреции чужеродных белков, так как выделение целевого белка в высокоочищенном виде из культуральной жидкости — задача гораздо более легкая, чем выделение его из клетки. Как известно, секретируемые белки отличаются от несекретируемых тем, что имеют на N-термине так называемую лидерную последовательность аминокислотных остатков, которая способствует переносу их через мембрану клетки в среду. На последней стадии контакта секретируемого белка с поверхностью образовавшей его клетки лидерная последовательность отделяется от основной полипептидной цепи. В соответствии с этим вводимый в микробную клетку чужеродный ген (точнее оперон) подвергается модификации: либо его нуклеотидная последовательность целенаправленно увеличивается таким образом, чтобы в чужеродном белке оказывалась лидерная последовательность аминокислот, либо конструируются гибридные опероны с общим промотором, включающие ген чужеродного белка и ген секретируемого белка, лидерная последовательность которого извлекает из клетки чужеродный белок. Далее два белка разделяются принятыми химическими или ферментативными методами.

В качестве продуцентов рекомбинантных белков человека чаще других в настоящее время используются: *Escherichia coli* (кишечная палочка), *Bacillus subtilis* (сенная палочка), *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи). Первые два микроорганизма — прокариоты, последний — эукариот. Эти организмы достаточно безопасны, однако попадание их (как продуцентов того или иного человеческого белка) в окружающую среду по ряду причин неже-

лательно. В связи с этим существуют принятые и тщательно соблюдаемые правила работы с рекомбинантами.

Безопасность должна соблюдаться на генетическом и на физическом уровнях. Безопасность на генетическом уровне означает, что в геном продуцента чужеродного белка (помимо чужеродных генов) вносится еще одно изменение — из него удаляются некоторые гены, например, участвующие в синтезе аминокислоты, существенной для роста микроорганизма. Иными словами, организм делается зависимым от наличия в среде этой аминокислоты. Если же клетки данного микроорганизма оказываются вне среды, то они не размножаются, т. е. опасность заражения территории предприятия культурой рекомбинанта значительно уменьшается.

Нельзя не отметить, что продуценты чужеродного белка не отличаются высокой способностью к выживанию в природных условиях. Точнее, они утрачивают способность образовывать ненужный им чужеродный белок, так как потеря этой способности ускоряет размножение клеток; медленно же размножающиеся клетки, которые продолжают синтезировать чужеродный им белок, постепенно исчезают из популяции.

Меры безопасности принимаются и на физическом уровне: на всех местах выброса газа устанавливают микробиологические фильтры. По завершении рабочего цикла без разъединения системы, что может привести к понижению давления во всех емкостях, где могут оказаться клетки рекомбинанта, так как вследствие нарушения герметизации воздух вместе с чужеродными клетками будет втягиваться в систему, оборудование стерилизуют. И последнее — на производстве должны соблюдаться все требования «Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств» (GMP).

Все перечисленное в равной мере относится к производству любых рекомбинантных белков. В качестве примера можно взять производство рекомбинантного инсулина.

На первом месте по объему производства и стоимости продукции рекомбинантного белка как лекарственного средства находится хорошо известный гормон — инсулин, контролирующий уровень глюкозы в крови. Промышленное производство рекомбинантного инсулина было впервые начато в 1982 г. В настоящее время его годовой оборот составляет около одной трети общего оборота всех рекомбинантных белков, используемых в медицине.

Инсулин состоит из двух полипептидных цепей. Цепь *A* содержит 21 аминокислотный остаток, а цепь *B* — 30 аминокислотных остатков. Между собой цепи *A* и *B* связаны двумя дисульфидными ( $-S-S-$ ) связями. Еще одна такая связь имеется между остатками цистеина, находящимися в *A*-цепи. Общая стереоструктура молекулы поддерживается этими тремя дисульфидными связями,

и любое изменение в ней ведет к исчезновению гормональной активности инсулина.

Традиционный источник инсулина — поджелудочные железы сельскохозяйственных животных — свиней и крупного рогатого скота. Но используется не вся железа, а лишь ткань так называемых «островков Лангерганса».

Российский рынок ежегодно потребляет примерно одну тонну инсулина. Подсчитано, что для получения такого количества инсулина требуется приблизительно 35 млн голов свиней. Известно также, что количество лиц, нуждающихся в систематическом введении инсулина, ежегодно возрастает на несколько процентов, поэтому проблема дефицита сырья применительно к инсулину животного происхождения существует до сих пор.

Однако не только этим обстоятельством обусловлен интерес к рекомбинантному инсулину, получаемому путем микробиологического синтеза. Инсулин, выделяемый из поджелудочной железы свиней, отличается от инсулина человека на один аминокислотный остаток. Инсулин крупного рогатого скота — на три. Это означает, что при введении их человеку он получает белок (полипептид) иной видоспецифичности. Следовательно, существует определенный процент случаев проявления аллергии. Также при парентеральном введении (особенно у детей) может наблюдаться болезненность. Одновременно приходится сталкиваться с проблемой передозирования, поскольку в случае аллергии инсулин (как антиген) частично нейтрализуется и, соответственно, вводить его необходимо больше.

Кроме того, предшественник инсулина при его биосинтезе в животной ткани, так называемый проинсулин, содержит еще одну полипептидную цепь (пептид С). Позднее эта цепь отделяется от зрелой (завершенной) формы гормона, однако при выделении инсулина из животных клеток от примеси проинсулина избавиться трудно. Как раз в пептиде С видовые различия аминокислотной последовательности гораздо более велики (по сравнению с самим инсулином), т. е. побочные эффекты инсулина животного происхождения в значительной степени обусловлены «чужим» пептидом.

Рекомбинантный инсулин, синтезируемый в микробной клетке, лишен указанных недостатков, поскольку аминокислотная последовательность двух его цепей кодируется генами человека. В принципе, он идентичен инсулину из человеческой ткани. Правда, его выделение и очистка требуют особой тщательности, так как в этом случае необходимо освобождаться от микробных липо- и гликопротеинов. Их примеси в рекомбинантном инсулине вследствие токсичности могут вызвать нежелательные побочные эффекты. Однако это уже относится к качеству отдельных серий препарата и культуре производства на данном предприятии.

В настоящее время в производстве рекомбинантного инсулина конкурируют две принципиально разные технологии. Согласно первой в клетки микроорганизма-хозяина вводят плазмиду, содержащую последовательность нуклеотидов, соответствующую проинсулину (цепи *A* *C*-пептиду, цепи *B* и далее лидерному пептиду и промоторному участку). В дальнейшем *C*-пептид отделяется. Особенность второй — раздельное получение цепи *A* и цепи *B* в двух микробных культурах, которые впоследствии объединяются.

В лабораториях одной из зарубежных фирм разработана схема получения рекомбинантного инсулина, основанная на раздельном биосинтезе двух его цепей; каждая цепь синтезируется в отдельной культуре *E. coli*. Предварительно на основе плазмид конструировались векторы (один — для гена цепи *A*, другой — для гена цепи *B*). К каждой последовательности присоединялся триплет, соответствующий метионину и нуклеотидам гена индуцибельного фермента бетагалактозидазы, включая оперон. Таким образом, между нуклеотидными последовательностями цепей *A*, *B* и бетагалактозидазой оказывался метиониновый триплет. Это обстоятельство является очень важным для завершающей стадии работы. Ферментация двух культур с вектором, несущим цепь *A*, и вектором, несущим цепь *B*, проводилась на среде с лактозой (индуктором синтеза бетагалактозидазы). Если не расщепить глюкозу, то она может быть использована организмом как источник энергии. Поскольку бетагалактозидаза и цепь *A* (или *B*) имели в векторе общий промотор, накопление бетагалактозидазы сопровождалось накоплением больших количеств связанной с ней цепи *A* (*B*). По окончании ферментации из двух культур выделялись два белка: цепь *A* плюс бетагалактозидаза и цепь *B* плюс бетагалактозидаза. Метиониновый остаток, связывающий каждую инсулиновую цепь с бетагалактозидазой, разрушался с помощью  $\text{BrCN}$ , а инсулиновые цепи при этом освобождались и выделялись.

На последнем (чисто химическом) этапе работы происходило объединение цепей *A* и *B* в молекулу инсулина (за счет двух дисульфидных связей; третья дисульфидная связь формируется между остатками цистеина в цепи *A*).

**Гормон роста (соматотропин).** В клинике испытан еще один рекомбинантный белок, полученный методом микробиологического синтеза, — гормон роста человека, который секретируется передней долей гипофиза и содержит 191 аминокислотный остаток. В организме человека этот гормон необходим для роста костей. При внутриутробном развитии он не нужен, однако его недостаточность резко проявляется в позднем детском возрасте и приводит к карликовости.

Ген гормона роста человека клонирован в *E. coli*. Биологическая активность выделенного белка была идентична образцу, полученному из гипофиза. Интенсивно ведутся работы по повыше-

нию избирательности действия гормона роста (уменьшению его связывания с рецептором пролактина).

**Эритропоэтин.** Этот гликопротеин необходим для созревания (дифференцировки) эритроцитоподобных клеток. Белок видоспецифичен, вырабатывается в почках. Эритропоэтин нужен при анемии, вызываемой почечной недостаточностью, а также при анемиях, которые могут наблюдаться при гемотрансфузии, облучении и химиотерапии опухолей, т. е. всюду, где может происходить угнетение кроветворения.

В США свыше 100 тыс. человек получают по две инъекции эритропоэтина в неделю (ампулы эритропоэтина в цитратном буфере по 2 000 — 4 000 ЕД содержат также сывороточный альбумин). Отметим и такой своеобразный факт: во время олимпийских игр и других международных соревнований спортсменов, злоупотребляющих эритропоэтином, дисквалифицируют.

Способ получения рекомбинантного эритропоэтина (необходимо подчеркнуть: гликопротеина) имеет важную особенность — ген эритропоэтина человека встраивается не в микробные, а в животные клетки (яйцеклетки китайского хомячка), где белок может быть гликозилирован. При этом продуцентом эритропоэтина является монослойная культура этих клеток.

**Пептидные факторы роста тканей.** Эти многочисленные биорегуляторы обладают как видовой, так и тканевой специфичностью. Иногда применительно к ним используется определение: гормоны, образуемые вне желез внутренней секреции. Их разработка для медицинской практики возможна лишь путем микробиологического синтеза, т. е. как рекомбинантных белков. В настоящее время подробно изучены эпидермальный фактор роста (ЭФР) и некоторые другие. Исследования в этом направлении продолжаются, но уже сейчас получены положительные результаты в экспериментах (например, ускорение заживления ран при использовании ЭФР), однако остается нерешенным вопрос о полной гарантии невозможности злокачественного перерождения тканей.

**Рекомбинантные белковые факторы врожденного иммунитета.** К числу используемых в качестве лекарственных средств видоспецифических белков относятся интерфероны — факторы врожденного иммунитета, открытые в свое время как белки, вырабатываемые клетками, зараженными вирусами. Они индуцируют локальные и системные противовирусные реакции в других клетках и, соответственно, используются как противовирусные препараты. Потенциально интерфероны представляют интерес и как противоопухолевые агенты. Их принято делить на три группы:  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  (из разных типов клеток).

До недавнего времени интерфероны из человеческих клеток были доступны лишь в малых количествах. Как медицинский пре-

парат использовался, главным образом, лейкоцитарный интерферон. Его источником служила кровь, получаемая из родильных домов. В настоящее время ген лейкоцитарного интерферона получен химическим синтезом. Затем он был включен в плазмиды, которые в свою очередь были введены в клетки кишечной палочки и дрожжей, ставшие таким образом продуцентами лейкоцитарного интерферона человека.

Ген интерферона из фибробластов человека был клонирован в клетках кишечной палочки. Также ведется работа по созданию методами генной инженерии гибридных интерферонов с большей противораковой активностью, чем у природных. Это относится к получению гибридов между интерферонами  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$ .

Вообще возможность получения и использования в медицине иммуномодифицированных рекомбинантных белков привлекает все большее внимание. Можно отметить, в частности, цикл исследований основного или главного катионного белка нейтрофилов, который обладает одновременно бактерицидной активностью и способностью нейтрализовать эндотоксин грамотрицательных бактерий вследствие повышения проницаемости внешней мембраны последних (шифр белка: BPI — bactericidal permeability increasing). Этот белок имеет молекулярную массу 55 кДа и обладает исключительно высоким сродством к липиду А (эндотоксину) внешней мембраны грамотрицательных бактерий.

Использование его как химиотерапевтического препарата, вводимого извне «в помощь» нейтрофилам своего организма, является весьма перспективным. Рационально использовать BPI человеческого происхождения во избежание аллергических реакций, но в данном случае, естественно, возникает проблема дефицита сырья. Отметим, что данный белок, являясь ингибитором воспалительных реакций, на уровне эндотоксина конкурирует с одним из белков острой фазы (образуемых печенью), который стимулирует противовоспалительные реакции. В настоящее время BPI получен генно-инженерными методами, причем его молекулярная масса значительно меньше в лекарственной форме, так как в этом случае используется лишь N-терминальная часть рекомбинантного белка с молекулярной массой 21 кДа (так называемый gBPI<sub>21</sub>).

## **1.5. Инженерная энзимология. Иммобилизованные биобъекты**

Биотехнология с момента зарождения была основана на ферментативных процессах. Однако вплоть до XX в. сведения о катализаторах белковой природы были минимальны. Лишь в наше время биотехнолог получил возможность опираться на глубокие знания структуры ферментов и механизмов ферментативных реакций.

С одной стороны, использование в биотехнологическом производстве ферментов в изолированном виде резко повысило его уровень в целом, а также предсказуемость результатов на каждой производственной стадии. Однако при этом пришлось решать проблему нестабильности многих ферментов. Дело в том, что изолированные ферменты не защищены системами клеточного гомеостаза, и большинство их в таком виде относительно быстро теряет активность, которая зависит даже от незначительных физико-химических изменений среды.

С другой стороны, при цикличности производственных процессов требуется постоянно повторяющаяся наработка высокоочищенных ферментных препаратов, что связано с большой затратой сил и средств. Проблема была решена путем создания так называемых «промышленных биокатализаторов» — иммобилизованных ферментов.

В данном случае под иммобилизацией подразумевается связывание фермента с нерастворимым носителем при сохранении функциональной, т.е. каталитической активности фермента. Получение и использование иммобилизованных ферментов в промышленности, в том числе и в фармацевтической, составляет основу инженерной энзимологии. Иммобилизация ферментов не только существенно повышает их стабильность, но позволяет длительно использовать одну партию или серию промышленного биокатализатора.

За последние десятилетия параллельно с иммобилизацией ферментов развивалось и другое направление — иммобилизация целых клеток (прежде всего микробных) для осуществления многостадийного метаболического процесса, например биосинтеза антибиотика. Такие клетки после иммобилизации могут «работать» неделями и месяцами, не теряя при этом жизнеспособности.

Понятие «иммобилизация биообъекта» означает физическое разделение биокатализатора и растворителя, при котором молекулы субстрата и продуктов реакции могут свободно проникать из жидкой среды в твердую, и наоборот. Иными словами, субстрат в токе растворителя подводится к биообъекту, связанному с нерастворимым носителем, а продукт реакции в токе растворителя удаляется от биообъекта и используется как целевой продукт.

В качестве нерастворимого носителя используются неорганические и органические вещества, последние, в свою очередь, могут быть как природными, так и синтетическими.

Биообъект иммобилизуется на носителе:

- адсорбцией;
- за счет образования с ним ковалентных связей;
- включением в формируемый этим носителем гель.

В перечень материалов, применяемых для адсорбции биообъектов, входят: оксид алюминия, карбонат кальция, бентонит,

уголь, целлюлоза, коллаген, ионообменные смолы, силикагель и т. д.

При ковалентном связывании ферментов используют агарозу, декстрин, целлюлозу, сополимеры полиакриламида, полиуретаны и т. д. В ряде случаев ковалентное связывание с носителем требует его предварительной активации, в результате которой на поверхности носителя образуются высокореакционноспособные электрофильные группы с нуклеофильными группами на белке (например, amino- и SH-).

При иммобилизации включением биообъекта в гель используют разные полисахариды, например гель альгината кальция (альгинат — гетерополисахарид из морских водорослей), полиакриламид (полиакриламидный гель) и другие полимеры. Весьма важным параметром при иммобилизации является максимальная «нагрузка» носителя, т. е. максимальное количество фермента, которое может быть иммобилизовано на определенном количестве носителя.

Каждый метод иммобилизации имеет свои преимущества и недостатки. Адсорбция — относительно «мягкий» метод связывания с нерастворимым носителем (без резкого снижения активности фермента). Однако фермент может связываться с носителем недостаточно прочно и легко десорбироваться при незначительных изменениях условий протекания каталитического процесса.

Связывание биообъекта с носителем за счет ковалентных связей, естественно, более прочно. Использование в производстве иммобилизованных биообъектов разных «типов» зависит от конкретных целей, стоящих перед биотехнологом. Например, если необходим катализ какой-нибудь одной ферментативной реакции, то, как правило, используется фермент либо изолированный, либо находящийся в интактной клетке, либо в клетке с повышенной проницаемостью оболочки; если же необходим полный биосинтез целевого продукта, то используется комплекс ферментов в интактной клетке включенных в многоэтапный биохимический процесс; и, наконец, если необходим биосинтез целевого продукта с его последующей трансформацией, то используются «системы, открытые для усложнения» (клетка + фермент и т. п.).

В качестве биообъектов для иммобилизации могут быть использованы ферменты без кофермента (например, гидролазы и изомеразы) с прочно связанной с апоферментом простетической группой. Однако ферменты с диссоциирующими, расходуемыми в эквимольном отношении к субстрату коферментами мало пригодны для иммобилизации (требуется регенерация последних при непрерывно протекающей реакции). Трудности, связанные с применением таких ферментов в промышленности, снимаются, если используется фермент не изолированный, а содержащийся в жиз-

неспособной клетке (в этом случае обеспечены одновременно и доставка, и регенерация кофермента).

Если же целевой продукт является внутриклеточным, то для его извлечения из клеток приходится разрушать всю систему, поэтому возникает вопрос о целесообразности использования иммобилизации биообъекта. Однако в этом случае методами генетической инженерии может быть сконструирована и введена в продуцент система транспорта целевого продукта из клетки в среду.

Активность изолированного (и иммобилизованного) фермента, несмотря на все усилия по подбору оптимальных условий для его функционирования, остается ниже его активности в целой клетке. Поэтому для катализа конкретной реакции целесообразно применять фермент, сохраняющийся в клетке. Но это возможно лишь при условии, что и субстрат, и целевой продукт не будут подвергаться воздействию других ферментов клетки. Иногда этого воздействия можно избежать, регулируя температуру, величину рН и некоторые другие условия, в которых протекает нужная биотехнологу ферментативная реакция.

Вместе с тем эффективность работы фермента внутри клетки может быть лимитирована ее оболочкой, ограничивающей доступ субстрата к ферменту. Проницаемость оболочки клетки можно увеличить за счет кратковременной обработки ее органическими растворителями, например, 5 % раствором диметилсульфоксида. При этом важно избежать неблагоприятного воздействия на внутриклеточный фермент, катализирующий нужную реакцию. В результате клетка должна быть «пермеабилитированной» (от англ. *permeability* — проницаемость), т.е. иметь повышенную проницаемость оболочки, но сохранять при этом жизнеспособность.

Включение в гель живых клеток, осуществляющих многостадийные ферментативные процессы, требует «мягких» условий иммобилизации и применения относительно малотоксичных носителей. Во-первых, должна быть обеспечена диффузия как молекул субстратов и частиц носителя в клетку, так и целевого продукта из клетки. Во-вторых, иммобилизованные клетки дышат, следовательно, для них должна быть сохранена возможность газообмена. В то же время носитель должен быть достаточно прочным. Существуют разные методы включения клеток биообъекта в гель; например, суспензия клеток смешивается с раствором альгината натрия, после чего в полученную смесь вносится раствор хлорида кальция (в избытке). В результате образуется гель альгината кальция с включенными в ячейки геля клетками. Процесс затвердевания заканчивается в течение примерно 20 мин.

В настоящее время активно разрабатываются подходы к созданию «систем, открытых для усложнения». В этом случае в одном биореакторе иммобилизуются синтезирующий определенное вещество продуцент и фермент, трансформирующий это вещество.

В качестве примера можно привести одновременную иммобилизацию микроорганизма *Penicillium chrysogenum* продуцента бензилпенициллина и выделенного из *Escherichia coli* фермента пенициллинацилазы. В результате из синтезированного пенициллина образуется продукт его ферментативного гидролиза 6-аминопенициллановая кислота (ключевое соединение для синтеза новых пенициллинов). Система может быть вновь «усложнена» включением в нее еще одного иммобилизованного фермента, катализирующего присоединение к 6-аминопенициллановой кислоте нового радикала взамен отщепленного. В итоге при использовании такой совокупности промышленных биокатализаторов можно получать практически совершенно новые полусинтетические пенициллины (рис. 4).

Для работы с промышленными биокатализаторами используют биореакторы разных конструкций. Простейший биореактор колоночного типа (рис. 5, а) пригоден для использования, когда иммобилизованным биообъектом является только фермент, т.е. в реакторе происходит одностадийное превращение субстрата. Колонка заполняется сферическими частицами нерастворимого носителя со связанным ферментом. При малом диаметре частиц увеличивается площадь поверхности, улучшается диффузия субстрата и продукта реакции. Однако при этом возрастает перепад давления по высоте колонки. Поэтому в каждом конкретном случае подбираются оптимальные размеры частиц носителя с учетом таких параметров, как площадь поверхности, перепад давления и равномерность заполнения колонки. Если биообъектом являются

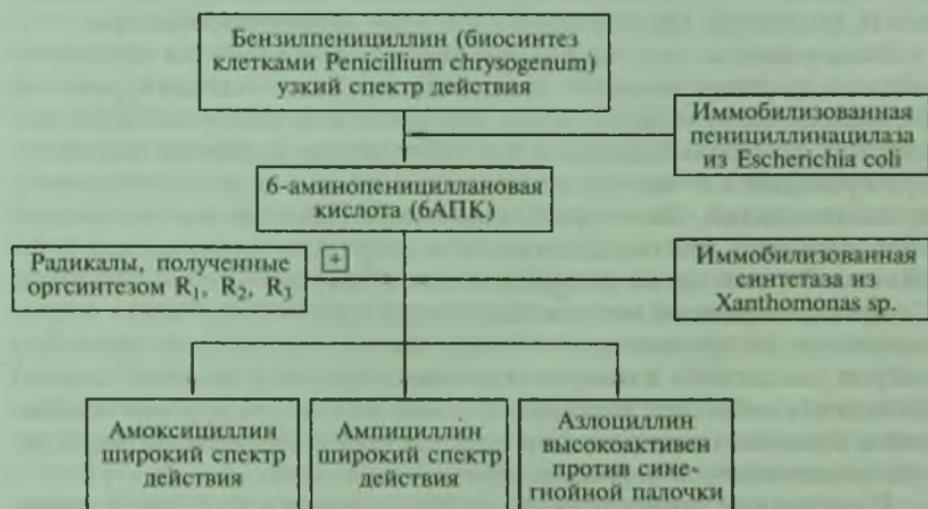


Рис. 4. Использование «системы, открытой для усложнения» в получении полусинтетических пенициллинов

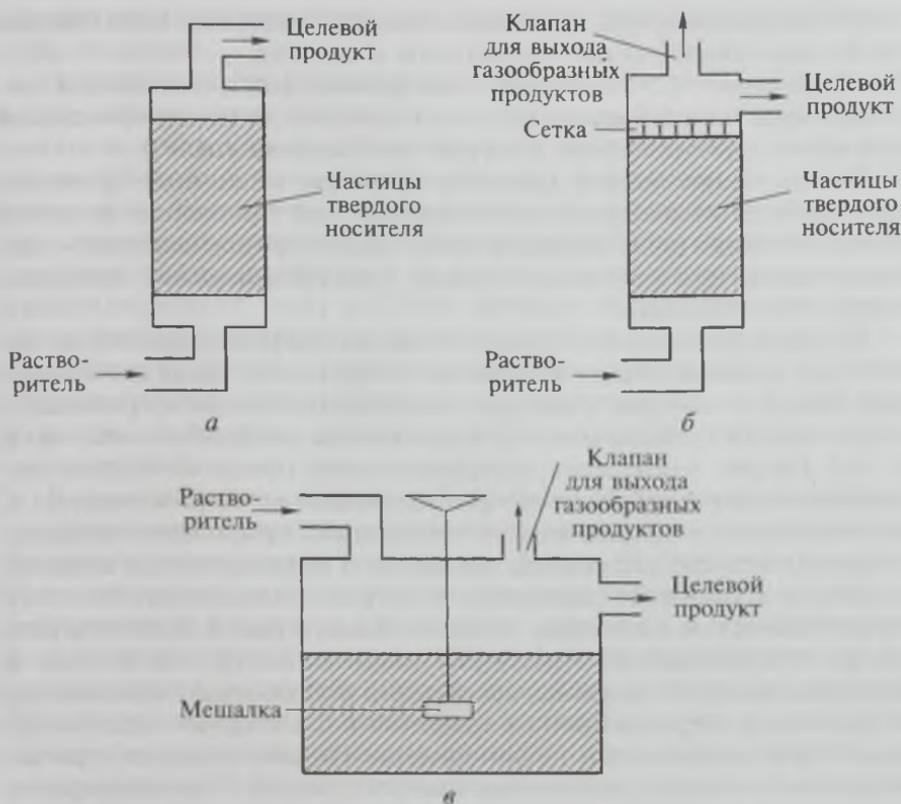


Рис. 5. Реакторы, используемые при иммобилизации биообъектов: *a* — колоночного типа; *б* — то же, модифицированный, *в* — с мешалкой

иммобилизованные живые клетки с активным дыханием, то особое внимание обращается на диффузию газов. Применение простейшего реактора колоночного типа здесь нецелесообразно, поэтому используется его модификация. В верхней части такого реактора расположен патрубок для выхода газа (преимущественно  $\text{CO}_2$ ), а ниже — прочно закрепленная сетка с таким размером ячеек, при котором перемешивание и вспучивание частиц носителя сводится к минимуму (рис. 5, *б*). Третий тип — биореактор с мешалкой (рис. 5, *в*). Однако в этом случае необходимо помнить о возможности разрушения частиц носителя лопастями мешалки.

При иммобилизации целых клеток, осуществляющих многостадийный синтез целевого продукта, на этот процесс влияют:

- биосинтез целевого вещества, происходящий на фоне роста и размножения клеток продуцента;

• питательная среда, на разных стадиях биосинтеза меняющаяся по физико-химическим показателям и составу;

• отдельные «ферментации» или ферментационные циклы, варьирующие по количеству целевого продукта, а также примесей в культуральной жидкости, которые необходимо удалять.

В заключение можно привести примеры успешного применения методов инженерной энзимологии при производстве одной из важнейших групп лекарств микробного происхождения — бета-лактамовых антибиотиков, а также — на производстве, выпускающем аминокислоты.

Процесс получения полусинтетических цефалоспоринов включает как «классические» биосинтез и оргсинтез, так и две ключевые стадии, в которых участвуют иммобилизованные ферменты — гидролаза из *Pseudomonas* sp. и синтетаза из *Xanthomonas* sp. и *E. coli*. На рис. 6 показано последовательное применение ряда иммобилизованных ферментов при получении из цефалоспорина С (малоценного в практическом отношении природного цефалоспорина) полусинтетических оральных и инъекционных цефалоспоринов с разными спектрами действия, обладающих высокой эффективностью в клинике. В нижней части рис. 6 показаны различия в субстратной специфичности синтетаз из *E. coli* и *Xanthomonas* sp. Первую целесообразно использовать для синтеза цефалотина, цефалоридина и цефазолина, а вторую — для получения цефалоглицина и цефоперазона. Иными словами, при замещении разными радикалами аминогруппы в 7-аминоцефалоспоровой кислоте (7АЦК) каталитическая активность сравни-

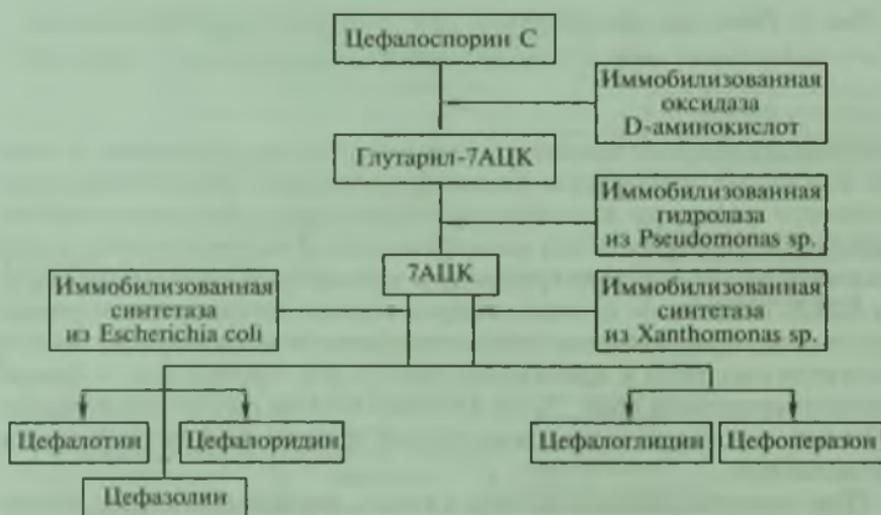
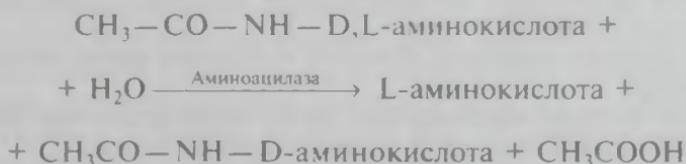


Рис. 6. Получение полусинтетических цефалоспоринов с помощью иммобилизованных ферментов

ваемых синтез газ варьирует неодинаково в зависимости от структуры радикала.

Несмотря на принципиальное сходство ключевых стадий при получении разными фирмами полусинтетических пенициллинов, носители для промышленных биокатализаторов могут быть разными. Обычно для иммобилизации как ферментов, так и клеток используют уже готовые коммерческие препараты активированных носителей («матриц»). В России разработан препарат пенициллинацилазы, состоящий из клеток *E. coli*, включенных в полиакриламидный гель; в США (фирма «Squibe») используется его аналог — пенициллинацилаза из почвенной споровой бактерии *Bac. megaterium*, сорбированная на бентоните; в Швеции (фирма «Astra») используется пенициллинацилаза из *E. coli*, ковалентно связанная с активированным носителем полисахаридной природы.

В производстве аминокислот широко применяют иммобилизованные аминоацилазы в качестве реагентов для трансформации биологически активных веществ (например, N-ациламинокислот). Известно, что аминокислоты, получаемые химическим синтезом, представляют смесь L- и D-изомеров (рацемат), а организм человека способен утилизировать только L-изомеры; D-изомеры накапливаются в организме и могут оказывать вредное воздействие. Для разделения L- и D-изомеров в аминокислотном рацемате существуют разные химические способы, но наиболее простым и точным является ферментативное деление с помощью аминоацилазы. Этот фермент, обладая уникальной способностью гидролизовать ацильные производные всех природных аминокислот (за исключением пролина), проявляет свойство L-стереоспецифичности, т. е. гидролизует связь CO—NH только в ацильных производных L-изомеров. На примере N-ацетильного производного аминокислоты рассмотрим реакцию:



Используя разные растворимости, разделяют L-аминокислоту и N-ацетил-D-аминокислоту: при этом оказываются в растворе одна, а в осадке другая составляющая смеси. С помощью микробной аминоацилазы получают, например, L-фенилаланин (аминокислота, которая входит в состав препарата L-дофа, используемого для лечения болезни Паркинсона). L-изомеры аминокислот применяют при производстве панангина и квадевита, а D-изомеры — при получении некоторых полусинтетических химиотерапевтических средств. В частности, D-фенилглицин ис-

пользуют при изготовлении полусинтетического антибиотика ампициллина.

Экономические преимущества использования иммобилизованных биообъектов в условиях производства несомненны. Применение иммобилизованных систем позволяют сделать условия биосинтеза более стандартными, а все производство более компактным. Полученный биообъект работает длительно. При этом на единицу продукции расходуется меньше сырья. В случае производства фармацевтических препаратов целевое вещество не будет содержать компонентов культуральной жидкости (мицелия, продуктов частичного лизиса клеток, компонентов комплексной питательной среды и т. д.), что значительно облегчает задачу выделения и очистки целевого продукта, гарантирует отсутствие в получаемом препарате отсутствие белковых и других вредных примесей.

Значительны также и экологические преимущества: сокращаются количество отходов, а также число «нестандартных» операций, например, когда из-за нестерильности среды большие объемы культуральной жидкости сливаются в канализацию.

### **Контрольные вопросы**

1. Какова роль биообъекта в биотехнологическом производстве? Что может быть использовано в качестве биообъектов в биотехнологии?
2. Какие свойства биообъекта можно использовать для его совершенствования в целях создания эффективного и безопасного производства лекарственных средств?
3. Что означает репарация биообъекта для биотехнологического производства лекарственных препаратов?
4. Как реализуются мутагенез и селекция в получении более продуктивных биообъектов?
5. Какие виды мутаций существуют?
6. В чем заключается принципиальное отличие методов клеточной инженерии от генной?
7. Что является ключевым моментом в создании новых рекомбинантных структур?
8. Какие факторы обуславливают выбор микроорганизма-производителя при промышленном получении рекомбинантных белков?
9. Какие виды иммобилизации биообъектов наиболее перспективны?
10. Биореакторы каких типов используются для работы с промышленными биокатализаторами?

# ГЕНОМИКА И ПРОТЕОМИКА

### 2.1. Общая характеристика

Успехи генетики, молекулярной биологии и биохимии привели к формированию в 1990-х гг. двух новых фундаментальных дисциплин — геномики и протеомики. Бурное развитие этих дисциплин обеспечивает в наше время прогресс в ряде разделов биотехнологии, в том числе фармацевтической.

Термин «геномика» производный от генома — совокупности всех генов организма; — «протеомика» — производный от протеома — совокупности структурных и каталитических белков в клетке эукариота или прокариота. Обе дисциплины можно считать как бы терминологическим оформлением современного этапа развития генетики и белковой химии, приближающим их к целостной клетке. И по времени возникновения, и в методологическом аспекте главенствующее значение здесь занимает геномика; протеомика базируется на геномике, являясь этапом познания живого уже на белковом уровне.

Генетика начала XIX в. получила позднее название формальной, поскольку исследования велись на уровне «ген-признак» (открытие знаменитых основополагающих законов Г. Менделем). Существование гена было постулировано, но материальная его природа оставалась неизвестной. Лишь в 1950-е гг. после появления и быстрого подтверждения справедливости концепции о двойной спирали ДНК и о гене как участке ДНК, началось бурное развитие молекулярной генетики: были установлены размеры отдельных генов, функциональные участки в гене и т.д. Параллельно биохимиками с участием генетиков был установлен матричный механизм белкового синтеза с передачей генетического кода от ДНК к белку.

Задача геномики — установление полной генетической характеристики всей клетки — количества содержащихся в ней генов и их последовательности, количества нуклеотидов в каждом гене и их последовательности, определение функций каждого гена по отношению к метаболизму организма или, более обще, применительно к его жизнедеятельности. Геномика позволяет выразить сущность организма — его потенциальные возможности, видовые (и даже индивидуальные) отличия от других организмов, предви-

деть реакцию на внешние воздействия, зная последовательность нуклеотидов в каждом из генов и число генов.

Цель геномики — получение информации о всех потенциальных свойствах клетки, которые не реализуются на данный момент, например, «молчащие гены», протеомика же дает возможность охарактеризовать клетку в данный момент, зафиксировав все находящиеся в ней белки в своего рода «моментальной фотографии» функционального состояния клетки на уровне ее протеома, т.е. совокупности всех ферментных и структурных белков, которые «работают» в отличие от неэкспрессирующихся генов. При этом, если геномика появилась прежде всего в результате развития техники секвенирования, то для протеомики такую же основополагающую роль играет техника двухмерного электрофореза — разделения белков в одном направлении по молекулярной массе, а в другом — по изоэлектрической точке. Сам по себе этот метод не нов, однако он в значительной мере усовершенствован, что позволяет следить в динамике за сотнями белков одновременно. Образно говоря, это как бы «киносъёмка» клетки на молекулярном (белковом) уровне. Кадры своеобразной киноленты последовательно фиксируют нарастание и падение количества индивидуальных белков клетки во времени, например, при ее переходе из одной фазы клеточного цикла в другую и при реакции клетки на изменения внешней среды, отражают посттрансляционные превращения белков и т.п.

Протеомика позволяет также следить за белковыми взаимодействиями. Это относится, например, к передаче сигналов от поверхности клетки к факторам избирательной транскрипции в ядре. С ее помощью может быть преобразована, таким образом, не только технология скрининга иммуносупрессоров, но и ингибиторов сигнальной трансдукции в целом. Методы протеомики позволяют получить более полную, всестороннюю картину взаимодействия с клеткой новых потенциальных антимикробных агентов. Работы по изучению динамики биосинтеза ферментов вторичного метаболизма у микроорганизмов при использовании протеомики могут быть переведены на новый, более высокий уровень.

Возвращаясь к связи протеомики с геномикой, следует подчеркнуть, что протеомика может быть названа продолжением именно функциональной геномики. В отличие от геномики предметом изучения протеомики являются продукты, кодируемые генами, экспрессирующимися в данный момент.

Минимальные геномы микроорганизмов некоторых видов состоят из нескольких сотен генов. Геном человека приближается к ста тысячам генов. Размеры отдельных генов варьируют примерно от одной тысячи пар нуклеотидов и выше. Таким образом, количество пар нуклеотидов, составляющих индивидуальный геном,

измеряется как минимум сотнями тысяч, обычно же многими миллионами пар нуклеотидов.

Следовательно, для полного знания генома организма надо определить последовательность (sequence) нескольких миллионов пар нуклеотидов (А-Т — аденин-тимидин, Г-Ц — гуанидин-цитозин). Провести «секвенирование», согласно вошедшему в употребление выражению, целого генома можно только при наличии высоких технологий и соответствующего оборудования.

В настоящее время в качестве ежесуточного итога работы многих десятков лабораторий в разных странах мира секвенируется приблизительно один миллион пар нуклеотидов. Хранить же полученные данные и пользоваться ими невозможно без обращения к специальным базам данных, некоторые из которых имеют статус международных. Широкую известность имеют базы данных института геномных исследований (США) и Гейдельбергского университета (Германия). Международные базы данных позволяют получать сведения о гене и его распространенности среди патогенов; о кодируемом этим геном продукте и об участии этого продукта (как правило, фермента) в том или ином метаболическом цикле; о катализировании им конкретной реакции в цикле. Иными словами, исходным тест-объектом для отбора антимикробных веществ, избирательных ингибиторов метаболизма становится уже не микробная культура, а ген (точнее, кодируемый им продукт).

Необходимо иметь в виду, что различие по последовательности нуклеотидов геномов разнообразных организмов не обязательно указывает на межвидовые различия; например, у микроорганизмов, используемых в качестве продуцентов в биотехнологической промышленности, зафиксированы различия в геномах у отдельных штаммов одного и того же вида. Внутривидовые различия в геномах могут обнаруживаться по всей лестнице живых существ, включая человека (в последнем случае индивидуальные различия, выявляемые при анализе ДНК, составляют, в частности, новый эффективный прием судебной экспертизы).

Как все недавно возникшие научные дисциплины, геномика дифференцируется по нескольким направлениям (специализируются, соответственно, и базы данных). Прежде всего, здесь должна быть упомянута структурная геномика, задачей которой является идентификация генов с помощью специальных компьютерных программ (ведется поиск открытых рамок считывания со старти и терминирующими кодонами). В результате изучаемый геном характеризуется по молекулярной массе, количеству генов и нуклеотидной последовательности в каждом гене; у прокариот — в геноме хромосомы, у эукариот — в каждой из хромосом.

Сравнительная геномика позволяет: относительно быстро, связавшись с базой данных и, получив ответ на свой запрос, установить, является ли изученный по последовательности нуклеотидов

ген уникальным, или он уже был идентифицирован в другой лаборатории, получить сведения о степени гомологии родственных генов, т.е. степени гомологии по последовательности нуклеотидов в открытой рамке считывания; ответить на вопрос об эволюционной близости одного организма другому и на ряд подобных вопросов, относящихся к фундаментальной биологии. В сравнительной геномике заложены возможности ответа и на вопросы практического характера. Например, если ведется поиск ингибиторов данного гена у патогенного микроорганизма с целью создания на их основе лекарственных средств, то важно знать, есть ли ген с такой или близкой последовательностью нуклеотидов в организме хозяина. Это позволяет сделать прогноз о степени безопасности создаваемых лекарств.

После структурной и сравнительной геномики следует назвать как сформировавшуюся научную дисциплину функциональную или метаболическую геномику. Ее цель — установление связи между геномом и метаболизмом, кластерами генов и многоступенчатыми метаболическими процессами, отдельными генами и конкретными метаболическими реакциями. Применительно к функциональной геномике относится понятие так называемых «модельных» организмов: прежде всего, это некоторые микроорганизмы, у которых прослежены связи между генами и кодируемыми этими генами ферментными и структурными белками, т.е. прокариоты и низшие эукариоты с полностью секвенированным геномом и досконально изученным метаболизмом. Примерами таких модельных микроорганизмов могут служить *Escherichia coli* (у прокариот) и *Saccharomyces cerevisiae* (у эукариот). Сопоставление гена у изучаемого организма с близким по степени гомологии геном у модельного организма позволяет предположить функции гена. Отсутствие гомологии указывает на необходимость специального изучения функций нового гена.

Особое значение применительно к фармации функциональная геномика имеет при установлении так называемой «существенности» отдельных генов. Под «существенностью» подразумевается необходимость гена для жизнедеятельности клетки. Так, при создании антимикробных лекарственных препаратов именно «существенные» гены должны быть мишенями для антимикробных веществ. Отметим, что иногда ген приобретает значение «существенности» только в особых условиях, в которых может оказаться патогенный микроорганизм.

Исходя из размеров генома и количества генов понятно, что задача полного секвенирования генома решается быстрее в случае микроорганизмов в отличие от высших эукариот. К настоящему времени полностью секвенирован геном нескольких десятков видов бактерий, в том числе патогенных. У разных видов бактерий размер генома варьирует, но в целом он близок к нескольким

тысячам генов или нескольким миллионам пар оснований соответственно. Например, у *E. coli* четыре с небольшим тысячи генов и, соответственно, более четырех миллионов пар оснований.

В клинике в настоящее время используется порядка двухсот природных и синтетических антибактериальных веществ. Каждое из них имеет свою мишень. Как правило, это или фермент, или рибосомный белок. Всего реализованных мишеней также около двухсот. Следовательно, подавляющее количество генов в качестве мишеней для антибактериальных агентов все еще не используется. Для доказательства «существенности» генов применяется метод избирательного «выбивания» гена из генома с проверкой выживания организма после такой процедуры, который представляет большой интерес как технология скрининга антибактериальных (или шире — антимикробных) агентов.

Традиционно первичный отбор последних проводится путем испытания их действия на рост тест-культуры микроорганизма. Высокоактивные, подавляющие рост (природные или синтетические) вещества, отобранные на этом этапе, проходят дальнейшие испытания, в частности определяется антимикробный спектр их действия и активность в опытах *in vivo* на лабораторных животных, а также токсичность как для макроорганизма в целом, так и для его отдельных органов и тканей.

По завершении доклинических испытаний в случае получения положительных результатов ставится вопрос о передаче препарата в клинику. Затем, как правило, начинается углубленное изучение механизма действия антимикробного агента на субклеточном и молекулярном уровнях, т. е. ведется поиск его внутриклеточной мишени — макромолекулы или макромолекулярного комплекса — таргета (англ. *target* — мишень) по недавно принятой терминологии. Далее выявляется ген, кодирующий образование этой макромолекулы, или гены, которые кодируют образование макромолекул, входящих в макромолекулярный комплекс.

По новой технологии скрининга (в отличие от вышеуказанной) используют информацию о полностью секвенированном геноме патогена и наличии в нем «существенных» генов. В лабораториях, работающих в области создания новых антимикробных лекарств, предварительно выбирается ген, который будет использован для их испытания как таргет (точнее, в качестве мишени будет использован продукт этого гена).

Таргетный скрининг позволяет в соответствии с выбором гена отбирать биологически активные вещества с запланированным механизмом действия (в отличие от традиционного метода, когда поиск ведется «от клетки к гену»). Первый этап таргетного скрининга начинается с выделения этого гена (соответствующего фрагмента ДНК) из генома. Далее, используя полимеразную цепную реакцию (ПЦР), фрагмент ДНК амплифицируется (создается ви-

русный вектор, который вводится в плазмиду). Количество копий гена умножается. Затем конструируются:

- бесклеточная система, где наработанная матрица служит для получения информационной РНК, специфичной для гена;
- бесклеточная рибосомная система, где эта информационная РНК служит для наработки белкового продукта, кодируемого данным геном.

Бесклеточная система, используемая для первичного отбора и оценки активности потенциальных лекарственных веществ — ингибиторов фермента (продукта изучаемого гена), содержит как фермент, так и его субстрат. Когда наработан белок (продукт избранного для изучения гена), тогда возникает вопрос: как узнать функцию этого белка? Например, какую реакцию он катализирует как фермент, чтобы по подавлению этой реакции отобрать ингибиторы. При близком сходстве этого белка с белком из «модельного» организма подобрать бесклеточную систему (субстрат для нового белка) нетрудно. Если сходство есть, но не очень близкое, то прибегают к анализу «мотивов» — коротких участков аминокислотной последовательности, которые распределены по всей длине белковой цепи и могут оказаться сходными у двух белков.

Когда такого сходства нет или сходство обнаружено, но нет ясности в функции самого гомолога, т.е. белка, взятого для сравнения, прибегают еще к одному способу: устанавливают, с какими белками он контранскрибируется (переписывается в последовательность матричной информационной РНК). Если транскрипт — часть полицистронной (эквивалентной гену) информационной РНК, необходимой для протекания в последующем определенного метаболического процесса с участием нескольких ферментов, тогда поиск функции изучаемого белка, включенного в группу этих ферментов, сужается.

В целом подходы к установлению функций продуктов изучаемых генов многочисленны, и их разнообразие неуклонно растет. Таким образом, можно, в конечном счете, проводить серийные испытания потенциальных ингибиторов функций почти любого из тысяч генов, составляющих геном патогена и обнаруживать все возможные «уязвимые точки» микробной клетки. Подобный путь достижения цели породил в литературе термин «обратная генетика», означающий ведение исследования не от клетки и ее фенотипа к гену, а, наоборот, от гена к клетке и к ее фенотипу.

Полное секвенирование генома в сочетании с применением методов генетической инженерии вносит свой вклад в фармацию еще в одном отношении. У патогенных микроорганизмов открыты гены, «существенные» для протекания инфекционного процесса, но «несущественные» при росте *in vitro* — на искусственных питательных средах. В последнем случае они ускользают от внимания исследователя, не поддаются идентификации и не могут быть ис-

пользованы как таргеты при поиске лекарств. Скрытые или по образному выражению «молчащие» *in vitro* гены патогенных микроорганизмов получили название *ivi* генов (генов вирулентности), несмотря на то, что в их число входят не только гены, кодирующие образование токсинов, адгезинов и других факторов вирулентности. К ним относят также гены ферментов и транспортных белков, позволяющих патогенной микробной клетке жить и размножаться в тканях макроорганизма в условиях дефицита некоторых органических веществ и неорганических ионов.

Можно привести такой пример: микробная клетка, находясь *in vivo*, испытывает недостаток ионов железа, чего не бывает на обычных питательных средах. В этом случае в клетке синтезируется специальная система транспорта железа в клетку из среды с малой концентрацией последнего, фактически транспорт идет против градиента концентрации. Для образования такой системы необходима экспрессия определенных генов. Из молчащих, «несущественных» они становятся «существенными», т.е. подавление их функций отобранными ингибиторами приведет к подавлению роста (размножения) патогена именно в условиях *in vivo*, т.е. в инфицированном организме. Это, собственно, и есть цель исследователей, создающих новые лекарственные препараты.

К числу генов, которые становятся «существенными» для патогена именно *in vivo*, относятся гены, кодирующие оптимальный компонентный состав системы, а также недостаток в пуринах и их предшественниках.

Вышеизложенное, конечно, не означает, что во время инфекции в клетке патогена экспрессируются только *ivi* гены. Большинство генов экспрессируется и *in vivo* и *in vitro*. Их продукты необходимы клетке всегда. Такие гены получили образное название «house keeping gens» — дословно «гены, на которых держится дом». Они экспрессируются в любых условиях, поскольку без них клетка просто не может существовать.

Соотношение между house keeping и *ivi* генами у разных патогенных бактерий варьирует, но в среднем более 90 % генов принадлежит к первой группе. Поскольку ингибиторы house keeping gens обнаруживаются при поиске на питательных средах *in vitro*, практически все применяемые в клинике антибиотики и синтетические антибактериальные препараты являются ингибиторами функций именно этих генов.

Значительный интерес представляют пути выявления и выделения *ivi* генов с последующим их использованием в бесклеточных системах отбора ингибиторов. В качестве примера можно привести метод IVET (In Vivo Expression Technology).

Геном патогенной бактерии (в данном случае речь идет о штамме *Salmonella typhi murium*) с помощью большого набора рестриктаз делится на сотни фрагментов. Каждый отдельный фрагмент ген-

но-инженерными методами соединяется с лишенным промотора (участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза) геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы. Такой лишенный промотора ген не может реплицироваться при его введении в клетку. Однако он мог бы реплицироваться, если соединенный с ним ген (в данном случае фрагмент ДНК салмонеллы) имел бы промотор для своей репликации. Тогда этот промотор вызвал бы репликацию не только своего гена, но и следующего за ним, лишенного промотора. Таким образом, репликация гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы могла бы происходить в клетке только за счет использования или «захвата» чужого промотора.

На следующем этапе работы к этому сдвоенному фрагменту, (обозначенному  $x$ -cat, где  $x$  — фрагмент генома салмонеллы, а cat — ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы) присоединяется также лишенный промотора лактозный оперон ( $lac Z$ ), который нужен для системы окисления лактозы. Далее этот фрагмент, состоящий из трех разнородных частей ( $x$ -cat- $lac Z$ ) включается в плазмиду. Фактически в данном случае речь идет не об одном фрагменте, а о нескольких, так как часть  $x$ , происходящая из генома салмонеллы, зависит от использованной рестриктазы и поэтому содержит разные участки генома. Фрагменты  $x$ -cat- $lac Z$  различаются именно по  $x$ . В результате получился набор разных плазмид, а после введения их в клетку *E. coli* — набор разных штаммов *E. coli* с разными частями генома салмонеллы.

Следующий этап работы заключается во внедрении каждого штамма *E. coli* в организм лабораторного животного (мыши) и введении животному хлорамфеникола. Спустя сутки из ткани животного высевают бактериальную культуру, причем на твердую индикаторную среду с лактозой. Выросшие колонии визуальным образом анализируют. Они оказываются или красного цвета (меняющие рН и окисляющие лактозу) или белого (бесцветные), причем красные доминируют, их более 90 %. Однако отбираются и подвергаются дальнейшему изучению именно белые. Ход рассуждений в данном случае: если из животного, которому ввели хлорамфеникол высеялась жизнеспособная клетка, давшая колонию на твердой среде, значит, в этой клетке экспрессировался ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы и, соответственно, образовывался фермент, инактивирующий (ацетилирующий) антибиотик. Следовательно, в данном фрагменте  $x$  есть ген с промотором. Этот ген экспрессировался в организме животного, а вслед за ним экспрессировался и ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (лишенный собственного промотора). Но экспрессироваться мог ген, принадлежащий как к *ivi*, так и к *house keeping* генам.

В случае колоний красного цвета экспрессируется ген, кодирующий образование фермента, расщепляющего лактозу; при этом меняется цвет индикатора, колония окрашивается и можно сде-

лать вывод, что в данном фрагменте *x* содержится (вместе с промотором) ген, принадлежащий к *house keeping gens*, т.е. он экспрессируется всегда: и в организме животного, и на искусственной питательной среде. Такой ген в данном случае не представляет интереса. Его можно обнаружить более традиционным путем (для подбора в последующем ингибиторов кодируемого им продукта).

Если колония на индикаторной среде с лактозой выросла бесцветной, значит, на искусственной питательной среде данный промотор не работал, и ген во фрагменте *x* не экспрессировался. Вероятно, что он нужен только при развитии инфекционного процесса и принадлежит к генам вирулентности, т.е. *ivi*-генам, которые не экспрессируются *in vitro*. Метод IVET — не единственный для идентификации *ivi* генов у патогенных микроорганизмов; существуют, например, методы с использованием направленного мутагенеза.

Интерес к *ivi* генам обусловлен тем, что они (их продукты) практически не использованы как таргеты, а в случае *ivi* генов можно рассчитывать на высокую избирательность действия (безопасность) создаваемых лекарственных средств. Вместе с тем геномика позволяет дифференцировать гены патогенных микроорганизмов по многим показателям, и это, в свою очередь, позволяет вести скрининг антимикробных агентов все более целенаправленно.

В качестве примера можно привести результаты, полученные при изучении представителей рода *Chlamydia* (внутриклеточных паразитов с относительно небольшим геномом — порядка миллиона пар нуклеотидов), которые вызывают инфекции бронхолегочного и мочеполового трактов. Прежде всего, гены этого прокариота были разделены на *house keeping* и *ivi* гены. Далее была выявлена группа генов, влияющих на апоптоз (запрограммированную гибель части популяции клеток многоклеточного организма — общебиологическое явление, отвечающее за поддержание необходимого и достаточного количества клеток) клетки-хозяина. Наконец, были идентифицированы гены, дублирующие систему жизнеобеспечения паразита. При этом было показано, что ряд этих генов близок по степени гомологии генам высших растений и приблизительно 27 % из них уникальны для рода *Chlamydia*.

## 2.2. Геном человека

### 2.2.1. Проект «Геном человека»

Полное секвенирование генома человека (несколько миллиардов пар нуклеотидов и идентификация генов всех сорока восьми хромосом) — задача качественно более трудная, чем секвенирование генома прокариот и низших эукариот. В начале 1990-х гг. был обнаружен Международный проект «Геном человека», целью

которого было решение указанной выше кардинальной проблемы с привлечением сил и средств ряда стран, в том числе и России. В 2003 г. этот проект был успешно завершен. Ученые описали все 25 000 генов, присутствующих в хромосомах каждой клетки. За это время были созданы базы ДНК из образцов генов десятков тысяч людей.

В самой общей форме коснемся некоторых предварительных заключений. Если раньше утверждалось, что геном человека содержит порядка ста тысяч генов, то сейчас указывается на значительно меньшее их число. Также в ДНК генома человека обнаружены многочисленные некодирующие последовательности. Вначале к ним прилагалось условное определение «мусор», под которым подразумевались «отходы — излишки, накапливающиеся по мере эволюции генома». Однако в настоящее время обнаружено, что некодирующие последовательности в геноме человека не случайны. Любопытные факты установлены в последние годы при сопоставлении генома человека и человекообразных обезьян. Ожидалось, что эти различия по сравнению с парадигмой дарвинизма о том, что «человек произошел от обезьяны», окажутся довольно значительными и что наш общий предок весьма отдален от нас, а дивергенция произошла очень давно.

Однако это сходство оказалось весьма близким, увеличивая количество загадок. К их числу относится постоянное присутствие в геноме человека последовательностей вирусного происхождения (своего рода «насыщенность» генома современного человека молекулами вирусных ДНК).

Также было обнаружено отличие между геномами представителей разных наций. Это очень деликатный вопрос, учитывая еще совсем недавние трагические страницы истории человечества. Тем не менее закрывать глаза на объективные факты из-за несовершенства человеческого общества было бы неразумно, тем более что познание собственного генома дает человечеству в новом тысячелетии предпосылки для своего совершенствования, над которыми не довлеют ни религиозные догмы, ни разрушительная революционная демагогия.

### 2.2.2. Генотерапия

Сравнивая гены, ученые смогут выявить связи разных генетических вариаций и мутаций со всевозможными заболеваниями.

Прогресс в познании человека привел к возникновению такого важного практического приложения геномики к медицине, как генотерапия. С ее помощью можно лечить многие наследственные заболевания, которые дифференцируются на моно- и полигенные.

Моногенные заболевания на молекулярном уровне сводятся к дефекту какого-либо одного белка в клетке — фермента транспортного или структурного белка. Во-первых, белка может не хватать, а, во-вторых, его функции могут быть нарушены. Так, мутация, в результате которой изменяется активность того или иного фермента, может приводить или к накоплению токсичного субстрата, или к дефициту соединения, необходимого для нормального функционирования клетки; мутация в гене, кодирующем структурный белок, — к серьезным нарушениям клеток, тканей или органов.

Кроме того, мутация в гене, экспрессирующемся в одной ткани, может сказаться самым серьезным образом на другой ткани и привести к появлению множества симптомов. Например, мутация в гене печеночного фермента фенилаланиндегидроксилазы, в результате которой блокируется превращение фенилаланина в тирозин, приводит к повышению уровня эндогенного фенилаланина в крови, неправильному формированию миелиновой оболочки вокруг аксонов нервных клеток ЦНС и, как следствие, — к тяжелой умственной отсталости.

Полигенность заболевания означает, что несколько белков в клетке обладают теми или иными дефектами. В каждой ткани организма экспрессируется свой набор из всей совокупности генов, но есть мутации, которые приводят к болезням, затрагивающим буквально все органы и ткани: мышцы, глаза, печень, кости, сердце и т.д. Отметим, что такие болезни, как рак и гипертония считаются полигенными. Некоторые ненаследственные и инфекционные болезни, в частности вирусной этиологии, также причисляются к полигенным.

Вполне естественно, что проведение генотерапии при моногенных заболеваниях показывает лучшие результаты. При этом ген, с которым ведется работа, должен быть не только картирован, но и идентифицирован (должна быть известна его функция). К настоящему времени картировано около одной тысячи генов, включенных в процесс возникновения и развития моногенных наследственных заболеваний, из которых идентифицировано всего несколько сотен.

При генотерапии требуются предварительное создание рекомбинантной генетической конструкции с нормальной «здоровой» копией дефектного гена, а также создание для этой конструкции вектора, переносящего ее в клетки организма. Для нормального функционирования гена необходимы специфические для каждого гена цис- и трансрегуляторные последовательности. Первые (цис) локализованы в той же хромосоме и могут быть непосредственно сцеплены с геном или находиться на некотором расстоянии от регулируемого ими гена, выступая в качестве промотора; вторые (транс) располагаются в других хромосомах.

Методы введения генов в клетки-мишени при генотерапии весьма разнообразны, но в большинстве случаев недостаточно эффективны. Это связано с встраиванием чужеродной ДНК в геном только небольшого процента клеток ткани, а также с разрушением ее нуклеазами и т.д. Обнадеживающие результаты получены при использовании генов, «упакованных» в липосомы.

В настоящее время наиболее перспективным путем переноса генов при генотерапии является включение их в векторы, построенные на основе ретро- или аденовирусов. Конечно, здесь прежде всего возникает вопрос о безопасности подобных векторов. Вирусы генетически модифицируются так, чтобы при сохранении способности проникать в клетку они теряли бы способность к автономной репликации.

Для направленной доставки сконструированной последовательности учитывается различный тропизм разных вирусов к определенным видам тканей. Так, представители аденовирусов высокотропны в отношении клеток эпителия дыхательных путей, вирус герпеса высокотропен в отношении нейронов ЦНС и т.д. В перспективе планируется проводить генотерапию с помощью целых рекомбинантных хромосом, что позволяет оперировать рядом генов и их регуляторных последовательностей одновременно.

Современная генотерапия направлена только на соматические, а не на половые (зародышевые) клетки.

Генотерапия *ex vivo* (вне организма) означает, что нормальная копия гена вводится в соматические клетки, предварительно извлеченные из организма пациента. Исправленные клетки наращиваются и вводятся пациенту трансфузией или трансплантацией. При этом рекомендуется использовать клетки именно от этого больного и их «исправленное» потомство возвращать ему же, что снимает проблему отторжения клеток за счет врожденного иммунитета. Тем не менее использование только аутологических клеток сужает возможность генотерапии, поэтому разработаны разные методы защиты от иммунного ответа и неаутологических клеток, которые включают, в частности, применение иммуносупрессоров.

При генотерапии *in vivo* доставка нормального гена осуществляется непосредственно в ткани человека (в клетки определенных тканей). При этом промотор гена должен быть трансспецифичен.

Перечень наследственных болезней, связанных с недостаточностью того или иного фермента, возрастает по мере раскрытия их биохимического механизма. Соответственно и подходы к реализации теоретических возможностей генотерапии привлекают все большее внимание и конкретизируются. В качестве примера можно привести использование генотерапии в лечении муковисцидоза. Ген муковисцидоза — муковисцидозный трансмембранный регулятор (МТР) кодирует мембранный белок — муковисцидозный

трансмембранный регулятор проводимости (МТРП). Основная функция МТРП — создание регулируемого циклическим 3,5-аденозинмонофосфатом (цАМФ) хлорного канала. Мутации в гене ведут к изменению количества или структуры данного белка, что нарушает транспорт ионов хлора и воды через мембраны клеток эпителия ряда органов. Выделяемая при этом экзокриновыми железами слизь обезвоживается, и вязкость ее повышается. Это приводит к воспалению и размножению инфекционных агентов (вторичная патология). При муковисцидозе наиболее сильно поражаются легкие (бронхи).

Предпосылками для применения генотерапии при муковисцидозе послужили положительные результаты, полученные на клеточных культурах. Введения только одной копии нормального гена в клетку с дефектным геномом было уже достаточно для нормализации ионного транспорта. Еще более обнадеживало, что достаточно было «исправить» 10 % общего числа клеток в монослое, чтобы добиться нормализации транспорта хлора во всем монослое (вероятно, за счет обмена ионами между соседними клетками). Оказалось, что особенно строгая регуляция функций нормального чужеродного гена, кодирующего белок МТРП, не нужна: этот белок (при его избыточном синтезе) не токсичен.

После подробных доклинических исследований генотерапия муковисцидоза была апробирована в клинике. Нормальный ген в составе модифицированных аденовирусов доставлялся в клетки эпителия легких с помощью липосом. Однако результаты генотерапии в клинике оказались не столь блестящими: из нескольких сотен случаев только отдельные опыты оказались удачными. Тем не менее сам по себе переход от экспериментов в области генотерапии муковисцидоза к клинике является большим успехом. Повидимому, на практике генотерапия муковисцидоза будет в перспективе сочетаться с антибиотико- и ферментотерапией, которые в настоящее время хотя и продлевают жизнь больного, но не ведут к полному излечению.

Генотерапия постепенно начинает привлекать все большее внимание научно-популярных изданий и СМИ. Несколько десятков технологий генотерапии разных заболеваний прошли апробацию на тысячах больных и добровольцах в США, Англии, Франции и других странах. В ряде клиник испытания прошли благополучно. Первая фаза клинических испытаний, как известно, направлена на проверку безопасности нового средства (метода) лечения. Имеются сообщения о нескольких случаях возникновения лейкоминоподобных заболеваний после клинической апробации некоторых технологий генотерапии. Отмечается, что во всех таких случаях использовались векторы на основе ретровирусов. Сообщается также об отдельных случаях, когда введенный ген экспрессировался не столь длительно, как было запланировано.

Однако несмотря на то, что первые испытания в клинике прошли менее успешно, чем ожидалось на основе данных доклинических испытаний, а применение некоторых видов технологий генотерапии в их сегодняшнем виде временно остановлено, в целом эти испытания продолжаются и технологии совершенствуются. Тем более что при безнадежном состоянии больного врач с согласия или по требованию последнего может проводить испытания технологий даже при определенных сомнениях, возникших в ходе их доклинической апробации.

### **2.2.3. Антисмысловые олигонуклеотиды**

Известно, что некоторые заболевания (как наследственные, так и ненаследственные) могут быть связаны не с дефицитом конкретного белка или его дефектом, а наоборот, с гиперпродукцией нормального функционально активного белка. Отсюда следует задача частичного или полного подавления продукции такого белка с разной вариабельностью. Иначе говоря, необходимо избирательно подавлять экспрессию гена, кодирующего этот белок, или гена фермента, участвующего в посттрансляционной модификации данного белка и превращении его в активную форму.

В соответствии с этим была выдвинута концепция создания инновационных лекарственных средств, получивших общее название антисмысловые олигонуклеотиды. Предполагается получать комплементарную для ДНК каждого гена (его участка) последовательность нуклеотидов, которая за счет водородных связей будет реагировать с ДНК гена или с информационной РНК, матрицей для которой служит указанная ДНК.

В первом случае подавление образования избыточного белка при связывании с геном будет происходить на стадии транскрипции, а во втором (при связывании с информационной РНК) — на стадии трансляции. Специфичность антисмысловой последовательности нуклеотидов (избирательность воздействия на выбранный ген) достигается при длине цепочки 15 — 20 нуклеотидов (отсюда название «олигонуклеотиды»).

Для реализации идеи использования антисмысловых олигонуклеотидов как лекарственных средств должен быть преодолен ряд трудностей: необходимо решить проблему направленной доставки их к клеткам — мишеням в организме человека, должна быть обеспечена защита антисмысловых олигонуклеотидов от расщепляющих их нуклеаз. Предлагаются: модификация таких нуклеотидов в соответствующих лекарственных препаратах, мешающая воздействию на них нуклеаз, но не препятствующая реагированию с ДНК- или РНК-мишенью; «упаковка» этих нуклеотидов в липосомы и т. д.

## 2.2.4. Конформационные болезни

Обобщающее название «конформационные болезни» появилось в научной печати в самое последнее время. Оно может охватывать множество еще не описанных, принципиально новых по своей природе заболеваний. Непосредственной причиной его появления в литературе стали наблюдения над необычными инфекционными заболеваниями как у животных, так и у людей. Возбудитель передается от животных человеку. Болезнь приводит к неминуемому смертельному исходу. Гистопатологическая картина демонстрирует губкообразное состояние серого и/или белого вещества головного мозга («трансмиссивная губкообразная энцефалопатия»). Ввиду отсутствия лекарственных препаратов, а также мер борьбы с болезнью, названной «коровье бешенство», правительства разных стран ограничиваются запрещением вывоза мясных продуктов из определенного региона и уничтожением зараженных животных. Случаи заболевания человека относительно редки, но частота появления их сильно варьирует в разных странах и местностях.

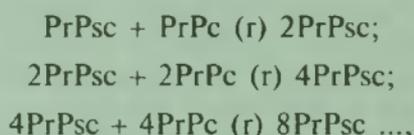
Особый интерес вызывает не только степень опасности болезни, но и принципиальная новизна относящихся к ней молекулярно-биологических данных. Исследования последнего времени показали, что открыт новый «мир» неизвестных ранее инфекций, которые назвали «конформационные болезни». Причем рядом авторов подчеркивается: все, что известно о конформационных болезнях к настоящему времени, может быть лишь «надводной частью айсберга».

Вначале это заболевание отнесли к вирусным инфекциям, однако вскоре выяснилось, что причиной болезни «скрепи» (scrapie) у овец, которые были завезены из Германии в Исландию для развития каракулеводства, является инфекционный агент, не содержащий нуклеиновых кислот, что полностью ломало привычные представления биологов и медиков. Сходное заболевание под названием «куру», при котором инфекционный агент также не содержит нуклеиновых кислот, было обнаружено у живущих в труднодоступных местностях Новой Гвинеи племен аборигенов, не потерявших обычаев каннибализма.

К настоящему времени известны четыре разновидности болезни со столь необычным инфекционным агентом у людей (в частности, болезнь Крейтцфельда—Якоба, куру) и несколько разновидностей у диких, сельскохозяйственных и домашних животных. Обнаружена корреляция между распространением болезни у людей и употреблением в пищу мяса сельскохозяйственных животных, молодняк которых откармливался с использованием мясокостной муки и других субпродуктов убоя овец, в частности овечьих голов. Шадящая технология обработки субпродуктов (для

повышения их питательной ценности) усиливает опасность возникновения эпидемии.

Инфекционный агент был выделен и оказался низкомолекулярным белком (27 — 30 кДа). Он получил название «инфекционный прионный белок». В качестве инфекционной единицы предложено название «прион». Это слово образовано из анаграммы английских слов Proteinaceous infectious (particle), т. е. подчеркивается, что этот белок обладает самоинфицирующей способностью. Размножение приона происходит за счет не синтеза «de novo», а изменения конформации предшественника нормального белка. Обнаруживается такой нормальный белок, в основном в нервной ткани, где экспрессия его гена в 50 раз выше, чем в других тканях. Этот белок регулирует циркадные — суточные ритмы активности и участвует в передаче нервных импульсов. Изменение прионом конформации нормального белка ведет к тому, что сам измененный белок превращается в прион. В результате содержание в клетке нормального белка падает, а содержание приона, соответственно, увеличивается, что приводит к ее гибели. Схематично данный процесс выглядит следующим образом:



где PrPsc — прион (sc — scrapie), PrPc — нормальный белок клетки (c — cell).

Некоторыми авторами высказывается предположение, что гибель нейронов при губкообразной энцефалопатии происходит путем апоптоза.

Попытки профилактики и лечения губкообразных энцефалопатий самыми разнообразными соединениями делались неоднократно. Для этого использовались стероиды, арахисовое масло, амфотерицин В, декстран-сульфат, некоторые из антрациклинов и т. д. Однако эти попытки ни к чему серьезному не привели, кроме некоторого замедления развития клинических симптомов заболевания за счет удлинения инкубационного периода, что не свидетельствует об избирательном действии на прион. Отметим: PrPc и PrPsc — изоформы одного белка; антитела на прионы не образуются, что существенно затрудняет лабораторную диагностику, иммунопрофилактику и иммунотерапию прионных болезней.

Согласно официальному мнению экспертов ВОЗ создание высокоэффективных избирательных средств лечения прионных болезней должно исходить из использования данных о трехмерной структуре прионов. Подвергающийся изменению нормальный белок (PrPc) содержит четыре  $\alpha$ -спиральных домена, соединенных дисульфидными мостиками. В молекуле же приона (PrPsc), явля-

ющейся инфекционной изоформой, только два домена остаются  $\alpha$ -спиральными, а два других становятся  $\beta$ -спиральными. Возможно, что это происходит в результате точечных мутаций в гене, кодирующем белок PrP<sup>c</sup>. Например, было установлено, что некоторые конститутивные белки могут изменяться по форме и превращаться в смертельно опасные прионы.

В борьбе с прионными болезнями предлагается использовать антисмысловые олигонуклеотиды для подавления экспрессии соответствующих генов. Другой потенциально возможный путь — создание своего рода молекулярного «клея», который, проникая через гематоэнцефалический барьер, связывал бы гидрофобную «сердцевину» PrP<sup>c</sup>, т.е. стабилизировал бы  $\alpha$ -спирали и предотвращал переход PrP<sup>c</sup> в PrP<sup>sc</sup>. Как альтернативный вариант предполагается создание «клея», который взаимодействовал бы с прионом (PrP<sup>sc</sup>), «окутывая» его, и предотвращал взаимодействие с PrP<sup>c</sup>. Эти предложения пока еще достаточно абстрактны, но демонстрируют современные подходы к лечению недавно открытых и необычных заболеваний.

### Контрольные вопросы

1. В чем отличие таргетного скрининга от традиционного при поиске и отборе новых лекарственных средств?
2. В чем отличие метода исследования в геномике от метода исследования в протеомике?
3. Как можно сопоставить геномику и протеомику в части поиска и создания новых лекарственных средств?
4. Как классифицируется геномика согласно поставленным в этой области задачам?
5. Что означает термин «обратная генетика»?
6. Каково в настоящее время практическое значение достижений в области геномики для фармации?
7. Что означает понятие «существенности» гена?
8. В чем отличие генотерапии *ex vivo* от *in vivo*?
9. Что такое антисмысловые олигонуклеотиды?
10. В чем необычность конформационных болезней?

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ РЕГУЛЯЦИИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

### 3.1. Индукция и репрессия синтеза ферментов

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

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

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

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

Схематически механизм индукции может быть представлен, исходя из предложенной в 1960-х гг. Ф. Жакобом и Ж. Моно концепции регуляции индукции и репрессии синтеза ферментов (рис. 7). Одновременно авторами концепции была разработана и «модель оперона», в соответствии с которой в систему регуляции синтеза ферментов на генетическом уровне входит несколько компонен-

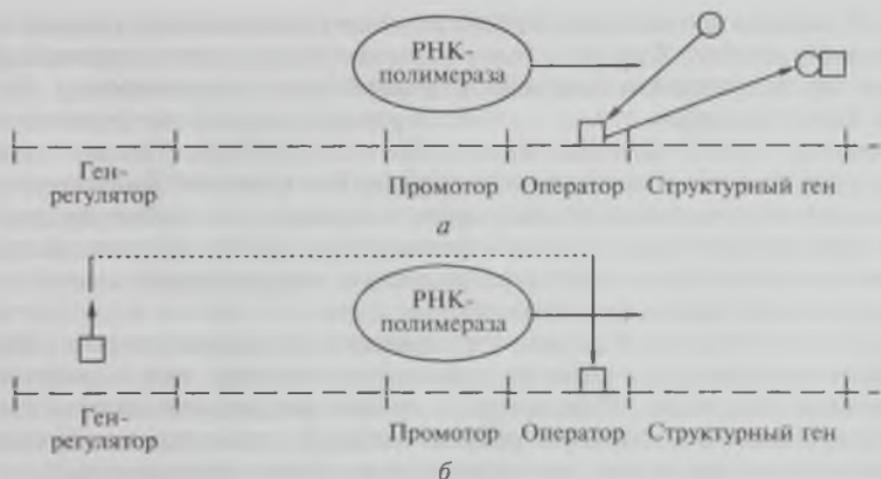


Рис. 7. Схема индукции (а) и репрессии (б) фермента:

□ — репрессор; ○ — индуктор; □○ — индуктор связывает (уводит) белок-репрессор

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

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

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

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

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

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

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

### **3.2. Ретроингибирование и преодоление этого явления**

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

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

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

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

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

Весьма иллюстративен пример неудачи при биосинтезе пенициллина (продуцент *Penicillium chrysogenum*) на комплексной, богатой лизином среде, используемой в качестве добавки к некоторым дешевым и недефицитным комплексным средам. Лизин является первичным метаболитом, пенициллин — вторичным. Одним из предшественников лизина является аминокислота, входящая в состав так называемого LLD-трипептида, из

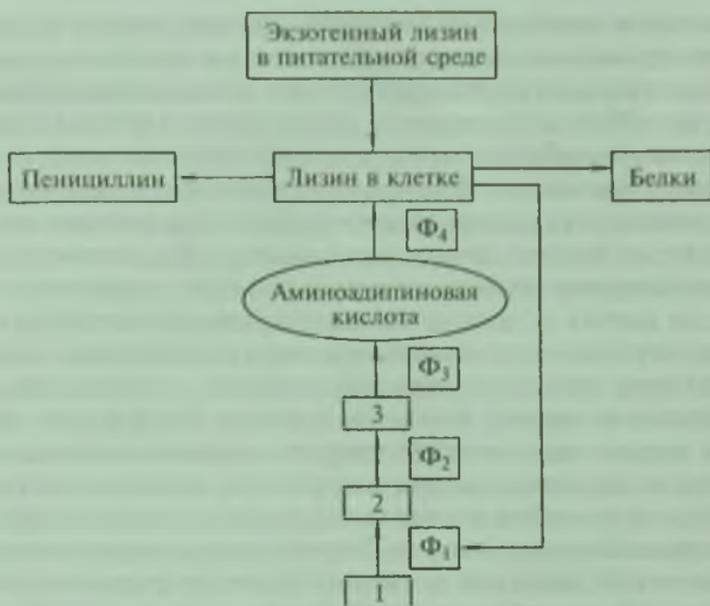


Рис. 8. Схема подавления лизином образования пенициллина:

$\Phi_1$  — начальный фермент метаболической цепочки;  $\Phi_2$ ,  $\Phi_3$ ,  $\Phi_4$  — ферменты, включенные в метаболическую цепочку; 1, 2, 3 — предшественники аминокадипиновой кислоты

которого в результате ряда последующих реакций формируется молекула пенициллина. Поэтому лизин, подавляя собственный биосинтез по механизму ретроингибирования, одновременно подавляет и биосинтез аминокадипиновой кислоты, а следовательно, и пенициллина (рис. 8). Таким образом, для биотехнологов, работающих в антибиотической промышленности, возникает актуальная задача по подбору сред с ограниченным количеством лизина или создания производственных штаммов *Penicillium chrysogenum* с нарушенным механизмом ретроингибирования по лизину.

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

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

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

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

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

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

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

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

ют с акцепторным местом, однако синтез полипептидной цепи не происходит, и синтез белка прерывается.

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

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

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

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

При конструировании микробных продуцентов чужеродного белка также необходимо учитывать роль гуанозин-тетрафосфата. Целевой белок должен быть стабилен и не подвергаться в клетке действию протеолитических ферментов, активность которых должна быть ограничена. Если же целевым продуктом является циклопептид и тем более если часть его аминокислотных остатков

находится в D-форме, как, например, у широко известного иммунодепрессанта циклоспорина А, опасность внутриклеточного протеолитического расщепления резко падает и в этом случае большое значение будет иметь «позитивный» эффект гуанозин-тетрафосфата — активация оперонов некоторых аминокислот.

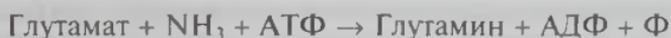
Естественно, чтобы использовать механизмы внутриклеточной регуляции для производственных целей, необходимо знать их действие на генетическом, биохимическом и физиологическом уровнях. Необходимо также знание видовых особенностей продуцента и особенностей его штамма. Но даже при наличии последних прогнозировать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

### 3.4. Регуляция усвоения азотсодержащих соединений

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

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

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



где Ф — фосфор неорганический.

На примере глутаминсинтетазы — важнейшего начального фермента азотного метаболизма, катализирующего переход аммиака в амидную группу (первая реакция), можно показать всю сложность регуляторных взаимодействий в сильно разветвленном метаболическом пути. Амидная группа глутамина является источни-

ком азота при биосинтезе шести соединений: двух ароматических аминокислот — триптофана и гистидина, а также АМФ, ЦТФ, глюкозамина-6-фосфата и карбамилфосфата. В опытах на клетках микроорганизма *E. coli* показано, что любой из конечных метаболитов, находясь в насыщающей концентрации (имеются в виду потребности микроорганизма), может действовать по принципу ретроингибирования. Однако вызываемое при этом ингибирование неполно. Вместе с тем при росте числа метаболитов (в насыщающей концентрации) проявляется аддитивность, т.е. ингибирование фермента усиливается почти до полного исчезновения его активности, что получило название кумулятивного ретроингибирования. Также установлено, что все метаболиты-ингибиторы глутаминсинтетазы связываются с ферментом в своем определенном месте. Таким образом, при связывании они не мешают один другому, что имеет принципиальное значение для регуляции активности глутаминсинтетазы.

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

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

Наряду с перечисленными механизмами регуляции активности глутаминсинтетазы существует также еще один механизм внутриклеточной регуляции, позволяющий некоторым микроорганизмам бороться с недостатком азота в питательной среде за счет усиления экспрессии гена глутаминсинтетазы.

Ферменты, участвующие в усвоении азотсодержащих соединений, в большинстве случаев индуцибельны и подвержены закономерностям азотной репрессии, которая проявляется после превращения этих соединений в глутамин. При синтезе глицина и аланина  $\alpha$ -аминогруппа глутамин реализуется с участием трансаминаз. При этом степень обеспеченности клетки азотом определяется соотношением глутамин с  $\alpha$ -кетоглутаратом. Также на раз-

ных клетках эукариот было показано, что дефицит источников углерода и энергии в питательной среде ведет к заметной протеолитической деградации ферментов, включенных в использование азотсодержащих соединений.

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

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

### **3.5. Катаболитная репрессия в создании и производстве лекарственных средств**

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

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

Другое понятие, которым оперируют применительно к катаболитной репрессии, — исключение индуктора. Глюкоза предотвращает поступление индуктора (менее эффективно используемого субстрата) в клетку. Еще одно понятие — катаболитное ин-

гибирование, которое относится к подавлению активности ряда ферментов продуктами быстрого катаболизма глюкозы.

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

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

### **3.6. Транспорт веществ через мембранные структуры клетки и его регуляция**

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

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

мембрану пересекают белки-порины. Их тримеры формируют через нее сквозные водные каналы.

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

Животные клетки имеют только цитоплазматическую мембрану. Так как цитоплазматическая мембрана присуща всем клеткам, то из этого следует, что системы регуляции транспорта из среды в клетку необходимых клетке веществ и системы выброса ненужных веществ из клетки в среду обязательно связаны с цитоплазматической мембраной. Клеточная стенка не играет существенной роли ни в транспорте низкомолекулярных метаболитов, ни в регуляции этого процесса. Однако внешняя мембрана грамотрицательных бактерий и, особенно, периплазматическое пространство содержат ряд ферментов, участвующих в процессах транспорта низкомолекулярных соединений.

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

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

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

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

Источником энергии для активного транспорта очень часто является трансмембранный электрохимический потенциал ионов

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

АТФ-зависимые системы активного транспорта используют энергию АТФ. В такие системы входят расположенные в периплазматическом пространстве белки с высоким сродством к ряду метаболитов, принадлежащим к пептидам, аминокислотам, сахарам и др. Они препятствуют выходу в среду ряда метаболитов из цитоплазмы. С их помощью в периплазматическом пространстве накапливаются определенные питательные соединения из среды.

Говоря об активном транспорте веществ в клетку, нельзя не упомянуть о системах транслокации (переноса) групп. Их функционирование приводит к транспорту в клетку, например, углеводов в виде фосфатных эфиров, а внутриклеточная концентрация оказывается гораздо выше, чем в среде.

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

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

Когда синтезируется такого рода белок, которому предстоит пересечь цитоплазматическую мембрану и выйти из клетки в среду, то, во-первых, его синтез происходит на рибосомах, связанных с обращенной в цитоплазму поверхностью цитоплазматиче-

ской мембраны, во-вторых, покидающая рибосому полипептидная цепь на своем N-терминальном конце содержит сигнальный или лидерный пептид (15—30 аминокислотных остатков). Этот дополнительный участок в полипептидной цепи временно нужен для выведения внеклеточного белка из клетки и имеет свои особенности:

- конечный аминокислотный остаток, положительно заряженный (облегчается взаимодействие с поверхностью мембраны, имеющей отрицательный заряд);
- протяженный участок гидрофобных аминокислотных остатков, облегчающий прохождение через липидные слои мембраны;
- наличие специфического участка для действия так называемой сигнальной протеазы (или пептидазы) — мембранного фермента, катализирующего отщепление лидерного пептида от основной полипептидной цепи после выполнения функции своеобразного проводника новой белковой молекулы из клетки в среду.

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

Разумеется, проблема выведения чужеродных белков не решается однозначно и только за счет присоединения лидерной последовательности, так как существует много других факторов, влияющих на экскрецию белков.

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

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

Например, ряд представителей микроорганизмов рода *Pseudomonas* и целенаправленно полученных от природных культур мутантов обезвреживают самые разнообразные химические соединения (кольчатые углеводороды и др.), попадание которых в окружающую среду приводит к нарушению экологии в обширных географических регионах. Причем способность вышеуказанных микроорганизмов обезвреживать загрязнения обусловлена не только набо-

ром ферментов, утилизирующих экзотические вещества, но и особенностями транспортных систем, начиная с режима осцилляции пориновых каналов внешней мембраны.

### **3.7. Молекулярные механизмы защиты продуцентов от веществ с «суицидным эффектом»**

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

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

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

Другие причины, наблюдаемые на примере некоторых групп антибиотиков — ингибиторов белкового синтеза, носят более ча-

ственный характер. Исследования с антибиотиками — аминокликозидами на примере наиболее подробно изученного неомидина (продукт *Actinomyces fridae*) показали, что в процессе или после сборки молекулы антибиотика он подвергается временной обратимой инактивации.

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

Существует и специфический механизм защиты клетки продуцента от неомидина, который может быть обратимо инактивирован за счет фосфорилирования одной из многочисленных в аминокликозидной структуре амино- или гидроксильных групп. Источником переносимого на антибиотик фосфатного остатка является АТФ. Обратимость инактивации обусловлена существованием в клетке продуцента локализованной в клеточной мембране щелочной фосфатазы. Этот фермент на последнем этапе выброса антибиотика в среду осуществляет его реактивацию, т.е. дефосфорилирование, после которого антибиотик уже в активном состоянии направляется в среду в силу односторонней проницаемости мембраны.

Причем иногда реактивирующий фермент не справляется со своими функциями, и в среду антибиотик выделяется в неактивном виде. Если его сконцентрировать и обработать щелочной фосфатазой, можно получить дополнительное количество антибиотика из, казалось бы, неактивной культуральной жидкости.

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

Однако помимо выполнения защитной функции фосфотрансфераза может воздействовать и на фрагменты собираемой аминокликозидной молекулы, активируя их, т.е. выполнять двойную функцию (при биосинтезе — как фактор защиты от суицидного агента). Кроме фосфорилирования-дефосфорилирования существуют и другие механизмы инактивации-реактивации аминокликозидов, например ацетилирование-деацетилирование.

Защита от собственных антибиотиков у актиномицетов — продуцентов макролидных структур (прежде всего эритромицина) обусловлена наличием в клетке специфической метилазы, метилирующей определенный адениновый остаток в 23 S рибосомальной РНК. В результате 50 S субъединица рибосомы продуцента эритромицина имеет конфигурацию, при которой реагирование антибиотика с пептидилтрансферазным центром рибосомы, как это происходит в случае эубактерий, невозможно. Иными словами, белковый синтез у продуцента специфически защищен от собственного антибиотика и помимо неспецифической защиты на физиологическом уровне.

Механизмы защиты клетки у продуцентов тетрациклинов изучены мало. Проводить аналогию с изученными механизмами тетрациклинорезистентности у патогенных бактерий довольно трудно.

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

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

### Контрольные вопросы

1. Каково влияние механизма ретроингибирования на выход конечных продуктов биосинтеза лекарственных средств?

2. Как влияет изменение содержания источников углерода, азота и фосфора в питательной среде на биосинтез антибиотиков?
3. Каковы механизмы регуляции экспрессии генов и их использование в биотехнологических процессах?
4. Какова роль системы регуляции метаболизма, обусловленной гуанозин-тетрафосфатом в биосинтезе целевых продуктов?
5. Какую роль играет катаболитная репрессия в биосинтезе лекарственных средств?
6. Что представляют собой мутанты с измененной регуляцией азотного метаболизма и каковы возможности интенсификации биосинтеза ряда первичных, вторичных метаболитов и некоторых ферментов?
7. Что такое системы внутриклеточного транспорта и секреции биотехнологических продуктов у микроорганизмов?
8. Каковы механизмы защиты клетки, если она является «суперпродукцентом»?
9. Как можно сохранить активность промышленных штаммов микроорганизмов?
10. Как переносится вещество через мембраны клетки?

## ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

### 4.1. Общая характеристика

Процесс биотехнологического производства фармацевтических препаратов состоит из определенного количества составляющих (рис. 9) и имеет разную степень сложности. Его сложность обусловлена слагаемыми конкретного биотехнологического процесса, которые варьируют в зависимости от продуцента — биообъекта (микроорганизма, растения, млекопитающего и др.), и зависит от целевого конечного продукта. Если целевым продуктом является биомасса (например, живые клетки молочнокислых бактерий), то технологическая линия короче; если это субстрат для производства высокоочищенных инъекционных препаратов, то схема производства сложнее (технологическая линия длиннее). Если

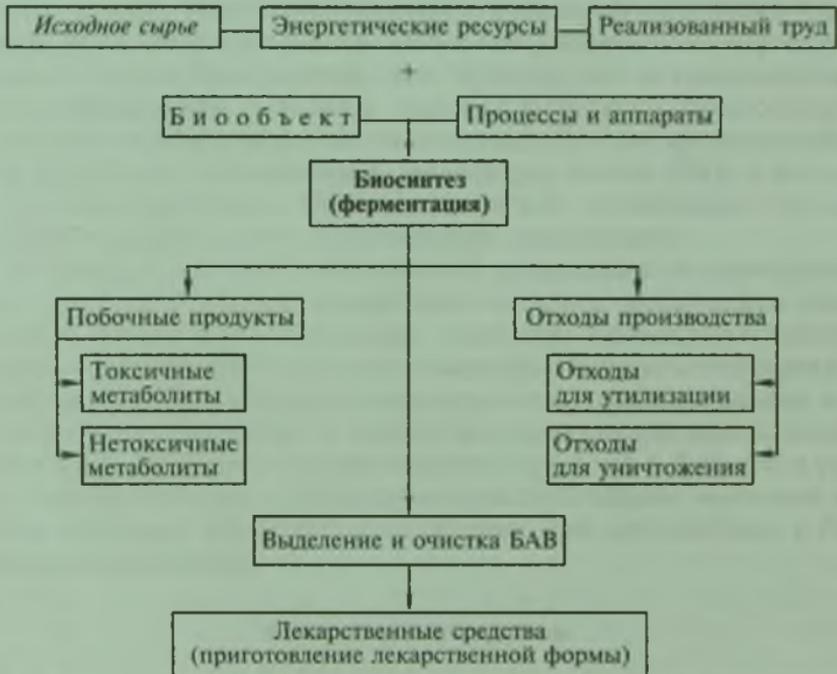


Рис. 9. Общая схема биотехнологического производства

же источником целевого продукта является микроорганизм (например, при производстве антибиотиков), то для его культивирования обязательны асептические условия, соответствующее оборудование и специальная подготовка к проведению процесса.

Свои особенности имеет биотехнологическое производство, основанное на использовании микроорганизмов-рекомбинантов, которое требует усиленного контроля за стабильностью продуцента, и, кроме того, тщательного и постоянного соблюдения мер, предотвращающих возможность попадания этого биообъекта в окружающую среду. Такие меры предусматривают использование специального оборудования и соблюдения определенных правил, относящихся непосредственно к технологическому режиму.

В современном биотехнологическом производстве наиболее частым биообъектом — продуцентом целевого продукта является штамм микроорганизма, выращиваемый в специальных ферментационных аппаратах (ферментерах или ферментаторах) разных типов (рис. 10). Ферментер снабжен приспособлениями (так называемой «обвязкой»), позволяющими создавать оптимальные условия для роста биообъекта и биосинтеза целевого продукта (не всегда эти условия совпадают).

Ферментационные аппараты, используемые фармацевтической промышленностью, в основном изготавливаются из коррозионно-стойкой стали. Их объем варьирует от десяти до ста кубических метров. Обычно ферментер, установленный в цехе ферментации, выглядит как вертикально расположенный цилиндр с полукруглым дном, в котором имеется приспособление для слива культуральной жидкости. В верхней части ферментера имеется полукруглая крышка с рядом входных устройств (вводов): для питательной среды, посевного материала, пропускаемого через специальное устройство воздуха (аэрация) и выходного устройства для вывода воздуха, прошедшего через толщу питательной среды. В центре ферментера по его вертикальной оси находится мешалка (одноярусная, многоярусная), обеспечивающая массообмен. Во внутреннем пространстве ферментера находятся «отбойники», предотвращающие возникновение «застойных» (мертвых) зон при работе мешалки. Этим обеспечивается равномерность концентрации растворимых веществ и коллоидных частиц в среде.

Постоянство оптимальной для процесса температуры в ферментере обычно поддерживается его наружной «рубашкой», через которую пропускается вода с заданной температурой.

Важнейшим условием успешного осуществления ферментации является соблюдение стерильности процесса. В реальных условиях добиться стерильности непросто. Этому мешают большой объем ферментера и сложность состава среды, а также большой объем пропускаемого через него воздуха и сложность конструкции ферментера. Попадание в культуральную среду и размножение в ней

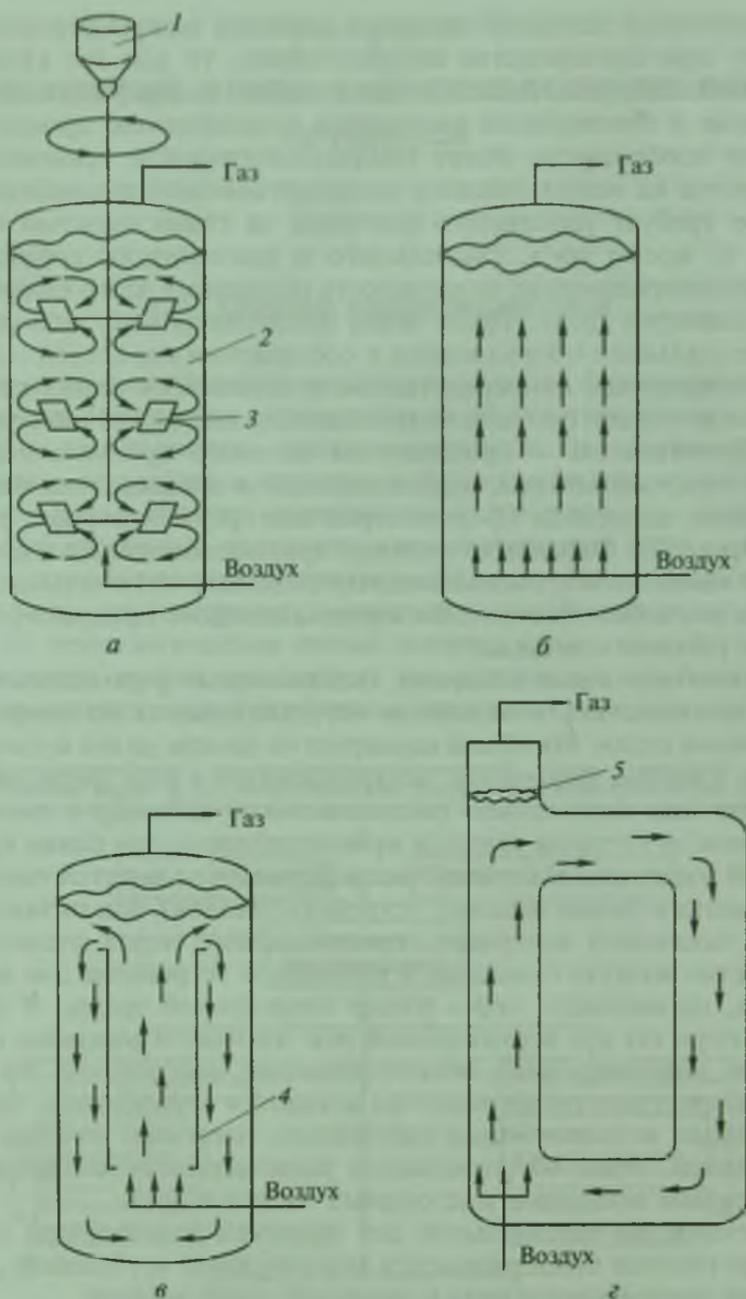


Рис. 10. Типы ферментеров (реакторов):

*a* — реактор с механическим перемешиванием; *б* — барботажная колонна; *в* — эрлифтный реактор с внутренней рециркуляцией; *г* — эрлифтный реактор с внешней системой рециркуляции; 1 — гиотор; 2 — культуральная среда; 3 — лопасти; 4 — центральная труба; 5 — газожидкостной сепаратор; стрелками показано направление потока культуральной жидкости

разных микроорганизмов во время ферментации приводят к изменению ее состава, рН и реологических свойств, что, в конечном счете, ведет к снижению выхода целевого продукта. Также в нем могут присутствовать в виде примесей (или микропримесей) новые соединения, образовавшиеся в результате жизнедеятельности посторонней микрофлоры.

Нестерильные ферментации недопустимы. Ввиду этого перед проведением каждого ферментационного цикла проводится стерилизация:

- всех внутренних поверхностей ферментера и входящих в него трубопроводов;
- пропускаемого через ферментер воздуха (так называемого «технологического воздуха», подаваемого в ферментер под давлением);
- питательных сред.

Как правило, ферментер заполняется питательной средой только на две трети своей емкости. Вносимый в ферментер посевной материал должен быть представлен чистой культурой биообъекта (не зараженной другими микроорганизмами).

Следует иметь в виду, что при нарушении стерильности в одном месте контаминируется вся система, и содержимое ферментера, по жаргонному выражению производственников, «сливается в трап», т. е. выбрасывается. Сложность ситуации заключается и в том, что для обнаружения заражения воды, воздуха и компонентов питательных сред микробиологическим путем необходимо от 24 ч до нескольких суток, чтобы содержание (число) посторонних клеток в 1 мл увеличилось до тысячи — видимого в микробиологическом мазке их количества.

## **4.2. Подготовка и стерилизация технологического воздуха**

Эта подготовительная операция требуется для обеспечения дыхания микроорганизмов — биообъектов, большинство которых являются аэробами. Использовать для аэрации кислород можно, но экономически и по технике безопасности это нецелесообразно. Поэтому используется воздух, который под давлением поступает в ферментер непосредственно с территории предприятия.

Какое же количество воздуха нужно для обеспечения одной ферментации в промышленном масштабе? Приведем такой пример: в ферментер объемом 50 м<sup>3</sup> ежечасно подается порядка 3 000 м<sup>3</sup> стерильного воздуха, а время ферментации измеряется сутками.

Для очистки и стерилизации воздуха его многократно фильтруют (рис. 11).

На первом этапе получения пригодного для пропускания через ферментер («технологического») воздуха его очищают от пыли в

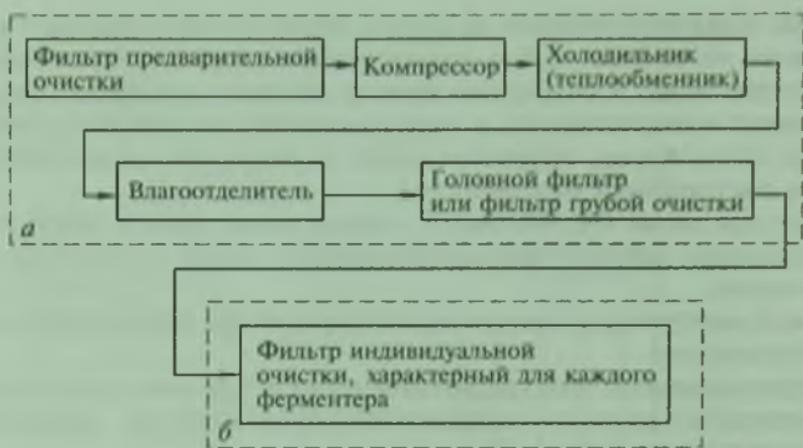


Рис. 11. Схема очистки технологического воздуха (стрелками показано направление потока воздуха):

*a* — за пределами цеха ферментации; *б* — в цехе ферментации

фильтре предварительной очистки, а затем подают последовательно в компрессор с системой холодильников, фильтр грубой очистки, систему стерилизации (головной фильтр, фильтры тонкой очистки). Таким образом, воздух подвергается не менее чем трехкратной фильтрации и, как минимум, дважды пропускается через стерилизующие фильтры. При этом, если головной фильтр является общим для всех аппаратов в цехе или вне цеха ферментации, то каждый из фильтров тонкой очистки относится к конкретному аппарату.

На стадии грубой очистки (головной фильтр) используются волокнистые фильтрующие материалы с волокнами диаметром от 15 до 50 мкм из стекла и базальта и грубозернистые пористые перегородки. Эффективность очистки на этой стадии достигает 98 %.

На стадии тонкой очистки (индивидуальные фильтры) применяются тонковолокнистые материалы (картон и бумага) с волокнами диаметром 0,5 мкм; зернистые жесткие фильтрующие перегородки — керамические и металлокерамические, из разных полимеров. Используются также мембранные фильтры.

При выборе фильтрующих материалов учитывают размер бактериальной клетки (например, для кокковых форм диаметр волокна 1 мкм, а для такой широко распространенной бактерии, как кишечная палочка, — 2 мкм). Естественно, возникает вопрос о защите находящихся в ферментере биообъектов — бактерий, актиномицетов, грибов от фагов. Это трудная задача, которая решается прежде всего получением фагоустойчивых штаммов биообъекта.

Постоянное использование фильтров, стерилизующих технологический воздух, требует также периодической стерилизации самих фильтров, так как задержанные фильтром микроорганизмы могут при благоприятных условиях размножаться. Слои фильтрующего материала будут при этом прорастать, микроорганизм появляется на «чистой стороне» фильтра и затем с потоком воздуха, проходящего через фильтр, распространяется по воздуховодам и внутренней поверхности ферментера.

Стерилизация фильтров может быть проведена обработкой антисептиками, ионизирующим облучением и, наконец, горячим паром. Последний метод наиболее надежен и экономичен. При выборе режима стерилизации, с одной стороны, обязательно уничтожить все микробные клетки и все споры, а с другой стороны, желательно сохранить свойства фильтрующего материала с тем, чтобы продлить срок службы фильтров. Температура при обработке паром 120—125 °С, время обработки 20—30 мин.

### **4.3. Герметизация и стерилизация оборудования**

Асептические условия производства требуют стерилизации перед началом процесса всей аппаратуры (изнутри) и всех материальных потоков. Этого, однако, недостаточно. Стерильность должна быть сохранена в течение всего рабочего цикла. Иными словами, технологический процесс должен быть защищен от контаминации за счет обеспечения герметичности всех соединений в аппаратуре.

В монтажной схеме любого ферментера имеется несколько десятков разного рода герметизирующих элементов. Наиболее распространенные из них — фланцевые соединения и запорная арматура уязвимы в отношении герметичности при монтаже с обвязкой ферментера.

В системах, работающих в асептических условиях, должна быть обеспечена возможность стерилизации всех точек внутренних объектов аппаратов и коммуникаций. Для этого перед загрузкой ферментеров через них пропускают насыщенный водяной пар под давлением. Однако здесь существуют свои сложности. Это касается, например, открытых трубных окончаний — участков труб, одним концом соединенных с полостью ферментера, а другим соприкасающихся с атмосферой. К ним относятся узел отвода отработанного, т. е. прошедшего через ферментер, воздуха и узлы отбора проб.

Повышенное давление в открытом трубном окончании создать невозможно, следовательно, и температура там будет не выше 100 °С. Из-за этого приходится увеличивать продолжительность обработки. Обычно в трубе делают врезку, и во время работы пар

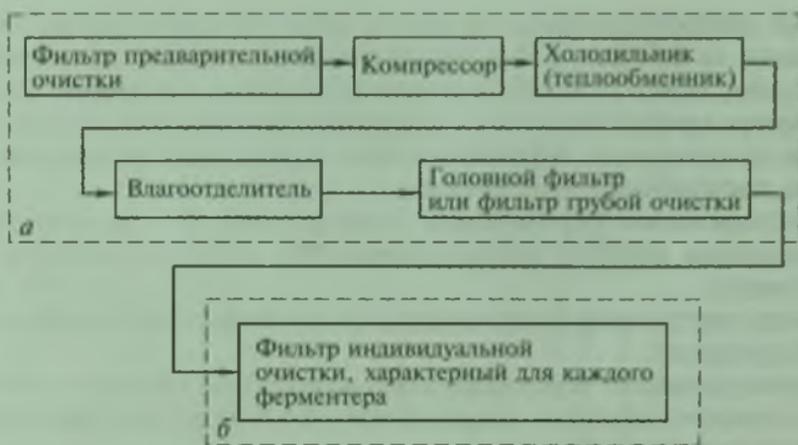


Рис. 11. Схема очистки технологического воздуха (стрелками показано направление потока воздуха):

*а* — за пределами цеха ферментации; *б* — в цехе ферментации

фильтре предварительной очистки, а затем подают последовательно в компрессор с системой холодильников, фильтр грубой очистки, систему стерилизации (головной фильтр, фильтры тонкой очистки). Таким образом, воздух подвергается не менее чем трехкратной фильтрации и, как минимум, дважды пропускается через стерилизующие фильтры. При этом, если головной фильтр является общим для всех аппаратов в цехе или вне цеха ферментации, то каждый из фильтров тонкой очистки относится к конкретному аппарату.

На стадии грубой очистки (головной фильтр) используются волокнистые фильтрующие материалы с волокнами диаметром от 15 до 50 мкм из стекла и базальта и грубозернистые пористые перегородки. Эффективность очистки на этой стадии достигает 98 %.

На стадии тонкой очистки (индивидуальные фильтры) применяются тонковолокнистые материалы (картон и бумага) с волокнами диаметром 0,5 мкм; зернистые жесткие фильтрующие перегородки — керамические и металлокерамические, из разных полимеров. Используются также мембранные фильтры.

При выборе фильтрующих материалов учитывают размер бактериальной клетки (например, для кокковых форм диаметр волокна 1 мкм, а для такой широко распространенной бактерии, как кишечная палочка, — 2 мкм). Естественно, возникает вопрос о защите находящихся в ферментере биообъектов — бактерий, актиномицетов, грибов от фагов. Это трудная задача, которая решается прежде всего получением фагоустойчивых штаммов биообъекта.

Постоянное использование фильтров, стерилизующих технологический воздух, требует также периодической стерилизации самих фильтров, так как задержанные фильтром микроорганизмы могут при благоприятных условиях размножаться. Слои фильтрующего материала будут при этом прорастать, микроорганизм появляется на «чистой стороне» фильтра и затем с потоком воздуха, проходящего через фильтр, распространяется по воздухопроводам и внутренней поверхности ферментера.

Стерилизация фильтров может быть проведена обработкой антисептиками, ионизирующим облучением и, наконец, горячим паром. Последний метод наиболее надежен и экономичен. При выборе режима стерилизации, с одной стороны, обязательно уничтожить все микробные клетки и все споры, а с другой стороны, желательно сохранить свойства фильтрующего материала с тем, чтобы продлить срок службы фильтров. Температура при обработке паром 120—125 °С, время обработки 20—30 мин.

### 4.3. Герметизация и стерилизация оборудования

Асептические условия производства требуют стерилизации перед началом процесса всей аппаратуры (изнутри) и всех материальных потоков. Этого, однако, недостаточно. Стерильность должна быть сохранена в течение всего рабочего цикла. Иными словами, технологический процесс должен быть защищен от контаминации за счет обеспечения герметичности всех соединений в аппаратуре.

В монтажной схеме любого ферментера имеется несколько десятков разного рода герметизирующих элементов. Наиболее распространенные из них — фланцевые соединения и запорная арматура уязвимы в отношении герметичности при монтаже с обвязкой ферментера.

В системах, работающих в асептических условиях, должна быть обеспечена возможность стерилизации всех точек внутренних объектов аппаратов и коммуникаций. Для этого перед загрузкой ферментеров через них пропускают насыщенный водяной пар под давлением. Однако здесь существуют свои сложности. Это касается, например, открытых трубных окончаний — участков труб, одним концом соединенных с полостью ферментера, а другим соприкасающихся с атмосферой. К ним относятся узел отвода отработанного, т.е. прошедшего через ферментер, воздуха и узлы отбора проб.

Повышенное давление в открытом трубном окончании создать невозможно, следовательно, и температура там будет не выше 100 °С. Из-за этого приходится увеличивать продолжительность обработки. Обычно в трубе делают врезку, и во время работы пар

непрерывно подается в открытое трубное окончание. В случае так называемых «тупиковых полостей» трудно обеспечить вытеснение воздуха и циркуляцию пара. Обычно в трубопровод врезают два вентиля, между которыми — подвод пара и отвод образующегося конденсата.

Промышленные ферментеры большого объема стерилизуют в течение часа при 125—130 °С.

#### 4.4. Стерилизация питательных сред

Используемые в промышленности среды (как правило, жидкие, комплексные, реже синтетические) стерилизуются тепловым методом (насыщенным паром).

Устойчивость микроорганизмов к тепловому воздействию определяется многими факторами, в частности видовой принадлежностью микроорганизма. Учитывается, что споры гораздо устойчивее к нагреванию, чем вегетативные клетки. На эффективность тепловой стерилизации влияет количество клеток в среде: чем их меньше, тем легче достигается стерилизующий эффект. Из этого следует, что перед стерилизацией необходимо понижать количество микробных клеток в среде.

Определяющее значение при тепловой стерилизации имеют температура и время ее поддержания. Чем выше температура, тем быстрее достигается стерилизующий эффект. Для оценки эффективности процесса стерилизации используют физические (по температуре и давлению пара), химические (по температуре плавления или изменению цвета), микробиологические (с высевом на стандартные среды), биоиндикаторные (с использованием *Bacillus stearothermophilus*) методы.

При тепловой стерилизации помимо гибели контаминирующих микроорганизмов могут разрушаться термолабильные вещества среды: витамины, ферменты, некоторые аминокислоты. С этим явлением, ухудшающим качество питательных сред, борются, повышая температуру и уменьшая время стерилизации.

Тепловая стерилизация жидкостей выполняется двумя способами: периодическим и непрерывным. При периодическом способе стерилизация происходит в самом ферментере. Одновременно нагревается весь объем жидкости (среды) до температуры стерилизации, которая выдерживается определенное время, после чего понижается до заданной. Этот способ прост и применяется в случае небольших аппаратов. Его недостатки: значительный градиент температуры по объему и «недостерилизация» в тупиках. При непрерывном способе (более прогрессивном и производительном) стерилизация осуществляется в специальных установках.

В результате температуру можно увеличить до 130—150 °С; при этом время стерилизации уменьшается до 3—10 мин, что положительно сказывается на качестве среды.

Недостатком в данном случае является увеличение протяженности трубопроводов, что повышает вероятность вторичной контаминации.

#### 4.5. Подготовка посевного материала

Необходимо подчеркнуть, что каждая производственная культура, которая используется в качестве продуцента целевого продукта, должна иметь свой паспорт, в котором указаны: ее название, род (вид), коллекционный номер, средний уровень активности, серия, дата выпуска, срок годности, характеристика среды для выращивания и хранения культуры.

Процесс подготовки посевного материала многоступенчатый, состоит из нескольких последовательных этапов. Сначала исходная культура выращивается на агаризированной среде в пробирке. На этом этапе при высевании исходной культуры на агаризированной среде можно посмотреть ее морфологию с целью изучения чистоты этой культуры. Далее выращивание ведется в колбах в жидкой среде на качалке. На этой стадии уже включается процесс аэрации и происходит перемешивание исходной культуры с жидкой питательной средой при определенной температуре. Затем исходную культуру, перемешанную с жидкой питательной средой, переливают в посевной аппарат (инокулятор) в количестве 10—25 % объема инокулятора. Здесь также осуществляются перемешивание и аэрация. Иногда посевной аппарат называют маленьким ферментером, а производственный аппарат — большим, функциональных различий между ними нет.

При подготовке посевного материала происходит ступенчатое увеличение биомассы. Поэтому могут использоваться один или несколько посевных аппаратов, возрастающие по объему (выращивание посевного материала осуществляется примерно до уровня 5—10 % объема основного ферментера). У инокулятора есть устройство подачи и фильтрации воздуха. Этот ферментер, как и основной, снабжен технологическими окнами, датчиками, отбойниками и т. д.

В посевном аппарате питательная среда стабильна. В ферментере же по мере накопления целевого продукта концентрация углерода и азота падает, т. е. с течением времени состав питательной среды изменяется. Поэтому микроорганизмы начинают испытывать дефицит питания, и их ответом на такое воздействие является выработка (выброс), например, антибиотика.

#### 4.6. Процесс биосинтеза. Классификация по технологическим параметрам

Центральный процесс биотехнологического производства — биосинтез в ферментере принято характеризовать с использованием разных критериев.

Наиболее часто он дифференцируется по принципу организации материальных потоков на периодический, полупериодический (или регулируемый), непрерывный, отъемно-доливной, многоциклический.

По характеру культивирования продуцента процесс биосинтеза подразделяется на поверхностную и глубинную ферментации.

По типу целевого продукта в биосинтезе выделяют биомассу, высокомолекулярное индивидуальное вещество (ферменты и т. п.), низкомолекулярные первичный и вторичный метаболиты.

Периодический процесс достаточно прост и довольно часто употребляем. Однако его нельзя считать оптимальным. При периодическом процессе одновременно загружают в ферментер все компоненты питательной среды и посевной материал. После этого включаются все элементы обвязки ферментера и совершается полный цикл ферментации. По его завершении культуральная жидкость (вместе с мицелием) сливается и направляется в цех химической очистки для выделения целевого продукта. Таким образом, какой-либо коррекции условий биосинтеза во время ферментационного цикла не выполняется: нет ни постоянного поддержания оптимального соотношения источников углерода, азота, фосфора, ни добавления в нужный момент предшественников целевого продукта, ни сохранения оптимального значения рН и т. п. Все это сказывается на продуктивности ферментации. Выход целевого продукта снижается.

Полупериодический (регулируемый) процесс по сравнению с периодическим более прогрессивен. Улучшаются рост продуцента и биосинтез целевого продукта, появляется возможность коррекции процесса при его отклонениях от оптимальных условий.

Непрерывный процесс ферментации заключается в том, что из ферментера непрерывно отбирают небольшие порции культуральной жидкости и одновременно в него же вносят такой же объем питательной среды. Система оказывается проточной. Использование непрерывного процесса целесообразно, например, в том случае, если целевым продуктом является непосредственно сама биомасса выращиваемого микроорганизма.

Отъемно-доливной ферментационный процесс является промежуточным между периодическим и непрерывным. Культуральная жидкость отбирается более крупными порциями, чем в непрерывном процессе.

Многоциклический процесс является еще одним вариантом периодической ферментации. По завершении ферментационного цикла при сливе культуральной жидкости в аппарате оставляют ее примерно 10 %, затем в ферментер вносят 90 % (объемн.) свежей питательной среды, и начинается новый ферментационный цикл. Таким образом, для этого процесса не надо ни выращивания нового посевного материала, ни подготовки и стерилизации ферментера и трубопроводов, одновременно экономятся время и средства.

По характеру культивирования продуцента в питательной среде выделяют поверхностную и глубинную ферментацию. Необходимо подчеркнуть, что большинство биообъектов, используемых в качестве продуцентов биотехнологических продуктов, являются аэробами.

При поверхностной ферментации биообъект растет только на поверхности жидкой питательной среды. Хотя целевой продукт (если он водорастворим) распределяется по всему объему среды, биомасса его продуцента располагается лишь в виде поверхностной пленки в любого рода емкостях: колбах, включая так называемые микробиологические матрацы, бутылках и, наконец, даже в ферментере при условии, что не работают мешалка и барботажное устройство, т.е. нет ни массообмена, ни аэрации. Биомассы оказывается очень мало и, соответственно, мало целевого продукта.

При глубинной ферментации, несмотря на различия конструкций ферментеров, клетки продуцента вследствие работы мешалки или турбинного перемешивания и пропускания под давлением воздуха через всю толщу среды «работают» во всем объеме питательной среды. Это делает процесс высокоэкономичным. В ферментере создаются условия для накопления большого количества активно функционирующей биомассы продуцента и, соответственно, целевого продукта.

В качестве примера, относящегося к истории биотехнологии, можно указать, что замена поверхностной ферментации (в колбах и бутылках) на глубинную (в ферментационных аппаратах) позволила в короткий срок резко повысить производство пенициллина, особенно остро необходимого в годы Второй мировой войны.

Ферментационные процессы могут, наконец, быть дифференцированы в технологическом отношении и по типу целевого продукта. Целевым продуктом может быть биомасса; индивидуальное высокомолекулярное вещество (как правило, это фермент — конститутивный или индуцибельный); низкомолекулярный метаболит. Метаболит, в свою очередь, может являться первичным или вторичным. Таким образом, необходимость в индукторах и предшественниках, а также время их внесения в среду зависят от целевого продукта. Поскольку биосинтез вторичных метаболитов характерен для определенных стадий развития культуры продуцента и стимулируется в так называемых стрессовых ситуациях,

например, при обеднении среды источниками углерода, азота, фосфора, внесение индукторов и предшественников обязательно в том случае, когда целью ферментационного процесса является именно вторичный метаболит.

Кривая накопления биомассы обычно совпадает с кривой накопления первичных метаболитов и не совпадает с кривой накопления метаболитов вторичных. В частности это относится к таким вторичным метаболитам, как антибиотики, которые наиболее быстро накапливаются в среде именно тогда, когда биомасса почти не возрастает.

При выделении и очистке целевого продукта существенные различия между биотехнологическим и химико-технологическим производствами обнаруживаются лишь на начальном этапе работы. Это обусловлено специфической особенностью биотехнологического процесса — необходимостью разделения целевого продукта и биомассы (рабочий термин «мицелий»).

Если целевой продукт растворим в воде, то при сливе он оказывается в культуральной жидкости. Мицелий может быть отделен фильтрацией с использованием разных приемов (в фильтр-прессах и т. д.), сепарированием.

Если целевой продукт накапливается в мицелии, то твердая и жидкая фаза разделяются, после чего целевой продукт экстрагируется из мицелия. Для лучшего выделения мицелия из культуральной жидкости (при наличии в ней целевого продукта) иногда прибегают к его предварительной коагуляции, в результате которой облегчается отделение мицелия.

### Контрольные вопросы

1. Что входит в понятие предварительной подготовки ферментационного процесса?
2. Что такое основной процесс и какие параметры биосинтеза относятся к регулируемым?
3. Что такое «обвязка ферментера» и каково ее значение?
4. Как можно обеспечить активный массообмен в ферментере, учитывая специфику культивируемых биообъектов?
5. В чем разница между глубинной и поверхностной ферментацией? Какие биообъекты используются в каждом конкретном случае?
6. Какие факторы (физические, химические и биологические) влияют на процесс ферментации?
7. Расскажите о процессе выращивания посевного материала. Из каких стадий он состоит?
8. Как обеспечивается стерильность всего биотехнологического производства?
9. По каким критериям можно охарактеризовать процесс биосинтеза?
10. Что такое паспорт культуры?

### **СИСТЕМА GMP ПРОИЗВОДСТВА И КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

В современных условиях рынок лекарственных средств является в полном смысле слова международным. Лекарство может производиться на одном континенте, а потребляться на другом. Потребитель отделен от производителя тысячами километров. Систематически возрастает разнообразие и лекарств, и лекарственных форм. Растет конкуренция между их производителями. Лекарственные средства производятся в странах с разным социальным строем, различиями в национальных традициях и обычаях; предприятия по производству лекарств могут работать в резко отличающихся климатических зонах и т. п.

Лекарственные средства относятся к тому виду продукции, оценить качество, эффективность и безопасность которого потребителю не всегда легко, так как для этого нужны специализированные лаборатории.

Общеизвестно, что качество лекарственного средства гарантирует фармакопея, имеющая законодательный характер. Однако уже с середины XX в. появилась необходимость еще в одном документе. Этот документ (или точнее, свод документов) — GMP — Good Manufacturing Practice — хорошо (правильно) организованное производство (лекарственных средств) — не заменяет фармакопеи, а, дополняя ее, служит одной конечной цели — гарантировать потребителю высокое качество лекарственных средств. Если фармакопея относится непосредственно к лекарственному средству, то официальное название этого документа в переводе «Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств» — к предприятию, на котором производится лекарство.

Правила GMP — требования к регламенту производства лекарственных средств, обеспечивающему высокую культуру работы на предприятии в отношении всех выпускаемых лекарственных препаратов, — носят официальный характер и составляют перечень руководящих нормативных документов. Они обязательны для всех предприятий, выпускающих как готовые лекарственные средства, так и субстанции — биологически активные вещества, предназначенные для изготовления готовых лекарственных

средств. Несоблюдение указанных правил ведет к налагаемым на предприятие санкциям, вплоть до его закрытия.

Впервые правила GMP были приняты в 1963 г. в США. Однако реальную международную значимость они приобрели в 1969 г., когда под эгидой ВОЗ около ста государств мира заключили многостороннее соглашение, приняв документ, который назывался «Система удостоверения качества фармацевтических препаратов в международной торговле». Подчеркивалось, что новый документ вводится «для оказания помощи органам здравоохранения импортирующих стран в оценке технического уровня производства и качества закупаемых ими лекарственных средств».

Принятие такого документа означало, что фармакопея в качестве единственного барьера, гарантирующего эффективность и безопасность лекарств, стала недостаточна. Поэтому потребовалось усиление контроля выпускаемой фармацевтической продукции. Заключенное соглашение давало определенные права и экспортерам лекарственных средств, стремящимся расширить рынок сбыта продукции. Однако экспортерам, чтобы воспользоваться этими правами, было необходимо выполнение трех условий:

- регистрация лекарственных средств в стране, где производится продукция;
- государственное инспектирование фармацевтических предприятий;
- правила GMP должны быть официально приняты.

В дальнейшем, с 1975 г., этот документ неоднократно совершенствовался. В настоящее время кроме международных правил GMP, принятых ВОЗ, существуют национальные правила GMP, принятые более чем в 30 странах (США, Великобритании, Японии и др.), и региональные, например, правила GMP Европейского сообщества, Ассоциации стран Юго-Восточной Азии, Арабского Союза производителей фармпрепаратов и др.

По разным причинам эти документы несколько разнятся. Одна из причин этого, например, стремление облегчить реализацию продукции на внутреннем рынке (иногда временно) для того, чтобы получить возможность в дальнейшем выйти на международный рынок.

В России, как следует из федеральной целевой программы «Развитие медицинской промышленности в 1998 — 2000 гг. и на период до 2005 г.» одной из важнейших задач, связанных с развитием фармацевтической промышленности, являлась «разработка и внедрение национального отраслевого стандарта GMP». Эта работа велась с учетом введенного в 1992 г. руководящего нормативного документа (РД 64-125—91), относящегося к правилам GMP. В феврале 1998 г. этот документ был пересмотрен, дополнен некоторыми разделами и утвержден министром здравоохранения Российской Федерации (ОСТ 42-510—98).

Правила GMP в их современном виде имеют сходную рубрикуцию независимо от того, являются ли они национальными, региональными или международными, и состоят из восьми разделов.

*В первом разделе* — «Терминология» дается определение ключевых понятий, используемых в документе. Во избежание излишних дискуссий их уточнение необходимо в случае возникновения конфликтных ситуаций.

Начинается раздел с определения фармацевтического производства. Далее следуют определения таких понятий как процессы производства, мероприятия, материалы, помещения и т.д.

*Во втором разделе* — «Обеспечение качества» указаны обязательные мероприятия, включающие укомплектованность персоналом и наличие сотрудников, ответственных за качество продукции; регистрацию этапов производства; определяется порядок возврата серий продукции при нарушении ее качества; выяснение причин нарушений качества и т.д.

*Третий раздел* (с несколькими подразделами) касается персонала фармацевтического предприятия. В нем подчеркивается обязательность профильного образования для руководителя фармацевтического предприятия (но не владельца), обязательность четкого разграничения функций руководящих работников. Специально оговаривается порядок подготовки персонала, личная гигиена и поведение персонала особенно в «чистых» помещениях. Перечисляются правила пользования и поддержания в функциональном состоянии технологической одежды. Наконец, перечисляются инструкции для персонала, порядок доведения их до сведения работников и т.д.

В качестве примера повышенного внимания к персоналу фармацевтических предприятий, можно отметить, что в некоторых национальных правилах GMP предлагается даже предварительное тестирование и отбор работников «чистых» помещений по стереотипу: в определенных случаях предпочитают флегматики, «делающие меньше лишних движений», но в то же время сангвиникам и холерикам никто не препятствует быть владельцами предприятий, коммерческими директорами и т.п.

Еще один пример — внимание к гигиене персонала. В некоторых национальных правилах GMP существует даже рекомендация о времени принятия душа — только после работы, так как после горячей воды возможно шелушение кожи, что противопоказано для работы в «чистых» помещениях.

*Четвертый раздел* правил GMP касается соответствия фармацевтическому производству зданий и помещений. В нем содержится свыше сорока требований, хотя такое требование, как обязательное расположение фармацевтического предприятия вне жилых зон и на большом расстоянии от других производств, отрица-

тельно влияющих (вследствие загрязнения атмосферы и т.д.) на качество фармацевтической продукции, выполнить очень трудно.

Правила GMP применительно к особенностям именно биотехнологического производства заключаются в следующем. При работе с продуцентами-рекомбинантами принимаются меры предосторожности, предусмотренные специальными инструкциями. Это касается, в частности, систем вентиляции помещений, их изоляции и т.д.

Особые требования к биотехнологическому производству должны соблюдаться в антибиотической промышленности. Учитывая аллергенность беталактамовых структур, рекомендуется производственные процессы, связанные с производством пенициллина и его производных, вести в отдельных помещениях. Пенициллин по сравнению со многими другими выпускаемыми промышленностью антибиотиками малотоксичен. Однако аллергенность, как известно, проявляется при исключительно малых концентрациях вещества, поэтому микроколичества пенициллина при попадании в препараты других антибиотиков и вообще в другую продукцию могут вызвать нежелательные последствия. Для работы с пенициллином рекомендуется использовать отдельные емкости, трубопроводы и т.п.

*Пятый раздел* правил GMP относится к технологическому оборудованию, начиная с цеха ферментации, затем цеха химической очистки и т.д. Оборудование должно быть адекватно процессам, контрольно-измерительные приборы в соответствии с графиком должны подвергаться проверке. Ряд рекомендаций касается конструкций оборудования, его размещения и эксплуатации. В частности обращается внимание на то, чтобы поверхности оборудования, соприкасающиеся с сырьем, полупродуктами и конечным продуктом, с ними не реагировали, не корродировали, выдерживали контакт с дезинфицирующими растворами и т.п.

*Шестой раздел* правил GMP касается процесса производства в целом. Большое внимание здесь уделяется исходному сырью (документация, условия хранения, контроль и т.д.). Для биотехнологического производства особое значение имеют такие виды сырья, как компоненты комплексных питательных сред: кукурузный экстракт, хлопковая, гороховая мука и др. Согласно требованиям GMP сырье такого типа подвергается проверке на микробную контаминацию и хранится в отдельных помещениях — непроизводственных и неподвальных (т.е. не в сырых). Выдача серий (образцов) сырья для использования в производственном процессе регистрируется. Все это особенно важно для биотехнологического производства, учитывая трудность в стандартизации комплексных питательных сред.

В этот раздел входит также важнейший пункт, в котором указано, что на предприятии обязателен постадийный контроль про-

цесса, проводимый совместно работниками цехов и отдела технического контроля. При этом проверяются соответствие сырья, вспомогательных материалов и полупродуктов требованиям нормативно-технической документации, санитарное состояние цехов и рабочих мест, выполнение регламентированных технологических операций. Результаты постадийного контроля фиксируются. Записи результатов проверки хранятся не менее года по истечении срока годности лекарственного средства, при изготовлении которого производилась проверка. Таким образом, работа предприятия, если она ведется в соответствии с правилами GMP, позволяет иметь все необходимые документы для выявления причин чрезвычайных происшествий, даже если они произошли давно.

*Седьмой раздел* правил GMP посвящен отделу технического контроля (ОТК). Указывается, что такой отдел обязателен для фармацевтического предприятия. Этот отдел контролирует не только готовый продукт, но также сырье и полупродукты при передаче их из цеха в цех. Именно ОТК контролирует стабильность готового продукта, хранит образцы каждой серии готового продукта (не менее трех лет).

*Восьмой раздел* правил GMP имеет особое значение и называется «Валидация» (англ. *validation* — ратификация, подтверждение).

Развернутая смысловая расшифровка названия этого раздела такова: «Оценка и документированное подтверждение соответствия производственного процесса и качества продукта установленным требованиям».

Валидация позволяет получить данные о соответствии технологического процесса регламенту, о соответствии качества готового продукта нормативно-технической документации. Оцениваются процесс, оборудование (его адекватность поставленной задаче), наконец, конечный продукт, пределы возможных отклонений в ведении процесса. Валидация завершается составлением отчета, на основании которого технологический процесс либо аттестуется, либо бракуется. Валидация проводится для каждого нового технологического процесса перед его внедрением в производство как для стерильных, так и для нестерильных лекарственных средств.

Повторная валидация проводится по графику, ревалидация — при частичном изменении технологии уже существующего процесса (замене сырья, оборудования и др.). Биотехнологическое производство имеет в этом отношении свою специфику, отличающую его от химико-технологического производства, например, на биотехнологическом предприятии может происходить замена штамма продуцента. Нередко это «дочерний» штамм, полученный генетиками из штамма, уже используемого предприятием, но образующий больше целевого продукта, т. е. более рентабельный.

Возникает вопрос: надо ли при этом проводить валидацию, которая требует определенной затраты сил, времени и средств? Ответ однозначен: валидация обязательна. Более высокая активность нового продуцента означает наличие изменений в его метаболизме. Эти изменения могут приводить не только к большей продуктивности, но и к сдвигам в наборе и концентрации ряда метаболитов у продуцента. Схема выделения и очистки целевого продукта, принятая согласно регламенту на предприятии, может в новых условиях оказаться неудовлетворительной, поэтому и процесс, и конечный продукт требуют валидации. То же в случаях, когда на предприятии заменяют ферментационную среду более продуктивной (или с менее дефицитными компонентами). Возможное изменение метаболизма продуцента требует валидации.

Используются термины «перспективная валидация» — перед внедрением технологического процесса в производство и «ретроспективная валидация» — анализ данных, полученных за определенное время с соответствующими выводами.

При валидации допускается эксперимент — моделирование условий, в которых проводится технологический процесс, в сторону приближения к экстремальным, например, повышение температуры в помещениях (конечно, в определенных пределах) и т. п. Это позволяет выяснить границы отклонений, в пределах которых данный технологический процесс не будет влиять на качество выпускаемой продукции. Иногда такие эксперименты сочетаются с более частым отбором проб для анализа по сравнению с предприятиями в регламенте.

В заключение отметим, что ВОЗ издано «Руководство по проведению валидации».

Правила GMP начинают постепенно распространяться практически на все стороны деятельности фармацевтического предприятия и продолжают постоянно совершенствоваться. С недавнего времени помимо указанных появились разделы: «Отходы», «Работа по контракту», «Рекламация и отзыв продукта», «Повышение культуры работы предприятия», «Конкурентоспособность».

В настоящее время правила GMP приняты в 140 странах мира. В качестве примера соответствия правилам GMP производственных участков в нашей стране можно привести технологические линии по производству таблеток на предприятии «Акрихин», инъекционных препаратов на предприятии «Ферейн», технологические линии фармацевтического предприятия при Институте кардиологии.

Правила GLP (Good Laboratory Practice) — правильно или надлежащим образом организованные лабораторные испытания (более точный перевод — не лабораторные, а доклинические или предклинические испытания нового препарата) — требуют не только точного соблюдения набора тестов, но и максимально возмож-

ной стандартизации условий при тестировании лекарственных средств. Достоверность результатов при работе с лабораторными животными должна быть обусловлена соблюдением многих требований, например, к подбору линейных животных, содержанию их на стандартной диете и т.п. Кроме того, животные в виварии должны быть размещены так, чтобы разного рода стрессорные воздействия на них были сведены к минимуму во избежание искажения результатов испытаний.

Новые, целенаправленно или случайно открытые вещества по спектру биологической активности могут изучаться в любых направлениях. Однако для проведения предклинических испытаний этих веществ и на добровольцах в клинике (с последующим внедрением в медицинскую практику) необходимо обязательное соблюдение правил GLP. Это дает возможность получить максимальную гарантию безопасности нового вещества при его последующем введении людям.

Новые лекарственные средства могут обладать видоспецифичностью и, несмотря на положительные результаты испытаний на животных, при клинических испытаниях на людях-добровольцах могут привести к летальному исходу.

В настоящее время существуют попытки замены экспериментов на животных (млекопитающих) разными биохимическими и биофизическими тестами с использованием ферментных систем, тканей и органов беспозвоночных. Подобные попытки в основном направлены на гуманизацию экспериментов.

В целом правила GLP составляют обширный пакет документов и уже имеют свою историю, а их разработка и совершенствование в разных направлениях продолжаются.

Аббревиатура GCP расшифровывается как Good Clinical Practice и означает «правильная или надлежащая организация клинических испытаний» (нового лекарственного препарата). По завершении предклинических испытаний нового биологически активного вещества с положительным результатом соответствующие официальные инстанции выдают разрешение на его испытание в клинике.

Касаясь правил GCP, необходимо подчеркнуть два основных аспекта — соблюдение максимальной безопасности для испытуемых и достижение максимальной достоверности результатов, получаемых на пациентах-добровольцах. Обязательно, чтобы те люди, кому вводится новый препарат, были проинформированы об этом и дали свое согласие на апробацию. Также они могут получить дополнительную информацию, в том числе и о праве на возмещение ущерба их здоровью в чрезвычайных случаях. За исключением специально оговоренных ситуаций испытания новых препаратов на детях запрещены.

В последние годы за рубежом и в России внедряется новая форма защиты прав пациентов. Организуются так называемые этические

(общественные) комитеты, не подчиненные администрации лечебных учреждений, в которых проводятся испытания. В состав этих комитетов входят медики, юристы, священнослужители, представители власти и т. д. Их функции ограничиваются контролем за соблюдением прав пациентов-добровольцев, на которых испытываются новые препараты (в соответствии с правилами GCP). Рекомендаций относительно назначаемых схем и режимов лечения этические комитеты не дают.

Вопрос о достоверности результатов клинических испытаний является довольно сложным. Одна из проблем — исключение влияния личной заинтересованности тех, кто испытывает препарат. Причины такой заинтересованности могут быть различны, например, «давление» со стороны разработчиков препаратов, фирм — владельцев данных препаратов и др.

Одним из путей повышения достоверности результатов клинических испытаний является объединение материалов, получаемых коллективами независимых исследователей. Данные, полученные, например, в пяти клиниках (по сто случаев применения в каждой), позволяют сделать более достоверные выводы об эффективности и безопасности препарата, чем материалы, полученные на том же количестве больных, но в одном учреждении. Разумеется, это лишь один из примеров проведения клинических испытаний в соответствии с правилами GCP.

В целом проведение клинических испытаний фармацевтических препаратов регламентируется большим количеством взаимосвязанных документов.

Изучение, испытание и производство фармацевтических препаратов жестко регламентируется, и новые препараты проходят все указанные стадии, находясь непосредственно под контролем вначале правил GLP, затем — GCP и, наконец, — GMP.

### **Контрольные вопросы**

1. Каковы причины введения международных правил в фармацевтическую практику?
2. Каково содержание правил GMP?
3. Какова разница между Фармакопеей и правилами GMP?
4. Что включают в себя правила GCP и GLP?
5. Почему в случае проверки качества испытуемого лекарственного средства (препарата) по правилам GMP можно получить более надежные результаты?
6. Каковы причины проведения валидации при замене штаммов-продуцентов на производстве?
7. Каковы особенности требований GMP к биотехнологическому производству?
8. Какие особые требования GMP предъявляются к производству бета-лактамных антибиотиков?

# ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

### 6.1. Понятие «экология»

В течение последних десятилетий понятие «экология» постоянно используется средствами массовой информации и встречается, как правило, при описании загрязнения окружающей среды и другого рода антропогенных воздействий на биосферу. Таким образом, понятие «экология» ассоциируется с определенными нарушениями, которые следует предотвратить.

Впервые термин «экология» был введен в научную литературу еще в XIX в. известным биологом Э. Геккелем. Экология (по Геккелю) — это «общая наука об отношениях организмов к окружающей среде».

Современные определения экологии конкретизированы и усложнены, например:

«экология — наука о взаимоотношениях живых существ между собой и с окружающей их неорганической природой, о связях в надорганизменных системах (сообществах), о структуре и функционировании этих систем»;

«экология — наука о взаимоотношениях: организмов и их популяций со средой обитания; о биоценозах и экосистемах как результате взаимообусловленной эволюции организмов и среды; об ауторегуляции экосистем и их роли в биосфере планеты».

Второе определение шире и подразумевает ответственность человека за свою деятельность по изменению окружающей среды. В этом случае экология исследует не только закономерности данного момента, но и эволюционные закономерности в движении. Кроме того, здесь ставится вопрос об ауторегуляции как проявлении внутреннего качества экосистем.

Как научная дисциплина экология может быть дифференцирована:

- на глобальную экологию (со своими закономерностями как предметом изучения);
- общую экологию;
- частную экологию (для определенной группы микроорганизмов определенного таксономического ранга).

Существует также деление этой дисциплины на нормальную и патологическую экологию.

Нормальная экология исследует взаимоотношения организмов и среды их обитания в естественных условиях.

Патологическая экология призвана изучать факторы, обусловленные антропогенной деятельностью, а также их влияние на сложившиеся природные отношения организмов со средой и перспективу этих отношений.

Как известно, биосфера (область распространения жизни на нашей планете) охватывает литосферу, гидросферу и атмосферу. Для человека окружающая среда фактически равнозначна биосфере, но данную аналогию нельзя экстраполировать на все живые организмы на Земле. В какой-то мере антропогенная деятельность начала сказываться и на околоземном космосе (околоземный «космический мусор»), но проблемы патологической экологии, в основном, сосредоточены все же на биосфере, где они становятся в настоящее время все более ощутимы, что дает даже повод говорить не только об экологической опасности, но и о грозящей экологической катастрофе.

Однако при объективном взгляде на результаты деятельности цивилизации придется отметить, что первыми на планете появились микроорганизмы, получавшие энергию в результате хемосинтеза. Именно их деятельность подготовила почву (в прямом и переносном смысле) к возникновению более сложных форм жизни. В результате произошло первое глобальное явление в биосфере, которое, как ни парадоксально, можно назвать экологической катастрофой.

Появились и в полном смысле слова завоевали планету зеленые растения, что привело к резкому увеличению количества кислорода в атмосфере, а последнее — к вымиранию некоторых высочувствительных к кислороду организмов.

Этот убедительный пример показывает, как нарушение баланса неживой природы неизбежно влечет изменения живой природы в глобальном масштабе.

Нет оснований полагать, что эволюция на современном этапе жизни на Земле уже завершилась, но даже при достаточно беглом анализе последствий развития цивилизации становится очевидным, что ситуация ухудшается с каждым годом.

Человек одновременно является высшей формой жизни и природной силой, которая преобразует окружающую среду (биосферу), что в свою очередь отражается на эволюции всех форм жизни, в том числе и на самом человеке. Действительно, некоторые изменения биосферы можно однозначно связать с воздействием антропогенных факторов, однако возникает вопрос — негативны они или позитивны?

Во время зарождения жизни на Земле повышение содержания кислорода в атмосфере привело к новой, более совершенной биоэнергетике и в дальнейшем — к животной клетке. Позитивность

или негативность определенного фактора для жизни может быть установлена только по конечному результату.

Предвидеть направление дальнейшей эволюции живого мы не можем. Моделировать такой процесс также практически невозможно. Поэтому вопрос дифференцировки антропогенных воздействий на благоприятствующие и препятствующие будущему развитию человечества остается открытым.

Человек уникален тем, что, создавая блага для себя, он одновременно может действовать во вред себе как виду. Даже если предположить, что этим человек создаст предпосылки для собственной эволюции, нельзя при этом допускать ни сокращения продолжительности жизни, ни утраты здоровья. Поэтому понятия «экологическая катастрофа и экологическая опасность» прежде всего целесообразно прилагать к самому человеку, а не распространять их на все эволюционные процессы.

## 6.2. Эколого-биохимические взаимодействия в организменных сообществах

Известно, что специализированные железы растений и животных вырабатывают биологически активные молекулы с сигнально-коммуникативными функциями, которые выделяются в окружающую среду и вызывают специфическую ответную реакцию у воспринимающих их особей того же вида. Ответной реакцией у воспринимающей особи может быть изменение либо поведения, либо процесса развития.

Таким образом, химической коммуникацией осуществляется передача информации. Вещества, обуславливающие подобного рода явления, получили название феромонов (от греч. *pherō* — управлять, приносить и т.п.).

Выделяют феромоны-релизеры и феромоны-праймеры.

*Феромоны-релизеры* вызывают немедленные поведенческие эффекты. К ним относятся половые феромоны, феромоны тревоги, следа, «мечения» территории и др. Отметим их исключительно высокую биологическую активность. Например, нескольких молекул этого феромона в 1 м<sup>3</sup> воздуха достаточно, чтобы воспринимающая его особь животного изменила направление своего движения. Так, немногочисленная популяция белых медведей, рассеянных на огромных территориях Арктики в виде отдельных кочующих особей, получает возможность встречи для дальнейшего спаривания благодаря своему видоспецифическому половому феромону. То же происходит и в немногочисленной популяции уссурийских тигров, причем необходимо отметить чрезвычайно высокую специфичность биологической активности соответствующего феромона, так как воздух уссурийской «субтропической тайги»

содержит многочисленные летучие органические соединения растительного и животного происхождения.

*Феромоны-праймеры* вызывают длительные физиологические эффекты в воспринимающем организме. К ним относятся вещества, которые фиксируют срок наступления половой зрелости животного (здесь прослеживается связь с простагландинами). Еще одним эффектом некоторых феромонов-праймеров является возможность сигнализации к соблюдению моногамии и отсутствию инцеста у определенных видов млекопитающих, например, у некоторых видов грызунов. В данном случае прослеживается приближение к закономерностям нейроэндокринного характера. К феромонам-праймерам относятся также вещества, регулирующие принадлежность к определенной касте особей «общественных» насекомых.

К феромонам относятся также *алломоны* и *кайромоны*. С их участием осуществляется «общение» в надорганизменных межвидовых сообществах. Алломоны приносят пользу тому, кто их вырабатывает, кайромоны — реципиентам.

Общебиологическое значение феромонов несомненно, хотя во многом еще не раскрыто. Как химические соединения феромоны исключительно разнообразны по структуре.

Исследования в области феромонов ведутся как с позвоночными, так и с беспозвоночными. Из позвоночных, преимущественно млекопитающих, выделено несколько сотен химических структур с сигнально-коммуникативной активностью. Из беспозвоночных — около двух тысяч. И первые, и особенно вторые с их огромным количеством видов в качестве источника феромонов изучены еще очень мало.

Перспективы применения феромонов в сельском хозяйстве — от животноводства до борьбы с сельскохозяйственными вредителями (замена инсектицидов) не вызывают сомнений и частично уже реализуются.

Представляет интерес разнообразная активность феромонов для использования в области фармации, однако решение этого вопроса зависит от раскрытия механизма действия феромонов на молекулярном уровне.

### **6.3. Экологические аспекты биотехнологического производства**

Подчеркнем, что антропогенное воздействие на биосферу неотъемлемо от развития цивилизации. Распашка земель, вырубка лесов, «вытаптывание» степей постоянно сопутствуют истории человечества. Уместно вспомнить об уничтожении отдельных видов животных и растений и о расселении некоторых видов из мест коренного обитания.

В связи с особой актуальностью проблемы влияния промышленности на биосферу рассмотрим, как выглядит в этом отношении биотехнологическое производство. Прежде всего, оно наукоемко и по сравнению с химико-технологическим производством более эффективно, так как клетка продуцента (биообъекта) представляет «сбалансированный комплекс биокатализаторов», работающий более производительно, чем системы последовательных химических реакций с неорганическими катализаторами.

Потребление энергоресурсов и воды биотехнологической промышленностью составляет доли процента от потребляемого современной химической промышленностью. Выброс в атмосферу газообразных отходов предприятий биотехнологической промышленности не превышает и десятой доли процента от выброса промышленностью в целом. Именно биотехнологическое производство наиболее приемлемо в современных условиях, однако и оно имеет специфические, экологические проблемы и, соответственно, совершенствуется в направлениях:

- создания и использования более активных биообъектов-продуцентов (в результате на единицу продукции будет меньше отходов!);

- замены сред и реагентов на менее дефицитные;

- иммобилизации биообъектов (как клеток, так и ферментов), многократного их использования для уменьшения отходов;

- внедрения мембранной технологии на стадии выделения и очистки целевого продукта (уменьшение количества применяемых органических растворителей во избежание агрессивных условий на некоторых стадиях производственного процесса);

- соблюдения правил GMP.

Рассмотрим кратко проблемы, относящиеся к ликвидации (утилизации) или очистки производственных отходов традиционного биотехнологического предприятия.

**Твердые отходы.** Прежде всего, к ним относится мицелий (биомасса) продуцента после его отделения от культуральной жидкости и целевого продукта. О количестве мицелия, с которым приходится иметь дело, можно получить наглядное представление исходя из того, что объем слива промышленного ферментера — это 50—100 м<sup>3</sup> густой, вязкой (из-за наличия мицелия) жидкости. Учитывая, что на предприятии имеется ряд ферментеров, а ферментационный цикл длится около недели, можно сделать вывод, что этот вид твердых отходов на одном (крупном) предприятии составляет сотни тонн в год. При этом необходимо учитывать, что мицелий содержит и остаточные количества целевого продукта, а это, как правило, биологически высокоактивные вещества.

В настоящее время твердые отходы ликвидируют путем переработки мицелия. Его перемешивают с почвой и помещают в ямы с бетонными подложками. Каждую такую яму оставляют закрытой

на несколько лет. За это время почвенные микроорганизмы подвергают органические вещества мицелия ферментативному расщеплению, используя их для построения «своей» биомассы. Фактически образуется компост, органическая часть мицелия при этом разлагается. Бетонная подложка в такого рода «компостных ямах» необходима, чтобы предотвратить попадание еще неразложившихся растворимых органических веществ мицелия в грунтовые воды и водоемы с дождевой водой. Обычно для компостных ям выделяют специальные участки на территории предприятия. Отметим, что вывоз подсушенного мицелия (его масса по сравнению с первоначальной уменьшается в 10—100 раз) на общегородские свалки запрещен.

Попытки применения мицелия для тех или иных целей в целом пока не увенчались успехом, однако в лабораторных условиях уже создана малоотходная технология. Из мицелия актиномицета продуцента тетрациклина извлекалась суммарная липидная фракция и использовалась как пеногаситель в следующем производственном цикле при получении тетрациклина, образуемого продуцентом, принадлежащем к тому же штамму. В некоторых случаях (при ограниченности пастбищ) простерилизованную и перемолотую биомассу некоторых микроорганизмов используют в качестве добавки в корм сельскохозяйственных животных. Мицелий грибов и актиномицетов (отходы при производстве антибиотиков) повышает качество некоторых строительных материалов (керамзитовые плиты, кирпич и др.), увеличивая их прочность. Но по экономическим соображениям производить эти материалы нецелесообразно.

**Жидкие отходы.** В случае биотехнологического производства жидкими отходами являются стоки и сточная жидкость, в основном это культуральная жидкость после отделения от нее мицелия и извлечения целевого продукта. Суммарный годовой объем культуральной жидкости, которая должна подвергнуться очистке, составляет для одного предприятия десятки тысяч кубометров. Степень очистки, контролируемой разными методами, должна быть такой, чтобы очищенная жидкость могла сливаться в открытые водоемы.

Существуют разные схемы очистки. Почти во всех из них ключевую роль играют микроорганизмы (биологическая очистка). Приведем одну из таких схем (рис. 12). Первым компонентом системы очистки является железобетонный отстойник, куда попадает отработанная культуральная жидкость. На дне отстойника проложены трубы, через которые происходит отсасывание осадка. На этой стадии из культуральной жидкости удаляется примерно 40 % загрязнений. Следующий участок системы очистки состоит из одного или нескольких, расположенных один за другим, аэротенков — баков с проходящими по дну трубами, из которых выходит



Рис. 12. Схема биологической очистки жидких отходов:

1, 3 — соответственно первичный и вторичный железобетонные отстойники; 2 — аэротенк; 4 — блок доочистки

в виде пузырьков воздух, проходящий через всю толщу жидкости, в результате она насыщается кислородом. Воздух способствует интенсивному протеканию окислительных процессов. Ключевая особенность аэротенка — наличие в нем так называемого «активного ила» (искусственного биоценоза — сообщества микроорганизмов, окисляющих растворенные в жидкости органические вещества до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ ), постепенно формирующегося в процессе работы предприятия.

Видовой состав биоценоза активного ила на разных предприятиях может незначительно варьировать, поскольку последний зависит от окисляемых субстратов. Как правило, в нем доминируют представители рода *Pseudomonas* (70%). Далее следуют микроорганизмы, объединенные в род *Bacterium* (20%). Остальные 10% составляют представители родов *Bacillus*, *Sarcina* и другие микроорганизмы. Характеризуя активный ил как биоценоз или как надорганизменное межвидовое сообщество применительно к очистке сточной жидкости биотехнологического производства, следует отметить три важных обстоятельства.

Во-первых, принципиальную роль здесь играют штаммы рода *Pseudomonas*. Однако не следует сводить этот род только к виду *Pseudomonas aeruginosa* — известному возбудителю опасных раневых инфекций. В природных условиях род *Pseudomonas* представлен большим количеством не опасных для человека видов. Именно непатогенные штаммы входят в состав активного ила. Для этих микроорганизмов характерен широкий набор окислительных фер-

ментов. Препараты, состоящие из клеток *Pseudomonas*, используются при ликвидации загрязнений, вызванных утечкой нефти. Окислению подвергаются, образно говоря, и экзотические субстраты, например, кольчатые углеводороды. Помимо этого оболочка сапрофитных видов *Pseudomonas*, входящих в активный ил, имеет свои особенности на уровне пориновых каналов, облегчающие доступ субстратов к окислительным ферментам.

Во-вторых, превращение некоторых субстратов в  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  осуществляется за счет последовательного воздействия на них ферментов разных микроорганизмов. Иными словами, одна ферментная система превращает конкретное соединение в промежуточные продукты, а другая катализирует дальнейшую деградацию этих промежуточных продуктов. Этим подчеркивается, что активный ил функционирует как комплекс микроорганизмов.

В-третьих, следует иметь в виду, что в сточных водах некоторых производств (в частности, предприятий антибиотической промышленности) могут содержаться остаточные количества антимикробных веществ. Это означает, что микроорганизмы в аэротенках постоянно контактируют с ними, т.е. создаются условия для селекции резистентных форм. Но не исключены случаи, когда концентрация антимикробных веществ в очищаемых жидких отходах может оказаться необычно высокой и вызвать гибель клеток активного ила.

Это требует контроля за состоянием активного ила. После участка с аэротенком или несколькими последовательно расположенными аэротенками и вторичным отстойником принципиально важным для системы жидких отходов является «блок доочистки». В нем культуральная жидкость, в которой остается примерно 10 % первоначального содержания органических веществ (как правило, это трудноокисляемые вещества), пропускается через биофильтры — пленки с иммобилизованными клетками микроорганизмов с наиболее высокой окислительной активностью. Нередко эти клетки принадлежат к сконструированным методами генной инженерии штаммам, содержащим плазмиды, несущие гены окислительных ферментов (ферментов деструкции). Такие целенаправленно полученные «штаммы-деструкторы» способны окислять трудноокисляемые вещества и уничтожать оставшиеся 10 % загрязнений в очищаемой жидкости.

Иммобилизация клеток таких штаммов в биопленках рациональна ввиду того, что при свободном размножении этих клеток искусственно повышенная окислительная активность может быть утрачена за счет обратных мутаций или потери плазмид. В этом случае в «блоке доочистки» как бы «сочетаются» генная инженерия и инженерная энзимология. Прошедшая «блок доочистки» жидкость, соответствующая официальным критериям питьевой воды (одним из принятых методов контроля токсичности в данном случае является подавление жизнеспособности микроскопического

ракообразного *Daphnia magna*), хлорируется и затем поступает в открытые водоемы.

Касаясь работы систем биологической очистки сточных вод в разных режимах, следует отметить, что при максимальных («шоковых») нагрузках могут возникнуть разные трудности. В такие рабочие периоды в аэротенки вносят высокоактивные штаммы деструкторы («бактериальные закваски»), что позволяет значительно усилить пропускную способность системы очистки жидких отходов. С этой целью для биотехнологических предприятий разного профиля рекомендованы специальные препараты: «Phenobac» — для утилизации углеводов, «Thermobac» — для окисления полисахаридов, «Polibac» — для освобождения от синтетических детергентов и т. п. Ориентировочная доза «бактериальной закваски» из живых клеток составляет около 100 мг на 1 м<sup>3</sup> сточной жидкости.

В заключение отметим возможное разнообразие схем биологической утилизации жидких отходов. Так, помимо аэробной очистки в схему могут быть включены: этап анаэробной очистки, этапы с использованием сорбентов (активированного угля, цеолитов и др.), этапы с применением электрохимических методов (например, электрокоагуляции).

**Газообразные отходы.** Газовые выбросы очищают от органических соединений при температуре от 300 до 1 000 °С в колонках с неорганическими катализаторами. В этом случае летучая «органика» превращается в СО<sub>2</sub>. В некоторых случаях используются биологические фильтры на основе микроорганизмов, окисляющих органические вещества до СО<sub>2</sub>.

### Контрольные вопросы

1. Каков общий вклад биотехнологии в решение современных экологических проблем?
2. Что собой представляют биотехнологические отходы?
3. Какие основные виды микроорганизмов присутствуют в «активном иле»?
4. Какие существуют схемы по очистке твердых, жидких и газообразных отходов?
5. Какова роль генной инженерии в экологии?
6. Что собой представляют сигнально-коммуникативные молекулы в надорганизменных системах, и каковы перспективы их использования для поддержания экологии?
7. Какие виды феромонов существуют?
8. Каковы особенности биотехнологических производств в отношении их отходов?
9. Какие коммерческие препараты используются в качестве «бактериальной закваски»?
10. По каким направлениям можно совершенствовать биотехнологическое производство в плане экологической безопасности?

### Глава 7

#### ПРОБЛЕМЫ ПОИСКА, СОЗДАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

##### 7.1. Антибиотики как вторичные метаболиты и их продуценты

История науки об антибиотиках началась с того момента, когда лондонский микробиолог А. Флеминг обнаружил в 1929 г. на агаровой среде в чашке Петри, засеянной стафилококком, колонию плесневого гриба из рода *Penicillium*, образовавшуюся в результате случайно попавшей на агар из воздуха споры этого гриба. Он заметил вокруг колонии зону прозрачного агара. Гриб образовывал антибиотик пенициллин, который не только останавливал размножение стафилококка, но и вызывал последующий лизис его клеток. Однако в очищенном состоянии пенициллин был выделен лишь спустя десятилетие, в начале Второй мировой войны, когда с особой остротой встала проблема борьбы с раневой инфекцией.

Под названием «антибиотики» объединены вещества, образуемые микроорганизмами и избирательно подавляющие рост других микроорганизмов. Позднее это понятие было распространено и на продукты их химической модификации, что получило отражение в наименовании «полусинтетические антибиотики». Некоторые из антимикробных антибиотиков обладают способностью подавлять рост опухолевых клеток, в связи с чем появился еще один новый термин — противоопухолевые антибиотики. Именно антибиотики, использование которых в медицинской практике при инфекционных заболеваниях началось в 1940 г., вызвали (за счет снижения смертности) резкие демографические изменения глобального масштаба, быстрый рост населения в развивающихся странах, увеличение продолжительности жизни в развитых странах и т. д. На мировом рынке годовая стоимость продукции промышленности антибиотиков сейчас превышает 20 млрд долл. и продолжает стремительно возрастать.

Важнейшая характерная черта антибиотиков — их избирательность действия на метаболизм. Обычно из нескольких тысяч метаболических реакций антибиотик подавляет только одну или несколько. В этом отношении антибиотики противопоставляются антисептикам, активность которых значительно ниже (антибио-

тики угнетают рост микроорганизмов в концентрации порядка 1 мкг/мл и меньше).

Антибиотики принадлежат к самым разным классам химических соединений. Известно около 14 000 природных антибиотиков, образуемых микроорганизмами. Из них в медицинской практике применяют около 200. К антибиотикам относятся только низкомолекулярные вещества — с молекулярной массой не более нескольких тысяч дальтон. Однако большинство антибиотиков, применяемых в медицине, имеет молекулярную массу в пределах одной тысячи дальтон. Образуемые микроорганизмами литические ферменты, несмотря на их антимикробную активность, к антибиотикам не относятся (белки-токсины).

Антибиотики высокоэффективны при инфекционных заболеваниях, вызываемых большинством грамположительных и грамотрицательных бактерий, многими патогенными грибами. Они с успехом используются при некоторых инфекциях простейших, риккетсий и крупных вирусов.

Успех лечения зависит от выбора антибиотика для индивидуального больного. Антимикробный спектр действия всех применяемых в медицинской практике антибиотиков известен, а вот видовая принадлежность и свойства возбудителя инфекции у конкретного больного, как правило, не известны. В то же время лечение, особенно при тяжело протекающем заболевании, должно быть начато своевременно. Осмотр и опрос больного, предварительные выводы о локализации и характере инфекций обычно позволяют врачу остановиться на одном из так называемых «антибиотиков выбора». Однако независимо от этого рациональная и целенаправленная антибиотикотерапия должна базироваться на тщательной бактериологической диагностике заболевания с выделением, идентификацией возбудителя и оценкой его чувствительности к ряду препаратов, чтобы выбрать наиболее эффективный для лечения антибиотик.

Для определения чувствительности возбудителя используются стандартные, бумажные диски, пропитанные раствором антибиотика и высушенные. Диски раскладываются на поверхности твердой питательной среды, засеянной культурой возбудителя, и после инкубации в термостате определяется величина зоны подавления роста диффундирующим в агар антибиотиком. В настоящее время в клинических микробиологических лабораториях используются автоматизированные системы, позволяющие быстро проводить большое количество таких определений.

Иногда, после сопоставления чувствительности возбудителя к разным антибиотикам, уже применявшийся «антибиотик выбора» заменяют или дополняют другим препаратом, более эффективным в каждом конкретном случае. Частой причиной такой замены является распространение среди патогенных микроорганизмов штаммов, устойчивых (резистентных) к тому или иному ан-

тибиотику. Тем не менее набор имеющихся в распоряжении врача антибиотиков, как природных, так и полусинтетических, не гарантирует полного успеха антибиотикотерапии.

Известно, что антибиотики не являются первичными метаболитами. Как правило, их структура резко отличается от первичных метаболитов. Иногда в их молекуле в качестве фрагментов обнаруживаются как необычные для организмов структуры, так и аналоги метаболитов, например, аминокиклитол и аминоксахара у аминогликозидов; макроциклические лактоны и аминоксахара у макролидов и полиенов. В отличие от первичных метаболитов (предшественников макромолекулярных соединений) антибиотики за редкими исключениями вообще не обнаруживаются во время первых часов роста культуры. Так, образуемые грибами или актиномицетами антибиотики можно выявить в культуральной жидкости или мицелии продуцента только на вторые — третьи сутки роста, причем в незначительных количествах. Максимум их накопления наступает на пятые — шестые сутки.

Несмотря на то, что при синтезе или «сборке» молекулы антибиотика используются первичные метаболиты (аминокислоты, сахара, жирные кислоты, пурины и т. д.), образование антибиотика подчиняется общим законам внутриклеточной регуляции, он становится необходимым для своего продуцента.

Существует несколько предположений о биологической роли антибиотиков. Наиболее распространенной считается гипотеза, что антибиотики являются средством преодоления «стрессовых» ситуаций для продуцента, независимо от того, чем вызвана такая ситуация — истощением питательных веществ в результате роста культуры конкурента или результатом размножения клеток своей же культуры.

Образование антибиотика определенной структуры не является строго видоспецифическим признаком. Принадлежащие к одному виду штаммы, выделенные из природных источников, могут иногда образовывать разные антибиотики. Особенно много таких примеров относится к виду *Streptomyces riseus*. Разные штаммы этого вида могут образовывать резко отличающиеся по структуре антибиотики: например, аминогликозидный антибиотик стрептомицин, полиеновый антибиотик кандицидин, антибиотик пептидной структуры виридогризеин.

Штаммы микроорганизмов, отнюдь не близкие по своему систематическому положению, могут иногда образовывать сходные структуры. Цефалоспорины образуются не только грибами, но и актиномицетами (в последнем случае они получили название цефамицины). Антибиотики, ключевым компонентом которых является беталактаманное ядро, образуются не только грибами и актиномицетами, но и отдельными штаммами бактерий некоторых видов, в том числе даже и неспорообразующих.

Все эти данные трудно объяснить, исходя из того, что каждый антибиотик играет специфическую роль в метаболизме своего продуцента. Японский исследователь Умегава, открывший несколько ценных для практики антимикробных и противоопухолевых антибиотиков, даже выдвинул гипотезу об антибиотиках как о случайных для штамма веществах. Он предположил, что гены биосинтеза антибиотиков могут быть локализованы во внехромосомных генетических элементах — плаزمиде и передаваться от одного вида микроорганизма другому путем конъюгации или, например, переноситься с помощью умеренных фагов широкой специфичности. В настоящее время гипотеза Умегавы отвергнута: гены биосинтеза антибиотиков считаются локализованными только в хромосомах.

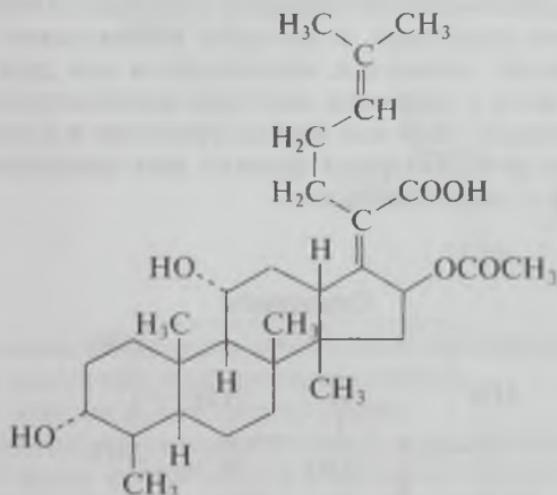
Внимание привлекла новая концепция: у микроорганизмов, особенно это относится к актиномицетам, часть генов в геноме находится в «молчащем» состоянии. Они не экспрессируются, т. е. продукты, кодируемые этими генами, в том числе антибиотики, не синтезируются. Однако под влиянием различных воздействий тот или иной участок «молчащего» генома начинает работать. В результате получают объяснение причины образования различными штаммами одного вида разных антибиотиков, а также образование близких антибиотиков микроорганизмами разных видов. Конечно, это не означает, что любой актиномицет может образовать любые антибиотики. Однако концепция «молчащих» генов заставляет уже на современном молекулярном уровне вернуться к одному из положений, высказанных классиком науки об антибиотиках американским микробиологом З. Ваксманом. Он утверждал, что, выделив почвенный микроорганизм на искусственных питательных средах и культивируя его в условиях, отличных от природных, нельзя получить представления о полном биосинтетическом потенциале микроорганизма и о перечне образуемых им вторичных метаболитов. Однако моделирование природных условий — исключительно сложная задача. Во-первых, на микроуровне они мало изучены. Во-вторых, их разнообразие должно быть очень велико.

В лабораториях разных стран мира выделены и охарактеризованы десятки тысяч продуцентов антибиотиков. Как правило, продуцентами антибиотиков являются такие почвенные микроорганизмы как плесневые грибы, актиномицеты и спорообразующие бактерии.

Плесневые или «низшие» мицелиальные грибы отличаются от «высших» грибов отсутствием плодового тела. Плесневые грибы широко распространены в почве. Их относят к микроорганизмам эукариотам, имеющим оформленное, окруженное мембраной ядро. Плесневые грибы имеют также субклеточные структуры — митохондрии, где сосредоточены ферменты, катализирующие биоэнергетические процессы. Клеточная стенка грибов состоит из хитина — полимера, содержащего остатки аминокислот. В целом



У пенициллинов с беталактамной структурой сконденсировано пятичленное кольцо, содержащее серу, а у цефалоспоринов — шестичленное. К грибам относится продуцент еще одного антибиотика, применяемого в медицинской практике. Представитель рода *Fusidium*, а именно *Fusidium coccineum*, образует антибиотик стероидной структуры — фузидиевую кислоту:



Необходимо отметить еще один ценный лекарственный препарат, образуемый грибами. На рубеже 1970—1980-х гг. из гриба рода *Tolurocladium* был выделен циклопептид, проявлявший слабую антимикробную активность, поэтому «забракованный» как антибиотик. Однако он оказался высокоэффективным в качестве иммуносупрессора. Циклопептид, получивший название циклоспорин (точнее циклоспорин G), широко используется при пересадке органов и тканей, а также при лечении некоторых аутоиммунных заболеваний.

Название «актиномицеты» отражает распространенное ранее неправильное представление об этих микроорганизмах как о лучистых грибах.

Установлено, что актиномицеты стоят гораздо ближе к бактериям, чем к грибам. Они являются прокариотами. Их геном не заключен в ядро, а представляет кольцевую хромосому, не отделенную от цитоплазмы ядерной мембраной.

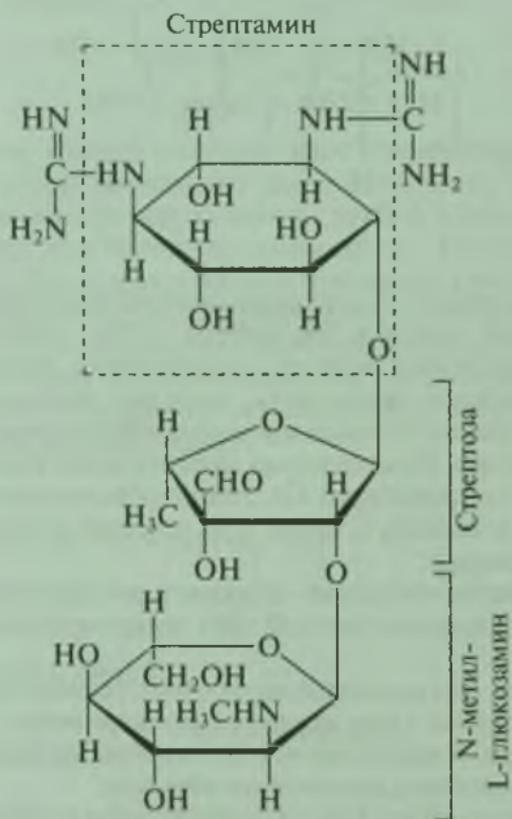
Клетки актиномицетов не содержат также и митохондрий. Их клеточная стенка построена из гетерополимера — пептидогликана. Все это сближает актиномицеты с бактериями. Однако актиномицеты в отличие от «истинных» бактерий (эубактерий) являются многоклеточными организмами со сложным циклом развития,

обычно за 5—6 сут. Актиномицеты образуют спороносы и споры.

Актиномицеты являются продуцентами огромного количества (около 4 000) разнообразных антибиотиков.

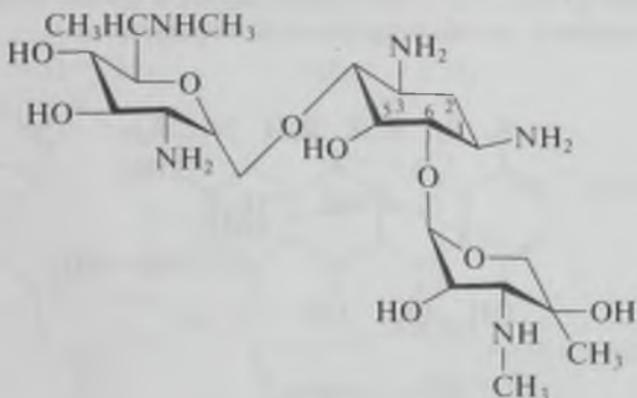
Актиномицетами образуется большинство антибиотиков, применяемых в медицинской практике. Ряд видов, относящихся к родам *Streptomyces* и *Micromonospora*, образуют (например, *Streptomyces griseus* и *Micromonospora purpurea*) антибиотики аминогликозидной структуры, к которым принадлежат: стрептомицин, гентамицин, неомицин, канамицин и ряд других антибиотических веществ с широким спектром антибактериального действия, получивших широкое распространение в клинике.

Как видно из структурных формул двух представителей аминогликозидов — стрептомицина:



и гентамицина (под последним названием промышленностью выпускается не индивидуальное вещество, а комплекс трех близ-

ких веществ — гентамицина  $C_{1\beta}$ , гентамицина  $C_{1\alpha}$ , гентамицина  $C_2$ ):

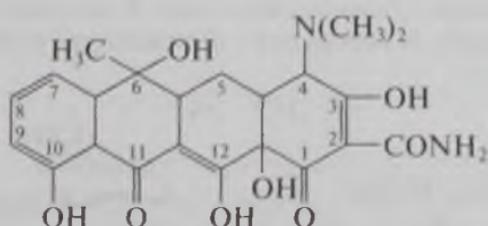


в молекуле аминогликозидов обязательно присутствуют:

- остаток шестичленного аминциклитола;
- остатки сахаров и/или аминсахаров.

Кроме природных аминогликозидов в медицинской практике в настоящее время используются и полусинтетические аминогликозидные антибиотики, т.е. продукты химической модификации природных аминогликозидов.

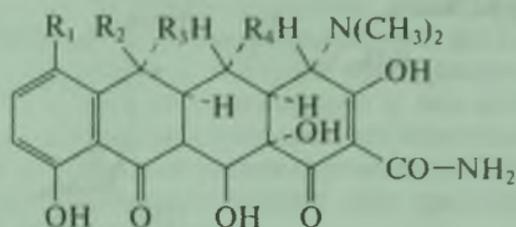
Виды, относящиеся к роду *Streptomyces* (*Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus* и др.), образуют широко известные антибиотики тетрациклиновой структуры — тетрациклин:



хлортетрациклин (при  $C_7-Cl$ ), окситетрациклин (при  $C_5-OH$ ).

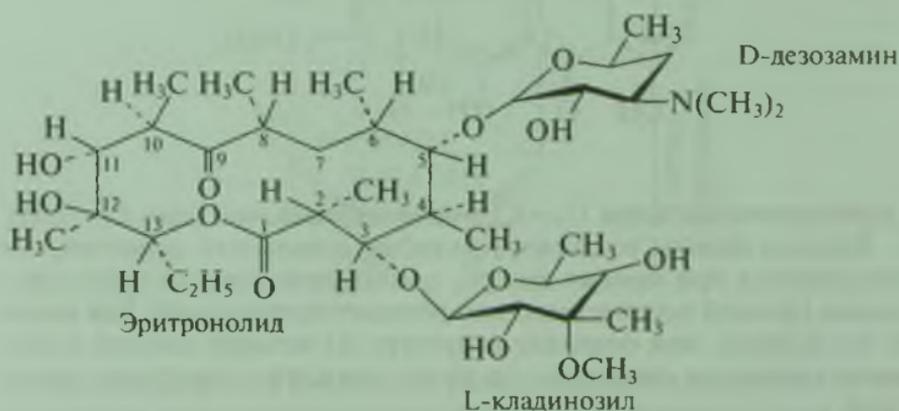
Все они близки по спектру антибактериального действия, все всасываются при приеме внутрь, однако некоторыми преимуществами (лучшей переносимостью) обладает тетрациклин. Как видно из их формул, они содержат структуру из четырех циклов и различаются только по «верхней», но не по «нижней» периферии молекулы.

Верхняя периферия тетрациклиновой молекулы была модифицирована химическим путем, что позволило получить полусинтетические тетрациклины — доксициклин, миноциклин и метациклин (первый из них длительно циркулирует в крови, второй обладает повышенной антибактериальной активностью):

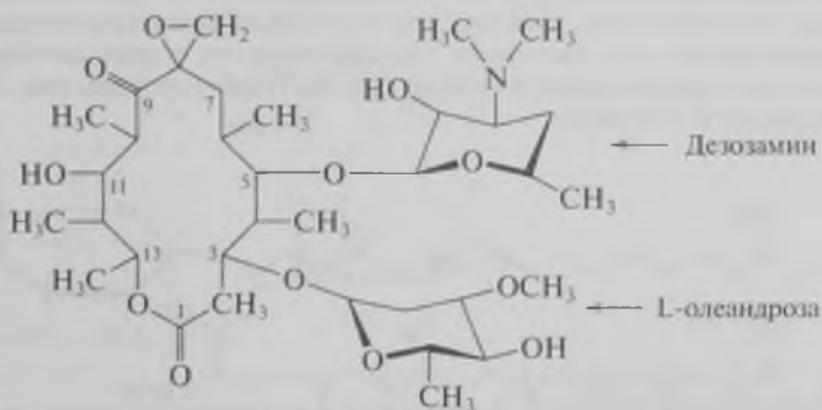


|                | Метациклин         | Доксициклин     | Миноциклин                        |
|----------------|--------------------|-----------------|-----------------------------------|
| R <sub>1</sub> | H                  | H               | —N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> |
| R <sub>2</sub> | —CH <sub>2</sub> — | H               | H                                 |
| R <sub>3</sub> | —CH <sub>2</sub> — | CH <sub>3</sub> | H                                 |
| R <sub>4</sub> | OH                 | OH              | H                                 |

Широко известны образуемые актиномицетами антибиотики макролидной структуры, содержащие макроциклическое лактонное кольцо и сахара и/или аминосахара. В частности, к ним относится эритромицин А (продукт *Streptomyces erythraeus*):

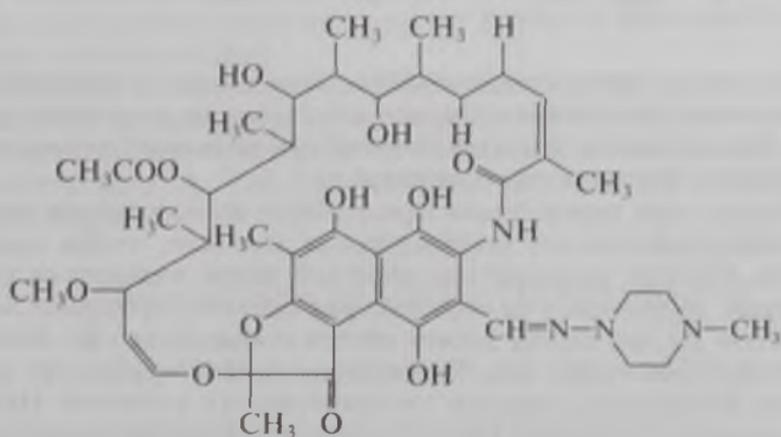


и близкий к нему олеандомицин, образуемый *Streptomyces antibioticus*:

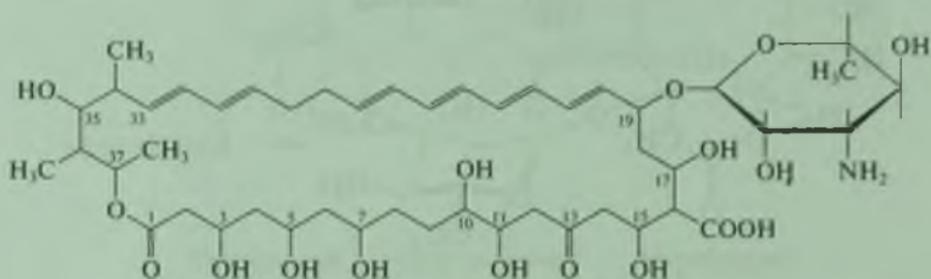


Эти антибиотики хорошо всасываются при приеме внутрь. Они высокoeffективны только против грамположительных бактерий, так как являются антибиотиками узкого спектра действия.

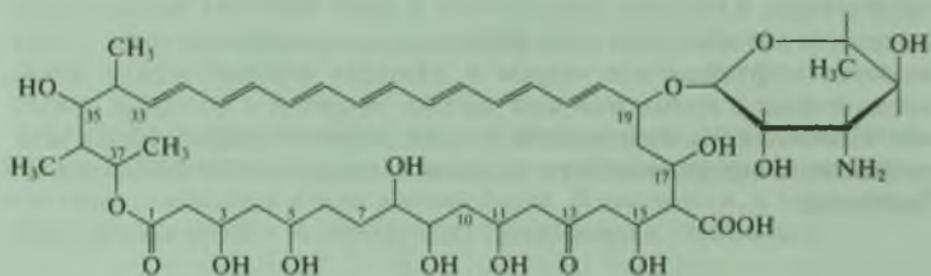
Из актиномицета, первоначально названного *Streptomyces mediterranei*, а позднее отнесенного к виду *Nocardia mediterranea*, выделены антибиотики сложной анзамициновой структуры. У них имеется нафталиновое «ядро» и длинная алифатическая цепь, соединенная с ароматической частью эфирной и амидной связями. Наибольшую известность из них получил рифампицин, или рифампин, который является, однако, полусинтетическим антибиотиком:



Рифампицин успешно применяется в лечении туберкулеза. Актиномицеты, помимо антибактериальных антибиотиков, образуют также и антибиотики, подавляющие рост грибов и дрожжей, в том числе патогенных. Представители рода *Streptomyces*, например, *Streptomyces pourasei*, являются продуцентами противогрибковых антибиотиков, относящихся к полиеновым макролидам. Макроциклическое лактонное кольцо содержит у этих антибиотиков ряд сопряженных двойных связей. Наиболее известны амфотерицин В (гептаен):



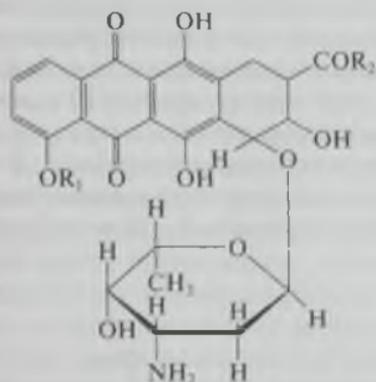
и нистатин (тетраен-диен):



В молекулу полиеновых антибиотиков входят и аминсахара. Полиеновые антибиотики широко известны в медицинской практике. Вследствие их высокой токсичности полиены применяются в основном наружно или перорально.

Нередко при пероральном применении их используют вместе с антибактериальными антибиотиками для того, чтобы предотвратить быстрое размножение дрожжей после подавления роста бактерий. Актиномицеты образуют ряд противоопухолевых антибиотиков. Из них свыше десяти нашли применение при лечении некоторых форм рака. Так, *Streptomyces verticillius* образует антибиотик блеомицин сложного гликопептидного строения. Наиболее важной в настоящее время считается группа антрациклинов,

к которой принадлежат дауномицин ( $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ ), адриамицин ( $R_1 = \text{CH}_3$ ;  $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$ ), карминомицин ( $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}_3$ ):

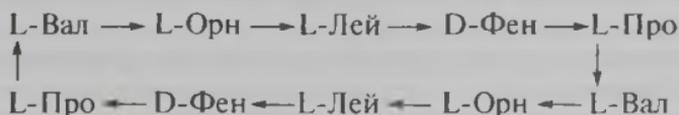


и их полусинтетические производные. Продуцентами антрациклинов являются разные виды рода *Streptomyces*.

Как видно из приведенной формулы, антрациклины содержат структуру частично сходную с таковой у тетрациклинов, а также остаток аминсахара. Однако ни по спектру антибиотического действия, ни по областям применения в клинике антрациклины и тетрациклины не сходны.

Аэробные спорообразующие грамположительные бактерии (бациллы) относятся к собственно бактериям. Как и все бактерии, они не имеют ядра. Их кольцевая хромосома имеет меньшие размеры, чем у актиномицетов. Их геном соответственно более прост, т.е. содержит меньшее, чем у актиномицетов количество генов, и тем более, у грибов. Бактерии не имеют митохондрий. Их клеточная стенка близка по составу к клеточной стенке актиномицетов и состоит из пептидогликана. Жизненный цикл бактерий значительно короче жизненного цикла грибов и актиномицетов — около полутора суток.

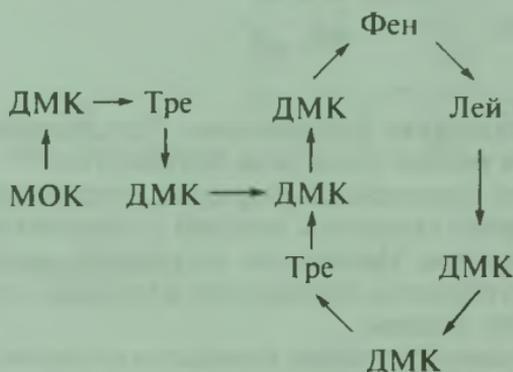
Открыто более тысячи антибиотиков бактериального происхождения. Большинство из них представлены пептидами и циклопептидами. Еще во время Второй мировой войны был внедрен в лечебную практику (для обработки ран) циклический декапептид — грамицидин С:



Продуцентом антибиотика является *Bacillus brevis*.

Как видно из приведенной формулы, кроме L-аминокислот (валина, орнитина, лейцина, пролина), антибиотик содержит также и D-фенилаланин.

Позднее из другого вида почвенных споровых бактерий (*Bacillus polymyxa*) был выделен также нашедший применение в медицинской практике антибиотик полимиксин В — представитель ряда полимиксинов, в который входят свыше 20 соединений, различающихся по отдельным аминокислотным остаткам, а также по входящему в их молекулу остатку жирной кислоты. В структуре полимиксина В присутствуют три фрагмента: циклопептид, линейный трипептид, остаток 6-метилоктановой кислоты (непептидная часть молекулы):



Здесь ДМК — остаток α,γ-диаминомасляной кислоты; Мок — остаток 6-метилоктановой кислоты.

В отличие от грамицидина полимиксин В используется не только для местного, но и для внутримышечного введения. В целом антибиотики, образуемые почвенными споровыми бактериями, не столь разнообразны, как антибиотики актиномицетов, и в медицинской практике они играют меньшую роль.

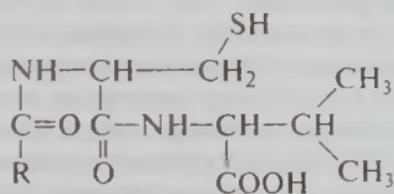
## 7.2. Механизмы биосинтеза антибиотиков

Три основных обстоятельства определяют особенности биосинтеза, общие для всех антибиотиков:

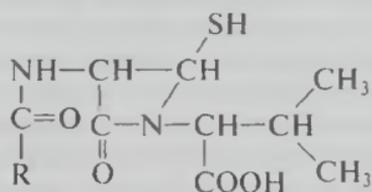
- антибиотики не относятся к прямым продуктам трансляции или вообще матричного синтеза;
- антибиотики как вторичные вещества образуются из первичных метаболитов;
- биосинтез молекулы любого антибиотика происходит с участием ряда ферментов.

Координация действия ферментов, т. е. обеспечение правильной последовательности ферментативных реакций, обеспечивается разными путями. Один путь, доказанный на примере биосинтеза циклопептидных и некоторых других антибиотиков, связан с тем, что синтез или сборка антибиотической молекулы происходит в мультиферментных комплексах с упорядоченно расположенными ферментами. Первичные метаболиты «входят» в мультиферментный комплекс, в котором происходит ряд их превращений. Из комплекса «выходит» или завершена молекула антибиотика, или ее крупный фрагмент, например, специфический агликон того или иного антибиотика и т. п. При «сборке» углеродного скелета молекулы антибиотика могут происходить различные реакции: метилирование или деметилирование; карбоксилирование или декарбоксилирование; аминирование или дезаминирование.

Предшественниками бета-лактамов являются аминокислоты. Началом формирования бета-лактамовой молекулы является синтез так называемого LLD-трипептида из трех L-аминокислот — первичных метаболитов — L-аминоадипиновой кислоты, L-цистеина и L-валина:



LLD-трипептид



Моноциклический бета-лактам

В образовании последнего принимает участие фермент, замыкающий пептидные связи, а также фермент, превращающий L-валин в его оптический антипод — D-валин. Это уже специфические ферменты биосинтеза антибиотика, не принадлежащие к ферментам, катализирующим превращения первичных метаболитов в обычных метаболических циклах.

Затем LLD-трипептид превращается в моноциклический бета-лактам, т. е. происходит замыкание бета-лактамового кольца. Следующий этап — появление пятичленного серусодержащего кольца, сконденсированного с бета-лактамовым. Все это означает участие в биосинтезе антибиотика новых ферментов. В случае образования бензилпенициллина необходимо присутствие фенилуксусной кислоты (в активированной форме), в результате чего освобождаются аминокислоты и кофермент А.

Во втором случае происходит «экспансия» — расширение пятичленного кольца до шестичленного, что катализируется специ-

фическим ферментом, получившим название «экспандаза». Далее, в результате еще ряда реакций формируется молекула цефалоспорины С.

Вышеперечисленные реакции биосинтеза демонстрируются как пример, чтобы еще раз подчеркнуть основополагающий тезис: молекула любого антибиотика синтезируется с обязательным участием ряда (5—10 и более) ферментов.

На основании анализа структурных формул аминокликозидов — стрептомицина и гентамицинов и других можно предположить, что их предшественником является глюкоза. Действительно, как показали многочисленные исследования, из глюкозы синтезируются не только остатки сахаров в молекулах аминокликозидов, но и их аминокликолитольный фрагмент. Два других фрагмента молекулы стрептомицина — пентоза (стрептоза) и L-глюкозамин также образуются из глюкозы за счет ряда ферментативных реакций. Наконец, сборка молекулы стрептомицина из трех компонентов — стрептидина, стрептозы и L-глюкозамина (замыкание между ними гликозидных связей) требует специфических ферментов. В биосинтезе стрептомицина и большинства других аминокликозидных антибиотиков участвуют не менее 20 ферментов.

Описывая ферментативные реакции биосинтеза тетрациклиновой структуры, обычно проводят аналогию с биосинтезом первичных метаболитов — жирных кислот, из остатков ацетатных или пропионатных единиц по принципу «голова к хвосту», когда формируется связь между углеродом карбоксильной группы и углеродом метильной группы (или метиленовой группы) следующей единицы. В этих ферментативных реакциях участвует кофермент А.

Существуют и принципиальные отличия между синтезом жирных кислот и антибиотиков — вторичных метаболитов. При биосинтезе антибиотиков не происходит восстановления карбонильных групп после реакции конденсации или такое восстановление происходит до образования гидроксильной группы или двойных связей. При полном восстановлении образуются ароматические структуры; при неполном — макроциклические лактоны. Таким образом, имеется определенная связь между «биогеозом» таких соединений, как тетрациклины и антибиотики-макролиды. Скелет молекулы тетрациклинов строится из одной малонамидной единицы и восьми малонатных.

Основа структуры лактонного макроциклического кольца эритромицина образуется как результат ферментативной полимеризации одной единицы пропионата и шести единиц метилмалоната. Сахара эритромицина происходят из глюкозы за счет ряда ферментативных превращений. В биосинтезе участвуют ферменты сборки молекулы из макроциклического лактона и сахаров.

Методы генной инженерии с успехом используются при создании продуцентов рекомбинантных белков, так как белки —

прямые продукты трансляции. В целом остается справедливым правило: один ген — один белок, т. е. один «структурный» ген определяет структуру (последовательность аминокислот) одного белка.

Антибиотики не являются прямыми продуктами трансляции в отличие от ферментов биосинтеза антибиотиков. Количество таких ферментов достигает нескольких десятков. Таким образом, в биосинтезе молекулы антибиотика принимают участие десятки «структурных» генов.

### 7.3. Биотехнология антибиотиков

Фактически ни один продуцент, выделенный из почвы или другого природного источника, непосредственно в производстве использован быть не может. Природный штамм образует лишь незначительные количества антибиотиков. Обработкой мутагенами и многоступенчатым отбором (селекцией) активных вариантов обычно удается повысить активность штамма, так как количество образуемого им антибиотика увеличивается в тысячи и даже десятки тысяч раз. Например, у продуцента пенициллина в результате десятков лет селекционной работы во многих лабораториях разных стран мира активность повысилась от десятков микрограммов до десятых долей грамма антибиотика в миллилитре среды.

У промышленных мутантных штаммов (рабочий термин «суперпродуценты») антибиотик, образуемый в огромном количестве, не должен влиять:

- на собственный биосинтез;
- жизнедеятельность своего продуцента.

Как известно, избыточное образование метаболита ведет к прекращению его биосинтеза по принципу обратной связи. В случае суперпродуцентов механизм обратной связи исключен.

Жизнедеятельность суперпродуцентов сохраняется в результате разных причин:

- максимум концентрации антибиотика достигается, когда рост культуры либо завершается, либо практически уже завершен;
- антибиотик синтезируется в местах клетки, отделенных от мест локализации жизненно важных метаболических процессов;
- после выхода антибиотика из мицелия в среду вновь в мицелий он не проникает, т. е. транспорт антибиотика через оболочку продуцента имеет одностороннее направление.

Однако свойство образовывать избыточные количества антибиотиков нестойко. Оно легко теряется полностью или частично, поэтому промышленные продуценты хранят в особых условиях, периодически проверяя их активность. При необходимости их рассеивают на отдельные колонии, из которых затем отбираются наиболее активные.

При разработке биотехнологии антибиотиков учитываются общие свойства продуцентов, а также, что каждый антибиотик является конечным продуктом длинной цепи специфических ферментативных реакций.

Продуценты большинства антибиотиков, в том числе важнейших для медицинской практики, являются аэробами или (реже) факультативными анаэробами. В связи с этим в первые годы после получения пенициллина, грамицидина С и некоторых других веществ их продуценты выращивали на поверхности жидкой питательной среды в стационарных условиях в микробиологических матрацах или колбах, помещаемых в термостат или термостатные комнаты. Культура продуцента росла только на поверхности среды. Этот способ был трудоемок, не экономичен и не позволял нарабатывать антибиотик в больших количествах. Очень скоро поверхностная ферментация была заменена на глубинную. Через питательную среду пропускали воздух и среду непрерывно перемешивали. Это позволило использовать для роста продуцента весь объем среды.

Только глубинная ферментация создала возможность современного биотехнологического производства с выпуском конечного продукта в большом количестве.

Кривые накопления биомассы продуцента и антибиотика в культуральной жидкости, а также и в мицелии продуцента, не совпадают во времени. Вторая кривая значительно запаздывает (рис. 13).

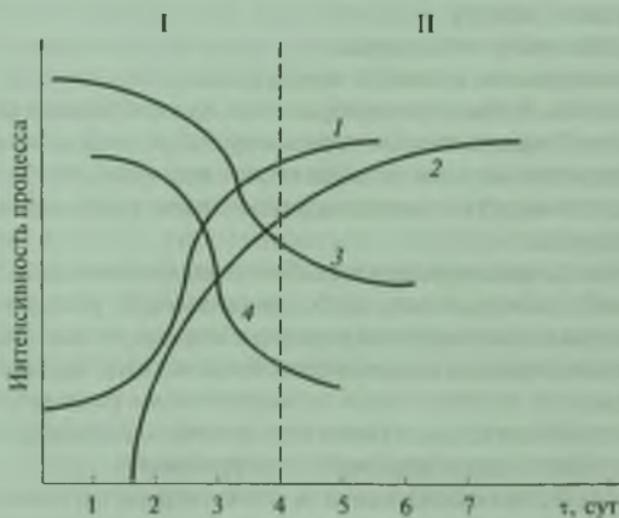


Рис. 13. Особенности ферментационного процесса при получении антибиотиков:

I — трюфаза; II — илиофаза; 1 — биомасса; 2 — антибиотик; 3 — углеводы; 4 — источники азота

Это относится к продуцентам всех важнейших антибиотиков: грибам, актиномицетам, споровым бактериям. Первая фаза развития культуры продуцента во время ферментационного процесса была названа «трофофаза» — фаза сбалансированного роста. Вторая — «идиофаза» или фаза несбалансированного роста. В течение трофофазы антибиотик в культуральной жидкости не обнаруживается или обнаруживается в незначительных количествах. Во время идиофазы прирост биомассы замедляется. Наступает быстрое накопление антибиотика в культуральной жидкости. В трофофазе источники углерода и азота в среде быстро потребляются, и количество их в среде уменьшается. В идиофазе их потребление замедляется, а в конце идиофазы происходит частичный лизис густой культуры мицелия.

Одновременно в культуре можно обнаружить и некоторое количество новых нитей молодого мицелия, который находится уже в условиях среды, обедненной питательными веществами, и участвует в биосинтезе антибиотика.

Таким образом, интенсивному биосинтезу антибиотика способствует значительное уменьшение в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Происходит дерепрессия ферментов синтеза антибиотика. Однако выращивание продуцентов с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, так как незначительное накопление биомассы в течение трофофазы ведет в конечном счете и к незначительному накоплению антибиотика малым количеством клеток продуцента.

Для высокопродуктивной ферментации необходимо соблюдать определенные условия. Продуценты антибиотиков выращивают на разных средах как относительно простого состава, так и сложного. Последние получили название комплексных сред. В них могут входить соевая или хлопковая мука, кукурузный экстракт и другие природные многокомпонентные источники питательных веществ. Также в среды вносят индивидуальные органические соединения и минеральные соли. Для каждого штамма-продуцента состав оптимальной для биосинтеза антибиотика среды подбирается отдельно. Это относится даже к штаммам одного вида, продуцирующим один и тот же антибиотик. Существуют и некоторые общие закономерности, учитываемые при работе с большинством продуцентов.

Углеродкатаболитная регуляция является одним из механизмов, воздействующих на биосинтез вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза — лучший источник углерода и энергии для любых организмов. Однако быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Показано, что глюкоза ослабляет биосинтез беталактамов, аминогликозидов и многих других антибиотиков, образуемых разными продуцентами. Относительно биосинтеза антибиотиков отметим, что глюкоза, фруктоза, саха-

роза и галактоза — сильные репрессоры этого процесса. Необходимо подчеркнуть, что продукты катаболизма глюкозы подавляют не активность ферментов биосинтеза антибиотиков, а сам синтез этих ферментов. Медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) более благоприятны для биосинтеза антибиотиков. Не является репрессором биосинтеза и лактоза, которая также медленно утилизируется: при ее гидролизе освобождающаяся глюкоза репрессирует бета-галактозидазу и, в результате, гидролиз лактозы (появление в среде глюкозы) замедляется.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно для биосинтеза большинства антибиотиков. Общая причина этого — обогащение клетки макроэргическими фосфорными соединениями (прежде всего АТФ), что повышает скорость роста мицелия. Накапливается много биомассы, но относительно мало антибиотика. Например, высокоактивные штаммы продуцентов тетрациклиновых антибиотиков содержат в мицелии меньше АТФ и растут медленнее, чем исходные низкоактивные продуценты тетрациклинов. Неблагоприятное действие фосфора на биосинтез бета-лактамов объясняется на биохимическом уровне следующим механизмом: образование LLD-трипептида — ключевого соединения, с которого начинается синтез пенициллинов и цефалоспоринов, ингибируется глюкозо-6-фосфатом. Взаимодействие легкоокисляемого сахара и фосфата оказывает отрицательный эффект на биосинтез. Однако все вышеизложенное не означает, что фосфор может быть полностью исключен из среды. Биосинтез антибиотиков снижается при его избыточном количестве, поэтому для каждого штамма-продуцента подбирается оптимальное содержание фосфора в среде.

Аммоний и другие легкоутилизируемые источники азота подобно легкоокисляемым углеводам усиливают рост продуцентов бета-лактамов, полиеновых антибиотиков (эритромицина, рифамицинов и др.), но отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, БВК (белково-витаминный концентрат) медленно расщепляются в процессе ферментации, т. е. из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов питательных сред, что позволяет получать высокий выход антибиотиков. Механизм отрицательного действия легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков не ясен. Есть данные, что у продуцентов бета-лактамов он связан с уровнем глутаминсинтетазы в мицелии. Известно, что глутамин является донором аминокрупп для ряда аминокислот, а сами аминокислоты, в свою очередь, являются предшественниками бета-лактамовых антибиотиков. Вероятно, что у разных продуцентов механизм этого действия на биосинтез различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источ-

ников азота на биосинтез обязательно учитывается при подборе сред, а также осуществляется контроль количества таких соединений.

Некоторые первичные метаболиты являются прямыми предшественниками антибиотиков, например, валин включается в трипептид, из которого формируются беталактамные структуры. При избытке валина и высокой концентрации его в мицелии происходит подавление валином собственного биосинтеза по принципу обратной связи. Находясь в избытке, он подавляет активность ацетогидроксисинтетазы — первого фермента своего биосинтетического пути. Однако в результате снижается и образование трипептида, т. е. в конечном счете и беталактамного антибиотика.

Некоторые же первичные метаболиты являются конечными продуктами разветвленного метаболического пути. Одно «ответвление» или один конец этого пути заканчивается первичным метаболитом, другое «ответвление» — антибиотиком. Так, альфа-аминоадипиновая кислота является, с одной стороны, прямым предшественником лизина, с другой — беталактамного антибиотика, так как включается в исходный для его синтеза трипептид. При избытке лизина происходит подавление образования альфа-аминоадипиновой кислоты по принципу обратной связи и, таким образом, снижается синтез не только лизина, но и беталактамного антибиотика (см. рис. 8).

Эти примеры показывают, что у высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков, полученных генетическими методами, должны быть нарушены механизмы обратной регуляции биосинтеза тех первичных метаболитов, которые необходимы для образования антибиотической молекулы. Можно отметить, например, что лизин подавляет биосинтез пенициллина у низкоактивных продуцентов. Полученные из них же «изогенные» высокоактивные штаммы уже не отвечают на избыток лизина в среде снижением биосинтеза антибиотика.

Важность аэрации для обеспечения роста продуцентов на стадии ферментации обусловлена тем, что большинство из них — аэробы. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков, так как последний расходуется при замыкании беталактамного и тиазолидинового колец во время биосинтеза беталактамной структуры. Например, для образования изопенициллина-N из LLD-трипептида молекулярный кислород необходим в стехиометрическом отношении 1 : 1 (предельное насыщение кислородом культуральной жидкости 30 %). Когда ферментация идет успешно, кислород потребляется со скоростью 1 ммоль/(л · мин). В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности. Оптимизация снабжения кислородом достигается увеличением скорости его переноса.

После стадии ферментации культуральная жидкость содержит растворенный антибиотик, мицелий продуцента, продукты его лизиса, ряд компонентов неиспользованной питательной среды, в том числе высоко- и низкомолекулярные органические вещества и неорганические соли.

Иногда антибиотик содержится не только в культуральной жидкости, но и в мицелии. Культуральная жидкость нередко отличается высокой вязкостью. Поэтому выделить антибиотик из столь сложной гетерогенной системы непросто.

В историческом аспекте можно отметить, что именно неудача химиков при выделении и очистке пенициллина отдалила на десятилетие его внедрение в медицинскую практику. Используемые в настоящее время методы и последовательность операций выделения и очистки разрабатываются применительно к конкретному антибиотику и определяются его физико-химическими свойствами: локализацией, составом культуральной жидкости, ее реологическими и другими характеристиками.

На стадии предварительной обработки культуральной жидкости отделяют растворенный антибиотик от суспензии мицелия и компонентов культуральной жидкости, находящихся в коллоидном состоянии. Если часть антибиотика находится в мицелии, его переводят в водную фазу, например, изменяя рН культуральной жидкости (в случае тетрациклинов). Иногда, наоборот, растворенный и связанный с мицелием антибиотик объединяют в общем осадке, из которого антибиотик затем экстрагируют. Отделяют нативный раствор от мицелия и коллоидных частиц методами фильтрации или центрифугирования, для чего используют барабанные вакуум-фильтры, фильтр-прессы, сепараторы разных конструкций и т. д.

На следующей стадии ставится задача получения антибиотика в виде индивидуального вещества. При этом необходимо учитывать довольно высокую лабильность многих антибиотиков, что ограничивает условия их выделения.

Принцип экстракции органическим растворителем используется при очистке таких важнейших антибиотиков, как пенициллин, эритромицин и некоторых других. При переходе в органический растворитель соответствующие антибиотики освобождаются сразу от многих примесей. Варьируя рН и меняя таким образом растворимость антибиотика в воде (точнее, в буферном растворе), можно многократно переводить антибиотик из одной фазы в другую, освобождаясь каждый раз от определенного количества примесей.

Один из примеров окончания процесса при экстракционном методе выделения и очистки — извлечение пенициллина из органического растворителя бутилацетата, где он находится в виде свободной кислоты: к бутилацетату добавляют насыщенный вод-

ный раствор ацетата калия. Выпадает калиевая соль пенициллина. Кристаллы промывают бутанолом и высушивают.

Также при очистке антибиотиков широко используются ионообменные смолы (катиониты и аниониты). Особое значение эти сорбционные методы сыграли в свое время в решении проблемы получения в высокоочищенном виде аминогликозидных антибиотиков — стрептомицина и других, имеющих свойства оснований. Аминогликозиды слаборастворимы в органических растворителях, и вследствие этого экстракционный метод применительно к ним не может быть использован. В производстве стрептомицина могут быть, например, успешно использованы карбоксильные катиониты в натриевой форме. Десорбция осуществляется раствором серной кислоты. После дополнительной процедуры, связанной с пропусканием стрептомицина через сульфокатионит (для удаления ионов натрия), получают сульфат стрептомицина.

Помимо традиционных экстракционных и сорбционных методов при выделении и очистке антибиотиков все большее значение приобретает комплекс приемов, объединяемых под названием мембранной технологии.

При обезвоживании препаратов антибиотиков в зависимости от свойств антибиотика используют лиофильную или распылительную сушку. В последнем случае раствор антибиотика распыляется из форсунок до частиц диаметром 5—25 мкм в токе нагретого до 160 °С воздуха. Сушка происходит в течение долей секунды. Затем препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

Так как биосинтез антибиотиков ведется в асептических условиях, то при выделении, очистке и получении лекарственных форм также соблюдаются максимально возможные предосторожности против контаминации. Тем не менее проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности препаратов для наружного применения остается одной из самых сложных для производства как антибиотиков, так и лекарственных средств в целом. Поэтому при обнаружении расфасованных, нестерильных серий препаратов иногда применяют метод радиационной стерилизации, учитывая нестандартность сложившейся ситуации. Определенные виды ионизирующей радиации допустимы для стерилизации лекарственных средств. Соответствующие указания имеются в официальных фармакопейных документах.

Хорошо известно, что ионизирующей радиацией стерилизуются хирургические инструменты, резиновые перчатки, шприцы одноразового пользования и т.п. Следует подчеркнуть, что при такой стерилизации (в минимальных дозах) загрязняющие препарат микроорганизмы теряют способность к размножению и гибнут вследствие повреждения ДНК (происходят сшивки между нуклеотидами, а также разрывы ДНК). При термической стерили-

зации в отличие от радиационной происходит денатурация многих белков клетки, в результате чего ее повреждения становятся более многочисленными; при стерилизации путем мембранной фильтрации микробные клетки не погибают, а удаляются из лекарственного препарата.

Как уже отмечалось, радиационная или лучевая (жаргонный термин) стерилизация используется на отдельных производствах ввиду объективных трудностей при внедрении технологии получения нового препарата, а иногда и по экономическим причинам. Установлено, что стерилизующая доза ионизирующего облучения составляет 2,5 Мрад (1 рад = 100 эрг/г).

Специалист с высшим фармацевтическим образованием должен занимать четкую и грамотную позицию в отношении бытующей радиофобии, выражающейся в том, что радиационная стерилизация может якобы привести к наведенной радиоактивности облученных препаратов. Разрешенные для стерилизации лекарств гамма-лучи изотопа кобальта ( $^{60}\text{Co}$ ) и быстрые электроны с энергией не выше 5 МэВ, получаемые на ускорителях, не могут вызвать наведенной радиации у обработанных ими препаратов независимо от поглощенной дозы облучения, так как неспособны расщепить атомное ядро.

Гамма-лучи ( $^{60}\text{Co}$ ) в воздухе распространяются на несколько десятков метров, в воде — на несколько десятков сантиметров, в свинце — на несколько сантиметров. На промышленной установке защитный слой воды, окружающий герметичную стерилизационную камеру, где находятся стандартные стержни с  $^{60}\text{Co}$  длиной до 1 м и упаковки со стерилизуемым лекарственным препаратом, должен составлять несколько метров. Стерилизационная камера снабжена автоматизированным дистанционным управлением, позволяющим вдвигать в нее и удалять из нее стержни с кобальтом, разъединяя таким образом источник облучения и упаковки со стерилизуемым препаратом. Режим стерилизации обычно подбирается с таким расчетом, чтобы стерилизующая доза (2,5 Мрад) набиралась облучаемым препаратом примерно за сутки. При этом следует иметь в виду, что период полураспада  $^{60}\text{Co}$  составляет около пяти лет. Естественно, что работа на установках с радиоактивным кобальтом постоянно требует особых мер предосторожности.

Установка, где для стерилизации используются быстрые электроны, во многом принципиально отличается от рассмотренной. Проникающая способность электронов, разогнанных до разрешаемого для стерилизации лекарств показателя, невелика. Электроны не могут «пронизать» несколько рядов флаконов или ампул. Чтобы набрать стерилизующую дозу в 2,5 Мрад, требуются секунды или доли секунд. Поэтому флаконы подают по одному с помощью транспортера к соответствующему «окошку», через которое

в них набирается стерилизующая доза. После выключения такая стерилизационная установка становится абсолютно безопасной в радиационном отношении.

Значительный опыт по использованию радиационной стерилизации биотехнологических препаратов накоплен при обработке антибиотиков: стерилизации подвергались расфасованные по флаконам лиофильно высушенные субстанции, соли антибиотиков и их препараты с разными наполнителями.

В ряде случаев препараты искусственно заражали микроорганизмами разных видов и их спорами. Стерилизующая доза в 2,5 Мрад обуславливала гарантированную стерильность. При этом облученные препараты — большинство антибиотиков (природные и полусинтетические пенициллины, аминогликозиды, тетрациклины и ряд других) сохраняли активность и удовлетворяли фармакопейным тестам. Исключение составляли полиены, т. е. структуры с сопряженными двойными связями (например, нистатин, который при облучении заметно терял активность).

При сравнении их с необлученными препаратами можно было выявить некоторые отличия: белые (бесцветные) порошки теряли «блестящий» оттенок, приобретая матовый, а порошки красного (актиномицины) и желтого (тетрациклины) цвета тускнели.

Под влиянием облучения изменяется и кристаллическая решетка стекла. Оно темнеет, мутнеет и приобретает, таким образом, непривлекательный с коммерческой точки зрения вид, хотя полностью сохраняет свои функциональные качества. Потемнение обратимо, но при комнатной температуре исчезает медленно (в течение нескольких месяцев). Не выпускать облученные препараты в течение такого срока в аптечную сеть — значит сократить для потребителя срок годности облученных серий. Теоретически для изготовления флаконов и ампул можно использовать стекло с некоторыми редкоземельными элементами, однако это стекло слишком дорого для изготовления из него сотен миллионов единиц стандартных изделий.

## **7.4. Механизмы действия антибиотиков**

### **7.4.1. Классификация механизмов**

Изучение механизмов действия таких высокоактивных и вместе с тем избирательных ингибиторов метаболизма, как антибиотики, связано с определенными проблемами, так как помимо первичного нарушения метаболизма, вызываемого непосредственно реагированием антибиотика с его внутриклеточной мишенью, наступает «каскад» вторичных реакций, ведущих к бактериостатическому или бактерицидному, а иногда и лигическому эффектам.

Применяемые в медицине антибиотики по механизму действия дифференцируются на следующие основные группы:

- ингибиторы образования клеточной стенки бактерий;
- ингибиторы белкового синтеза из бактерий;
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот;
- ингибиторы функций цитоплазматической мембраны микробной клетки.

#### **7.4.2. Ингибиторы образования клеточной стенки бактерий**

Ингибирование происходит вследствие избирательного подавления активности тех или иных ферментов, включенных в многоэтапный синтез основного полимера клеточной стенки — пептидогликана. В число ингибиторов синтеза пептидогликана входят цефалоспорины и другие вещества бета-лактамной структуры.

Пептидогликан, в соответствии со своим названием, состоит из принципиально разных частей. Его длинные параллельные гликановые нити построены из перемежающихся остатков двух сахаров: N-ацетилглюкозамина и мурамовой кислоты. Мурамовая кислота (ее название — от греч. *муриς* — стена, так как впервые она была обнаружена в клеточной стенке бактерий) является эфиром N-ацетилглюкозамина и молочной кислоты. Пептидная часть полимера состоит из коротких пептидных цепочек (трех—пяти аминокислотных остатков), отходящих от остатков мурамовой кислоты в гликане.

Пептидные цепочки, ответвляющиеся таким образом от параллельных гликановых нитей, замыкаются пептидной связью. Между параллельными нитями гликана образуются поперечные пептидные «мостики» и формируется заверченный или целостный пептидогликан, который жесткой «сетью» охватывает всю бактериальную клетку (рис. 14).

Грамположительные бактерии имеют толстый слой пептидогликана; у грамотрицательных он гораздо тоньше.

Бета-лактамные антибиотики (все без исключения) во время биосинтеза пептидогликана подавляют катализируемое ферментами замыкание пептидных цепочек в пептидные мостики. Гликановые нити остаются разъединенными; формирования непрерывной сети пептидогликана, охватывающей клетку, не происходит. Это означает, что пептидогликан теряет свои свойства, жизненно необходимые бактериальной клетке. Бактериальные клетки делятся, увеличиваются в размерах, вновь делятся и т. д., а это требует постоянного синтеза пептидогликана и «вставки» вновь синтезированных фрагментов в полимер, который для этого «разрезается» специфическими гидролазами пептидогликана. В нор-

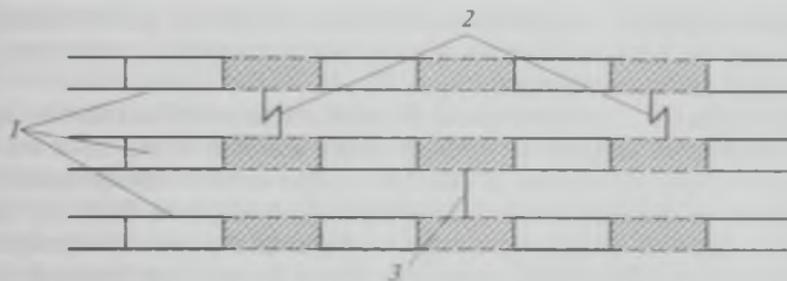


Рис. 14. Фрагмент структуры пептидогликана:

1 — гликан; 2 — незамкнутые пептидные цепочки; 3 — пептидные мостики

мальных условиях в клетке сохраняется баланс между действием ферментов, гидролизующих пептидогликан и синтезирующих его.

В присутствии бета-лактамовых антибиотиков этот баланс нарушается. Прекращается синтез пептидогликана, но его ферментативный гидролиз продолжается и даже усиливается из-за того, что клеточная стенка теряет некоторые компоненты, «сдерживающие» их активность путем обратимого блокирования гидролаз. Гидролизуются и гликановые нити, и пептидные мостики. Механизм антибиотической активности бета-лактамов связан с теми ферментами — мишенями, которые не имеют аналогов в животной клетке. В ней нет ни жесткой клеточной стенки, ни пептидогликана, ни, соответственно, ферментов его синтеза. Таким образом, бета-лактамы не могут быть токсичны для организма человека, а если у некоторых из них при определенных условиях выявляются токсические свойства или аллергенность, то это никак не связано с механизмом их антибактериального действия.

### 7.4.3. Ингибиторы белкового синтеза у бактерий

К ним относятся все аминогликозиды (стрептомицин, гентамицин и др.), а также тетрациклины, эритромицин, левомицетин и некоторые другие антибиотики. Эти антибиотики реагируют с рибосомами бактерий, в результате чего синтез белка в рибосомных системах прекращается. Цитоплазматические рибосомы животной клетки реагируют с ними гораздо слабее или вообще не связывают указанные антибиотики. Рибосомы митохондрий животной клетки (близкие по свойствам к бактериальным) защищены от перечисленных антибиотиков митохондриальной мембраной. Два этих обстоятельства и создают возможность использования этих антибиотиков в клинике, т. е. делают их малотоксичными для человека.

Существуют антибиотики, реагирующие с рибосомами и микроорганизмов, и животной клетки. В медицинской практике они

не используются, но производятся как реагенты для биохимических и молекулярно-биологических исследований (например, антибиотик циклогексимид).

Как правило, ингибиторами белкового синтеза являются бактериостатические вещества. Прекращение синтеза белка само по себе не ведет к гибели клетки. В опытах *in vitro* клетки прекращают размножение и постепенно, очень медленно отмирают. Если же антибиотик вызывает бактериостазис в макроорганизме, то прекратившие размножение клетки уменьшаются в количестве гораздо быстрее, так как уничтожаются защитными силами организма хозяина.

Среди ингибиторов белкового синтеза оказались и бактерицидные вещества — большая группа антибиотиков аминогликозидов. Последние реагируют с малой рибосомной субъединицей и связываются именно с тем ее местом, где происходит узнавание кодона информационной РНК антикодонами транспортных РНК. В результате нарушается точность узнавания. В синтезируемый в это время рибосомной (точнее полисомной) системой белок включаются аминокислоты, не соответствующие последовательности аминокислот в этом белке, закодированной в информационной РНК. Это явление получило название «нарушение точности передачи генетического кода на стадии трансляции».

Хотя аминогликозиды быстро прекращают белковый синтез, особенность места их связывания на рибосоме приводит к тому, что до прекращения работы рибосомных систем с них успевает «сойти» некоторое количество белковых молекул с неправильной последовательностью аминокислот. Эти белки, получившие название «летальных», включаются в цитоплазматическую мембрану бактериальной клетки и нарушают ее молекулярную организацию. Клетка начинает терять низкомолекулярные метаболиты, коферменты, неорганические ионы. Все это ведет к дисбалансу ферментативных реакций и гибели клетки.

#### **7.4.4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот**

К этой группе антибиотиков (антрациклины, блеомицин, оливомицин и др.) относится ряд ДНК-тропных противоопухолевых веществ. Они подавляют синтез РНК, а некоторые из них — синтез и ДНК, и РНК, поскольку связываются с ДНК (последняя играет роль матрицы как при репликации ДНК, так и при транскрипции, т. е. синтезе РНК).

Такие антибиотики всегда заметно токсичны, потому что связываются с ДНК любого происхождения — бактериального, вирусного, растительного, животного. Возможность их применения как цитостатиков в онкологической практике обусловлена тем, что клетки опухолей растут (размножаются) быстрее клеток нор-

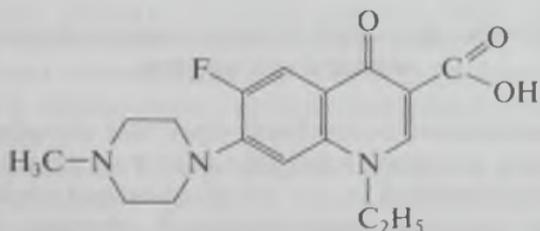
мальной ткани, и антибиотический эффект на опухоли выражается сильнее.

В инфекционной клинике ДНК-тропные препараты не принято употреблять ввиду их токсичности и наличия в распоряжении лечащего врача ряда более избирательно действующих антимикробных антибиотиков.

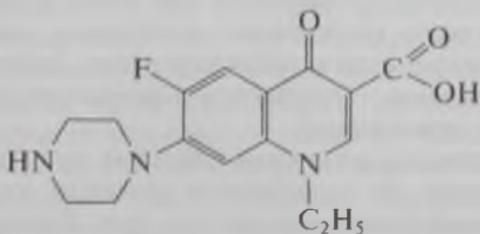
Ингибиторами синтеза нуклеиновых кислот могут быть не только ДНК-тропные антибиотики. Антибиотик рифампицин — ингибитор синтеза РНК, связывается не с ДНК-матрицей, а с ферментом — РНК-полимеразой, причем связывается избирательно: только с ферментом из бактерий, а не из животных клеток. Рифампицин применяется для лечения ряда инфекций, в том числе туберкулеза, так как может длительно вводиться человеку без проявления токсичности.

К числу ингибиторов ферментов, участвующих в синтезе и превращениях нуклеиновых кислот, относятся и новые синтетические антибактериальные вещества — фторхинолоны, внедряемые в настоящее время в лечебную практику.

Эти препараты обладают широким антибактериальным спектром действия. В качестве примера можно привести пefлоксацин (абактал):



преимущественно влияющий на грамотрицательные бактерии и норфлоксацин (нолицин):



отличающийся от первого отсутствием метильной группы в пиперазинильном ядре и более высокой антибактериальной активностью.

Отметим, что есть данные о влиянии фторхинолонов на развитие хрящевой ткани (в связи с этим применение фторхинолонов в детской клинике не рекомендуется). Они не являются продуктами биотехнологического производства. Вместе с тем, учитывая их практическую важность, а также возможность получения ковалентно связанных цефалоспоринов с фторхинолонами, целесообразно кратко рассмотреть механизм их действия.

Фторхинолоны являются ингибиторами фермента ДНК-гиразы. Функция этого фермента — введение в кольцевую ДНК «супервитков» или «скручивание» ее молекулы. Молекула ДНК становится более компактной, а также приобретает «внутреннее напряжение»: при разрезании ее рестриктазами комплементарные нити быстро расходятся, чем облегчается действие ДНК- и РНК-полимераз при репликации ДНК или транскрипции (синтезе РНК на ДНК-матрице). Фермент ДНК-гираза состоит из нескольких субъединиц и катализирует несколько реакций, в том числе требующих энергии при введении в ДНК супервитков. Фторхинолоны подавляют функции так называемой субъединицы А. Бактериальная ДНК-гираза относится по классификации ферментов к ДНК-топоизомеразам. В реакции с ДНК-топоизомеразами животной клетки фторхинолоны не вступают.

#### **7.4.5. Ингибиторы функций цитоплазматической мембраны микробной клетки**

Среди применяемых в лечебной практике антибиотиков с таким механизмом действия наиболее известны противогрибковые антибиотики полиеновой (т.е. с сопряженными двойными связями) структуры: нистатин, амфотерицин В, леворин. Они реагируют со стеролами в мембране патогенных грибов и дрожжей, в результате чего образуются поры, через которые «вытекают» низкомолекулярные метаболиты, и клетка гибнет. Эргостерол (основной стерол в мембране грибов и дрожжей) реагирует с полиеновыми антибиотиками быстрее и при более низких концентрациях, чем холестерол (холестерин) мембраны животных клеток. Эта реакция лежит в основе избирательного действия полиенов. Тем не менее полиены — препараты в основном только наружно-го и полостного применений.

Если рассматривать механизм действия антибиотиков на молекулярном уровне, то выявляются различия уже между представителями одной и той же группы, т.е. близкого механизма действия.

Например, разные ингибиторы белкового синтеза реагируют с разными субъединицами рибосом и с разными местами на этих субъединицах. При этом подавляются, естественно, разные реак-

ции такого сложного многоэтапного процесса, как белковый синтез. Указанное обстоятельство объясняет причину применения в клинике не одного, а разных ингибиторов белкового синтеза, поскольку на молекулярном уровне механизм их действия неодинаков.

Второй пример относится к беталактамным антибиотикам. Мишенями в клетке для пенициллинов и цефалоспоринов являются ферменты транспептидазы и D,D-карбоксипептидазы, которые катализируют последние реакции сложного процесса синтеза полимера клеточной стенки бактерий — пептидогликана. Активный центр этих ферментов имеет сродство к остаткам аминокислот, которыми заканчиваются пептидные цепочки.

Почти у всех бактерий последняя и предпоследняя аминокислота в пептидной цепочке — D-аланин. Беталактамное кольцо в молекуле антибиотиков, подавляющих активность транспептидаз и D,D-карбоксипептидаз, имеет сходство с одной из стереоформ, которые принимают попавший в активный центр свободный конец пептидных цепочек, являющийся D-аланил-D-аланином.

Попав в активный центр ферментов-мишеней, беталактамный антибиотик после расщепления своего беталактамного кольца ковалентно связывается с ферментом, ацилируя одну из гидроксильных групп в активном центре. Бактериальная клетка содержит несколько разных по молекулярной массе транспептидаз, например, участвующих в элонгации (удлинении, росте палочковидных клеток) пептидогликана или в формировании полюсов клеток, или в образовании пептидогликановой перегородки при делении клетки.

Сродство у разных беталактамных молекул к разным транспептидазам, получившим название «пенициллинсвязывающие белки» (Penicillin bounding proteins): PBPs1, PBPs2, PBPs3 и др., неодинаково. Поэтому фактически неодинаков и механизм действия разных беталактамов. Все это непосредственно сказывается на лечебных свойствах беталактамных антибиотиков.

Важность сведений о механизме действия антибиотиков, в частности беталактамов, для лечащего врача или фармацевта наглядно демонстрируется тем, что в самые короткие по тексту рекламные материалы, рассчитанные на широкие круги практических работников, зарубежные фирмы нередко вставляют строку: новый беталактам реагирует с таким-то «пенициллинсвязывающим белком» (конкретным PBPs). К сожалению, наши специалисты мало знакомы с этим критерием, определяющим продолжительность антибиотического эффекта препарата, переносимость его определенными категориями больных и другие важные качества.

Изложенное свидетельствует о необходимости знания врачами и фармацевтами основ механизмов действия антибиотиков.

## 7.5. Антибиотикорезистентность

### 7.5.1. Молекулярные механизмы

Выделяют четыре основных механизма резистентности антибиотиков:

- изменение конформации внутриклеточной мишени для данного антибиотика. Антимикробный агент проникает в клетку, но его мишень (транспептидаза пептидогликана, рибосома, ДНК-гираза и т.д.) его не «связывает» и подавления метаболизма не происходит;

- уменьшение проницаемости оболочки микробной клетки для антибиотика. Антибиотик хотя и проникает в клетку, но в незначительных количествах;

- появление в оболочке клетки системы активного «выброса», проникающего в клетку антибиотика, вследствие чего его внутриклеточная концентрация не может оказываться высокой;

- ферментативная инактивация антибиотика защитными ферментами. Этот последний тип защиты микробной клетки для нее наиболее эффективен и является очень частой причиной неудач антибиотикотерапии. Ферментативной инактивации подвергаются все важнейшие группы антибиотиков: пенициллины и цефалоспорины, аминогликозиды, эритромицин, а также некоторые другие антибиотики.

Формирование в бактериальной клетке указанных защитных механизмов обусловлено появлением «генов резистентности» не только в хромосоме. Большое внимание привлекают и внехромосомные (плазмидные) генетические элементы микробной клетки — кольцевые молекулы ДНК, имеющие размер в сотни раз меньший, чем хромосомы. Плазмиды, несущие гены резистентности к антибиотикам, получили название R-плазмид (более старый термин — R-факторы).

Основная опасность плазмидной резистентности в генетическом плане состоит в том, что плазмиды передаются из клетки в клетку конъюгацией (аналог полового процесса) — без деления клетки, однако плаزمида при этом реплицируется. Таким образом, одна клетка может быстро передать резистентность большому количеству клеток. Этому способствует и многокопийность плазмид некоторых типов. Возник даже термин «инфекционная резистентность», т.е. «заражение резистентностью» одних клеток от других.

Плазмидная резистентность редко встречается лишь в случае первого из перечисленных выше механизмов резистентности. Причиной антибиотикорезистентности, вызванной изменением конформации внутриклеточной мишени, являются спонтанные мутации в структурном гене, определяющем структуру той мишени-макромолекулы, с которой «связывается» антибиотик. В результа-

те таких мутаций меняется аминокислотная последовательность в ферменте или в рибосомном белке, что ведет и к изменению конформации молекулы, перестающей связывать антибиотик.

Мутировавшие хромосомные гены могут быть согласно принятому термину «мобилизованы», т. е. оказаться в плазмидах и быть переданы в другие клетки за счет механизмов распространения плазмид. Однако переноса резистентности при этом в большинстве случаев не происходит. В новой клетке-хозяине будут работать (экспрессироваться) как свои (хромосомные), так и чужие (плазмидные) структурные гены, и в результате часть мишеней для антибиотика будет «чувствительной» к нему — будет его связывать, а часть — резистентной. В таких случаях антибиотикочувствительность доминирует над антибиотикорезистентностью.

Именно поэтому при выявлении резистентности за счет изменения конформации мишеней гены резистентности оказываются локализованными в хромосомах. Исключения здесь связаны с теми случаями, когда изменения конформации мишени происходят не вследствие мутации в ее структурном гене, а в результате ферментативной модификации уже синтезированной мишени. Ген фермента, модифицирующего мишень, может иметь не только хромосомную, но и плазмидную локализацию.

Особенно часто плазмидная локализация генов резистентности встречается при ферментативной инактивации антибиотиков. Иногда в одной плазмиде оказываются локализованными несколько генов, кодирующих ферменты, воздействующие на антибиотики разных групп. Отсюда возникло понятие полирезистентности микроорганизмов. Полирезистентные штаммы возбудителей инфекций представляют серьезную проблему в инфекционной клинике.

Мишени, на которые направлены антибиотики, располагаются или в цитоплазматической мембране (ферменты биосинтеза пептидогликана), или в самой цитоплазме (рибосомы, ферменты биосинтеза белка, биосинтеза нуклеиновых кислот и т. д.). Чтобы достигнуть мишени, антибиотик должен проникнуть через внешнюю мембрану и клеточную стенку, а иногда через цитоплазматическую мембрану (если мишени находятся в цитоплазме). Резистентность к антибиотикам нередко обусловлена особыми изменениями в оболочке бактериальной клетки. Под оболочкой подразумевается совокупность, состоящая из внешней мембраны (только у грамотрицательных бактерий), клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

Клеточная стенка, хотя и является жесткой «решетчатой» структурой, построенной из пептидогликана, не может препятствовать проникновению небольших молекул антибиотиков.

За последние десятилетия неоднократно отмечалось возрастание роли грамотрицательной микрофлоры в инфекционной пато-

логии. Это относится к инфекционным осложнениям при хирургическом вмешательстве, к урологическим инфекциям и т. д. Большую роль в инфекционном процессе играют грамотрицательные, неферментирующие бактерии.

Возрос интерес к присущей всем этим микроорганизмам внешней мембране. Основные компоненты последней: липополисахариды, липопротеиды, фосфолипиды и специфические белки — порины (от слова *пора*); тримеры этих белков формируют поры или водные каналы, через которые из внешней среды в клетку диффундируют низкомолекулярные питательные вещества (аминокислоты, небольшие пептиды, моно-, ди-, трисахара, неорганические ионы и т. п.).

Пориновые каналы «осциллируют», т. е. находятся то в открытом, то в закрытом состоянии. В бедной среде канал в открытом состоянии находится дольше, чем в богатой среде. Этими же пориновыми каналами «пользуются» и антибиотики при проникновении в клетку.

Антибиотики, быстро проникающие через водные каналы поринов, относятся к препаратам широкого спектра действия — подавляют рост и грамотрицательных, и грамположительных бактерий. Антибиотики, молекула которых имеет большие размеры, например, эритромицин, через пориновые каналы не проникают и поэтому не эффективны против грамотрицательных бактерий, хотя высокоактивны против грамположительных. Отметим, что на проникновение молекулы влияют не только ее размеры, но и стерические особенности, включая те, которые обуславливают ее «гибкость». Учитывается не только диаметр водных каналов, но и свойства формирующих их белков-поринов. Существуют катионоселективные и анионоселективные каналы. Применительно к антибиотикам это означает, что в случае бактерии, у которой во внешней мембране преобладают катионоселективные каналы, в клетку лучше будут проникать антибиотики основной природы.

Примером является бензилпенициллин. Его относительно небольшая молекула очень слабо проникает через пориновые каналы кишечной палочки, так как у этого организма, как и у многих других грамотрицательных бактерий, пориновые каналы катионоселективны.

В то же время у относительно небольшой группы грамотрицательных кокков пориновые каналы анионоселективны, что способствует проникновению в их клетку бензилпенициллина. Отсюда следуют общеизвестные врачам факты: бензилпенициллин непригоден для лечения кишечных инфекций, но высокоактивен при лечении гонореи. Катионо- и анионоселективность пориновых каналов определяется средой обитания вида бактерии. Так, катионоселективность пориновых каналов у кишечной палочки позволяет

этой, обитающей в кишечнике, бактерии избежать неблагоприятного действия поступающих в кишечник желчных кислот.

Не только размеры молекулы антибиотика, стерические особенности и заряд определяют возможность и скорость ее проникновения через пориновые каналы. Так как каналы заполнены водой, большое значение имеет степень гидрофобности молекулы — при высокой гидрофобности проникновение антибиотика заметно снижается.

Кроме пориновых каналов — главного пути проникновения антибиотиков через барьер внешней мембраны в клетку — существуют и другие возможности транспорта:

- за счет специфической системы первичного метаболита, если молекула антибиотика сходна по структуре или является аналогом метаболита;

- за счет липидных участков внешней мембраны бактерий, если это липофильные вещества (в том числе и антибиотики).

Некоторые антибиотики нуклеозидной природы используют специфические системы транспорта нуклеозидов через внешнюю мембрану. Например, был получен полусинтетический цефалоспорин с катехолоподобной группировкой, который в соответствии с размерами своей молекулы не должен был проникать через пориновые каналы. Однако благодаря наличию вышеуказанной группировки, он образовывал комплексы с ионами железа и проникал в грамотрицательную клетку, используя специфическую систему транспорта железа. Иными словами, данный цефалоспорин, имитируя переносчик железа, преодолевал барьер мембраны тем же путем, что и переносчик. Вместе с тем антибактериальная активность определенных полусинтетических липофильных пенициллинов и тетрациклинов обусловлена их проникновением через липидные участки внешней мембраны.

Изучение механизмов антибиотикорезистентности штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных из клинического материала, показало, что нередко резистентность обусловлена уменьшением количества пориновых белков в мембране, и, соответственно, количества пориновых каналов. В результате проникновение антибиотиков в клетку замедляется.

Еще один механизм резистентности связан с изменением уже самих пориновых белков и сужением диаметра пориновых каналов.

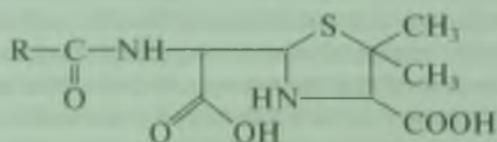
В обоих случаях резистентность является неспецифической и ослабляется, хотя и в разной степени, при проникновении в клетку антибиотиков, диффундирующих через пориновые каналы. Но полного прекращения проникновения антибиотиков в клетку при указанных механизмах резистентности произойти не может, поскольку пориновые каналы жизненно необходимы для транспорта в нее питательных веществ, а их полное исчезновение в мемб-

ране привело бы к гибели клетки. Показано, что уровень резистентности бактерий за счет изменений в их внешней мембране ниже, чем, например, при наличии защитных, инактивирующих антибиотики ферментов.

Однако среди штаммов, выделяемых в клинике, часто обнаруживаются такие, у которых выявляются сразу два механизма резистентности: ослабление проникновения антибиотика через внешнюю мембрану и ферментативная инактивация антибиотика. В этом случае уровень антибиотикорезистентности особенно высок.

Одна из основных причин, вызывающих потребность в создании и внедрении в медицинскую практику новых бета-лактамовых антибиотиков, — распространение среди патогенных микроорганизмов способности продуцировать ферменты, катализирующие расщепление бета-лактамового кольца у пенициллинов и цефалоспоринов, внедренных в медицинскую практику. Они получили название пенициллиназ и цефалоспоринаяз в соответствии с их субстратной специфичностью и избирательностью действия на пенициллины или цефалоспорины.

Ферментативное расщепление (гидролиз) бета-лактамового кольца ведет к полной инактивации бета-лактамового антибиотика. Это было показано на примере бензилпенициллинов еще в 1940-х гг. Э.Чейном, впервые очистившим пенициллин. Продукт ферментативного расщепления бензилпенициллина — пенициллоиновая кислота:



полностью не активна. Это легко объяснимо, так как механизм действия бета-лактамовых антибиотиков связан именно с расщеплением бета-лактамового кольца и ацилированием гидроксильной группы серина в активном центре ферментов-мишеней. В случае же пенициллиназ и цефалоспоринаяз бета-лактамовое кольцо также расщепляется, и антибиотик быстро освобождается из активного центра этих ферментов с присоединением атома водорода и гидроксила.

В настоящее время пенициллиназы и цефалоспоринаязы составляют обширную группу одинаковых по механизму действия, но различающихся по субстратной специфичности ферментов, объединенных под общим названием «бета-лактамазы». Известно, что бета-лактамазы произошли от транспептидаз и D,D-карбокسينепти-

даз пептидогликана, т. е. из ферментов-мишеней в бактериальной клетке, необратимо инактивируемых бета-лактамами.

Гены бета-лактамаз, особенно цефалоспориназ, локализируются как в бактериальной хромосоме, так и в плазмидах, которые не находятся под столь строгим регуляторным контролем в клетке, как хромосомный генетический материал, и могут существовать во многих копиях, что повышает количество генов бета-лактамаз и уровень самих ферментов в клетке. Между хромосомами и плазмидами нередко происходит обмен генами, в частности бета-лактамаз.

Очень важно, что гены бета-лактамаз, локализованные в плазмиде, могут передаваться при конъюгации вместе с плазмидой в другую клетку. Это означает, что плазмидные гены быстро распространяются по клеточной популяции, для чего не нужно даже деления клеток. Возможен и межвидовой перенос плазмидных генов бета-лактамаз, например, из клетки кишечной палочки в клетку сальмонеллы и т. п.

Бета-лактамазы могут быть как конститутивными (у одних штаммов бактерий), так и индуцибельными (у других штаммов). Иногда в одной клетке могут оказаться две разных бета-лактамазы, причем одна из них образуется постоянно, т. е. конститутивно, тогда как другая обнаруживается, когда клетка попадает в среду с бета-лактаманым антибиотиком.

Способность к индукции бета-лактамаз является отрицательным свойством бета-лактаманых антибиотиков с позиций медицинской практики, поэтому новые бета-лактаманые структуры оцениваются при изучении их свойств не только на устойчивость к ферментативной инактивации, но и на способность индуцировать бета-лактамазы. Последняя зависит от того, с какой мишенью, т. е. с каким из РВРs связывается бета-лактаманый антибиотик, так как именно РВРs являются «сенсорами», запускающими сложный механизм индукции бета-лактамаз.

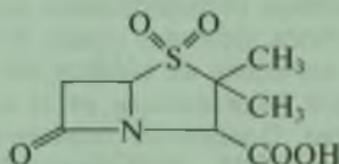
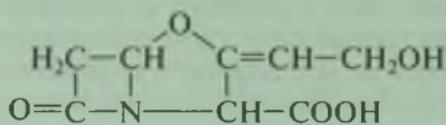
Схематически этот механизм выглядит следующим образом: бета-лактаманый антибиотик, находящийся в среде, реагирует с одним из белков, принадлежащих к РВРs. Его взаимодействие с белком ведет к изменению конформации этого белка. Меняются биофизические параметры белка, сигнал об этом передается на специальный трансмембранный белок, молекула которого пересекает цитоплазматическую мембрану и выходит на ее внешнюю поверхность. Далее сигнал последовательно передается на первый и второй цитоплазматические белки, включенные в систему индукции ферментов и, наконец, на белок-репрессор, уже непосредственно регулирующий экспрессию именно гена бета-лактамазы. В результате репрессор перестает подавлять экспрессию этого гена. Соответственно, начинаются его экспрессия и синтез молекул информационной РНК, которая далее постуает в рибо-

сомную систему, где на ней как на матрице синтезируются молекулы бета-лактамазы.

Система индукции бета-лактамаз специфична: на своем начальном участке РВРs являются первичными сенсорами в отличие от других белков мембраны, а на конечном участке — белок репрессор специфичен только для гена бета-лактамазы. Среди бета-лактаманых антибиотиков обнаружены как очень активные индукторы бета-лактамаз, так и малоактивные, которые более предпочтительны для использования в клинике.

Ввиду несомненного сходства многих бета-лактамаз с их ферментами-мишенями был предпринят поиск специфических ингибиторов бета-лактамаз. Среди природных бета-лактамов и продуктов их химической трансформации были отобраны ингибиторы бета-лактамаз, воздействующие и на бета-лактамазы, и на транспептидазы пептидогликана, т.е. обладающие антибактериальной активностью.

Практическая ценность ингибиторов бета-лактамаз обусловлена тем, что их используют вместе с бета-лактаманых антибиотиками, которые чувствительны к бета-лактамазам. Ингибиторы бета-лактамаз защищают эти антибиотики от ферментативной инактивации. Широкую известность получили такие ингибиторы, как клавулановая кислота (слева) и сульбактам (справа):



и некоторые другие. Однако необходимо учитывать, что любой конкретный ингибитор не может воздействовать на все многочисленные типы бета-лактамаз. Спектр действия каждого ингибитора ограничен бета-лактамазами лишь нескольких типов, распространенных среди бактерий.

За рубежом выпускаются смесь полусинтетического пенициллина (ампициллина) с сульбактамом (2:1) под фирменным названием «уназин», а также препарат сультамициллин — химическое соединение ампициллина с сульбактамом. Получил практическое применение и препарат аугментин, являющийся смесью амоксициллина (полусинтетического пенициллина) с клавулановой кислотой. При подборе комбинаций ингибиторов бета-лактамаз с бета-лактаманых антибиотиками важно иметь в виду и соблюдать следующее условие: фармакокинетика ингибитора и антибиотика должна быть сходной. Иными словами, их распределе-

ние по органам и тканям организма, пути выведения (например, преимущественно с мочой или с желчью), время циркуляции в организме должны быть близкими. Ингибитор не сможет выполнять свою защитную роль, когда его концентрация в местах локализаций антибиотика окажется низкой или если он будет выводиться из организма гораздо быстрее, чем антибиотик.

Ферментативная инактивация аминогликозидов — наиболее часто встречающийся механизм резистентности к этим антибиотикам. Ферменты, инактивирующие аминогликозиды, существенно отличаются от беталактамаз. Во-первых, они не являются гидролазами, т. е. их активность выявляется не просто в водной среде, а требует для своего проявления более сложной реакционной смеси. Во-вторых, если часть беталактамаз — грамположительных микроорганизмов относится к внеклеточным ферментам, что облегчает их обнаружение, то ферменты, катализирующие инактивацию аминогликозидов, практически всегда имеют только внутриклеточную локализацию.

Ферменты, инактивирующие аминогликозидные антибиотики, относятся по современной номенклатуре и классификации ферментов к классу трансфераз. Это означает, что они не расщепляют молекулу аминогликозидных антибиотиков, а переносят (англ. *transfer*) на нее определенные фрагменты, катализируя замещение гидроксильных групп у аминогликозидов остатками фосфорной или адениловой кислоты, а аминогруппы аминогликозидов замещают остатками уксусной кислоты. Таким образом, инактивирующие аминогликозиды ферменты включают фосфотрансферазы, аденилтрансферазы, ацетилтрансферазы. Важнейшее свойство данных ферментов заключается в том, что каждый фермент катализирует замещение только одной функциональной группы в молекуле аминогликозидного антибиотика. Однако обычно этого бывает достаточно для потери антибиотиком своей активности.

Донором переносимых на аминогликозидные антибиотики остатков фосфорной и адениловой кислоты является широко известное макроэргическое соединение аденозин-3-фосфорная кислота (АТФ). В реакционной смеси АТФ должна присутствовать; вне клетки (в среде) ферменты не могут играть защитную роль, так как для проявления их активности необходима АТФ в высокой концентрации. Для проявления активности аминогликозид-ацетилтрансфераз необходимо присутствие в реакционной смеси уксусной кислоты, кофермента А и АТФ (или, вместо двух первых компонентов, одного ацетилкофермента А).

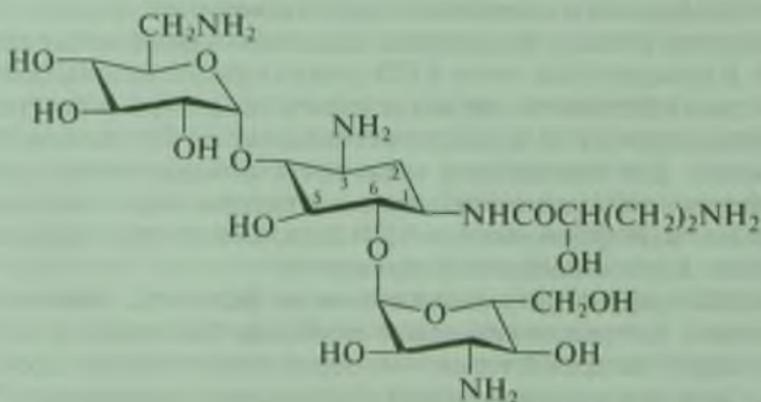
Воздействующие на аминогликозиды ферменты обычно локализованы в цитоплазматической мембране бактерий, а в случае грамотрицательных бактерий — в периплазматическом пространстве — между клеточной стенкой и внешней мембраной. Такая

локализация ведет к инактивации аминогликозидов во время их проникновения в клетку и защищает от них мишени (рибосомы).

Гены ферментов, катализирующих фосфорилирование, ацетилирование или аденилирование аминогликозидов, как правило, локализованы у бактерий в R-плазмидах. Локализация таких генов в бактериальных хромосомах встречается крайне редко. Таким образом, и здесь наблюдается отличие от беталактамаз, гены которых встречаются как в плазмидах, так и в бактериальных хромосомах.

После установления механизмов ферментативной инактивации аминогликозидных антибиотиков резистентными к ним бактериями начались попытки целенаправленной трансформации молекул аминогликозидов с целью сделать их «нечувствительными» к инактивирующим ферментам. Так, в молекуле канамицина группа  $\text{NH}_2$  в первом положении в аминоклитольном фрагменте молекулы была замещена остатком L- $\gamma$ -амино- $\alpha$ -оксимасляной кислоты. Это привело к общему изменению конформации природной молекулы, при сохранении у нее почти всех функциональных групп. Сохранилась антибактериальная активность, но была в то же время потеряна «чувствительность» ко всем ферментам, распространенным среди резистентных микроорганизмов, инактивирующим аминогликозиды. Полученное производное, названное «амикацин», оказалось высокоэффективным против штаммов бактерий, имеющих фосфотрансферазы, ацетилтрансферазы и аденилтрансферазы, инактивирующие исходный канамицин.

В настоящее время амикацин — наиболее эффективный полусинтетический аминогликозидный антибиотик, поскольку он подавляет рост микроорганизмов, резистентных к природным аминогликозидам, за счет ферментативной инактивации последних как наиболее распространенного механизма резистентности:



Резистентность микроорганизмов к антибиотикам тетрациклиновой группы: тетрациклину, окситетрациклину, хлортетрациклину получила широкое распространение в связи с их многолетним использованием в медицине, а также в животноводстве в качестве ростстимулирующих добавок к кормам сельскохозяйственных животных.

В настоящее время в медицинской практике используется в основном тетрациклин, а в животноводстве — все три указанных выше антибиотика.

Изучение механизмов резистентности бактерий к тетрациклинам привело к результатам, резко отличающимся от тех, что были выявлены в случае беталактамов и аминогликозидов. Так, ферментативной инактивации тетрациклинов резистентными к ним микроорганизмами обнаружено не было.

В редких случаях резистентность была связана с защитой или «экранированием» от тетрациклинов (ингибиторов белкового синтеза) рибосом. У резистентных штаммов был найден белок, предотвращающий доступ тетрациклинов к местам их связывания на рибосоме.

Наиболее часто встречающийся механизм тетрациклинорезистентности обусловлен изменениями, происходящими в оболочке, точнее в цитоплазматической мембране бактериальной клетки. Известно, что в клетках резистентных штаммов тетрациклины не накапливаются. При этом в цитоплазматической мембране присутствуют несколько новых белков, которые отсутствуют в мембране тетрациклиночувствительных штаммов. Эти новые белки, появляющиеся в цитоплазматической мембране при тетрациклинорезистентности, являются белками, составляющими систему активного «выброса» тетрациклинов, проникающих в клетку. Иными словами, тетрациклины проходят через оболочку бактериальной клетки, в том числе и через цитоплазматическую мембрану, однако они не успевают прореагировать с рибосомами, так как быстро удаляются или «выбрасываются» в среду.

В настоящее время в медицинскую практику внедрено несколько продуктов химической трансформации природных тетрациклинов. Наиболее важным из них является доксициклин (6-дезоксиг-5-окситетрациклин), который гораздо дольше циркулирует в организме, чем природные тетрациклины.

Существует несколько механизмов резистентности к эритромицину.

1. Рибосомы резистентных клеток не «связывают» эритромицин. В результате антибиотик теряет способность тормозить белковый синтез. Причиной этого является метилирование рибосомной РНК в большой субъединице бактериальной рибосомы. В резистентных клетках специфическая метилаза катализирует введение метильных групп в строго определенный остаток аденина в моле-

куле рибосомной РНК. В результате изменяется конформация всей большой рибосомной субъединицы, и эритромицин теряет способность «связываться» с ней и вообще с рибосомой.

2. Ферментативное расщепление макроциклического лактонного кольца, что ведет к потере активности эритромицина.

3. Фосфорилирование или гидроксילирование по ОН-группе одного из присутствующих в молекуле антибиотика сахаров.

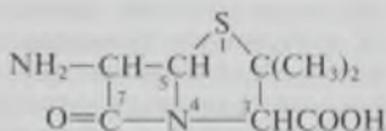
### **7.5.2. Поиск новых природных беталактамов и целенаправленная трансформация беталактамной молекулы**

Мишени для беталактамов в бактериальной клетке, как отмечалось, множественны, в клетке имеются разные виды пенициллин-связывающих белков (РВРs). Преимущественное воздействие на белок того или иного вида ведет к разным эффектам — литическому, бактерицидному без лизиса, бактериостатическому с разной длительностью бактериостазиса и т. п. Все это имеет значение для клиники при определении выбора препарата для конкретного больного, режима антибиотикотерапии: частоту введения, возможность использования комбинаций двух беталактаменных антибиотиков и т. д.

У некоторых встречающихся в клинике резистентных к беталактамам штаммов бактерий резистентность проявляется, как отмечалось, на уровне РВРs, т. е. мишени уменьшают родство к «старым» беталактамам. Поэтому новые природные и полусинтетические беталактамы проверяются на степень родства к РВРs этих штаммов.

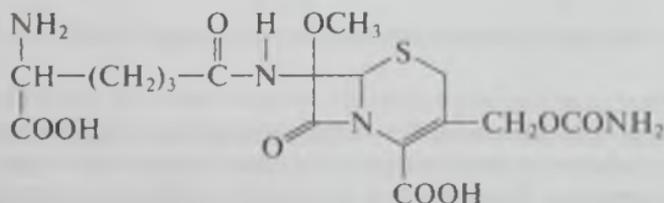
Высокое родство означает перспективность новых беталактаменных структур. Далее, при оценке новых беталактаменных структур проверяется их устойчивость к действию разных беталактамаз — пенициллаз и цефалоспориназ плазмидного и хромосомного происхождения, выделенных из разных бактерий. С этой целью используются большие наборы беталактамаз, обладающих разной субстратной специфичностью. Если большинство используемых беталактамаз не инактивирует новую беталактаменную структуру, то она признается перспективной для клиники и заслуживает дальнейшего углубленного изучения.

Первые успехи в этом направлении были получены, когда химиками были созданы нечувствительные к распространенным у стафилококков пенициллиназам полусинтетические пенициллины, такие как метициллин и оксациллин, а также нечувствительный к ферменту из синегнойной палочки карбенициллин. Получить эти полусинтетические пенициллины удалось после того, как из бензилпенициллина была выделена 6-аминопенициллановая кислота (6АПК):

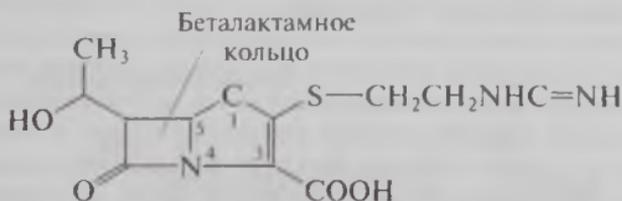


условно названная «ядром» молекулы пенициллина. В промышленных условиях 6АПК производят ферментативным гидролизом либо бензилпенициллина (в России), либо феноксиметилпенициллина (за рубежом) с помощью фермента пенициллинацилазы, который осуществляет гидролиз пенициллина по связи CO—NH (между радикалом и ядром) с получением 6АПК. Ацилированием 6АПК были получены указанные антибиотики.

Далее было показано, что наличие метоксигруппы или некоторых других заместителей в 6α-положении у пенициллинов и, соответственно, в 7α-положении у цефалоспоринов приводит к тому, что многие беталактамазы теряют способность гидролизовать беталактамное кольцо у таких природных или полусинтетических беталактамных антибиотиков как, например, у цефамицина С:



Эффективность беталактамов против грамотрицательных бактерий зависит и от такого фактора, как скорость прохождения через пориновые каналы. Преимущество здесь имеют компактные молекулы, которые проникают и через катионоселективные, и через анионоселективные каналы. Получил, например, практическое применение антибиотик такого рода, как имипенем:

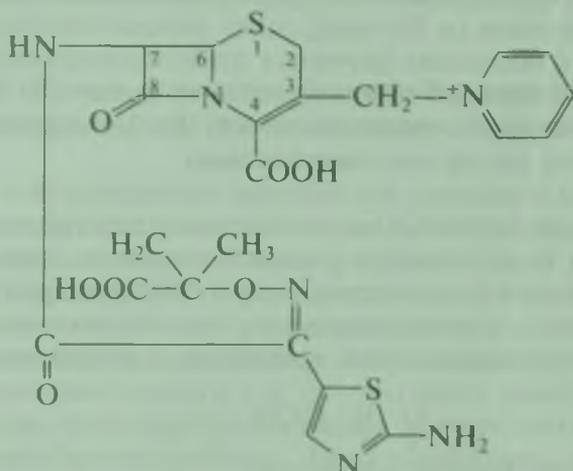


К его ценным свойствам относится также устойчивость к ряду беталактамаз.

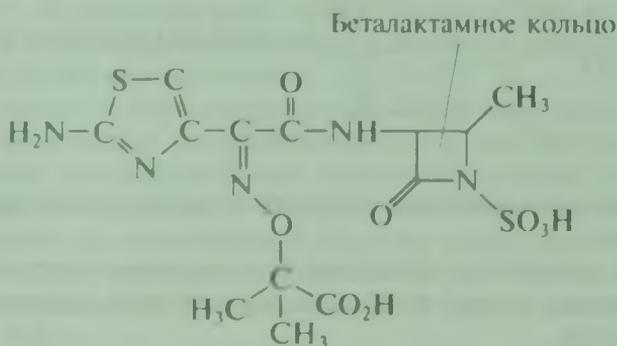
Немалой ценностью обладают беталактамные структуры, у которых вводимые в ядро молекулы-заместители создают в ней катионный центр.

Такие беталактамы высокоактивны против многих кишечных бактерий по причине катионоселективности пориновых каналов у бактерий, обитающих в кишечном тракте.

В качестве примера можно привести структуру молекулы применяемого в клинике беталактама — цефтазидима:



Отметим, что химические модификации все чаще затрагивают структуру сконденсированного с беталактамом пяти- или шестичленного кольца. Если сера в пятичленном (пенициллины) или шестичленном (цефалоспорины) кольце замещена на кислород или углерод, то соединения называют «нетрадиционные» или «неклассические» беталактамы. К ним относится уже упоминавшийся, быстро проникающий через пориновые каналы имипенем. Также к «нетрадиционным» относят и такие беталактамы, в которых беталактамное кольцо не сконденсировано с другим кольцом (пяти- или шестичленным). Они получили название «монобактамы», а наибольшую известность приобрел ценный для медицинской практики препарат азтреонам:



Значительный интерес представляют также природные соединения с гаммалактамным, т.е. пятичленным, кольцом, обладающие высокой антибактериальной активностью и широким спектром действия. Их мишенями, как и у бета락тамов, являются транспептидазы пептидогликана, т.е. разные PBP. При контакте с мишенью гаммалактамное кольцо подобно бета락тамному расщепляется и происходит ацилирование одного из аминокислотных остатков в активном центре транспептидаз. Бета락тамазы могут, как оказалось, инактивировать и гаммалактамы. Однако большая стабильность пятичленного гаммалактамного кольца по сравнению с четырехчленным бета락тамным расширяет возможности химического синтеза, т.е. получение синтетических гаммалактамов с пространственной защитой гаммалактамного кольца от бета락тамаз.

Ряды получаемых синтетических гаммалактамов быстро растут и некоторые из этих соединений уже проходят предклинические испытания.

### 7.5.3. Пути борьбы с антибиотикорезистентностью

Потребность периодического обновления используемых в медицине антибиотиков обусловлена постепенным распространением в микромире вариантов резистентности к антимикробным препаратам. Постоянное применение в клиниках определенного географического региона конкретного антибиотика в течение 20—30 и более лет приводит к тому, что резистентные к нему штаммы начинают обнаруживаться все чаще. Применяемые в медицинской практике антимикробные антибиотики, непосредственно с геномом микроорганизмов не реагируют, т.е. не являются мутагенами.

Однако в популяциях микроорганизмов происходят, хотя и редко, разнообразные «спонтанные» мутации отдельных генов, причины которых неизвестны. Образуются мутанты с измененными субклеточными структурами и отклонениями в метаболизме. Нормальные клетки, являясь результатом длительной эволюции, хорошо приспособлены к окружающим их естественным условиям. Мутанты к таким условиям приспособлены хуже и, спустя определенное время, после ряда генераций исчезают, однако, если сама окружающая среда изменилась и эти изменения длительно сохраняются, то мутантные формы микроорганизмов могут оказаться лучше приспособленными к новым условиям, что и объясняет распространение такого разнообразия антибиотикорезистентных форм.

Одни и те же антибиотики при их массовом и непрерывном применении играют роль селективных факторов отбора резистент-

ных к ним мутантных микроорганизмов. В этом случае именно мутанты, обладающие резистентностью, реализуют свой потенциал. Исходные антибиотикочувствительные культуры такой возможности не получают даже в том случае, если их скорость размножения в свободной от антибиотиков среде выше, чем у мутантов. Спонтанные мутации — отнюдь не единственный источник генов резистентности.

У продуцентов некоторых антибиотиков, например аминогликозидов, существуют ферменты, модифицирующие или трансформирующие молекулу собственного антибиотика, что приводит к его последующей инактивации. Гены, кодирующие ферменты инактивации, могут включаться в ДНК некоторых фагов, а иногда и в плазмиды и переноситься из продуцентов в клетки патогенных и непатогенных бактерий. Таким образом, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков.

Есть прямые доказательства того, что гены резистентности к антибиотикам и, соответственно, разные механизмы этой резистентности существовали до конца 1950-х гг. — до того времени, когда стали применяться пенициллин, стрептомицин, левомицетин, тетрациклины.

Музейные коллекции культур бактерий, хранившиеся с конца XIX в. и не соприкасавшиеся с препаратами антибиотиков (музейные культуры пересеваются два — три раза в год в боксах с особыми предосторожностями), содержат, хотя и редко, варианты, стойкие к тем или иным антибиотикам. Например, у таких культур были обнаружены гены, кодирующие образование бета-лактамаз.

Еще одно доказательство изначального существования генов антибиотикорезистентности было получено в 1960-х гг. микробиологами в труднодоступных районах планеты, где местное население еще не соприкасалось с антибиотиками (в верховьях Амазонки, на островах Полинезии). Из кишечной микрофлоры аборигенов, хотя и очень редко, но выделяли штаммы с генами резистентности, обуславливающими образование бета-лактамаз или ферментов, инактивирующих антибиотики аминогликозидной структуры.

Все перечисленные факты свидетельствуют, что полностью избавиться от генов резистентности теоретически невозможно, однако частоту их распределения можно минимизировать. Изъятие антибиотика из клинической практики будет означать уменьшение распространенности генов резистентности к нему. Через определенное время антибиотик и близкие к нему препараты восстановят свою эффективность и могут быть возвращены в лечебную практику. Так, в США ставший малоэффективным стрептомицин, был вытеснен из лечебной практики гентамицином, ами-

кацином, полусинтетическими беталактами и другими новыми антибиотиками. В небольших городах, не являющихся транзитными пунктами для большого количества людей, стрептомицин восстановил свою эффективность спустя примерно 20 лет после прекращения его применения.

В Нидерландах было запрещено использование тетрациклина в животноводстве ввиду широкого распространения тетрациклино-резистентных сальмонелл. Уже через пять лет после этого частота встречаемости этих бактерий в стране снизилась в два раза, а применение тетрациклина при случаях пищевых отравлений стало в два раза более эффективным.

Общая стратегия в борьбе с антибиотикорезистентностью может заключаться в последовательной замене одних препаратов другими с возвращением «старых» препаратов в практику через определенный срок. Такая «цикличность» быстрее приведет к желаемым результатам, если она будет соблюдаться в крупных географических регионах.

В настоящее время в клинической практике ассортимент антибиотиков и других антимикробных препаратов не позволяет достаточно эффективно полностью заменять одни группы антибиотиков другими. Однако при условии получения ряда новых групп антибиотиков принцип цикличности мог бы быть реализован. В этом случае произойдет постепенное значительное уменьшение генов резистентности к представителям временно исключенных из лечебной практики групп антимикробных препаратов.

Таким образом, не только эффективность лечения, но и возвращение к экологическому равновесию в окружающей человека микрофлоре требует усиления работы в области создания методами биосинтеза и оргсинтеза антибиотических средств с новыми механизмами действия.

### Контрольные вопросы

1. Какова биологическая роль антибиотиков как вторичных метаболитов?
2. Как накопление антибиотика — целевого продукта согласуется с накоплением биомассы?
3. Каковы пути создания высокоактивных продуцентов антибиотиков?
4. Каковы механизмы защиты от собственных антибиотиков у их суперпродуцентов?
5. Каковы особенности ферментации актиномицетов и бактерий (эубактерий) как продуцентов антибиотиков?
6. Почему в инструкциях по применению антибиотиков существуют указания на RVPs2 и RVPs3?
7. Какую опасность представляют хромосомная и плазмидная резистентность?

8. Какими препаратами антибиотиков представлены новые поколения цефалоспоринов и пенициллинов?

9. Каков механизм резистентности к аминогликозидным антибиотикам?

10. В чем преимущества целенаправленной трансформации аминогликозидов на примере антибиотика амикацина?

11. Какие аналоги эритромицина, превышающие его эффективность в отношении внутриклеточных возбудителей инфекции, известны в настоящее время?

12. Какие природные источники генов резистентности к антибиотикам существуют?

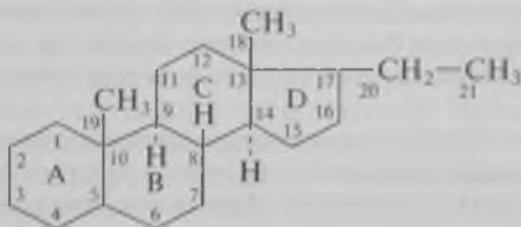
13. Какие организационные мероприятия ограничивают распространение генов антибактериальной резистентности?

## ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ПОЛУЧАЕМЫЕ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

### 8.1. Стероиды

К фармацевтическим препаратам, в производстве которых используется биотехнология, принадлежат стероидные гормоны, к основным представителям которых относятся кортикостероиды, прогестогены, эстрогены и андрогены. Они не только участвуют практически во всех жизненно важных функциях организма, но и как лекарственные средства высоко избирательны, имеют большую широту спектра действия. В медицинской практике стероидные гормоны применяются в качестве противовоспалительных, диуретических, анаболических, контрацептивных, противораковых лекарств.

При сравнении структуры наиболее ценных кортикостероидов, прогестогенов, эстрогенов и андрогенов можно обнаружить, что все они содержат в положении С-3 кетогруппу, кроме эстрогенов, у которых кольцо А — ароматическое. Кортикостероиды



содержат при С-17 гидроксизамещенную ацетильную группу. Их отличительной особенностью является наличие кислородной группы у 11-го углеродного атома. Андрогены и эстрогены в положении С-17 имеют карбонильную или гидроксильную группы, а их модифицированные аналоги — алкильную или этильную группу. К стеринам (стеролам) относятся стероиды, имеющие в положении С-3 гидроксильную группу.

В основе истории синтеза стероидных гормонов лежат методы биотрансформации (биоconversion), результатом применения которых является превращение метаболитов в структурно родственные соединения под влиянием микроорганизмов или микробных

клеток. В этом процессе весьма существенно, что микроорганизмы могут влиять только на отдельные (единичные) стадии довольно сложных и длительных процессов химического синтеза.

Общей чертой всех процессов микробиологической трансформации является изменение именно молекулярной структуры трансформируемого вещества, а не синтез молекулы *de novo*. Основные процессы микробиологической трансформации — это окисление, восстановление, декарбоксилирование, дезаминирование, гидролиз, метилирование, конденсация, изомеризация и т.д.

Реакции биотрансформации в большинстве строго специфические, осуществляются индуцибельными ферментами в строго определенном порядке. Так, например, процесс гидроксирования относится к дыхательным системам (гидроксилаты содержат ионы железа или цинка), а в дегидрировании участвуют ферменты флавиновой природы, содержащие рибофлавин и витамин В<sub>12</sub>.

С позиций физиологии биотрансформация стероидных соединений как источников углеродного питания (стерины расщепляются до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O) связана с метаболизмом микроорганизмов, в процессе которого происходит детоксикация субстрата (например, 11 $\alpha$ -окисоединения обладают меньшим отрицательным влиянием на рост и дыхание клеток).

Использование биотрансформации при получении тех или иных продуктов известно с древних времен. В качестве примера можно привести методику получения уксуса еще во времена Древнего Вавилона (около 5 000 лет до н.э.), когда этиловый спирт с помощью микроорганизма *Gluconobacter suboxidans* превращали в уксусную кислоту (естественно, что все подобные методы носили чисто эмпирический характер и не имели никакой научной подоплеки).

В настоящее время возможности и достоинства использования биотрансформации проявились наиболее ярко в области превращений стероидных соединений. Дело в том, что сложность и громоздкость молекул стероидов затрудняет даже незначительные их модификации химическим путем. Микроорганизмы могут осуществлять уникальные реакции в синтезе лекарственных препаратов стероидной природы, например 1,2-дегидрирование и 11 $\alpha$ - и  $\beta$ -гидроксирование. Промышленный синтез таких важнейших лекарств, как гидрокортизон, преднизолон, дексаметазон стал возможен только после разработки микробиологических способов их получения.

Первые сообщения о микробиологической трансформации стероидов появились задолго до установления их химической структуры. Так, еще в XIX в. было известно, что бактериальная флора кишечника млекопитающих превращает холестерин в каппростерин, а холевую кислоту в дезоксихолевую. В 1913 г. было открыто

полное расщепление холестерина микобактериями, но только в 1930 г., после установления структуры основных стероидных гормонов, стали пытаться применить биотрансформацию как метод получения этих соединений.

В те годы ученые Базельского университета впервые получили из надпочечников кортизон. Однако лишь десять лет спустя было установлено, что кортизон эффективен при лечении ревматоидного артрита.

На примере промышленного получения кортизона можно показать, каких успехов можно достичь при использовании методов биотрансформации.

Первоначальный химический синтез кортизона насчитывал 37 стадий, и стоимость 1 г вещества составляла 200 долл. США. В 1952 г. было обнаружено, что штамм *Rhizopus nigricans* способен гидроксिलировать прогестерон (промежуточный продукт синтеза кортизона).

В результате синтез кортизона сократился до 11 стадий, а стоимость гормона упала до 6 долл. за 1 г. Кроме того, в случае применения биотрансформации брожение происходило при 37 °С и атмосферном давлении ( $10^5$  Па) в водной среде, тогда как химический синтез требовал экстремальных температур и давлений, осложняя и удорожая технологию производства. Дальнейшее совершенствование биотехнологического производства (использование мутантных штаммов) позволило к 2002 г. снизить цену кортизона в США до 0,3 долл. за 1 г, т.е. в 600 с лишним раз меньше по сравнению с ценой в 1930 г.

Внедрение биотрансформации в процессы получения стероидных гормональных препаратов вызвало буквально переворот в фармацевтической промышленности, позволив многократно удешевить и сделать эти ценные лекарственные препараты доступными для большинства нуждающихся людей.

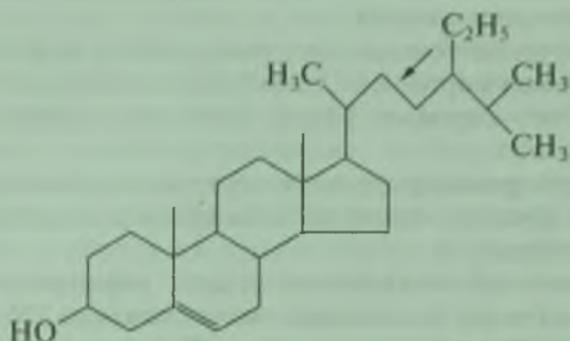
Для синтеза указанных гормонов используют природные соединения, содержащие стероидную структуру, которую необходимо химически модифицировать перед введением функциональных заместителей того или иного гормона.

В качестве исходного сырья для производства этих препаратов используются стерины растений (класс фитостеринов). Прежде всего, это — эргостерин, обнаруженный у многочисленных представителей растительного мира, а также у грибов и микроорганизмов.

Особенно много эргостерина в дрожжевых микроорганизмах (для его промышленного получения используют пекарские дрожжи).

Следующий представитель фитостеринов — стигмастерин, который в значительных количествах присутствует в соевом масле и сахарном тростнике. Весьма близок к нему по структуре  $\beta$ -сито-

стерин, отличаясь лишь отсутствием двойной связи в боковой цепи (в формуле показано стрелкой):



Ситостерины присутствуют в больших количествах в хлопковом масле, в зародышах пшеницы, в натуральном каучуке, в сахарном тростнике. Получают ситостерин и при переработке древесины в целлюлозно-бумажном производстве.

В условиях промышленного производства из ситостерина получают андростендион (АД) путем окисления боковой цепи стерина с образованием 17-кетоандростана с помощью мутантных штаммов *Mycobacterium vacca* (штаммы, у которых блокированы системы, ответственные за полный распад стероидного скелета). В этой комплексной технологии помимо химических стадий используются методы микробиологической трансформации для введения гидроксильной группы в 1,1-положение стероидной структуры и двойной связи в 1,2-положение. Для этих групп известны альтернативные химические варианты, но они уступают по эффективности биотрансформации из-за многостадийности, более низкого выхода и по экологическим показателям. О высокой региоселективности микробиологического отщепления боковой цепи ситостерина (без затрагивания стероидного скелета) свидетельствует высокий выход (70—80 %) продукта трансформации.

Кроме выхода целевого продукта важным показателем, определяющим экономичность процесса микробиологической трансформации стероидного субстрата, является концентрация стероида в культуральной жидкости. В данном процессе концентрация ситостерина составляет 10—15 г/л, при этом стерин вносится в культуральную жидкость в микронизированном виде. Поскольку стероиды трудно растворимы в воде, то и целевой продукт трансформации — АД на 99 % выделяется в виде кристаллов.

Это свойство стероида определяет метод его извлечения. Сначала методом фильтрации культуральную жидкость отделяют от биомассы и кристаллов АД. Затем последние растворяют в ацетоне и еще раз фильтруют для отделения от биомассы. Концентри-

рованием ацетонового раствора выделяют АД, который на конечной стадии перекристаллизовывают. Аналитический контроль реакции трансформации ведут отбором проб через определенные временные интервалы и анализом их методом тонкослойной хроматографии на силуфол в присутствии «свидетелей» — исходного стероида, целевого продукта трансформации и некоторых промежуточных и побочных продуктов, которые участвуют в данном процессе. Дальнейшей химической модификацией АД получают такие препараты, как тестостерон, метилтестостерон, оксипрогестерона капронат, спиронолактон и др.

Биотрансформация стероидов — аэробный процесс глубинной ферментации, для проведения которой используется оборудование, отвечающее высокой степени массообмена. Трансформация может осуществляться как растущей на среде культурой, так и отмытыми от питательной среды клетками микроорганизма. Последний вариант предпочтительнее, поскольку облегчает выделение и очистку целевого продукта. Но, как показала производственная практика, не все микроорганизмы переносят промышленное сепарирование без потери активности; так, представители муконовых грибов очень чувствительны к сепарированию, тогда как представители несовершенных грибов теряют свою активность незначительно.

Способность трансформировать стероиды обнаружена в самых разных группах микроорганизмов. Используются, как правило, естественные штаммы, выделенные из почвы или из других объектов. Условно можно сказать, что процессы гидроксирования наиболее распространены среди грибов. Так, процесс  $11\alpha$ -гидроксирования способны осуществлять представители 300 видов микроорганизмов, причем 50 % из них — несовершенные грибы и 20 % — фикомицеты. Бактериальным культурам больше присущи процессы окисления гидроксильных групп до кетонов, восстановление кетонов до оксигрупп, введение в кольцо стероидной молекулы двойных связей.

Наиболее известные  $11\alpha$ -гидроксильные культуры относятся к родам *Absidia*, *Beauveria*, *Curvularia*, *Cunninghamella*. Для дегидрирования в положении 1,2 в основном применяют *Corynebacterium simplex*. Для изомеризации с одновременным окислением 3-оксигруппы в 3-кетогруппу широко используются штаммы *Corynebacterium mediolanum* (sin. *Flavobacterium dehydrogenans*). Отметим важность этой реакции, поскольку источники сырья (диосгенин, соласодин) содержат  $3\beta$ -оксигруппу, тогда как активные стероидные препараты должны иметь 3-кетогруппу.

Специфическая особенность процесса биотрансформаций — использование чистых культур микроорганизмов. Поэтому все операции по подготовке и выращиванию трансформирующих культур проводят в стерильных условиях. Используют культуру-

трансформатор в стадии замедления роста, когда питательные компоненты среды в значительной степени израсходованы, а сильно разросшаяся культура подавляет рост посторонней микрофлоры. Что касается микробиологического контроля, то он осуществляется только на стадии выращивания трансформирующей культуры.

Стероиды — малорастворимые в воде соединения: их растворимость колеблется от 0,3 г/л (гидрокортизон) до 0,01 г/л (ацетонид фторкортексолона). Важным аспектом эффективности процессов трансформации является выбор оптимальной концентрации субстрата, зависящий от биологической доступности последнего. Поэтому трансформационные процессы осуществляют обычно при концентрации субстрата в пределах 1—10 г/л, что предполагает нахождение основной массы стероида в твердой фазе. В этом случае необходимым условием является высокая степень предварительного измельчения стероидного субстрата (поступает в среду в микронизированном виде) с использованием ультразвуковых или механических измельчителей.

В случае, когда растворимость стероидного субстрата слишком мала для проявления присущей микроорганизму ферментативной активности, задействуют методы, повышающие водорастворимость стероидов.

Первый — подача стероида в растворителе, смешиваемом с водой (ацетоне, метаноле, этаноле, диметилформамиде, диметилсульфоксиде и др.). Ограничением для применения этого метода является токсичность определенных концентраций растворителей.

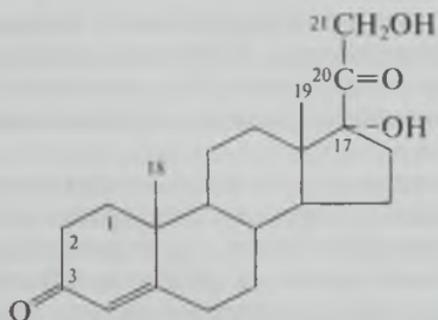
Второй — использование водорастворимых форм стероидов в виде натриевых солей 2,1-гемисукцинатов или фосфатов. Осложняющим моментом для широкого использования таких модификаций является высокая степень избирательности по отношению к ним со стороны микроорганизмов, например для дегидрирующего микроорганизма *Coagulobacterium simplex* эти формы стероидов оказались недоступны.

Третий метод — заключение стероидов в растворимый комплекс с циклодекстрином. Использование комплекса стероидов с циклодекстрином не имеет ограничений предыдущих методов.

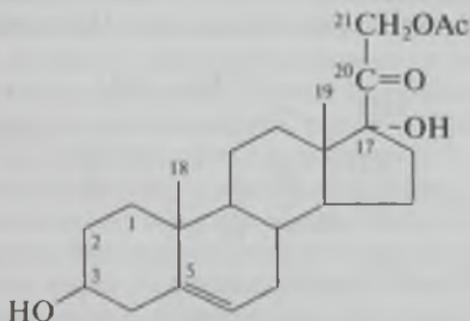
Микробиологическое гидроксилирование — наиболее часто применяемый метод получения стероидных препаратов, так как присутствие гидроксильных групп в 3,11,16,17-положениях молекулы стероида обуславливает, как правило, физиологическую активность для большинства гормональных стероидных препаратов.

Широко используется в промышленности микробиологический синтез одного из основных кортикостероидов — гидрокортизона (кортизола) и его синтетических аналогов: преднизолона и дексаметазона. В этом случае исходным продуктом для 11 $\beta$ -гидрокси-

лирования может служить вещество Рейхштейна (кортексолон), которое для краткости принято называть «вещество S»:



Само по себе «вещество S» является модифицированным продуктом биотрансформации (с помощью культуры *Corynebacterium mediolanum*) моноацетата «вещества R»:



Процесс ферментативного превращения моноацетата «вещества R» в «вещество S» с помощью вышеуказанной культуры состоит из гидролиза 21-ацетогруппы и окисления 3 $\beta$ -гидроксигруппы в 3-кетогруппу с одновременной миграцией двойной связи.

Отметим, что данная трансформация имеет принципиальное значение в производстве кортикостероидов, так как практически определяет количественный выход «вещества S», что в свою очередь в значительной степени влияет на конечный выход продуктов следующих трансформаций.

Применение в качестве субстрата не «вещества S», а моноацетата «вещества R» позволило увеличить выход гидрокортизона с 50 до 70—73 %.

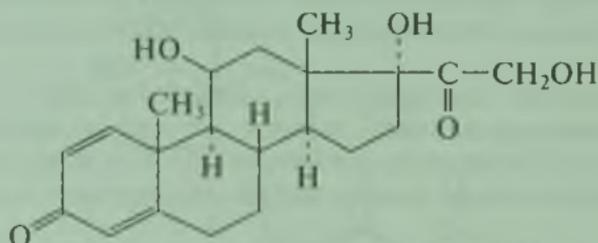
Вместе с тем было установлено, что использование в производстве гидрокортизона промышленного штамма грибковой культуры *Cirvalaria lunata* имеет преимущество по выходу целевого продукта и по наименьшему количеству примесей перед другими микроорганизмами, например, *Absidia ovchidis*. Гидроксилирова-

ние в 11 $\beta$ -положении сопряжено с образованием 11 $\alpha$ -, 14 $\alpha$ - и 6 $\beta$ -гидроксипроизводных в качестве нежелательных, побочных продуктов данной реакции.

Широкую субстратную специфичность гидролаз демонстрируют многие микроорганизмы. Например, штамм *Cunninghamella blakesleeana* вводит оксигруппу в 11 $\beta$ -положение большого набора стероидов — производных эстрана, тестостерона, кортексолона, прогестерона и т.д.

Главным препятствием, стоящим на пути развития промышленного микробиологического гидроксирования стероидов является низкая производительность ферментаций, несмотря на высокий процентный выход по субстрату. Причины этого, с одной стороны, практическая нерастворимость стероидных субстратов в воде, а с другой — токсичность применяемых растворителей и, следовательно, невозможность использования достаточно высоких концентраций субстрата.

Микробиологическое дегидрирование стероидов также имеет большое значение, поскольку введение 1,2-двойной связи способствует повышению физиологической активности. Например, преднизолон:



являясь 1,2-дегидроаналогом гидрокортизона, превосходит последний по противовоспалительной и антиаллергической активности, проявляя при этом значительно меньше побочных эффектов. В реакции 1,2-дегидрирования принимает участие внутриклеточный фермент 3-оксистероид-1,2-дегидрогеназа, локализованный на внешней стороне цитоплазматической мембраны. В процессе реакции электроны с фермента переносятся на кислород через дыхательную цепь; потребление кислорода происходит стехиометрически. Биотрансформация гидрокортизона в преднизолон осуществляется штаммами *Mycobacterium globiforme*, дегидрогеназы которых обладают широкой субстратной специфичностью, что позволяет получать целевые продукты с высоким количественным выходом — до 85%. Поэтому данный процесс экономически выгоден и в целом обеспечивает рентабельность производства.

Возможны случаи, когда для биотрансформации требуются смешанные культуры или последовательное добавление микробных штаммов или видов, каждый из которых строго индивидуален в осуществлении каждой специфической стадии. Значитель-

ный эффект биотрансформации связан с использованием иммобилизованных клеток (более стабильных, чем ферменты или клеточные культуры). В пользу данного метода свидетельствует тот факт, что участвующие в этом процессе ферменты — дегидрогеназы представлены довольно лабильными белками, выделение и очистка которых является трудоемкой и дорогой процедурой. Кроме того, интактные клетки микроорганизмов обладают более совершенными защитными механизмами и возможностью регенерировать кофакторы, необходимые для ферментативных реакций.

Также этот метод позволяет положительно решать проблемы, связанные с нерастворимостью стероидных субстратов. Наконец, данный метод дает возможность многократного использования иммобилизованных клеток с применением последующей автоматизации процесса, что в конечном итоге приводит к значительному уменьшению затрат на выделение и очистку продуктов реакции.

К методам применяемой иммобилизации относятся адсорбция, ковалентное связывание, микрокапсулирование, а также включение в разные полимеры. Например, включение в альгинатные гели относится к мягким методам иммобилизации, т.е. клетки после иммобилизации остаются жизнеспособными и могут осуществлять полиферментные процессы. Положительным качеством геля является возможность размножения в нем клеток, а также его способность к растворению при изменении рН и температуры, что позволяет выделять жизнеспособные клетки.

В заключение отметим, что в промышленном производстве стероидных препаратов биотехнологические методы имеют конкретные преимущества перед методами химического синтеза:

- возможность реакций, недоступных для химического синтеза;
- превращение субстрата в биологически активную форму соединения в течение одной стадии процесса (в отличие от многостадийного и весьма затратного химического синтеза);
- удобство, экономичность и экологичность производства.

## 8.2. Витамины

Витамины представляют низкомолекулярные органические соединения, необходимые для жизнедеятельности организма, синтез которых в организме либо ограничен, либо отсутствует. Не подлежит сомнению исключительно высокая биологическая активность витаминов. Потребность в них для организма человека вполне достаточна в очень небольших количествах (от нескольких микрограммов до нескольких десятков миллиграммов в день).

Витамины, не являясь пластическим материалом или источником энергии, служат активными биокатализаторами разных метаболических процессов в организме. Почти все водорастворимые

витамины, а также жирорастворимый витамин К являются коферментами или кофакторами биохимических реакций. Витамины А, D, Е регулируют генетический аппарат клетки. Помимо этого абсолютно каждому витамину свойственна своя, специфическая функция в организме. Все это указывает на незаменимость витаминов для жизнедеятельности организма.

В современных социально-экономических условиях вследствие индустриализации и достижений цивилизации человек изменил характер питания и стал употреблять много рафинированных и консервированных продуктов, обладающих меньшей витаминной ценностью. В качестве примера можно привести муку высших сортов, при производстве которой теряется до 80—90 % всех витаминов. Другой пример, при операции экстрагирования, дезодорирования и осветления растительных масел разрушаются жирорастворимые витамины. Витамины А, Е, К и каротин достаточно устойчивы к термообработке, но весьма чувствительны к свету и кислороду воздуха.

Для стран со слабо развитой экономикой дефицит витаминов приобретает массовое явление вследствие достаточно низкого прожиточного минимума для большинства населения этих стран, одновременно с этим снижается качество питания из-за отсутствия в нем свежих овощей, фруктов, мяса, рыбы.

Широкое распространение полигиповитаминозов, снижение резистентности организма к болезнетворным микроорганизмам, сопровождающееся вредными экологическими факторами (радиацией, канцерогенами, промышленными токсинами) — все это повышает роль витаминов в профилактической и лечебной работе врачей, поэтому в экономически развитых странах стали реализовываться государственные программы искусственной витаминизации пищевых продуктов (муки, хлеба, молока, соков и др.).

В основе классификации витаминов (табл. 1) находятся их физико-химические свойства, в соответствии с которыми все витамины делят на водо- и жирорастворимые.

Известно, что водорастворимые витамины в тканях не накапливаются (за исключением витамина В<sub>12</sub>), из чего следует необходимость их ежедневного поступления в организм. Жирорастворимые витамины способны накапливаться в тканях, поэтому их недостаточность или дефицит встречаются реже. Для них не свойственна и коферментная функция (кроме витамина К). Интересно, что, выполняя функцию индукторов синтеза белков, представители жирорастворимых витаминов проявляют сходство со стероидными гормонами, особенно это имеет отношение к витамину D. И, наконец, все жирорастворимые витамины являются структурными компонентами клеточных мембран, проявляя антиоксидантное действие.

Обращаясь к источникам витаминов, можно сказать, что приоритет в этом случае остается за растениями. Не секрет, что на содержание витаминов в пищевых продуктах существенно влияет

## Классификация витаминов

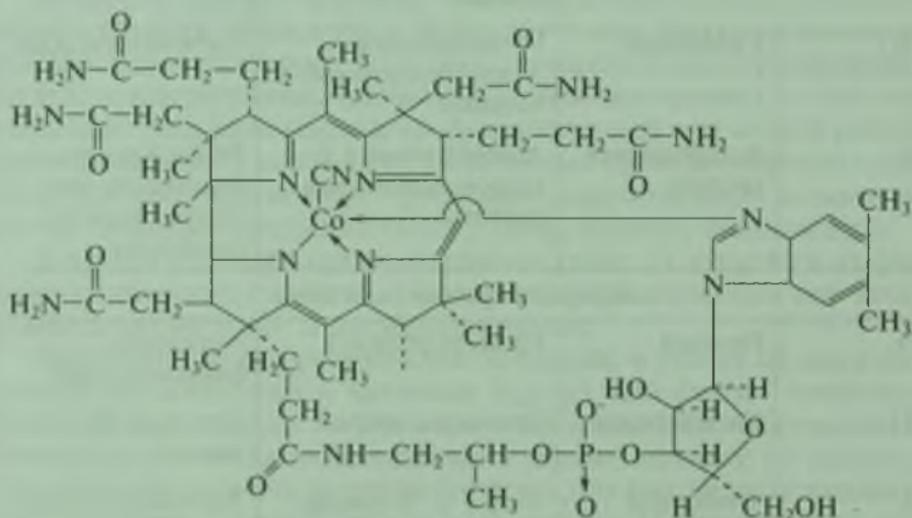
| Буквенное обозначение           | Химическое название  | Активная форма витамина                                       | Лечебный эффект                                      |
|---------------------------------|----------------------|---|--|
| <i>Водорастворимые витамины</i> |                      |   |  |
| B <sub>1</sub>                  | Тиамин               | Тиаминпирофосфат (ТПФ), кокарбоксилаза, тиаминтрифосфат (ТТФ) | Антиневритный  |
| B <sub>2</sub>                  | Рибофлавин           | ФМН,ФАД   | Витамин роста  |
| B <sub>3</sub>                  | Пантотеновая кислота | КоА-SH, дефосфоКоА, 4-фосфопантетеин                          | Антидерматитный                                      |
| B <sub>5</sub> (PP)             | Ниацин               | НАД <sup>+</sup> и НАДФ <sup>+</sup>                          | Антипеллагрический                                   |
| B <sub>6</sub>                  | Пиридоксин           | Пиридоксальфосфат, пиридоксаминфосфат                         | Антидерматитный                                      |
| B <sub>12</sub>                 | Кобаламин            | Метилкобаламин, дезоксиаденозинкобаламин                      | Антианемический                                      |
| C                               | Аскорбиновая кислота | Аскорбиновая и дегидроаскорбиновая кислоты                    | Регулятор метаболических процессов, иммуностимулятор |
| <i>Жирорастворимые витамины</i> |                      |   |  |
| A                               | Ретинол              | Ретинол/ретиаль   | Антиксерофтальмический                               |
| D                               | Кальциферол          | Эргокальциферол   | Антирахитический                                     |
| E                               | Токоферол            | α-, β-, γ-, δ-токоферолы, токотриенолы                        | Антиоксидантный                                      |
| K                               | Филлохинон           | Дифарнезилнафтохинон  | Антигеморрагический                                  |

тот или иной сезон календарного года и кулинарная обработка, что опять нас возвращает к вопросу организации рационального и сбалансированного питания.

Научные исследования последних лет показали не только высокую биологическую активность витаминов, но и то, что, как правило, этой активностью обладают не сами витамины, а их производные — коферменты, которые нашли широкое применение в медицинской практике.

Если говорить о производстве основной части витаминной продукции, то ведущее положение здесь занимают химические методы, но в ряде производств в качестве их полноправного конкурента как в нашей стране, так и за рубежом, выступают биотехнологические методы, использование которых более предпочтительно в связи с ужесточением экологических требований к фармацевтическому производству. Кроме того, при применении биотехнологических методов появляются возможности сокращения части стадий химического синтеза за счет использования высокоактивных штаммов микроорганизмов-продуцентов. Например, производство витаминов В<sub>12</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub> и D (эргостерина) осуществляется в одну стадию. Также микроорганизмы нашли свое применение и в синтезе витамина С, убихинонов, каротиноидов.

### Витамин В<sub>12</sub> (кобаламин)



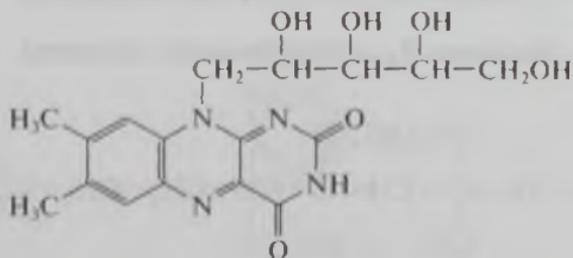
В настоящее время витамин В<sub>12</sub> получают чисто биотехнологическими методами. Витамин В<sub>12</sub> является производным внутреннего кобальтового комплекса нуклеотида бензимидазола и макроциклической корриновой системы. Способность синтезировать соединения корриноидной природы широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Так, некоторые мутантные штаммы пропионовых бактерий из рода *Propionibacterium*

способны продуцировать свыше 50 мг витамина В<sub>12</sub> на 1 л среды, а в присутствии его предшественника 5,6-диметилбензимидазола (5,6-ДМБ) накапливать до 200 мг на 1 л культуральной жидкости. Культивируют продуценты витамина В<sub>12</sub> на средах, приготовленных из пищевого сырья (кукурузный и мясной экстракты, соевая и рыбная мука). В настоящее время успешно ведется поиск активных продуцентов, образующих достаточное количество витамина на средах, из непищевого сырья, когда в качестве источника углерода и энергии используются изопропиловый спирт, метанол и др. Пропионовые бактерии выращивают периодическим методом в анаэробных условиях на среде, содержащей кроме пищевого сырья глюкозу, соли кобальта и сульфат аммония.

В процессе ферментации образуются кислоты, которые затем нейтрализуют, непрерывно подавая в ферментер раствор щелочи. Через 72 ч после начала ферментации в питательную среду вносят предшественник (5,6-ДМБ), так как без добавления последнего вместо витамина В<sub>12</sub> синтезируются фактор В (кобинамид) и не обладающий терапевтическим эффектом псевдовитамин В<sub>12</sub>, у которого азотистым основанием служит аденин. Общее время ферментации — 6 сут. По ее окончании витамин В<sub>12</sub> остается в клетках бактерий, т.е. в биомассе, которую далее сепарируют, а целевой продукт экстрагируют подкисленной водой.

Необходимо отметить, что в качестве новых перспективных разработок создан высокопродуктивный штамм *Propionibacterium ari*, способный в отличие от ранее известных продуцентов выделять витамин В<sub>12</sub> в культуральную среду. Для предотвращения образования коферментной формы витамина В<sub>12</sub> в качестве стабилизатора добавляют нитрит натрия. Далее следуют стандартные стадии выделения и очистки, поэтому подробно на них останавливаться не будем. Полученный продукт используется для изготовления разных лекарственных форм препарата и в производстве поливитаминных препаратов.

### Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин)



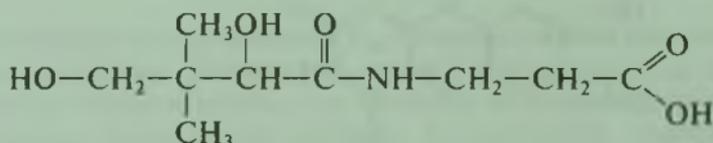
Биосинтез флавинов осуществляется как растительными, так и многими бактериальными клетками, а также плесневыми гри-

бами и дрожжами. Благодаря именно микробному биосинтезу рибофлавина в желудочно-кишечном тракте жвачные животные не нуждаются в этом витамине. У человека синтезирующихся флавинов недостаточно для предупреждения гиповитаминоза.

Витамин В<sub>2</sub> хорошо растворим в воде, устойчив в кислой среде, но легко разрушается в нейтральной и щелочной средах, а также под действием УФ-облучения. Для этого витамина характерно функционирование в коэнзимных формах: флавиномононуклеотид (ФМН) и флавиноадениндинуклеотид (ФАД). Именно на примере выделения рибофлавина в культуральную жидкость было открыто явление сверхсинтеза. При промышленном получении рибофлавина используют культуры дрожжеподобных грибов *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossipii*, синтезирующих до 3,8 и 6,4 г/л рибофлавина соответственно. Однако серьезным недостатком этих культур является их нестабильность при хранении на твердых средах во всем диапазоне температур — от комнатной до температуры лиофилизации, в результате чего они теряют способность к сверхсинтезу рибофлавина. Поэтому для сохранения активности штамма приходится систематически проводить рассев на твердые среды, отбирая колонии с высокой активностью.

Сейчас вместе с вышеуказанными культурами при промышленном получении рибофлавина в помощью методов используется мутантный штамм продуцент *Bacillus subtilis* с нарушенной регуляцией синтеза витамина В<sub>2</sub>. Этот штамм устойчив к наиболее сильному антиметаболиту рибофлавина — его аминоксимуляру розеофлавинолу и обладает способностью к сверхсинтезу витамина В<sub>2</sub>. При культивировании его на среде с мелассой и дрожжевым экстрактом в культуральной жидкости накапливается 3,5—4,5 г/л рибофлавина. При этом время ферментации сократилось в 3 раза. Рибофлавин получают и химическим методом, используя в качестве биокатализатора сухие клетки бревивактерий. Причем, если биосинтез с нативными клетками занимает несколько суток, то при биосинтезе с суспензией сухих клеток время синтеза ФАД составляет всего 15—17 ч.

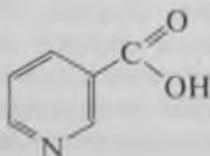
### Витамин В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота)



В основном в условиях промышленного производства пантотеновую кислоту получают методом химического синтеза. Наиболее

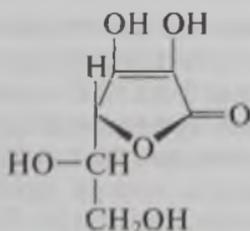
важной коферментной формой витамина В<sub>3</sub> является кофермент ацетилирования (КоА). Способностью продуцировать в значительных количествах КоА обладают многие микроорганизмы, в частности актиномицеты. Активно внедряются в промышленное производство способы получения пантотеновой кислоты и ее структурных компонентов из β-аланина и пантотеата калия с помощью иммобилизованных клеток бактерий, а также достигнуты существенные успехи при получении КоА с использованием мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes*, которые позволяют получать КоА в количестве до 3 г на литр.

### Витамин РР (никотиновая кислота)



Одним из наиболее распространенных биотехнологических способов получения коферментной формы никотиновой кислоты — никотиनाмидадениндинуклеотида (НАД) является выделение (экстракция) его из микроорганизмов, как правило, из пекарских дрожжей. Для повышения содержания НАД в дрожжевых клетках культивирование проводят на средах с предшественниками синтеза никотиновой кислоты. Так, при добавлении в среды культивирования аденина или самой никотиновой кислоты получают до 12 мг НАД на 1 г клеток (по сухой массе). Использование мутантных штаммов *Brevibacterium ammoniagenes* с одновременным изменением проницаемости мембраны клеток микроорганизмов (коферменты через биомембраны не проникают) с помощью поверхностно-активных соединений (цетилсульфата натрия, цетилпиридина хлорида) позволяет получать НАД до 6 г/л.

### Аскорбиновая кислота (витамин С)



Аскорбиновая кислота в мировом промышленном производстве витаминной продукции в целом занимает наибольшую

долю — около 40 тыс. т в год. Ее синтез был разработан швейцарскими учеными А. Грюсснером и С. Рейхштейном в 1934 г. и используется до настоящего времени. Синтез аскорбиновой кислоты является многостадийным химическим процессом, в котором только одна стадия представлена биотрансформацией. Эта стадия трансформации d-сорбита в L-сорбозу при участии ацетатных бактерий. Для получения сорбозы используют глубинную ферментацию, когда культуру продуцента *Gluconobacter oxydans* выращивают в ферментерах периодического режима с мешалкой и барботером для усиления аэрации и массообмена в течение 20—40 ч с результатом по выходу сорбозы до 98 % исходного количества сорбита в среде. Обычно для достижения такого высокого выхода целевого продукта в питательную среду вносят кукурузный или дрожжевой экстракт в количестве около 20 %. По окончании ферментации сорбозу выделяют из культуральной жидкости. Помимо оптимизации среды можно совершенствовать и технологическую аппаратуру. Например, переход от периодического культивирования продуцента *Gluconobacter oxydans* к непрерывному в аппарате колоночного типа увеличивает скорость образования сорбозы в 1,7 раз.

В настоящее время широкое использование биотехнологических процессов позволяет совершенствовать синтез аскорбиновой кислоты, сокращая многэтапные и дорогие химические стадии. Например, синтез витамина С осуществляют енолизацией его важнейшего промежуточного продукта — 2-кето-L-гулоновой кислоты, которую, в свою очередь, получают методом двухстадийного микробиологического синтеза, состоящего из окисления d-глюкозы в 2,5-дикето-d-глюконовую кислоту (2,5-ДКДГК) и биотрансформации последней в 2-кето-L-гулоновую кислоту (2-КГК).

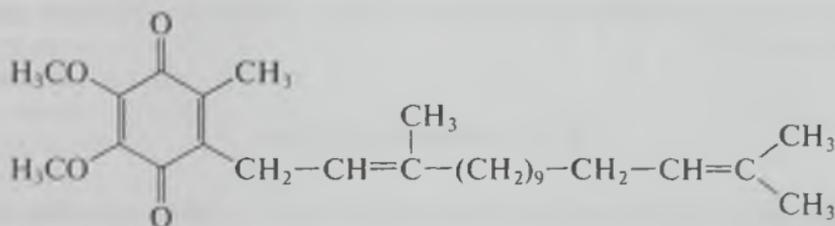
Основными продуктивными микроорганизмами, обеспечивающими процессы окисления d-глюкозы в 2,5-ДКДГК и восстановление последней до 2-КГК, являются мутантные штаммы *Erwinia punctata* и *Corynebacterium* sp., при использовании которых выход целевого продукта составляет около 90 % количества глюкозы.

Однако данная технология имеет существенные недостатки, так как при совместном культивировании продуцентов происходит ингибирование синтеза 2-КГК. Поэтому культуральную жидкость после выращивания продуцента 2,5-ДКДГК стерилизуют, применяя поверхностно-активные вещества (ПАВ), что позволяет значительно сократить потери при получении гулоновой кислоты.

Существует и другой биотехнологический способ получения гулоновой кислоты, основанный на синтезе этого продукта штаммом микроорганизмов рода *Gluconobacter* из сорбозы, производ-

Использование отходов крахмало-паточного производства — кукурузного экстракта и зеленой патоки позволяет снизить себестоимость получаемой продукции, а применение в качестве источника углерода целлобиозы, образующейся при утилизации отходов целлюлозы, позволяет в несколько раз увеличить синтез каротиноидов у штаммов культуры *Blakslea trispora*.

### Убихиноны (коферменты Q)



Убихиноны в последнее время вызывают интерес как перспективные лечебные препараты. С одной стороны, они синтезируются в организме животных и человека, делая необязательным их поступление с пищевыми продуктами, что отличает их от группы витаминов.

С другой стороны, недостаток убихинонов ведет к нарушениям в обменных процессах, характерных для проявлений недостаточности витаминов групп В и К. Убихиноны являются регуляторами тканевого дыхания, окислительного фосфолирования в цепи транспорта электронов и за счет высокой специфичности проявляют свой регуляторный эффект.

С практической стороны наибольший интерес вызывают высшие гомологи: убихинон-9 ( $\text{CoQ}_9$ ) и убихинон-10 ( $\text{CoQ}_{10}$ ). Убихинон-10 является коферментом организма человека, вследствие чего на его основе создан лекарственный препарат *Ubichynon compositum*, проявляющий общетонизирующее, антиоксидантное и иммуностимулирующее действие.

В производстве убихинонов применяются биотехнологические методы, в основе которых лежит экстракция  $\text{CoQ}$  из биологического материала. В промышленном производстве убихинонов в качестве субстрата используются как растительные ткани (каллус риса или опухольевые ткани *Carthamus tinctorius*), так и микроорганизмы с высоким содержанием убихинонов, например дрожжи *Cryptococcus curvatus* и грибы *Candida maltosa*.

В настоящее время используется биотехнология получения убихинона-9 и эргостерина из микробных липидов, являющихся побочным продуктом крупного производства белково-витаминного концентрата при выращивании грибов *Candida maltosa*.

Установлено, что биомасса уксуснокислых бактерий (*Glucobacter oxydans*), которые используются в производстве аскорбиновой кислоты на этапе окисления d-сорбита в L-сорбозу, содержит значительное количество КоQ<sub>10</sub> без примеси его гомологов. Причем, с одной стороны, эта биомасса является отходом производства аскорбиновой кислоты, с другой стороны, штаммы *Glucobacter oxydans* в биомассе характеризуются наибольшей окислительной активностью по сорбиту. Этот уникальный факт позволил разработать и внедрить совместную технологию получения L-сорбозы и экстракции убихинона-10 из отсепарированной биомассы с последующей очисткой и с выходом целевого продукта до 85 %.

### 8.3. Аминокислоты

Все более ухудшающиеся экологические условия создают для населения планеты новую тяжелую проблему — выживание. Одновременно к этой проблеме добавляются такие факторы, как бедность, плохое питание, неуверенность в завтрашнем дне, стрессы. Хорошо изучено благоприятное действие аминокислотных смесей на иммунную систему и различные органы. Помимо этого аминокислоты заменяют насыщенные белком пищевые продукты, недоступные для большинства населения низкоразвитых стран. Таким образом, аминокислоты становятся в настоящее время одним из важнейших факторов выживания населения Земли.

Все 20 аминокислот хорошо изучены (методы их синтеза давно подробно описаны) и являются составными элементами белков или мономерами для построения природных полипептидов. Известно также, что эти соединения существуют в виде оптических изомеров. При этом надо отметить, что аминокислоты в белках находятся в L- и D-формах (L,D-стереоизомеры), причем биологически активны в основном L-формы, а D-стереоизомеры могут быть даже токсичными. Все аминокислоты делятся на незаменимые и заменимые, в зависимости от того, синтезируются они в организме человека или нет. Приблизительно половина из 20 аминокислот являются незаменимыми, а остальные, соответственно, заменимыми.

Незаменимые аминокислоты имеют широкий спектр применения как в сельском хозяйстве (кормовые балансирующие добавки), так в пищевой (биологически активные добавки) и медицинской (лекарственные препараты и смеси для парентерального питания) промышленности.

В сельском хозяйстве аминокислоты используются для балансировки кормов по аминокислотному составу, чтобы в организм животных и птиц они поступали в том соотношении, в каком

они находятся в белках этих животных и птиц. Введение аминокислот в корма обеспечивает максимальную скорость синтеза белка и, соответственно, рост биомассы животного. Это очень важно в случае «скороспелого» животноводства, свиноводства и птицеводства.

В питательные продукты для человека также можно добавлять незаменимые аминокислоты. Это целесообразно делать или по медицинским показаниям, или в силу каких-либо соображений, когда человек питается только растительной пищей (растительными белками). Эту пищу можно оптимизировать и улучшить ее питательные свойства, сбалансировав ее по аминокислотному составу путем добавления туда лизина, треонина, метионина (например, в пищу для вегетарианцев). Кроме того, что аминокислоты имеют огромное значение для нашей пищи, они также широко используются и в традиционной клинической практике (табл. 2).

Таблица 2

**Моно- и комплексные лекарственные препараты  
на основе аминокислот**

| Препарат | Действие  | Применение  |
|----------|---|---|
| Глицин   | Обладает ноотропным и седативным эффектом; снижает проявления абстиненции у больных алкоголизмом  | В клинике нервных и психических заболеваний; в наркологии — для стимуляции умственной деятельности (некоторые студенты проводят терапию глицином перед экзаменами)  |
| Глутамин | Обеспечивает формирование высших психических функций; участвует в многообразных реакциях пересаминирования, т. е. обеспечивает синтез других заменимых аминокислот; активно связывает образующиеся в процессе метаболических реакций ионы аммония, которые являются токсичными и накопление их в клетках головного мозга вызывает процесс возбуждения | В клинике нервных и психических заболеваний, а также при задержке умственного развития у детей; входит в состав комплексных препаратов для профилактики стресса, например препарат глутаминит наряду с витаминами и микроэлементами содержит также и глутаминовую кислоту |

| Препарат          | Действие   | Применение   |
|-------------------|--|--|
| Метионин          | Является донором метильной группы в разных биохимических реакциях. В частности, при участии метионина осуществляется синтез холина (соединение, входящее в состав клеточных мембран) из жиров; обладает липотропным и гепатропным эффектом | При циррозах и гепатитах печени и лицам преклонного возраста, у которых имеются признаки атеросклероза                             |
| Цистеин           | Приостанавливает процесс помутнения хрусталика   | В начальных стадиях развития катаракты; входит в состав глазных капель — витайодурола и др.  |
| Тимоген           | Иммуностимулирующее; усиливает неспецифическую резистентность организма  | Для стимуляции репаративных процессов после тяжелых травм (в том числе переломов костей)   |
| Церебролизин      | Регулирует процессы регенерации в головном мозге   | После травм головного мозга; инсультов и ишемического голодания головного мозга, а также при задержке умственного развития у детей |
| Румалон           | Корректирует метаболизм костной и хрящевой ткани   | При артритах и артрозах  |
| Раверон           | Регулирует обмен веществ в предстательной железе   | Воспалительные болезни и гиперплазия предстательной железы   |
| Эмбриобласт       | Усиливает метаболические процессы  | Для профилактики и коррекции возрастных изменений кожи лица и шеи  |
| Препарат NCTC-109 | Создает благоприятную среду для метаболических процессов   | Для ускорения заживления и восстановления кожных покровов  |

Перечень препаратов на основе аминокислот и их комплексов постоянно растет и расширяется. Очень хорошую перспективу для успешного развития имеют препараты для парентерального питания, содержащие комплексы аминокислот. Они назначаются, когда питание «естественным» образом противопоказано, так как стимулирует секрецию пищеварительных желез. Например, при остром панкреатите человек не должен ни пить, ни есть, поскольку любая стимуляция секреции может привести к самоперевариванию поджелудочной железы.

Тенденция сегодняшнего дня — использование препаратов, содержащих весь комплекс аминокислот (или, по меньшей мере, 18 из них), т. е. в оптимальном для человеческого организма соотношении. В основном это импортные препараты: аминоклазаль, кетостерил, валин (Германия); аминостерил КЕ (Финляндия); аминосола (Югославия). Некоторые из этих препаратов помимо аминокислот содержат также глюкозу и витамины. Соотношение аминокислот в них оптимальное. В организме человека в зависимости от возраста синтезируются белки соответствующего состава, например аминокислотный состав этих препаратов для детей приближается к составу грудного молока матери, для взрослых он несколько иной.

Установлено, что в любом органе и ткани имеются свои пептиды — соединения, состоящие из небольшого количества аминокислотных остатков, которые образуются и выделяются при их разрушении, стимулируют, как правило, и процессы их регенерации. В соответствии с этим из того или иного органа животных готовят экстракты и на их основе — лекарственные препараты, которые используют для терапии заболеваний этих органов. Общим для всех этих препаратов является то, что действующим началом у них являются пептиды. В частности, в препарате на основе тимуса — тимогене таким действующим началом является глутамилтриптофан (дипептид, состоящий из глутаминовой кислоты и триптофана). Аминокислоты также входят в состав комплексных препаратов, применяемых в косметологии.

Существуют так называемые космоцевтические медицинские препараты, для получения которых используется фармацевтическое сырье, к чистоте которого предъявляют повышенные требования. При этом известно, что особочистыми являются вещества, полученные биотехнологическими методами, например с помощью специально выведенных штаммов-микроорганизмов.

Иллюстрацией может служить препарат эмбриобласт, получаемый из эмбриональной зубной ткани овец, содержащий как биостимуляторы (факторы роста, цитокины и др.), так и необходимый «строительный материал» — аминокислоты, нуклеотиды, витамины, минералы.

В настоящее время аминокислоты получают методами:

- биологическим (применение гидролиза белоксодержащих субстратов);
- химическим (тонкий органический синтез);
- химико-энзиматическим (энзиматическая трансформация химически синтезированных предшественников аминокислот с образованием биологически активных L-изомеров);
- микробиологическим (получение L-аминокислот).

Древнейший способ получения аминокислот — кислотный, щелочной или ферментативный гидролиз белоксодержащих субстратов (мясо, молоко и т.д.). При высокой температуре белок расщепляется на соответствующие аминокислоты или фрагменты, состоящие из нескольких аминокислот. При этом образуется смесь аминокислот и пептидов. Извлечение из этой смеси какой-либо определенной аминокислоты — довольно сложная, но тем не менее выполнимая задача.

Само по себе сырье (мясо и белок молока — казеин) — дорогостоящий продукт, и этот метод применяется, когда имеют дело с «бросовым» сырьем, т.е. с отходами производства (таким сырьем являются рога, копыта, волосы, перья и пух, состоящие из кератина, в котором содержится очень много серосодержащей кислоты цистеина, и — в небольших количествах — других аминокислот).

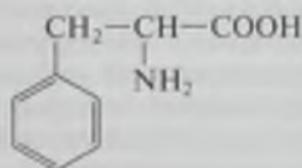
Следующий способ получения чистых аминокислот — химический синтез. Их синтезируют подобно другим органическим кислотам, это не сложно. Однако в процессе химического синтеза получается смесь D- и L-стереоизомеров (иногда получается и большее количество изомеров), а как известно, в белках человека биологически активны только L-стереоизомеры аминокислот, поэтому существуют трудности разделения этих изомеров. Кроме того, химическое производство аминокислот, как правило, связано с использованием дорогостоящего оборудования и нередко агрессивных токсических соединений в качестве исходного сырья. Процесс протекает при высокой температуре, требует дорогостоящих катализаторов и как всякое химическое производство сопровождается образованием побочных продуктов, загрязняет окружающую среду, небезопасно и небезвредно для обслуживающего персонала.

Тем не менее некоторые аминокислоты получают химическим синтезом, например глицин, а также D-, L-метионин, D-изомер которого малотоксичен, поэтому медицинский препарат на основе метионина содержит D- и L-формы, хотя за рубежом в медицине используется препарат, содержащий только L-форму метионина. Там рацемическую смесь метионина разделяют биоконверсией D-формы в L-форму под влиянием специальных ферментов живых клеток микроорганизмов.

Следующий способ получения аминокислот — химико-энзиматический. Как видно из названия, этот метод получения ами-

нокислот предполагает два этапа. Сначала химическим методом синтезируется «предшественник» — соответствующая карбоновая кислота, а затем эта карбоновая кислота (обычно в присутствии аммиака) превращается в соответствующую аминокислоту. Эта биотрансформация (биоконверсия) осуществляется ферментами живых клеток. Причем полученные L-стереоизомеры аминокислот сами по себе необходимы для жизнедеятельности этих клеток, т. е. фактически этот способ наполовину биотехнологический. Таким методом получают, например, аспарагиновую кислоту (на основе фумаровой кислоты). Раствор фумаровой кислоты пропускают через колонки, в которых иммобилизованы или ферменты, или клетки микроорганизмов с высокой активностью аспартазы, например, *Escherichia coli* или *Serratia marcescens*; туда же подается аммиак и осуществляется биотрансформация.

Аналогичным образом на основе коричной кислоты получают фенилаланин (L-стереоизомер):



используя для этого дрожжевые клетки. Химико-энзиматически можно производить практически все аминокислоты, однако из-за дороговизны и сложности получения соответствующих органических кислот-предшественников этот метод не всегда экономически выгоден и в большинстве случаев уступает методу прямого микробиологического синтеза.

Четвертый способ получения аминокислот — их прямой микробиологический синтез — целиком основан на использовании биообъектов (т. е. является полностью биотехнологическим). В качестве биообъектов в нем применяются штаммы-продуценты аминокислот. Этим методом аминокислоты чаще всего получают на основе *Escherichia coli* (кишечная палочка — симбионт человека), *Bacillus subtilis* (сенная палочка — почвенный микроорганизм) и *Corynebacterium glutamicum* (почвенный микроорганизм).

Все эти микроорганизмы на сегодняшний день прекрасно изучены. Известна полная нуклеотидная последовательность всего их генома. Для кишечной палочки разработаны многообразные способы генетического обмена, позволяющие легко комбинировать разные гены и изменять процесс метаболизма. В меньшей степени это относится к *Bacillus subtilis*, и еще в меньшей степени к *Corynebacterium glutamicum*.

Использование этих микроорганизмов для получения аминокислот основано на их способности самостоятельно синтезировать все 20 аминокислот. Также они являются гетеротрофными

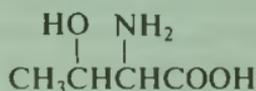
бактериями, которые в качестве источника углерода используют органические соединения (углевод или какую-нибудь органическую кислоту), а все остальные компоненты получают из неорганических соединений.

Применение микроорганизмов гетеротрофов позволяет существенно сократить по времени процесс ферментации. Так, кишечная палочка в богатой питательной среде делится каждые 20—30 мин, коринебактерии — каждый час. В бедных средах — время регенерации в два раза больше (1 ч для кишечной палочки, 1,5—2 ч для коринебактерий и сенной палочки).

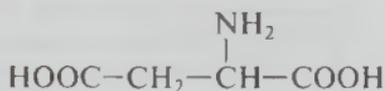
Вместе с тем существуют бактерии, так называемые ауксотрофные мутанты — микроорганизмы, которые, с одной стороны, утратили способность самостоятельно синтезировать необходимые для построения всех компонентов своей клетки разные аминокислоты, а с другой — приобрели способность к сверхсинтезу целевой аминокислоты. Такие мутанты получают либо воздействием различных мутагенов физической и химической природы на исходную культуру микроорганизма с последующей селекцией штамма по заранее заданным признакам, либо методами генной инженерии.

Известно, что клетки бактерий синтезируют аминокислоты для удовлетворения собственных потребностей (синтез белка и другие метаболические процессы); синтезируется их в клетках бактерий определенное количество. В процессе эволюции (естественного отбора) выживали только те формы, в которых метаболические процессы протекали наиболее экономно, и это обеспечивалось за счет механизмов регуляции этих процессов.

Известно, что в регуляции и управлении метаболическими процессами используется принцип обратной связи. Существуют два уровня (механизма) регуляции биосинтеза конечного (целевого) продукта — ретроингибирование и репрессия. На первом уровне образующаяся в цепи последовательных реакций аминокислота ингибирует активность одного из начальных ферментов собственного синтеза. Если этого механизма недостаточно и конечный продукт (аминокислота) все равно присутствует в избытке, то включается второй механизм регуляции и в результате подавляется (репрессируется) образование всего комплекса ферментов соответствующей биосинтетической цепи. На примере биосинтеза аминокислоты треонина:



можно показать, как реализуются эти принципы в клетках кишечной палочки. Треонин, а также лизин и метионин относятся к семейству аспарагиновой кислоты. В клетках бактерий сначала синтезируется аспарагиновая кислота:



а затем на ее основе синтезируются треонин, метионин и лизин (поэтому они и объединены в семейство аспарагиновой кислоты). Синтез каждой из этих аминокислот осуществляется в несколько этапов с образованием промежуточных соединений. Каждый из этих этапов катализируется белком-ферментом, синтез которого контролируется (кодируется) соответствующим геном, в нуклеотидной последовательности которого записана структура этого белка.

Первая реакция синтеза этих аминокислот — превращение аспарагиновой кислоты в аспартил-фосфат под влиянием фермента аспартокиназы (киназы — ферменты, «навешивающие» фосфорную группу).

Следующий этап — превращение аспартил-фосфата в полуальдегид аспарагиновой кислоты (промежуточное соединение). Эту реакцию катализирует фермент дегидрогеназа полуальдегида аспарагиновой кислоты. Ген, контролирующий синтез этого фермента, локализуется в другом участке хромосомы и называется ASD. Под влиянием фермента гомосерин-дегидрогеназы, кодируемого геном треонин А-2, синтезируется гомосерин, который является предшественником для синтеза треонина и метионина. В свою очередь гомосерин под влиянием фермента гомосерин-киназы превращается в гомосерин-фосфат (ген, кодирующий эту реакцию, — треонин В). И, наконец, гомосерин-фосфат под воздействием фермента треонин-синтетазы превращается в треонин. Ген, кодирующий образование (синтез) этого фермента, — треонин С. При добавлении в среду пирувата из треонина образуется изолейцин (рис. 15).

Все структурные гены в хромосоме кишечной палочки расположены в определенной последовательности в общей регуляторной области, которая включает промотор (участок связывания РНК-полимеразы, которая считывает информацию, в результате чего образуется информационная РНК, которая затем присоединяется к рибосомам и транслируется, при этом образуется каждый из указанных белков-ферментов) и так называемый аттенуатор — регуляторный элемент, который воспринимает сигналы обратной связи.

Необходимо подчеркнуть, что синтез треонина происходит одновременно с ростом биомассы и после остановки ее роста синтез треонина замедляется и постепенно прекращается (рис. 16, кривая 1).

Регулируется биосинтез треонина в клетках кишечной палочки следующим образом: когда треонин в клетках бактерий накапливается в количестве большем, чем его нужно для метабо-

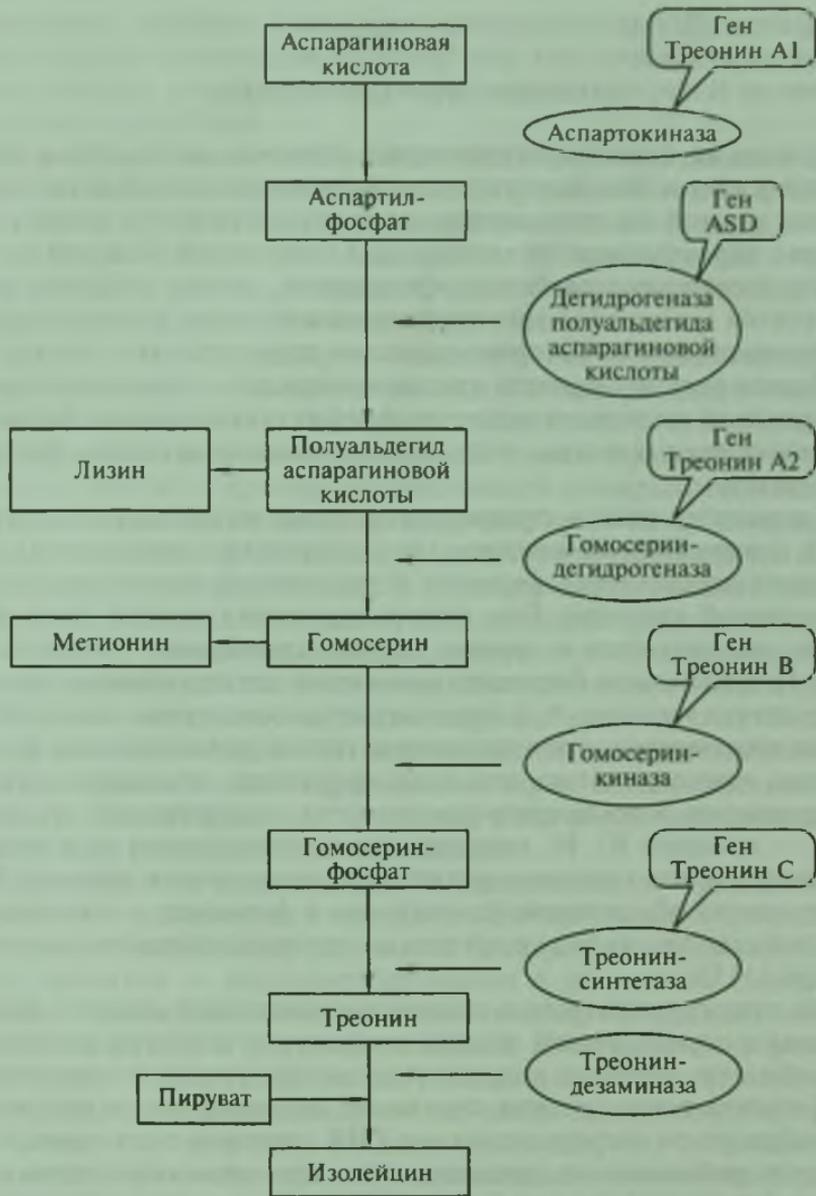


Рис. 15. Схема биосинтеза треонина у бактерий *Escherichia coli*

лических процессов и синтеза белка, и появляется в свободном состоянии, — он подавляет активность фермента аспартокиназы. Фермент аспартокиназа — аллостерический фермент (allos — другой), имеющий кроме активного центра еще один, так называемый аллостерический центр, который может взаимодействовать с низкомолекулярными эффекторами. И таким эффектором в дан-

ном случае является треонин. При присоединении к аллостерическому центру треонин изменяет конформацию аспартокиназы, в результате чего активный центр становится недоступным для субстрата, и фермент утрачивает активность.

В свою очередь подавление активности аспартокиназы ведет к прекращению синтеза аспартил-фосфата и, соответственно, прекращается синтез всех промежуточных соединений пути биосинтеза треонина.

Когда одного механизма оказывается недостаточно и треонин продолжает накапливаться в избытке, у кишечной палочки включается еще один механизм регуляции биосинтеза — репрессия. При этом, если треонин накапливается в избытке, он превращается в изолейцин, который, в свою очередь, также накапливается в избытке. В тот момент, когда треонин и изолейцин накапливаются в избытке *одновременно*, они опосредованно взаимодействуют с аттенуатором и подавляют транскрипцию, вызывая ее терминацию. В этом случае синтез всех белков-ферментов данного синтетического пути прекращается.

Как уже отмечалось, у природных микроорганизмов контроль за скоростью биосинтеза аминокислот исключает их перепроизводство, поэтому выделение аминокислот из клетки в среду возможно лишь у культур с нарушенной системой регуляции. Советскими учеными в конце XX в. был создан штамм-суперпродуцент треонина. Использование его в промышленных масштабах позволило увеличить синтез треонина до 100 г/л, а время ферментации сократилось до одних суток.

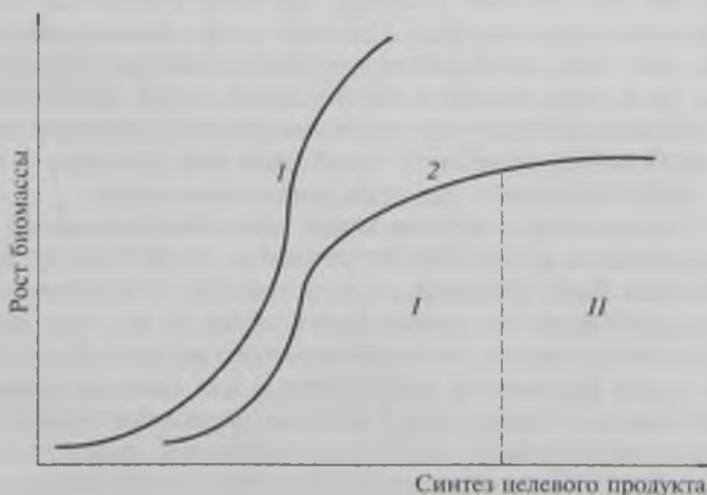
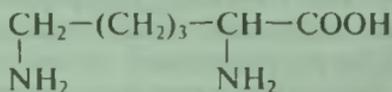


Рис. 16. Зависимость синтеза треонина и лизина от роста биомассы:  
1 — треонин; 2 — лизин (I, II — стадии процесса)

В промышленном производстве лизина



в настоящее время используется штамм-суперпродуцент коринебактерий (*Corynebacterium glutamicum*). Продолжительность ферментации 2—3 сут. Уровень накопления целевого продукта составляет 50—100 г/л.

Коринебактерии являются грамположительными, более древними в эволюционном отношении микроорганизмами, отличаются от грамотрицательной кишечной палочки также тем, что у них очень низкая активность внутриклеточных протеиназ, поэтому синтезированные клеткой белки-ферменты долго остаются в активном состоянии.

Схема биосинтеза лизина представлена на рис. 17. У штамма *Corynebacterium glutamicum* существует только один механизм регуляции биосинтеза по принципу обратной связи — совместное (согласованное) ретроингибирование активности аспартокиназы. Это единственный фермент, активность которого регулируется совместно треонином и лизином. Когда треонин и лизин *одновременно* избыточно накапливаются в клетке, они *вместе* присоединяются к аллостерическому центру; в результате, активность аспартокиназы подавляется, и этот биосинтетический путь блокируется.

Итак, синтез лизина контролируется треонином и лизином, а чтобы получить штамм-суперпродуцент лизина, нужно «убрать» треонин, так как треонин и лизин, находясь в избытке, подавляют активность аспартокиназы. Поэтому нужно блокировать синтез треонина. Для этого необходимо получить мутацию, блокирующую этот ген, но в этом случае в питательную среду необходимо добавлять чистый треонин (так как большинство продуцентов лизина неспособны синтезировать гомосерин или треонин — они являются «ауксотрофами» по этим аминокислотам).

Если блокировать в другом месте цепи биосинтеза, то мутант будет нуждаться в метионине и треонине, тогда в среду добавляют гомосерин. Если добавить в среду треонин и метионин в *ограниченном* количестве, то штамм будет расти до тех пор, пока они не будут израсходованы, но в клетках этого штамма будут присутствовать также ферменты, необходимые для синтеза лизина, которые длительно сохраняются в клетках коринебактерий в активном состоянии. И штамм начнет синтезировать лизин, т. е. синтез лизина штаммом *Corynebacterium glutamicum* будет осуществляться, только когда исчерпан треонин. Экспериментально подбирают такое количество треонина и метионина, которое при внесении в питательную среду обеспечило бы максимальный синтез

лизина. Как только треонин исчезает из среды и рост биомассы прекращается, начинается активный синтез лизина. Таким образом, данный процесс имеет две стадии развития: рост биомассы и синтез лизина (рис. 16, кривая 2).

Биотехнологи при разработке микробиологической технологии получения аминокислот в процессе культивирования продуцентов подбирают такие условия, при которых скорость синтеза аминокислоты клетками продуцента являлась бы максимально высокой и сохранялась максимально долго, а также образование побочных продуктов биосинтеза сводилось бы к минимуму.

Максимально высокая скорость синтеза достигается при создании оптимальных условий выращивания высокоактивной биомассы. Для этого в ферментере поддерживаются определенные (оптимальные) концентрации источников углерода, аммонийного азота, минеральных солей, ростовых факторов, pH и температура.

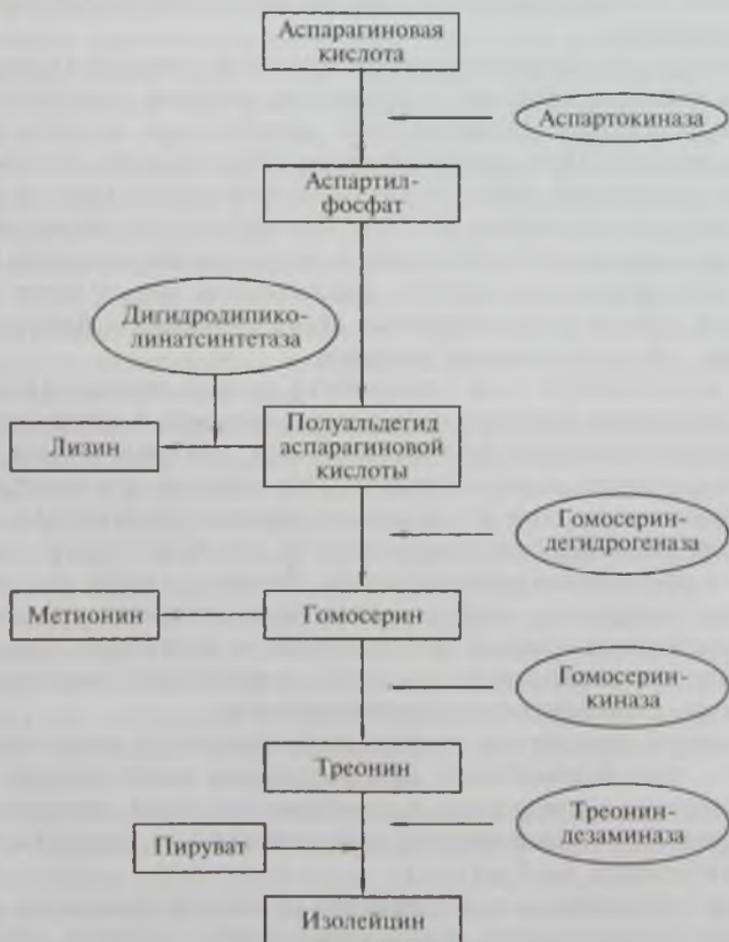


Рис. 17. Схема биосинтеза лизина у коринебактерий

Все процессы с высоким уровнем накопления аминокислоты (порядка 50—100 г/л) ведутся при дробной подаче субстратов — источников углерода и азота. В качестве источников углерода при биосинтезе аминокислот используют углеводы или органические кислоты (например, ацетат), а в качестве источника азота, необходимого для построения аминокислотной группы, — аммонийные соли и аммиак.

Несмотря на то, что аминокислоты в целом нейтральны, в процессе их биосинтеза происходит сильное закисление среды вследствие нарушения ионного баланса культуральной жидкости. Дело в том, что микроорганизмы-продуценты преобразуют ионы аммония  $\text{NH}_4^+$ , присутствующие в питательных средах в форме аммонийных солей ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и др.), в аминные группы аминокислот. При этом в среде остаются несбалансированными «лишние» радикалы  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ . Для поддержания в среде оптимальной концентрации ионов аммония и оптимальной величины рН биосинтез аминокислот ведут при автоматическом рН-статировании аммиаком.

Оптимальную концентрацию источников углерода в среде можно поддерживать, подавая в ферментер раствор углеводов с той скоростью, которая отражает темп потребления сахаров культурой продуцента. При промышленном производстве аминокислот широко применяют также автоматический режим подачи углеводов по сигналу от датчика рН. При этом рН-статирование ведут не аммиаком или аммиачной водой, а *смесью аммиачной воды и углеводов*. При правильном выборе соотношения между ними на постоянном уровне поддерживается концентрация не только ионов аммония, но и источников углерода.

Для ауксотрофов типа продуцента лизина чрезвычайно важным параметром является начальная дозировка в среде источников ростовых факторов (тех аминокислот, которые штамм не может синтезировать самостоятельно). Их избыток приводит к угнетению биосинтеза; при их дефиците концентрация клеток продуцента в ферментере будет недостаточна для обеспечения высокой скорости накопления аминокислоты. Поэтому у продуцентов, аналогичных продуценту лизина, существует оптимальная концентрация ростовых факторов. Эта величина не постоянна. Она может варьировать в зависимости от сырья, аэрационных возможностей аппаратуры, температуры культивирования.

Процессы биосинтеза аминокислот являются энергоемкими, в связи с чем ферментация при получении аминокислот обязательно должна проводиться в аэробных условиях при интенсивной аэрации и перемешивании, обеспечивающих скорость растворения кислорода 3—7 г/(л·ч).

После образования в ферментере активной биомассы, синтезирующей аминокислоту, необходимо создать условия, при которых клетки микроорганизмов «работали» бы как можно дольше.

В процессе биосинтеза по разным причинам они теряют жизнеспособность, и для продления активного участка ферментации применяют разные методы. В частности для ауксотрофных продуцентов аминокислот (например, продуцента лизина) продолжительность биосинтеза и выход целевой аминокислоты могут быть увеличены, если по ходу ферментации в питательные среды вносить подпитки, содержащие источники углерода в смеси с источниками ростовых факторов (белковыми гидролизатами).

Синтез целевой аминокислоты может прекращаться из-за воздействия на продуцент токсичных метаболитов синтезируемых самим же продуцентом. Примером сказанному может служить биосинтез фенилаланина продуцентом *Bacillus subtilis*. Бациллярные продуценты в процессе роста на средах с углеводами синтезируют ацетоин и бутандиол — вещества, необходимые клеткам для образования спор. При этом клетки начинают лизировать, спороваться и прекращают вырабатывать фенилаланин.

Избежать накопления побочных примесей удастся, если процесс ферментации ведут, лимитируя источник углерода. Раствор сахара, служащий для этого продуцента источником углерода, подают в среду с постоянной скоростью, но меньшей, чем скорость его утилизации культурой. Вследствие этого в культуральной среде поддерживается очень низкая «фоновая» концентрация источника углерода, и весь подаваемый сахар расходуется на синтез фенилаланина. В результате рабочий цикл ферментации возрастает в 1,5—2 раза, а доля примесей (не только ацетона, но и побочных аминокислот) снижается. При этом выход фенилаланина и конверсия источника углерода в целевую аминокислоту увеличивается почти в два раза.

Эффективность использования субстрата при биосинтезе целевой аминокислоты зависит также от продуктивности биомассы. Если синтез аминокислоты разобщен с ростом биомассы (как у продуцента лизина), то эффективность использования субстрата будет тем выше, чем дольше культура будет работать после остановки роста. Если же синтез идет параллельно росту (как у продуцента треонина), то продуктивность биомассы можно увеличить, перераспределив потоки субстратов внутри клетки, расширяя поток предшественников на биосинтез аминокислоты, одновременно сужая все остальные потоки. Однако не всегда этого удастся достичь с помощью таких технологических приемов, как в примере с продуцентом фенилаланина.

Для этой цели наиболее действенны методы генетической инженерии — введение в клетку микроорганизма многокопийных гибридных плазмид, содержащих гены, контролирующие биосинтез аминокислоты, что приводит к увеличению количества соответствующих ферментов в клетке. У генно-инженерных продуцентов ферментативная система действует наподобие «вакуумного насоса», мобили-

зующего все ресурсы клетки на образование целевой аминокислоты в ущерб росту биомассы и синтезу других клеточных компонентов. При введении гибридных плазмид побочные примеси, как правило, автоматически исчезают, при этом продуктивность биомассы и коэффициент использования субстрата существенно возрастают.

## 8.4. Пробиотики

Пробиотики — живые организмы и/или вещества микробного или иного происхождения, оказывающие при естественном способе введения благоприятные эффекты на физиологические функции, а также на биохимические и поведенческие реакции организма хозяина, оптимизируя его микробиологический статус.

Симбионт — участник симбиоза — совместного проживания организмов разных видов в одной и той же экологической нише. Симбиоз многоклеточных организмов с одноклеточными — древнейшее явление в эволюции. Оно возникло в тот момент, когда появились многоклеточные организмы. Известно, что в соответствии с научными представлениями жизнь на Земле возникла около 3—4 млрд лет назад в силу естественных причин. При этом первыми живыми существами были микроорганизмы. По некоторым данным их эволюция продолжалась около миллиарда лет. Именно за это время сформировалось все многообразие биохимических реакций, которые лежат в основе центрального метаболизма всех живых существ.

Многоклеточные организмы возникли на основе одноклеточных в мировом океане (в одной и той же экологической нише) и симбиоз многоклеточных организмов с одноклеточными наблюдался с самого начала их возникновения. Известно, что в процессе эволюции у многоклеточных организмов сформировались механизмы, обеспечивающие переменчивость внутренней среды, и типы взаимодействия многоклеточных организмов с одноклеточными. На сегодня известны следующие формы симбиоза:

- мутуализм — взаимовыгодный симбиоз;
- паразитизм — один из партнеров получает одностороннюю выгоду за счет другого;
- комменсализм — один из партнеров получает одностороннюю выгоду, не нанося при этом никакого ущерба другому организму;
- нейтрализм — партнеры не оказывают заметного влияния один на другого.

Все эти формы наблюдаются при рассмотрении симбиоза одноклеточных микроорганизмов с многоклеточными. Когда говорят конкретно о симбиозе человека с микроорганизмами, имеют в виду, что кожные покровы, слизистые оболочки и полости че-

ловеческого тела, сообщаясь с внешней средой, заселены огромным количеством микроорганизмов — симбионтов.

Примеры: желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) — от полости рта до прямой кишки; органы дыхания — от носоглотки до альвеол; толстый кишечник.

Особенно много микроорганизмов в толстом кишечнике, где насчитывается до 20 родов и более 100 видов микроорганизмов, обладающих огромной метаболической активностью. По этой активности микроорганизмы толстого кишечника сравнивают иногда с печенью, где метаболическая активность считается наивысшей. Естественно, что микроорганизмы толстого кишечника существенно влияют на физиологию человека (рис. 18). Микрофлора толстого кишечника участвует в процессе переваривания пищи — попадающие туда белки, углеводы и другие компоненты пищи расщепляются ферментами, продуцируемыми микроорганизмами-симбионтами. Они также способны продуцировать так называемые целлюлазы — комплекс ферментов, который позволяет расщеплять клетчатку.

Для человека эта функция симбионтной микрофлоры играет большую роль, у некоторых же организмов (травоядных и жвачных животных) усвоение клетчатки осуществляется только благодаря микроорганизмам-симбионтам. Микроорганизмы толстого кишечника могут осуществлять гидролиз (способствовать усвоению) других компонентов пищи. В частности, молочнокислые бактерии расщепляют лактозу до молочной кислоты. Микроорганизмы-симбионты способны также расщеплять некоторые другие попадающие с пищей соединения. Например, они могут восстанавливать нитраты до нитритов и затем катализировать их. Нитриты могут обладать мутагенными и аутогенными (онкогенными) свойствами, поэтому, нейтрализуя их, микроорганизмы предотв-

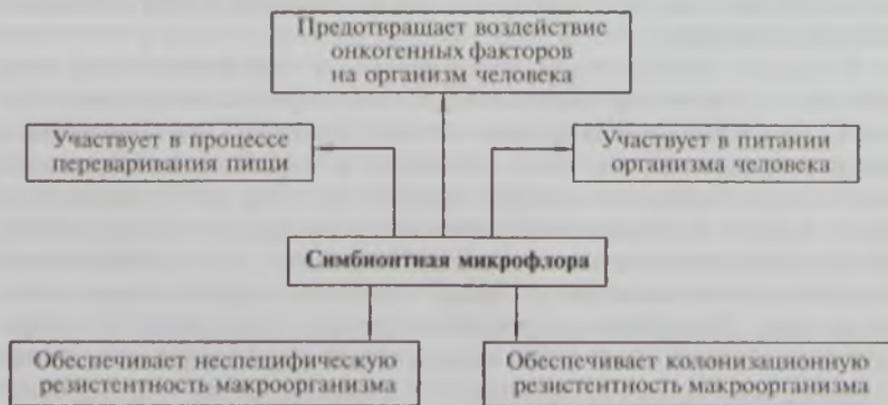


Рис. 18. Функции симбионтной микрофлоры

рашают воздействие этих потенциально активных аутогенных (онкогенных) факторов на организм человека. Но следует отметить, что некоторые микроорганизмы-симбионты могут активировать некоторые проканцерогенные вещества.

Микроорганизмы-симбионты обеспечивают организм человека некоторыми питательными веществами, например витаминами (К, группы В, в меньшей степени каротиноидами и другими жирорастворимыми витаминами). Кроме витаминов они способны продуцировать органические кислоты (молочную, уксусную, янтарную, муравьиную), которые всасываются и усваиваются макроорганизмом. Некоторые из этих микроорганизмов могут продуцировать незаменимые аминокислоты, в частности лизин, триптофан, треонин. Одновременно микроорганизмы симбионты обеспечивают утилизацию микроэлементов, образуя комплексы, которые более эффективно всасываются стенками кишечника, что особенно важно, когда этих микроэлементов в пище оказывается недостаточно.

Симбионтная микрофлора является также стимулятором неспецифического иммунитета (антигенным стимулятором) и обеспечивает неспецифическую резистентность макроорганизма.

И последнее: заселив ЖКТ (резидентная микрофлора), микроорганизмы-симбионты препятствуют поселению здесь посторонних микроорганизмов, в том числе и патогенных. В окружающей среде существует огромное количество микроорганизмов, которые нашли бы в кишечнике человека благоприятные условия для своего развития (это и обилие питательных веществ, и постоянная температура, и влажность). Однако патогенные микроорганизмы (гнилостные, а также продуцирующие разные токсины и токсические соединения, например, *Clastridium butulinum*) не размножаются в кишечнике человека. Почему же этого не происходит? Потому что экологическая ниша занята микроорганизмами-симбионтами, препятствующими поселению в ней посторонней микрофлоры.

Функции симбионтной микрофлоры в основном были установлены в течение прошлого века. Главную роль сыграли эксперименты на стерильных животных (гнотобионтах). Гнотобиология — область биологии, которая занимается изучением стерильных животных, в организм которых вводят тот или иной микроорганизм, а затем исследуют влияние микрофлоры на жизнедеятельность организма животных и птиц. Например, для получения стерильного цыпленка куриное яйцо тщательно обрабатывают антисептиками, убивая все микроорганизмы на поверхности и в порах скорлупы, и помещают его в термостат. Через 21 день вылупляется цыпленок, которого помещают в стерильную камеру, куда подается стерильный воздух; кормят стерильной пищей и поят стерильной водой.

Стерильных животных также можно получать кесаревым сечением. Например, беременной свинье делают кесарево сечение; затем половину числа поросят помещают в стерильные условия, а остальных — в обычные и сравнивают. На основании подобных опытов было установлено:

- стерильные животные живут несколько дольше, чем нестерильные. В начале прошлого века И. И. Мечников выдвинул гипотезу, что одна из причин старения — отравление организма человека гнилостной микрофлорой, обитающей в толстом кишечнике. Идея И. И. Мечникова о том, что существуют гнилостные микроорганизмы, с которыми можно бороться с помощью других микроорганизмов, которые подавляют рост первых, получила свое дальнейшее развитие и на ее основе были созданы препараты пробиотиков;

- эти животные нуждаются в большом количестве питательных веществ, витаминов, органических кислот, хуже усваивают некоторые органические соединения;

- они чрезвычайно чувствительны к любой слабовирулентной и даже условно-патогенной инфекции. Попавшие в стерильную среду условно-патогенные бактерии сразу же заселяют ЖКТ и, не находя там никакой конкуренции, проникают в кровоток, вызывая инфекцию и быструю гибель животного. Это связано с отсутствием у таких животных реакций неспецифического иммунитета, которые индуцируются симбионтной микрофлорой.

Какие же микроорганизмы-симбионты обитают в ЖКТ? Классификация их постоянно меняется, поэтому рассмотрим основные группы микроорганизмов, присутствующих в ЖКТ.

Первая группа — бифидобактерии (*Bifidobacterium bifidum*, *longum*, *infantis*, *breve*) и молочнокислые бактерии (*Lactobacillus acidophilus*, *plantarum*) — грамположительные, анаэробные микроорганизмы (строгие анаэробы), обычно лишенные каталазы, неспорообразующие. Это самая многочисленная группа микроорганизмов-симбионтов. В процессе метаболизма они продуцируют молочную кислоту (иногда только ее) и другие органические кислоты (уксусную и т. д.).

В кишечном содержимом ребенка, находящимся на грудном вскармливании, бифидобактерии составляют до 99 % всех микробных популяций. Их титр доходит до  $10^{11}$  —  $10^{12}$  в 1 г кишечного содержимого. Это сметанообразная масса, из которой состоят экскременты ребенка, находящегося на грудном вскармливании. С началом прикорма к содержимому кишечника ребенка присоединяются другие микроорганизмы. Среди них важная роль принадлежит лактобактериям или молочнокислым бактериям. Количество лактобацилл у здоровых людей в 1 г кишечного содержимого колеблется, составляя  $(5-50) \cdot 10^8$ .

Большинство из вышеперечисленных бактерий относится к совершенно безвредным микроорганизмам. Они ни при каких усло-

виях не вызывают патологические процессы. Существует вид *Lactobacillus plantarum* — растительная палочка (млечный сок на срезах растений), которая также присутствует в кишечнике человека. Этот микроорганизм не относится к совершенно безвредным лактобактериям. У людей с различными видами иммунодефицита (СПИД, аутоиммунные заболевания и т. д.) *Lactobacillus plantarum* находят даже на клапанах сердца при эндокардитах.

Следующий род молочнокислых бактерий кишечника — энтерококки, которые сравнительно недавно были выделены из рода *Streptococcus*. Существуют два важнейших вида энтерококков: *Enterococcus faecium* и *Enterococcus faecalis*. Среди последнего вида культур часто встречаются штаммы, которые могут вызывать патологические процессы.

Вторая группа бактерий — условно-патогенные и гнилостные бактерии (в принципе, это одни и те же микроорганизмы, и это деление носит условный характер). Условно-патогенные (следует из названия) бактерии при определенных условиях могут вызывать патологические процессы. Эти бактерии постоянно присутствуют в организме человека и поражают его, когда он либо ослаблен, либо в том случае, когда численность условно-патогенных бактерий возрастает до очень высоких значений. В последнем случае они вызывают вялотекущие воспалительные процессы в ЖКТ (энтероколиты и дизентероподобные заболевания). Также они могут заселять и нетипичные для них области, например протоки поджелудочной железы и желчного пузыря, а также сам желчный пузырь, вызывая там патологические процессы (в нормальном состоянии в этих областях микроорганизмов-симбионтов нет — они стерильны).

Наконец, у ослабленных людей условно-патогенные микроорганизмы могут поступать в кровь и вызывать очаговые воспалительные процессы (эндокардиты, артриты, гнойничковые заболевания — вплоть до сепсиса). Важнейшая по значению группа (не по численности) — семейство энтеробактерий — кишечная группа микроорганизмов. К ней относятся как явные патогены, например некоторые виды сальмонелл — возбудители таких инфекционных заболеваний, как тиф, паратиф (*Sallmonella typhi* и *Sallmonella paratyphi*) и дизентерия (*Shigellae*), так и большое количество условно-патогенных бактерий. К числу последних относятся: кишечная палочка, протеи, сальмонеллы, стафилококки и др.

Второй по численности род микроорганизмов обитателей кишечника (после бифидобактерий) — бактероиды. Это грамотрицательные микроорганизмы, строгие анаэробы. Их титр в одном грамме кишечного содержимого составляет  $10^{10}$ — $10^{11}$ . Среди этих микроорганизмов есть и муколитические штаммы, выполняющие полезные функции, однако у ослабленных людей эти штаммы могут вызывать патологические процессы.

Следующая группа — кластридии (*Clastridium*). Эти микроорганизмы выполняют важную экстралитическую функцию (именно кластридии продуцируют экстралитические ферменты); одновременно при определенных условиях они могут вызывать и патологические процессы, например при попадании в брюшную полость. К кластридиям также относятся и некоторые патогены (возбудители газовой гангрены, столбняка, ботулизма).

В кишечнике (так же как и в других полостях организма) встречаются дрожжи рода *Candida* (условно-патогенные микроорганизмы, которые при избыточном размножении вызывают молочницу). При применении антибиотиков широкого спектра действия резидентная микрофлора кишечника уничтожается, а так как эти антибиотики не действуют на дрожжи рода *Candida*, то естественно, что в отсутствие конкуренции эти микроорганизмы избыточно размножаются.

Итак, важнейшая роль среди этих двух основных групп микроорганизмов принадлежит бифидо- и молочнокислым бактериям, которые благодаря своей антагонистической активности по отношению к условно-патогенным бактериям подавляют жизнедеятельность последних. При этом они полностью контролируют численность условно-патогенных и гнилостных бактерий и поддерживают ее на уровне, безопасном для физиологии человека.

Симбионтная микрофлора делится на пристеночную и внутриполостную. Пристеночные бактерии размножаются на поверхности эпителия, а внутриполостные прикрепляются к твердым остаткам пищи, так как многим видам бактерий для того, чтобы они размножились (делились), нужно прикрепиться к какому-нибудь твердому субстрату.

К внутриполостным относятся энтеробактерии и некоторые штаммы бифидо- и лактобактерий.

Антагонистическая активность бифидо- и молочнокислых бактерий по отношению к условно-патогенной микрофлоре (бактериостатическое и бактерицидное действия) проявляется в виде факторов ее подавления:

- образования молочной и других органических кислот (муравьиная кислота), токсичных для условно-патогенных и гнилостных микроорганизмов. Одновременно эти кислоты снижают рН кишечного содержимого (закисляя его), что также неблагоприятно сказывается на жизнедеятельности последних;

- образования пероксидных соединений, при расщеплении которых выделяется атомарный кислород, подавляющий клетки условно-патогенной микрофлоры;

- образования антибиотикоподобных веществ (бактериоцинов: ацидофилина, колицинов и др.), подавляющих метаболизм условно-патогенных и гнилостных бактерий, взаимодействуя с клеточной мембраной и вызывая лизис клеток;

- способности прикрепляться к эпителию кишечника, образуя на его поверхности плотную биопленку (за счет интенсивного размножения), что является препятствием для фиксации патогенных микроорганизмов;

- изменения окислительно-восстановительного потенциала среды, что создает неблагоприятные условия для размножения условно-патогенных и гнилостных микроорганизмов.

Совокупность этих факторов в целом подавляет избыточное развитие условно-патогенной и гнилостной микрофлоры. Состояние микроэкологической системы толстого кишечника, когда молочнокислые бактерии преобладают в численности над условно-патогенными и гнилостными бактериями, называется зубиозом или зубактериозом. И наоборот, состояние, при котором численность бифидо- и молочнокислых бактерий снижается, а гнилостных и условно-патогенных соответственно возрастает, называется дисбактериозом. Избыточное размножение гнилостных микроорганизмов будет вызывать интоксикацию макроорганизма, включая порочный круг явлений, когда у ослабленного человека возникают и развиваются дополнительные инфекции. Более того, при этом условно-патогенные микроорганизмы способны сами вызывать развитие дисбактериоза.

Какие причины ведут к развитию дисбактериоза? Одна из них — попадание в организм человека группы веществ с антибактериальной активностью. Среди таких веществ первое место принадлежит антибиотикам. Конечно, антибиотики, как раньше, так и сейчас, играют колоссальную роль в терапии больных с инфекциями разного рода, спасении сотен миллионов жизней, но у них имеется негативный эффект: они не выбирают между мутуалистическими штаммами (молочнокислые бактерии), патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Антибиотики широкого спектра действия подавляют всю микрофлору ЖКТ, в том числе и молочнокислые бактерии. Их подавление ведет к тому, что по завершении лечения условно-патогенные бактерии и гнилостные микроорганизмы начинают доминировать над молочнокислыми бактериями. Дело в том, что в клетках гнилостных и условно-патогенных бактерий чаще встречаются плазмиды, определяющие устойчивость к тем или иным антибиотикам, которые передаются от клетки к клетке. В результате популяция условно-патогенных и гнилостных микроорганизмов становится устойчивой к действию тех или иных антибиотиков.

Кроме антибиотиков в организм человека с пищей попадают вещества, которые вводят в пищу специально для предотвращения ее порчи гнилостными микроорганизмами. Это так называемые консерванты, которые сами по себе обладают антибактериальной активностью. В пище могут содержаться и антибиотики, которые применяют в животноводстве и птицеводстве для лече-

ния заболевших животных и птиц, а также для стимулирования их роста и развития. Пища (особенно растительная) может содержать гербициды и пестициды, обладающие антибактериальной активностью.

Развитию дисбактериоза способствует изменение гормонального статуса макроорганизма (во время полового созревания, беременности, при половом угасании). Физиологическое состояние макроорганизма влияет на жизнедеятельность, размножение и поддержание симбионтной (в частности, пристеночной) микрофлоры. С возрастом количество пристеночной микрофлоры (молочнокислых бактерий) уменьшается, происходит изменение гормонального статуса. При этом возможно очень быстрое слушивание пристеночной микрофлоры — слизистая обнажается и становится доступной для условно-патогенных и гнилостных микроорганизмов.

Оказывается, что если человек испытал сильный стресс, то у него на следующий день может появиться диарея и связано это с изменением гормонального статуса под влиянием стресса. А если этот стресс хронический, то тем самым создаются условия для развития дисбактериоза.

Препараты пробиотиков предназначены для профилактики и лечения дисбактериоза. В России производят в основном моновалентные препараты: бифидумбактерин (на основе *Bifidobacterium bifidum*), апилак (на основе *Lactobacillus acidophilus*), колибактерин (на основе кишечной палочки *E. coli* M-17), лактобактерин (на основе *Lactobacillus plantarum, fermentum*). Комплексные препараты, например бификол (*Bifidobacterium* и *E. coli* M-17). За рубежом — поливалентные (комплексные) препараты: симбиофтор (*Enterococcus faecium* + *E. coli*), бификор (*Bifidobacterium longum* + *Enterococcus faecium*), примодофилюс (содержит комплекс микроорганизмов симбионтов) и другие — энтерол (на основе дрожжей), гастрофарм (*Lactobacillus bulgarius* не является симбионтом и поэтому действует какое-то короткое время). Существуют препараты, которые содержат живые клетки микроорганизмов симбионтов, но при этом не являются пробиотиками, например бактисуптил (на основе культуры *Bacillus cereus*, мутантного штамма IP 5832).

Особенно широко применяют пробиотики в клинике детских болезней (при острой дизентерии, сальмонеллезе, эшерихиозе, вирусных диареях, диатезе и др.). Известно, что в детском организме еще не сформировалась микробиологическая система ЖКТ, поэтому у детей часто наблюдаются диспепсия и диарея. В этом случае применение препаратов пробиотиков оказывается очень эффективным. Изучение длительного применения препаратов пробиотиков в детских коллективах показало, что дети, систематически получавшие данные препараты и кисломолочные продук-

ты, содержащие пробиотические штаммы, реже болеют не только кишечными инфекциями, но и ОРЗ, лучше растут и развиваются, легче переносят любые детские инфекции. Препараты пробиотиков также применяют в комплексном лечении кишечных инфекций (при колитах; бактериальных кольпитах, вызванных стафилококком и кишечной палочкой; энтероколитах на фоне нарушения микрофлоры с дефицитом или полным отсутствием бифидофлоры и др.).

По завершении лечения антибиотиками необходимо обязательно провести лечение пробиотиками для восстановления нормальной микрофлоры. Пробиотики назначают также ослабленным людям при соматических заболеваниях. Нередко возникает порочный круг, когда сама ослабленность является причиной дисбактериоза, а он в свою очередь усугубляет течение соматического заболевания. Препараты пробиотиков назначают и лицам преклонного возраста, так как у них в связи с изменением гормонального статуса уменьшается количество бифидо- и лактобактерий. Поэтому для нормализации микрофлоры нужно периодически (а в преклонном возрасте — постоянно) потреблять диетические пищевые продукты наряду с препаратами пробиотиков. Например, ацидофилин, который получают на основе ацидофильной закваски, бифидумбактерин.

Какова технология процесса получения таких препаратов? Во-первых, необходимо иметь штаммы микроорганизма симбионта. Их выделяют из кишечного содержимого здоровых детей и взрослых, например штамм *Enterococcus faecium* был выделен из кишечника ребенка. Во-вторых, выделенные штаммы обязательно надо идентифицировать. Дело в том, что для получения пробиотиков разрешены штаммы только определенных видов микроорганизмов. Эти штаммы должны обладать следующими свойствами:

- эффективной антагонистической активностью, обеспечиваемой в свою очередь синтезом органических кислот, которые штамм должен активно продуцировать. При выделении штаммов бифидобактерий важным антагонистическим началом продуктов метаболизма являются муравьиная и молочная кислоты. Желательно также, чтобы эти штаммы продуцировали пероксиды и антибиотикоподобные вещества;

- эффективной способностью прикрепляться к эпителию кишечника, если речь идет о пристеночных микроорганизмах;

- не гидролизовать кишечную слизь, которая обладает протективным действием. Некоторые микроорганизмы продуцируют мукополисахариды, которые разрушают (гидролизуют) эту слизь;

- не повреждать клетки кишечного эпителия (холеститы).

Отобранные штаммы обязательно проверяют на патогенность и токсичность *in vitro* на культуре клеток холеститов, на чувствительных животных. Побочные эффекты у пробиотиков не должны

проявляться даже при их избыточных дозах. Для проверки препарат вводят в организм чувствительных животных в больших количествах, иногда до нескольких граммов на килограмм веса.

Штаммы должны быть технологичны, т.е. хорошо расти и размножаться на искусственных питательных средах. Их обрабатывают методом лиофилизации: замораживают до низких температур и затем высушивают при низком давлении. Соответственно, отобранные штаммы должны быть криорезистентны и выдерживать процедуру высушивания.

Удовлетворяющие всем этим требованиям штаммы поступают в контрольный институт, откуда их передают в фармацевтическое производство с соответствующими документами, в которых отражены их характеристики. В заводских лабораториях штаммы высеивают на искусственные питательные среды, проверяют их соответствие паспортным данным (род, вид, биологические свойства). И только после этого используют для получения препаратов пробиотиков. В условиях промышленного производства эти штаммы рассеивают и получают отдельные колонии, которые затем пересевают на агаризованные или жидкие питательные среды (например, молочнокислые бактерии хорошо растут в обезжиренном молоке).

И бифидобактерии, и лактобациллы, и энтерококки — это ауксотрофы, т.е. для своего роста они нуждаются в ряде питательных веществ и микроэлементов, не могут сами синтезировать аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины: их должна содержать питательная среда. Для культивирования этих бактерий используют такое сырье, которое разрешено к применению в пищевой промышленности, так как препарат, выращенный на этих средах, впоследствии используется для внутреннего применения.

Источником аминокислот обычно служит белок молока (казеин), который гидролизуют с помощью ферментов (трипсина и пепсина) и получают, соответственно, триптол или пептол. Как источник витаминов, а также пиримидиновых и пуриновых оснований используют дрожжевой экстракт, который получают из дрожжей рода *Saccharomyces* (пивных либо пекарских). В качестве микроэлементов используют соли магния, марганца, цинка, которые добавляют в питательную среду для культивирования молочнокислых бактерий. Источником энергии, как правило, служит лактоза или глюкоза.

Обычно молочнокислые бактерии культивируют от 8 до 16 ч (довольно короткая ферментация). Собирают штаммы в той фазе роста, при которой выживание клеток культуры будет наиболее длительным, что в свою очередь, при дальнейшем получении препарата, обеспечивает его длительное хранение. Все это определяется экспериментальным путем и часто является ноу-хау фир-

мы-производителя. Как правило, выбирают конец логарифмической фазы или начало стационарной, в зависимости от культуры (штамма). По завершении процесса культивирования получают бактериальную суспензию, содержащую в 1 мл  $10^9$  и более клеток. Эти клетки собирают, используя поточные центрифуги или сепараторы, в которых образуется похожая на сметану с кремовым оттенком масса со специфическим запахом кислого молока (напоминает прессованные дрожжи). Раствор криопротекторов (вещества белковой природы — обезжиренное молоко или желатин; углеводы — лактоза, сахароза) добавляют в проточную массу и получают густую суспензию клеток, которую разливают в ампулы. Затем их замораживают в жидком азоте и подвергают лиофильной сушке. Сухая масса приобретает пузырчатый вид. Ее измельчают и определяют титр, в соответствии с которым вносят во флаконы (стеклянные, пластмассовые) или смешивают с культурой другого штамма. В последнем случае получают несколько видов микроорганизмов симбионтов.

Форма выпуска — флаконы (бифидумбактерин) или ампулы (бификол, содержащий бифидобактерии и кишечную палочку), или капсулы (индийский препарат «Нутролин В», содержащий штаммы лактобацилл), или пакетики (бифидумбактерин фирмы «Партнер», Россия).

## 8.5. Ферменты

Ферменты или энзимы (*fermentum* — «закваска», *enzyme* — «в дрожжах») — высокомолекулярные соединения белковой природы, являющиеся катализаторами биохимических реакций в живых организмах и вне их. К настоящему времени найдена лишь одна ферментативная реакция небелковой природы, когда молекула РНК катализирует собственное «разрезание» на части.

В живой клетке присутствует множество разнообразных соединений, но реакции между ними не беспорядочны, а образуют строго определенные метаболические пути, характерные для данной клетки. Индивидуальность клетки в большой степени определяется уникальным набором ферментов, который она генетически запрограммирована производить. Отсутствие даже одного фермента или какой-нибудь его дефект могут иметь очень серьезные отрицательные последствия для организма.

Все ферменты относятся к глобулярным белкам, причем каждый фермент выполняет специфическую функцию, связанную с присущей ему глобулярной структурой. Однако активность многих ферментов с большой молекулярной массой — от 10 кДа до 1 МДа и более (для сравнения: молекулярная масса глюкозы 180, диоксида углерода 44, аминокислот от 75 до 204) зависит от

небелковых низкомолекулярных соединений, называемых кофакторами.

Молекулярный комплекс белковой части (апофермента) и кофактора называется холоферментом. Роль кофактора могут выполнять ионы металлов ( $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ) или сложные органические соединения. Органические кофакторы обычно называют коферментами, некоторые из которых являются производными витаминов. Связи между ферментом и коферментом могут быть разными. Иногда они существуют отдельно и связываются только во время реакции. В других случаях кофактор и фермент связаны постоянно и иногда прочными ковалентными связями (тогда небелковую часть фермента называют простетической группой). Важнейшими коферментами являются производные витаминов, кофакторами — минералы (макро- и микроэлементы). При дефиците витаминов и минералов активность ферментативных реакций резко падает, с чем связаны многие патологические процессы в организме.

Ферменты делятся на простые и сложные. Простые состоят только из аминокислот, а сложные (их большинство) помимо белка включают небелковую группу (кофактор или кофермент).

Особенностью ферментов является их исключительно высокая активность (они ускоряют реакции в миллиарды раз). Так, одна единственная молекула фермента может катализировать при обычной температуре превращение от тысячи до миллиона молекул вещества в минуту. Эта скорость катализа недостижима для небиологических катализаторов. Другое, не менее важное, свойство ферментов — специфичность (избирательность) их действия в отношении структуры субстрата, типа реакций и условий ее проведения.

Ферменты, обладая высокой специфичностью, направляют превращение вещества в строгое русло. Они катализируют реакции в мягких условиях, т.е. при обычном давлении, небольшой температуре и значениях pH, близких к нейтральным, весьма чувствительны к сдвигам pH среды и изменению температуры. Так как максимальная активность фермента обусловлена оптимальной конформацией молекулы фермента в целом и активного центра в частности, то даже небольшие изменения окружающих условий, которые затрагивают связывание субстрата или конформацию третичной структуры белка, будут соответственно влиять на скорость ферментативной реакции.

Оптимальное pH для каждого фермента означает, что состояние его ионизации соответствует наилучшей комплементарности. Изменение температуры вызывает противоречивый эффект: с одной стороны, при повышении температуры до  $37-40^{\circ}C$  скорость ферментативной реакции увеличивается, что закономерно для катализа; с другой стороны, при температуре более  $50^{\circ}C$  на-

чинается денатурация фермента. Ферментативные процессы не дают побочных реакций, для них характерен 100%-й выход целевого продукта.

Ферменты регулируются, т.е. могут изменять свою активность под воздействием ряда факторов, при этом выход целевого продукта будет разным. Этим обеспечивается скоординированность всех метаболических процессов во времени.

Скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента, поэтому недостаток фермента в организме означает низкую скорость превращения какого-либо соединения, и наоборот, одним из путей приспособления организма к изменениям внешней среды является увеличение количества требуемого фермента.

Известно более 6 000 ферментов, многие из которых катализируют только одну реакцию; 150 из них выделены в кристаллическом виде.

Энзимы классифицируются не как индивидуальные вещества, а как катализаторы определенных химических превращений или групп химических превращений, в соответствии с этим их подразделяют на шесть основных классов:

- оксидоредуктазы — катализаторы окислительно-восстановительных реакций;
- трансферазы — реакции переноса отдельных групп с одной молекулы на другую;
- гидролазы — гидролитическое расщепление связей (с участием воды);
- лиазы (синтазы) — реакции соединения или расщепления молекул (присоединения-отсоединения воды, аммиака, диоксида углерода и т.д.);
- изомеразы — взаимопревращение изомеров (изменение строения внутри одной молекулы);
- лигазы (синтетазы) — образование связей в реакции конденсации двух разных соединений с участием энергии АТФ.

Осознание ключевой роли ферментов во всех клеточных процессах привело к широкому их применению в разных отраслях, в том числе при производстве лекарственных средств, а также в медицинской практике в качестве лечебных и диагностических препаратов.

В настоящее время четко определились три основных направления исследований в области медицинской энзимологии: энзимопатология, энзимодиагностика и энзимотерапия.

*Энзимопатология.* Как известно, из более чем двух тысяч наследственных болезней человека молекулярный механизм развития выяснен только у двух-трех десятков. Чаще всего развитие болезни непосредственно связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза одного-единственного

фермента в организме больного. Типичный пример подобной связи болезни с отсутствием синтеза в печени специфического фермента — фенилпировиноградная олигофрения — наследственное заболевание, приводящее к гибели в раннем детстве или к развитию тяжелой умственной отсталости. Фермент фенилаланин-4-монооксигеназа, катализирующий реакцию превращения незаменимой аминокислоты фенилаланина в тирозин, не синтезируется в клетках печени. Лечение в основном сводится к исключению из питания ребенка (в том числе и из молока матери) аминокислоты фенилаланина. Аналогично развитие другого тяжелого наследственного заболевания — галактоземии (непереносимость молочного сахара) связано с отсутствием синтеза в клетках печени фермента, катализирующего превращение галактозы в глюкозу. Следствие подобной аномалии — накопление галактозы в тканях и развитие катаракты в раннем детстве, поражение тканей печени и мозга, нередко приводящее к гибели ребенка; лечение в этом случае сводится к исключению из диеты молочного сахара.

Помимо наследственных заболеваний энзимопатология успешно решает и проблемы патогенеза соматических болезней, в задачу которых входит выяснение молекулярных основ, например, злокачественного роста клеток, атеросклероза или ревматоидных артритов.

*Энзимодиагностика.* О степени поражения органов, биомембран клеток и субклеточных структур, о тяжести патологического процесса можно судить по появлению (или резкому повышению уровня) органотропных ферментов и изоферментов в сыворотке крови больных, что составляет предмет диагностической энзимологии.

В настоящее время известно более 30 ферментов, активность которых повышается в крови при повреждении клеток различных органов в период острого и хронического заболеваний. Определение активности большинства из этих ферментов в сыворотке крови используется для диагностики и контроля лечения многих заболеваний. Для каждого из этих ферментов определены контрольные величины (уровни) активности и пределы колебания в норме как в сыворотке крови, так и в самом органе.

В качестве примера можно сослаться на результаты определения активности трансаминаз — аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы; активности этих ферментов в сыворотке крови в норме составляют 5—40 МЕ. При сердечной недостаточности и ишемической болезни сердца активность обеих трансаминаз в сыворотке крови больного незначительно повышается, однако при наступлении инфаркта миокарда уже через 20 мин активность обеих трансаминаз в сыворотке крови резко (в десятки и сотни раз) превышает уровни контрольных величин в крови здорового человека.

Кроме трансаминаз сыворотки крови при инфаркте миокарда весьма информативными диагностическими ферментными пробами являются лактатдегидрогеназный и креатинфосфокиназный тесты, относящиеся также к так называемым некротическим ферментным методам. При повреждении и распаде части сердечной мышцы вследствие закупорки коронарной артерии тромбом из обескровленной зоны вымываются в кровь продукты распада, включая ферменты. При благополучном исходе болезни уровни ферментов в сыворотке крови возвращаются к норме уже ко второму-третьему дню после инфаркта. Но при повторном инфаркте миокарда, наступающем обычно в течение первой недели болезни, электрокардиограмма обычно не улавливает его, тогда как ферментные тесты реагируют повторным и резким повышением уровня их в сыворотке крови.

Диагностическая ценность ферментов существенно повысилась после внедрения в клиническую практику методов определения изоферментов. В этой связи отметим диагностическую значимость двух ферментов, определение изоферментных спектров которых внедрено почти во всех клинических лабораториях мира.

Первый из них — лактатдегидрогеназа (ЛДГ), катализирующая обратимое превращение пировиноградной кислоты в молочную. Подчеркнем, что ЛДГ является ключевым ферментом анаэробного обмена углеводов во всех живых организмах, определяя скорость образования энергии в виде аденозинтрифосфата (АТФ). Широко распространенный фермент ЛДГ синтезируется почти во всех клетках организма человека. Различают два типа ЛДГ: так называемый сердечный Н- (от англ. *heart* — сердце) и мышечный М-тип (от англ. *muscle* — мышцы); каждый из них состоит из четырех субъединиц. При органическом поражении сердечной мышцы, например инфаркте миокарда, в сыворотке крови резко повышается уровень общей лактатдегидрогеназы, что преимущественно обусловлено изоферментами 1 и 2 (это очень важно для точности диагноза).

При поражениях скелетной мускулатуры, а также при воспалительных процессах (гепатиты) или при вирусных поражениях ткани печени, и, наконец, при отравлении тетрахлоридом углерода или другими ядами, когда преимущественно поражается печень, вызывая некроз ткани, уровень изоферментов 3 и 4 ЛДГ резко повышается при почти неизменном уровне 1 и 2 изоферментов. Естественно, что методы лечения будут резко отличаться; в выборе метода немалую роль играет изоферментный спектр ЛДГ Н- или М-типа.

Второй фермент, диагностическая ценность которого еще выше, особенно при инфаркте миокарда, — креатинфосфокиназа (КФК), катализирующая биосинтез креатинфосфата из креатина и АТФ. Креатинфосфокиназа — ключевой фермент биосинтеза макроэр-

гического субстрата — креатинфосфата, играющего наряду с АТФ выдающуюся роль в биоэнергетике сердечной мышцы и всего организма. Молекула КФК также состоит из субъединиц двух типов — мышечного (М) и мозгового (В) (от англ. *brain* — мозг); выделены и охарактеризованы три изофермента КФК.

Диагностическая энзимология достигла значительных успехов при постановке диагноза болезней не только указанных органов, но и других, в частности почек, поджелудочной железы, желудка, кишечника и легких.

Одним из первых тестов на поражение печени является определение активности щелочной фосфатазы — фермента, катализирующего отщепление фосфатной группы от органических соединений — эфиров фосфорной кислоты. Активность данного фермента значительно повышается при первичных и вторичных новообразованиях печени, печеночном холестазах, циррозе печени. Также в клинической практике широко используют, например, определение трансаминазы в сыворотке крови — фермента, открытого только в ткани почек и поджелудочной железы; или определяют активность фермента гистидазы, обнаруженного только в клетках печени и эпидермиса кожи. При органических поражениях этих органов, воспалительных процессах, травмах, хирургических вмешательствах в сыворотке крови больных появляются указанные ферменты, в норме в ней отсутствующие.

*Энзимотерапия.* В настоящее время для фармацевтических целей применяется свыше 40 ферментных препаратов животного, растительного и микробного происхождения. Получен ряд препаратов протеолитического действия (трипсин, химотрипсин и др.); специальные фибринолитические препараты (фибринолизин, стрептолиза и др.); препараты, уменьшающие вязкость гиалуроновой кислоты (лидаза, ронидаза) и др. Эти препараты часто используются при лечении заболеваний, сопровождающихся гнойно-некротическими процессами, при тромбозах и тромбоэмболиях, нарушениях процессов пищеварения и др. Ферментные препараты находят также применение при лечении онкологических заболеваний (аспарагиназа). Новые перспективы успешного применения ферментных препаратов открывает разработка новых лекарственных форм — иммобилизованных ферментов (стрептодеказа).

Одновременно стал расширяться круг лекарственных средств, действие которых связано с инактивированием ферментов. К ним относятся ингибиторы протеолитических ферментов (пантрипин, ингитрил и др.), широко применяемые при лечении острых панкреатитов и других заболеваний; избирательно действующие ингибиторы фибринолиза (аминокапроновая кислота и др.), применяемые в качестве антигеморрагических средств; также большая группа антихолинэстеразных препаратов; ингибиторы моноами-

ноксидазы, применяемые как психотропные средства; ингибиторы карбоангидразы, используемые в качестве диуретиков. Эффективность аллопуринола при гиперурикемии связана с ингибированием им фермента ксантиноксидазы, действие тетурама при лечении алкоголизма — с угнетением им фермента ацетальдегидоксидазы.

Важную группу лекарственных веществ составляют реактиваторы ферментов, восстанавливающие инактивированную функцию ферментов (реактиваторы холинэстеразы).

Микробиологическим синтезом для медицинских целей получают следующие ферментные препараты:

- солизим — гидролизующий жиры липолитический фермент, который применяется при хронических заболеваниях ЖКТ;
- $\alpha$ -амилаза — сахаролитический фермент, гидролизующий крахмал, используется в составе лечебного препарата «фестал» при недостаточной функции поджелудочной железы;
- террилитин — протеолитический фермент, который рекомендуется для лечения гнойных ран ожогов, трофических язв;
- стрептокиназа — фибринолитический фермент, эффективный при лечении тромбозов;
- галактозидаза — сахаролитический фермент, хорошо зарекомендовавший себя при лечении лактазной недостаточности.

Традиционные биотехнологии, основанные на переработке тканей животных, поставляют в медицинскую практику:

- трипсин, химотрипсин — протеолитические ферменты, используемые для рассасывания рубцов и спаечных процессов;
- урокиназу — протеолитический фермент, предназначенный для лечения тромбозов;
- пепсин — протеолитический фермент, незаменимый при расстройствах пищеварения.

Те же традиционные биотехнологии, но основанные на переработке растительного сырья, дают такие протеазы, как бромелин, папаин, фицин, которые используются в заместительной терапии при нарушении пищеварения и в серологической диагностике для выявления резус-фактора.

Лекарственные формы на основе ферментов характеризуются большим разнообразием — это таблетки, капсулы, мази, аэрозоли.

В нашей стране и за рубежом первое место по объему выпускаемых ферментных препаратов занимают протеолитические, наиболее глубоко изученные среди всех известных ферментов. Протеазы в числе первых белков были получены в высокоочищенном кристаллическом состоянии. Расшифрована первичная структура таких ферментов, как химотрипсин, трипсин, папаин, субтилизин. К настоящему времени известно четыре класса протеаз: сериновые, карбоксильные, цистеиновые и металлопро-

теазы. Классификация основана на специфическом строении активных центров этих ферментов, которые представляют уникальное сочетание определенных аминокислотных остатков, расположенных в разных точках полипептидной цепи. Для идентификации определенных реакционных групп используют специфические ингибиторы.

Класс сериновых или щелочных протеаз объединяет группу протеолитических ферментов, содержащих в активном центре триаду: аспарагин — серин — гистидин. Специфическими ингибиторами этих ферментов, чья максимальная активность проявляется в диапазоне рН 7,5—12,5, являются фенилметилсульфонилфторид и диизопропилфторфосфат.

К щелочным протеазам относятся ферменты из животного сырья: трипсин и химотрипсин, которые широко используются в медицинской практике как для местного и парентерального применения. Их применяют и в виде аэрозолей при воспалительных заболеваниях дыхательных путей — трахеитах, пневмонии, а также в виде внутримышечных инъекций при остеомиелитах, тромбозах и разных формах пародонтоза. По отношению к здоровым тканям эти препараты неактивны и безопасны в связи с наличием в этих тканях ингибиторов трипсина.

Из различных штаммов микроорганизмов *Bacillus subtilis* выделены и детально изучены внеклеточные щелочные протеиназы. Субтилизины — одни из немногих белков, для которых определена трехмерная структура и построена модель молекулы. Благодаря широкой специфичности действия, эти ферменты гидролизуют до 80 связей в белках. Они обладают эстеразной и амидазной активностями; стабильны в диапазоне рН 5—10, однако оптимум действия проявляют при рН 9—10. По механизму действия и субстратной специфичности субтилизины близки к трипсину и химотрипсину, несмотря на отсутствие какого-то бы ни было сходства в структуре между ними. В биотехнологической промышленности щелочные протеазы из бактериальных культур задействуются для гидролиза белков с последующим использованием гидролизатов в качестве компонентов питательных сред, поставляемых в клиничко-бактериологические лаборатории.

Основными представителями класса карбоксильных или кислых протеаз являются пепсин, химозин и протеазы из грибов. Первичная структура пепсина расшифрована и включает 300 аминокислотных остатков. Пепсин продуцируется клетками слизистой оболочки желудка в виде зимогена — неактивной формы фермента, которая активируется под действием другого фермента-активатора, отщепляющего в молекуле зимогена аминокислоту с N-конца. В активном центре зимогена содержатся две карбоксильные группы аспарагиновой кислоты. Специфическим ингибитором протеаз данного класса является природный пепстатин. Для кислых про-

теаз характерны некоторые общие признаки. Они стабильны в кислой среде (рН 2,0—5,0); оптимум действия при рН 1,5—5,0 и быстро инактивируются при нейтральном значении рН. Пепсин и химозин не имеют  $\alpha$ -спиралей, но характеризуются наличием антипараллельной  $\beta$ -структуры. Японские исследователи полагают, что устойчивость кислых протеаз при низких значениях рН связана именно с этой особенностью их вторичной структуры.

Тиолзависимые или цистеиновые протеазы в медицинской практике представляют папаин из дынного дерева, фицин из латекса растений, бромелин из плодов ананаса и ряд ферментов из микроорганизмов.

Цистеиновые протеазы содержат в активном центре триаду аминокислот — цистеин-гистидин-аспарагиновая кислота. Активность тиоловых протеаз подавляется специфическими блокаторами сульфгидрильных групп (йодацетатом, йодацетамидом, П-хлормеркурибензоатом, ионами тяжелых металлов). Их максимальная активность проявляется при рН 6,0—9,5. Папаин и химопапаин устойчивы к действию температуры. Отличительная особенность этих ферментов — высокая устойчивость к денатурирующим веществам, например в 6—8 М мочеvine или в 70 % метиловом спирте их активность не изменяется.

При изучении их гидролитической активности было показано, что эти ферменты расщепляют белки глубже по сравнению с ферментами животного и бактериального происхождения. Так, папаин способен гидролизовать практически любые пептидные связи. Кроме пептидных связей тиолзависимые ферменты гидролизуют амидные и эфирные связи.

Бромелин, папаин и фицин используются в медицине для лизирования нежизнеспособных некротических тканей при лечении гнойно-воспалительных процессов. В результате ферментатического очищения ран сроки заживления сокращаются в 1,5—2,0 раза. Бромелин, папаин и фицин применяются в заместительной терапии при нарушении пищеварения, а также в акушерской практике при выявлении и предотвращении резус-конфликтных ситуаций.

Класс нейтральных или металлопротеаз составляют ферменты в основном микробного происхождения. Нейтральные протеазы в активном центре содержат ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Эффективные при нейтральных значениях рН металлопротеазы проявляют строго эндопептидазную активность и не расщепляют пептидные связи, образованные аминокислотными остатками со свободной  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -группами. Нейтральные протеазы гидролизуют казеин, желатин, яичный альбумин и в отличие от субтилизинов не обладают эстеразным действием. В медицинской практике широко используется террилитин из *Aspergillus terricola* для лечения острых гнойных заболеваний и трофических язв. Ингаляциями

террилитином лечат воспалительные процессы в легких. Другая нейтральная протеаза микробного происхождения — коллагеназа применяется в глазной хирургии для рассасывания рубцовой ткани.

Несмотря на то, что уже осуществлен лабораторный синтез ряда ферментов — рибонуклеазы, лизоцима, ферредоксина и цитохрома С, трудно ожидать, что синтетическое получение ферментов получит широкое распространение в ближайшие десятилетия ввиду сложности и дороговизны, поэтому единственным способом получения ферментов остается выделение их из биологических объектов. Выделяют ферменты так же, как и другие белки, хотя есть приемы, применяемые преимущественно для ферментов. Из них можно отметить экстракцию глицерином, в котором сохраняются нативные свойства ферментов, а также метод ацетоновых порошков, заключающийся в осаждении и быстром обезвоживании (при температуре не выше 10 °С) тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты.

К числу таких методов относится и получение ферментов путем адсорбции с последующей элюцией (снятием) с адсорбента. Адсорбционный метод выделения и очистки ферментов разработан детально. Одна из его модификаций — аффинная хроматография, где адсорбентом служит вещество, с которым фермент взаимодействует избирательно. В результате лишь этот фермент задерживается на колонке, а все сопутствующие ему вещества выходят с током проявителя. Изменяя характер проявителя, нужный фермент элюирует с колонки. Этим методом достигают очистки фермента в несколько тысяч раз, применяя всего лишь одноступенчатую (аффинная сорбция — элюция) схему выделения.

Наряду с ним широко применяют метод ионообменной хроматографии, метод молекулярных сит, электрофорез и особенно изоэлектрофокусирование.

Для успешного выделения ферментов из клеточного содержимого необходимо очень тонкое измельчение исходного материала, вплоть до разрушения субклеточных структур (в частности, лизосом, митохондрий, ядер), несущих в своем составе многие индивидуальные ферменты. Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, исключающих денатурацию белка, которая ведет к потере ферментативной активности. Поэтому данные технологические операции проводят в присутствии защитных добавок, в частности, SH-содержащих соединений (цистеина, глутатиона, меркаптоэтанола, цистеина и др.). Очень важно поддерживать на всех этапах выделения ферментов низкую температуру, так как некоторые из ферментов даже при 80 °С теряют активность. Для оценки гомогенности ферментного препарата прибегают к обычным методам бел-

ковой химии. О степени чистоты ферментного препарата судят, как правило, по его биологической активности: если активность при дальнейшей очистке не возрастает, препарат можно считать гомогенным.

В качестве примера можно привести краткие технологические схемы получения трех ферментов: террилитина, стрептокиназы и липазы.

Протеолитический ферментный препарат террилитин получают культивированием штамма *Aspergillus terricola* с последующим отделением от мицелия. Затем полученный нативный раствор освобождают от пигментов пропусканием через анионит (продукт поликонденсации феноксипроизводных формальдегида при нейтральном рН). Далее методом ультрафильтрации раствор ферментов обессоливают и концентрируют; полученный концентрат лиофилизируют. С целью сокращения длительности процесса и увеличения выхода целевого продукта депигментированный нативный раствор дополнительно очищают от высокомолекулярных балластных веществ.

Стрептокиназу получают непрерывным культивированием продуцента *Streptococcus egyptisimilis* на питательной среде, включающей мясопептонный бульон, содержащий настой из говяжьих сердец, глюкозу и бикарбонат калия. Подачу питательной среды регулируют в зависимости от изменения рН культуральной взвеси.

Далее целевой продукт выделяют и очищают. Для повышения выхода целевого продукта питательную среду перед культивированием нагревают до заданного рН.

Липазу получают из семян хлопчатника, которые облучают определенное время импульсным концентрированным светом. Затем семена проращивают в темноте. Проросшие семена измельчают и обрабатывают ацетоном, после чего последовательным осаждением раствором сульфата аммония и ацетона липазу выделяют из ацетонового экстракта. Для увеличения выхода целевого продукта и повышения его активности перед облучением семена предварительно замачивают.

### Контрольные вопросы

1. Какие химические модификации стероидной молекулы осуществляются с помощью биотрансформации?
2. Что служит основным источником сырья для производства стероидных препаратов и почему?
3. На чем основан выбор микроорганизмов, способных трансформировать стероиды?
4. Что лежит в основе классификации витаминов?
5. Какие методы доминируют в производстве витаминов?

6. Какая стадия получения аскорбиновой кислоты является биотехнологическим методом?

7. Какие лекарственные препараты на основе аминокислот существуют?

8. В чем отличие биосинтеза треонина от биосинтеза лизина?

9. Каковы причины развития дисбактериоза?

10. Какие требования предъявляются к производственному штамму микроорганизма-симбионта?

11. Какие основные классы ферментов существуют?

12. Каковы особенности методов очистки и выделения ферментов?

## **БИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

### **9.1. Общая характеристика**

Одним из главных механизмов, поддерживающим стабильность жизни на Земле, является сохранение разнообразия, взаимосвязанного и взаимозависимого сосуществования человека и природы. Так, академик Г. Ф. Гаузе доказал, что устойчивость сообщества тем выше, чем больше число составляющих его видов. Рост городов, вырубка лесов, ухудшение экологии, усиленная эксплуатация дикорастущих и плантационных растений — традиционного источника лекарственных средств приводят к растущему дефициту сырья. Многие виды растений находятся на грани вымирания. Использование культур клеток и тканей растений помогает спасти от уничтожения ставших уже редкими тысячи дикорастущих растений, которые синтезируют необходимые для жизнедеятельности человека вещества.

Культивирование растительных клеток и тканей на искусственной питательной среде в биореакторах помимо решения ряда экономических экологических и технологических задач позволяет, в частности, преодолеть ряд проблем:

- свести к минимуму влияние климатических, сезонных и географических условий;
- сократить посевные площади в хозяйственном обороте страны;
- получать уже известные, присущие интактному растению вещества, например никотин, кодеин, хинин, диосгенин и синтезировать новые биологически активные соединения;
- использовать культуры растительных клеток для биотрансформации конечных продуктов.

Использование новых технологий получения биомассы лекарственных растений (содержащих то или иное активное начало) в виде каллусных (лат. *callus* — толстая кожа, мозоль) и суспензионных культур имеет ряд преимуществ:

- стандартность накапливаемого сырья;
- высокий выход активного начала (на примере культивирования женьшеня: рентабельность производства стала возрастать при внедрении технологии получения «бородатых корней», где по условиям роста и скопления клеток возникают субпопуляции с повы-

шенной дифференцировкой — самые продуктивные клетки по биоактивным веществам);

- сокращение сроков культивирования для накопления растительной биомассы;

- возможность промышленного производства биомассы экзотических растений, малодоступных для нашей страны, например, таких как раувольфия, диоскорея, унгерея и др.;

- использование разных технологических режимов;

- использование методов иммобилизации и биотрансформации для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применительно к растительным клеткам.

Однако растительные клетки и ткани имеют свои особенности, затрудняющие работу с их культурами (по сравнению с клетками микроорганизмов):

- размеры клеток растений (15 — 1 000 мкм) в 50 — 100 раз больше, чем клеток бактерий;

- в результате роста клеток растений у них появляется большая вакуоль, при этом все физические и химические константы клеток изменяются;

- суспензионные культуры состоят из клеток-агрегатов разного размера;

- культуры клеток растений имеют целлюлозную стенку, что весьма затрудняет работу биотехнолога с такими культурами.

Промышленный способ выращивания изолированных культур дает возможность за сравнительно короткий срок (30—45 сут) получить значительный объем ценного лекарственного сырья, используя каллусные и суспензионные культуры.

Метод получения лекарственных средств на основе культур клеток растений начинается с процесса получения культуры каллусной ткани (или каллуса), образующейся в местах повреждения органов растения (спонтанная пролиферация клеток растения), и используется для получения изолированных тканей и клеток растения. Впервые каллусная культура была получена в 1902 г. Она состоит из сообщества клеток, выращиваемых на искусственной питательной среде. До середины 1950-х гг. культуры каллусных тканей использовали как модельную систему для исследования физиологических и биохимических процессов в работе с изолированными клетками и органами растений.

Через некоторое время было доказано, что культуры клеток растений на искусственных питательных средах могут синтезировать вещества, присущие интактному растению, т.е. могут быть продуцентами БАВ. В этой связи необходимо рассмотреть такое понятие как тотипотентность — способность любой клетки образовывать полноценное растение, что предопределено ее генетическим потенциалом. Все типы дифференцировки — образование отдельных дифференцированных клеток, тканей, органов (орга-

ногенез) — возможны, благодаря тотипотентности, т.е. любая растительная клетка содержит полный набор генов организма, из которого она была выделена.

В культуре каллусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток, поэтому морфогенез в них можно рассматривать как проявление тотипотентности растительных клеток. Каждая клетка каллусной культуры может дать начало целому организму, однако реально детерминируется только одна из 400 — 1 000 клеток, что, по-видимому, определяется как физиологическим состоянием клетки, так и ее компетентностью.

Существенную роль в дифференциации клеток играют как генотип растения-продуцента, так и условия культивирования. Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях происходит независимо от принадлежности растений к той или иной таксономической группе. Существуют общие требования к выращиванию объектов в культуре *in vitro*.

Асептика является обязательной и необходимой для культивирования как отдельных клеток, так и каких-либо фрагментов ткани или органа растения (экспланта). На растительных тканях может оказаться эпифитная микрофлора, которая в дальнейшем обнаружится и в культуре ткани. Внутреннее инфицирование растительной ткани чаще всего встречается у тропических и субтропических растений. Поэтому кроме поверхностной стерилизации с использованием дезинфицирующих веществ применяются и антибиотики, убивающие микробную флору внутри ткани, однако существует серьезная проблема подбора антибиотика направленного действия.

Для успешного культивирования клеток и тканей какой-либо культуры растений необходимо учитывать влияние физических факторов на рост и физиологические характеристики этой культуры на уровне фенотипа и генотипа (рис. 19).

Большинство каллусных тканей растут в условиях слабого освещения, так как они не способны к фотосинтезу. Но в то же время свет может являться и фактором морфогенеза, активирующим процессы вторичного синтеза. В качестве источника света используются люминесцентные лампы. Примером влияния освещенности на метаболизм каллусных клеток является культура чайного растения, у которого под действием света увеличивается биосинтез полифенолов. Однако в культуре клеток *Scopolia parviflora* тот же свет подавляет образование алкалоидов.

Для большинства каллусных культур также важна оптимальная температура (около 26 °С).

Из-за низкой интенсивности дыхания этих клеток потребность их в кислороде соответственно понижена, и необходимость в обес-

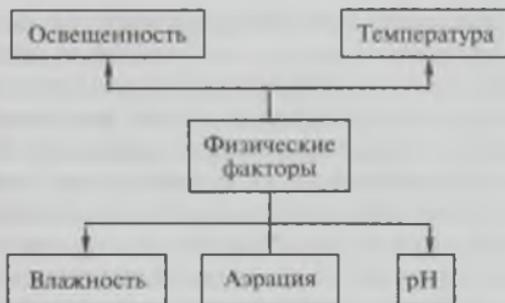


Рис. 19. Физические факторы, влияющие на рост клеточной культуры

печении данных культур системой интенсивной аэрации отпадает. В связи с этим при внедрении технологии суспензионного культивирования надо подбирать соответствующие типы биореакторов с объемом не более  $20 \text{ м}^3$  и с системами особого перемешивания (турбинное, восходящим потоком воздуха, встряхиванием), чтобы не разрушить растительные клетки. При сравнении ферментеров разных типов было установлено, что максимальный синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре происходит при подаче воздуха снизу. Если же выращивают клетки в колбах малого объема, то аэрация достаточна при постоянном перемешивании суспензии.

Оптимальная влажность для роста культуры обычно составляет 60—70%. Весьма существенным для обеспечения роста биомассы и синтеза продуктов вторичного метаболизма является подбор ингредиентов среды культивирования. Особое значение для культивирования изолированных клеток и тканей имеют жидкие питательные среды. Они, как правило, многокомпонентны, имеют определенные различия по составу, но в то же время в них обязательно должны быть включены: неорганические питательные вещества — макроэлементы, микроэлементы; источники железа; органические добавки — витамины, фитогормоны, ауксины и цитокинины (регуляторы роста растений, играющие роль пусковых механизмов); источники углеводов — сахароза или глюкоза.

Сахароза или глюкоза особенно необходимы для каллусных тканей, так как они лишены хлорофилла и не способны к автотрофному питанию. Обязательным компонентом питательной среды должны быть ауксины — индолилуксусная кислота, нафтилуксусная кислота и 2,4-дихлорфеноксипусная кислота и цитокинины — 6-бензиламинопурин; N-изоптен, 6-фурфуриламинопурин. Ауксины вызывают дедифференцировку клеток экспланта и повышают продуктивность культур клеток, являясь пусковыми механизмами первичного и вторичного метаболизма. Индуцируя клеточное деление, цитокинины по-разному влияют на накопление

вторичных метаболитов: одни не реагируют на внесение в среду цитокинина, например культура клеток *Datura tatula*, другие, например, *Scopolia maxima*, активно образуют алкалоиды.

Высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия, фосфора координирует скорость роста клеток в среде. Истощение среды приводит к снижению как роста клеток, так и процессов вторичного метаболизма. Для синтеза вторичных метаболитов весьма существенно внесение в питательную среду предшественников, стимулирующих определенные ферментативные пути метаболизма. Например, внесение фенилаланина в среду для культивирования клеток увеличивает выход диосгенина на 100%. При приготовлении твердых питательных сред для выращивания каллусных тканей используют очищенный агар-агар — полисахарид, выделенный из морских водорослей.

При получении каллусных культур сначала готовят эксплант — маленькие (2—4 мм) кусочки растительной ткани, не утратившие способность к репродукции. Этот растительный материал тщательно моют, стерилизуют 96% спиртом или 0,1% сулемой, а затем снова тщательно промывают дистиллированной водой и помещают на синтетическую агаризованную питательную среду. Сосуды закрывают ватно-марлевыми тампонами. Для образования каллуса и роста ткани сосуды переносят в темное помещение, где поддерживают определенную температуру (24—26 °С) и влажность (65—70%), при этом через 2—3 нед на раневой поверхности образуется первичный каллус. Каллусная клетка развивается аналогично другим клеткам, проходя соответственно такие циклы, как деление, растяжение, дифференцировка, старение и отмирание. Кривая роста каллусной ткани имеет S-образный характер и включает пять фаз разной длительности у разных растений (рис. 20).



Рис. 20. Кривая роста каллусной ткани. Фазы:

1 — латентная (лаг-фаза — клетки адаптируются и готовятся к делению); 2 — линейная (рост каллусной ткани идет с постоянной скоростью); 3 — экспоненциальная (время максимальной митотической активности; рост клетки ускорен, масса каллуса увеличивается); 4 — стационарная (интенсивность деления резко снижается); 5 — отмирания

Нет однозначного ответа на вопрос, как связан синтез вторичных метаболитов с ростовыми процессами. У большого числа культур вторичные метаболиты синтезируются и накапливаются в значительных количествах либо во время экспоненциальной фазы, когда ростовые процессы особенно активны, либо в период стационарной фазы роста культуры клеток, когда прирост клеточной массы прекращается. Однако есть культуры (например, клеток *Catharanthus roseus*), у которых синтез вторичных метаболитов сопровождается весь период роста.

Синтез вторичных соединений может коррелировать с процессом дифференцировки в культуре клеток. Например, в суспензионной культуре *Paraveg somniferum* синтез алкалоидов начинается после того, как в ней дифференцируется достаточно большое количество специализированных клеток млечников, предназначенных для депонирования метаболитов. Культуры же клеток табака и моркови синтезируют большое количество никотина и антоциана соответственно, хотя их клетки слабо дифференцированы. Синтез вторичных метаболитов в культивируемых клетках связан с внутриклеточными органеллами — в основном с пластидами и эндоплазматическим ретикулумом. В клетках, не способных к транспорту метаболитов, продукты вторичного синтеза обычно накапливаются в вакуолях и свободном пространстве.

Важная особенность культивируемой популяции клеток — ее стабильность в отношении синтеза и накопления вторичных метаболитов. Необходимо отметить, что клетки каллусной культуры обычно не транспортируют синтезируемые метаболиты в питательную среду или другие клетки, хотя некоторые культуры составляют исключение, в частности культура клеток мака, которые депонируют алкалоиды в млечники. Очень важно, что каллусные культуры сохраняют многие физиологические особенности растения, из которого они были получены (например, морозостойкость, устойчивость к внешним воздействиям, способность к синтезу вторичных метаболитов и т. д.).

Стабильность синтеза вторичных метаболитов как целевого продукта зависит, как правило, от стадии культивирования и дифференцировки клеток.

Например, дифференцированные корневые каллусы *Atropa belladonna* синтезируют тропановые алкалоиды, а недифференцированные — уже не способны к их синтезу. Однако недифференцированные клетки *Rauwolfia serpentina* способны синтезировать индолиловые алкалоиды с достаточно большим выходом метаболитов. Исходя из этого, можно сделать вывод, что морфологическая специализация клеток не является основной предпосылкой для синтеза БАВ.

В настоящее время промышленный синтез вторичных метаболитов на основе суспензионных культур клеток является перспек-

тивным и рентабельным, так как производство растительного сырья для него не зависит ни от климатических факторов, ни от повреждения насекомыми. Каллусные культуры выращивают на малых площадях и в дальнейшем используют для синтеза соединений практически всех классов. Причем выход вторичных метаболитов — несопоставимо более высок по сравнению с их синтезом в целых растениях.

Использование технологий получения каллусных культур из растительного сырья дает такие преимущества, как надежность и стабильность по выходу биомассы и продуктов вторичного метаболизма, а также возможность использования каллусной системы для иммобилизации с последующей биотрансформацией. Недостаток только один — необходимость применения ручного труда.

Из сравнения каллусных и суспензионных культур следует, что выход продуктов вторичного метаболизма выше именно в каллусных культурах, но при этом управление процессом культивирования легче осуществлять при работе с суспензионными культурами.

При промышленном выращивании суспензионных культур применяют биореакторы, в которых процессы глубинного культивирования ведут к увеличению биомассы и синтезу вторичных соединений. Выделяют биореакторы, в которых суспензионная культура перемешивается только за счет подачи воздуха, и биореакторы, в которых суспензионная культура перемешивается механическим способом (см. рис. 10).

Культуры растительных клеток в биореакторах выращивают в одном из двух режимов:

- первый — периодическое культивирование, при котором по окончании процесса биосинтеза откачивают и используют всю суспензию клеток;
- второй — полупериодическое культивирование, при котором в биореактор постоянно добавляют определенный объем свежей питательной среды и одновременно забирают тот же объем либо клеточной суспензии (открытое проточное культивирование), либо отработанной питательной среды, оставляя при этом клеточную массу в реакторе (закрытое проточное культивирование).

В основном растительные клетки выращивают в периодическом режиме. Полупериодическое культивирование используют, когда показано, что нарастание биомассы четко коррелирует с синтезом вторичных метаболитов.

Существуют также две разновидности открытого проточного культивирования:

- турбидостат — автоматическое поддержание концентрации клеточной биомассы в реакторе на одном уровне регулировкой скорости потока;

• хемостат — в биореактор с постоянной скоростью подается питательный раствор при одновременном откачивании с той же скоростью клеточной суспензии.

Существуют также технологии получения вторичных метаболитов с помощью иммобилизованных клеток каллусной культуры. Их помещают (встраивают) в определенные носители: альгинат кальция; агарозные шарики; трехмерные сетчатые структуры из нейлона, порошкового металла, полиуретана (в частности, такие системы используются для иммобилизации каллусной культуры клеток *Digitalis lanata*) или адсорбируют в них. Носитель с клетками помещают в питательную среду, клетки при этом остаются живыми. Они прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду. Основные условия иммобилизации — выделение метаболитов в питательную среду и свободное извлечение метаболитов, например алкалоидов из питательной среды.

Иммобилизованные клетки по сравнению с суспензионными культурами имеют следующие преимущества:

- многократное использование;
- четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма;
- увеличение продолжительности культивирования на стадии активного биосинтеза;
- получение большего количества вторичных метаболитов;
- сокращение времени ферментации;
- увеличение срока работы клеток (иммобилизованные клетки с низкой скоростью роста способны к интенсивной выработке метаболитов).

Довольно часто синтез метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до получения необходимого целевого продукта. В этом случае получение конечного продукта возможно, благодаря процессу биотрансформации, суть которого в изменении промежуточных метаболитов с помощью культур других растений или клеток бактерий с целью повышения биологической активности конкретной химической структуры. Несмотря на то, что биотрансформация очень эффективна в случае применения бактериальных клеток, однако растительные клетки также используют, когда процесс по каким-либо причинам не может осуществляться в клетках микроорганизмов.

В качестве примера можно привести превращение дигитоксина в дигоксин клетками *Digitalis lanata*. Недифференцированные культуры клеток *Digitalis lanata* сами по себе не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять реакции биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду. Растения наперстянки (*Digitalis lanata*) в большом количестве синтезируют дигитоксин вместо необходимого дигоксина. Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки. Иммобилизованные

клетки этой культуры способны долгое время с постоянной скоростью трансформировать  $\beta$ -метилдигитоксин в  $\beta$ -метилдигоксин (за счет реакции 12-гидроксилирования, катализируемой ферментом, находящимся в клетках *Digitalis lanata*).

Другой пример: культура клеток женьшеня корневого происхождения способна биотрансформировать (гликозилировать) фенольные соединения (продукты жизнедеятельности суспензионной культуры клеток корня *Panax ginseng*).

Еще один пример — биотрансформация карденолидов, в которых содержатся гликозиды, используемые в медицине для лечения болезней сердца.

Для успешного осуществления процессов биотрансформации необходимо постоянно проводить селекцию специализированных линий клеток и оптимизировать условия культивирования.

В заключение приведем в качестве примеров используемые в клинической практике лекарственные средства, полученные на основе каллусных и суспензионных культур клеток растений: шиконин (кожные заболевания), дигоксин (сердечно-сосудистые заболевания), берберин (кишечные расстройства — в качестве бактерицидного средства), диосгенин (противозачаточное средство), панаксозиды (адаптогены, укрепляющие иммунитет). При производстве настоек женьшеня плантационное выращивание этой культуры по выходу панаксозидов имеет преимущество перед каллусным сырьем, однако препараты, получаемые из каллусного сырья, менее токсичны.

## 9.2. Трансгенные растения

Возможности современной биотехнологии в отличие от традиционных методов генетики и селекции позволяют комбинировать гены разных биологических видов и получать трансгенные растения. Трансгенными называются растения тех видов, в которых успешно функционируют гены (или ген), пересаженные из растений или животных других видов. Делается это для того, чтобы растение-реципиент получило новые удобные для человека свойства: повышенную устойчивость к вирусам, гербицидам, вредителям и болезням растений. Пищевые продукты, полученные из таких генноизмененных культур, могут иметь улучшенные вкусовые качества, лучше выглядеть и дольше храниться. Также часто такие растения дают более богатый и стабильный урожай, чем их природные аналоги.

Если взять гены устойчивости к заболеваниям — из вирусов, морозоустойчивости — из рыбы, сопротивляемости вредителям — из бактерий и внести этот «коктейль» в геном какого-нибудь растения, то такая комбинация придаст растению совершенно новые свойства, хотя его биологический вид не изменится. Карто-

фель останется картофелем, просто теперь он станет неуязвимым для колорадского жука. Уже получены: морозоустойчивая свекла, светящаяся в сумерках газонная трава и даже банан, съев который, получаешь «прививку от тропических болезней».

Поиски путей введения чужеродных генов в клетки высших растений интенсивно ведутся во всем мире с 1970-х гг. Было обнаружено, что опухолеобразующие Ti-плазмиды агробактерий (Ti — tumor inducing), представляющие миникольцевые ДНК, являются великолепной природной векторной системой, которую в настоящее время используют для переноса генов в растения. Плазмида содержит тДНК (transferred DNA), состоящую из 12—22 тыс. пар оснований и кодирующую ферменты синтеза фитогормонов и опинов — производных аминокислот, которые используются бактерией как источник углерода, азота и энергии. Кроме тДНК, в Ti-плазмиде содержатся: *vir*-область, отвечающая за перенос тДНК в растение, гены утилизации опинов, а также локусы, контролирующие размножение плазмиды в бактериальной клетке и ее перенос при бактериальной конъюгации. Плазмида агробактерии переносит часть своей ДНК в ДНК растительной клетки, т.е. в ДНК последней встраивается «нужный» ген.

Весь процесс вырезания и интеграции тДНК в растительную хромосому осуществляют продукты генов, локализованных в *vir*-области. Индукция *vir*-генов обратима, что очень важно для патогена: в случае, если хозяин — больной и нежизнеспособный организм, перенос тДНК не осуществляется. Внедрение тДНК в растительный геном является многоступенчатым процессом, при этом в геном растения могут встраиваться несколько копий тДНК.

После встраивания в хромосому тДНК становится обычной частью генома растения и транскрибируется в растительных клетках РНК-полимеразой растения-хозяина. Сама бактерия в клетку не проникает, а остается в межклеточном пространстве и использует растительные клетки со встроеной тДНК как фабрику, продуцирующую опины.

тДНК Ti-плазмид обладает двумя свойствами, делающими ее по существу идеальным вектором для введения чужеродных генов в клетки растений. Во-первых, круг хозяев агробактерий очень широк: они трансформируют клетки практически всех двудольных растений (иногда даже однодольных, в том числе злаков). Во-вторых, интегрированная в состав генома растения тДНК наследуется как простой доминантный признак в соответствии с законами Менделя, а ее гены имеют собственные промоторы (регуляторная область гена, определяющая время и место его экспрессии), под контролем которых могут экспрессироваться вставленные в тДНК чужеродные гены. В целом идеальная векторная система на основе Ti-плазмиды должна содержать все сигналы, необходимые для переноса и стабильной интеграции в ядерную ДНК

растений, систему для экспрессии чужеродных генов в растениях (узнаваемый растительными полимеразы регулируемый промотор), маркер (репортерный ген), который необходим для селекции трансформированных клеток и не содержать онкогенов, т.е. генов, которые подавляют дифференцировку растительных клеток.

Сейчас используют широкий арсенал методов для получения трансгенных растений. Одним из способов введения тДНК в клетки растения является использование бинарных векторных систем, создание которых заключается в том, что агробактериальная клетка должна содержать по крайней мере две разные модифицированные Ti-плазмиды. Одна из них должна содержать только *vir*-область, гены которой будут участвовать в вырезании тДНК. Такие плазмиды называют плазмидами-помощницами. Вторая Ti-плазида должна содержать область тДНК с нужным встроенным геном. Продукты *vir*-генов способны вырезать тДНК как на собственной плазмиде, так и на соседней, т.е. *vir*-гены могут работать вне зависимости от их местоположения.

Таким образом, если клетки агробактерии содержат Ti-плазмиду с сегментом *vir* и другую плазмиду с тДНК, несущей встроенный ген, эти бактерии могут трансформировать клетки растений. Существуют и другие способы введения чужой ДНК в клетки растения. Например, можно ферментами растворить толстую клеточную оболочку растительной клетки, мешающую прямому проникновению чужой ДНК, поместить такие очищенные клетки в раствор, содержащий ДНК и какое-либо химическое вещество, способствующее проникновению ДНК в клетку (чаще всего применяется полиэтиленгликоль).

Иногда в мембране клеток короткими импульсами высокого напряжения проделывают микроотверстия, через которые в клетку могут проходить отрезки ДНК. В некоторых случаях применяют даже непосредственно «впрыскивание» ДНК в клетку микрошприцем под микроскопом. Несколько лет назад предложено покрывать молекулами ДНК сверхмалые металлические «пули», например шарики из вольфрама диаметром 1—2 мкм, а затем из специального прибора «Shotgun» «стрелять» ими в растительные клетки. Проделываемые в стенке клетки отверстия быстро заживляются, а застрявшие в протоплазме «пули» так малы, что не мешают клетке функционировать. Часть «залпа» приносит успех — некоторые «пули» внедряют свою ДНК в нужное место, осуществляя таким образом трансформацию растительных клеток.

В последние годы ученые используют новый подход для получения трансгенных растений с «antisense RNA» (перевернутой или антисмысловой РНК), который позволяет управлять работой интересующего гена. В этом случае при конструировании вектора копию ДНК (кДНК) встраиваемого гена переворачивают на 180 град.

В результате в трансгенном растении образуется нормальная молекула мРНК и перевернутая, которая в силу комплементарности нормальной мРНК образует с ней комплекс, и кодируемый белок не синтезируется.

Такой подход был использован для получения трансгенных растений томатов с улучшенным качеством плодов. В вектор была включена кДНК гена PG, контролирующего синтез полигалактуроназы (polygalacturonase) — фермента, участвующего в разрушении пектина, основного компонента межклеточного пространства растительных тканей. Продукт гена PG синтезируется в период созревания плодов томатов, а увеличение его количества приводит к тому, что томаты становятся более мягкими, что, в свою очередь, значительно сокращает срок их хранения. Отключение этого гена позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые не только значительно дольше сохранялись, но и сами растения были более устойчивы к грибным заболеваниям.

Наиболее остро стоит вопрос о получении растений, устойчивых к вредителям сельского хозяйства (прежде всего к фитопатогенным грибам и насекомым), так как болезни растений стали основным лимитирующим фактором получения урожая. Было обнаружено, что устойчивость растений к вредителям можно запрограммировать генетически — введением в геном растений чужеродных генов, продукты которых вызывают гибель вредителя. Традиционно для этого используют ген *bt*, продуктом которого является бактериальный токсин, продуцируемый бактерией *Bacillus thuringiensis*. Этот крупный белок (протоксин), контролируемый геном *bt*, попадая в кишечник личинок насекомых, разрушается под действием ферментов, а его фрагмент (эндотоксин) приводит к гибели насекомых. Трансгенные растения картофеля, хлопка, кукурузы с геном *bt* уже производятся фирмами «Monsanto», «Ciba Seeds» и успешно продаются на мировом рынке.

Известно, что растения, подобно животным, способны вырабатывать иммунитет. Однако этим замечательным свойством обладают только устойчивые растения, у которых при атаке патогенов резко меняется метаболизм. В результате у этих растений накапливаются такие химические соединения, как пероксид водорода, салициловая кислота и фитоалексины. Повышенное содержание этих соединений способствует противостоянию растения в борьбе с патогенами. Например, трансгенные растения табака, которые содержат бактериальный ген, контролирующий синтез салицилата гидролазы (этот фермент разрушает салициловую кислоту), были неспособны к иммунному ответу. Поэтому изменение генно-инженерным путем уровня салициловой кислоты или выработки в растениях в ответ на патоген пероксида водорода может быть перспективным для создания устойчивых трансгенных растений.

Многообещающим направлением в генной инженерии растений является получение трансгенных растений, содержащих комбинацию определенных гормональных генов бактерий. Оказалось, что плоды некоторых из таких трансгенных растений являются партенокарпическими, т. е. сформировавшимися без опыления. Эти плоды характеризуются либо полным отсутствием семян, либо очень небольшим их количеством, что позволяет решить проблеме «лишних косточек», например в арбузе, у citrusовых и т. д. Уже получены трансгенные растения кабачков, которые в целом не отличаются от контрольных, но практически не содержат семян.

Во всем мире активно ведутся работы по созданию на основе трансгенных растений так называемых «съедобных вакцин», которые в дальнейшем можно будет использовать для предупреждения наиболее опасных болезней человека. Например, учеными СО РАН успешно ведется разработка противотуберкулезной вакцины. При создании вакцины ученые используют гены человека, кодирующие синтез специфических антител к белкам возбудителя болезни — *Mycobacterium tuberculosis*. Эти антитела и обеспечивают иммунитет к данному заболеванию. Гены, кодирующие антитела против туберкулеза, встроили в геном растительных клеток. Из клеток, в которых удачно произошло встраивание защитных генов, регенерировали полноценные растения, которые обладают способностью синтезировать антитела против туберкулеза.

Традиционные методы лечения туберкулеза не всегда безвредны и эффективны, и ученые надеются, что использование трансгенных растений дает шанс не только избавиться от болезни, но и избежать побочных эффектов. Также в Институте физиологии и биохимии растений СО РАН создается вакцина против СПИДа, гепатита на основе трансгенеза томата и огурца. Группе немецких ученых-генетиков из *Giessen University* во Франкфурте удалось вырастить генетически модифицированную морковь, которая содержит вакцину против гепатита В, что позволяет значительно снизить затраты на профилактику этого заболевания (по официальной статистике ВОЗ около 350 млн человек в мире инфицированы вирусом гепатита В, который приводит к тяжелым повреждениям печени, хронизации процесса и смертельным исходам, ежегодно унося 1 млн человеческих жизней). Трансгенная морковь может расти в разных климатических поясах и на разных грунтах, хорошо хранится, транспортируется, может употребляться в сыром виде. Потребляя этот продукт с пищей, человек как бы постоянно вводит вакцину маленькими дозами, чем поддерживает активность иммунитета к вирусу гепатита В.

Крупнейшим в мире производителем и потребителем трансгенных растений являются США, лидирующие как по площадям посевов, так и по степени принятия обществом трансгенной пищи.

Повсеместное использование там генетически модифицированных растений (от общего количества, взятого за 100 %) составляет: 40 % выращиваемой в стране кукурузы, 81 % сои, 65 % канолы (рапса) и 73 % хлопка, и оно продолжает расти. Получением и испытанием таких растений занимаются сотни коммерческих фирм с совокупным капиталом более 100 млрд долл.

На сегодня лидером по выращиванию трансгенного хлопка, устойчивого к насекомым, является Китай. В Аргентине, правительство которой поддерживает выращивание генетически модифицированных культур, доля трансгенной сои составляет 90 %, а кукурузы и хлопка — 50 %.

Южно-Африканская Республика — единственная африканская страна с масштабными посадками трансгенных культур — 80 % хлопка, 20 % кукурузы и 11 % сои здесь генетически модифицированы. Остальную часть Африки агrobiотехнологические фирмы рассматривают прежде всего как полигон будущих испытаний. Япония одним из приоритетов своего научного бюджета сделала агrobiотехнологию, несмотря на то, что применение генетически модифицированных продуктов встречает здесь сильное сопротивление общественности.

В Европе после принятия ЕС в 1998 г. правил применения генетически модифицированной продукции Франция, Италия, Дания, Греция и Люксембург запретили эти продукты. Сейчас ЕС принял новые правила сертификации и маркировки последних и значительно смягчил свою позицию. Однако только в Испании в незначительных объемах выращивают трансгенную кукурузу. В России к выращиванию на полях не разрешено ни одно трансгенное растение.

Исключение составляет трансгенная соя, и то только в качестве пищевого сырья или компонента продуктов (ее можно есть, но не выращивать).

Несмотря на потрясающие успехи биотехнологии по созданию трансгенных растений с одновременным проведением всех необходимых тестов на токсичность, аллергенность, мутагенность, в обществе существует настороженное отношение к генетически модифицированным продуктам. Есть вполне реальные опасения по поводу того, что пыльца и семена трансгенных растений и сорняков могут скреститься и в конечном счете вырастет такой суперсорняк, который не сможет уничтожить ни один гербицид.

Вместе с тем неконтролируемое распространение («горизонтальный перенос») чужеродных генов в популяции культурных, традиционных сортов и дикорастущих форм растений может привести к нарушению равновесия в биоценозах, а также к засорению традиционных сортов трансгенными вставками и в дальнейшем к их полному уничтожению. Улучшение питательных

свойств картофеля, кукурузы, сои может стать причиной тяжелых аллергических реакций у человека. Некоторые ученые высказывают серьезную обеспокоенность по поводу возможности образования новых вирулентных штаммов в результате генетической рекомбинации между трансгенами и генами природных вирусов.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие проблемы производства лекарственных средств решаются при использовании культур клеток растений?
2. Какова специфика растительных клеток, определяющих условия их культивирования при получении лекарственных средств?
3. Каковы особенности роста растительных клеток в культурах и как это влияет на выход конечного продукта?
4. Какова специфика питательных сред для культур растительных клеток?
5. Какова роль биотрансформации (биоинженерии) при получении лекарственных средств на основе культур растительных клеток?
6. Каковы преимущества иммобилизации растительных клеток при получении на их основе лекарственных веществ?
7. Какие существуют формы и методы иммобилизации растительных клеток и в чем заключается сложность иммобилизации растительных клеток по сравнению с клетками микроорганизмов?
8. Каковы перспективы развития биотехнологии в получении лекарственных средств на основе культур растительных клеток?
9. Какие основные методы получения трансгенных растений существуют?
10. Могут ли трансгенные растения использоваться для получения лекарственных средств?

## ИММУНОБИОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

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

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

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

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

Способы усиления иммунного ответа по типу воздействия подразделяют на активные и пассивные, последние — на специфические и неспецифические (табл. 3).

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

Вместе с тем существует группа препаратов с иммуносупрессивной активностью, появление которых в клинической практике в 1960-х гг. было связано с необходимостью подавления реакции отторжения тканей при трансплантации органов и лечения аутоиммунных заболеваний (табл. 4).

Как видно из табл. 4, к препаратам, вызывающим супрессию специфического иммунного ответа к какому-либо аутоантигену относятся толерогены. Их получают, конструируя комплекс из рекомбинантных антигенов и неиммуногенных носителей, подав-

Таблица 3

**Способы усиления иммунного ответа с помощью иммунобиопрепаратов**

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

**Способы супрессии иммунного ответа с помощью иммунобиопрепаратов**

| Специфическое воздействие   |   | Неспецифическое воздействие   |
|---|---|---|
| активное  | пассивное   |   |
| Рекомбинантные антигены, IgE-связывающие молекулы и созданные на их основе толерогены | Иммунотоксины, антиидиотипические антитела в качестве мишени для аутоантител. Специфическая плазмоиммуносорбция | Моноклональные антитела против цитокинов. Неспецифическая гемосорбция и иммуноплазмофорез |

ляющий специфический IgE-ответ на аллерген. При конъюгации цитостатика или токсина с антителами (иммунотоксинами) можно осуществить направленный транспорт лекарственного средства к определенному рецептору клетки, к конкретной субпопуляции клеток, например к Т-лимфоцитам (Т-хелперам). Кроме того, антиидиотипические антитела (образующиеся против антигенсвязывающих центров) могут быть мишенью для аутоантител, с помощью которых можно влиять на течение аутоиммунного заболевания, нивелируя его симптомы, корректируя, например, нарушения системы свертывания крови и т.д.

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

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

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

лучения интерлейкина-1 и -2 для группы Т-клеточных лимфоцитов, а также медиаторов семейства интерферонов.

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

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

- заключают его в липосомы, липидная оболочка которых имеет высокое сродство к нужным органам;
- встраивают гены специфических токсинов в инфильтрующие опухоль лимфоциты, которые высвобождают эти токсины непосредственно в опухоли;
- присоединяют молекулы лекарственных веществ к моноклональным антителам, специфичным по отношению к белкам, находящимся на поверхности строго определенных клеток, например опухолевых (рис. 21, а);
- используют лекарственные вещества в неактивной форме, переводя их в активное состояние при помощи ферментов. Чтобы такое превращение происходило только вблизи клетки-мишени, фермент присоединяют к моноклональному антителу, специфичному к поверхностному антигену этой клетки (рис. 21, б).

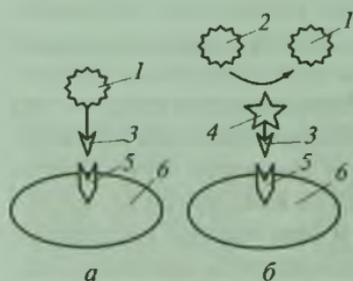


Рис. 21. Использование моноклональных антител для целевой доставки лекарственных веществ:

1 — лекарственное вещество; 2 — инертная форма лекарственного вещества; 3 — моноклональное антитело; 4 — фермент; 5 — поверхностный белок; 6 — клетка-мишень

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

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

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

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

Весьма существенно для биотехнолога то, что отобранные клоны могут длительно храниться в замороженном состоянии, поэтому в случае необходимости можно взять определенную дозу такого клона и ввести животному, у которого будет развиваться опухоль, продуцирующая моноклональные антитела заданной специфичности. Вскоре в сыворотке животного будут обнаружены антитела

в очень высокой концентрации от 10 до 30 мг/мл. Клетки такого клона можно также выращивать *in vitro*, а секретируемые ими антитела получать из культуральной жидкости. В настоящее время гибридная технология получила широкое применение. Создание гибридом, которые можно хранить в замороженном состоянии (криоконсервирование), позволило организовать целые гибридные банки, что в свою очередь открыло большие перспективы по применению моноклональных антител. Сфера их применения помимо количественного определения разных веществ включает самую разнообразную диагностику, например идентификацию определенного гормона, вирусных или бактериальных антигенов, антигенов группы крови и тканевых антигенов (табл. 5).

Только благодаря использованию моноклональных антител, полученных в результате иммунизации животных лекарствами, стало возможно определение дозы этих лекарств. Такая «иммунодозировка» надежна и экономична. В 1990-х гг. в США «Управление по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств» (FDA) впервые утвердило к прода-

Таблица 5

**Области применения моноклональных антител**

| Диагностика   | Терапия  | Технология  | Научные исследования   |
|---|--|---|--|
| 1. Иммунохимические анализы биологических жидкостей, клеток организма, микроорганизмов, вирусов и т. д.<br>2. Иммуногистохимические методы.<br>3. Иммуносцинтиграфия опухолей.<br>4. Типирование групп крови и тканей | 1. Воздействие на определенные клеточные популяции.<br>2. Влияние на иммунные регуляторные механизмы с помощью антител к лимфокинам.<br>3. Иммунорегуляция с помощью антиидиотипических антител.<br>4. Направленный транспорт лекарств с помощью моноклональных антител.<br>5. Элиминация токсинов, иммуноглобулинов из класса IgE | 1. Идентификация молекул.<br>2. Очистка клеток, несущих специфический антиген | 1. Исследование этиологии и патогенеза различных заболеваний.<br>2. Исследование системных и межсистемных механизмов регуляции.<br>3. Создание новых лекарственных средств и биопрепаратов |

же коммерческий набор для диагностического скрининга на основе гибридом, предназначенный для установления аллергена.

С помощью моноклональных антител возможно выделение биологически активных веществ (белков, гормонов, токсинов) из сложных смесей. Например, при использовании иммуноадсорбции для очистки интерферона был получен препарат высочайшей степени очистки (до 99%). Только после одного пассажа через колонку с иммобилизованными моноклональными антителами препарат очищался в 5 000 раз!

Можно использовать моноклональные антитела и в качестве меток для точной идентификации специализированных клеток, например нейронов. Существует также технология использования моноклональных антител для изучения клеточных мембран, позволяющая выделять мембранные белки в чистом виде и измерять их биологическую активность.

Моноклональные антитела можно использовать как в качестве стандартного реагента для обнаружения определенных молекул на клеточной мембране, так и для разделения популяции клеток, несущих на поверхности разные антигены.

Кроме того, с помощью моноклональных антител можно создавать высокоспецифичные вакцины, особенно против определенных вирусных штаммов и паразитов. Моноклональные антитела способны также к нейтрализации лимфоцитов, ответственных за отторжение трансплантата и аутоантител, образующихся при аутоиммунных заболеваниях (некоторые формы диабета, рассеянный склероз, ревматические болезни). В сочетании с лекарственными средствами они могут значительно усиливать эффективность действия последних на клетки-мишени, позволяя избегать серьезных побочных явлений, весьма обычных, например при химиотерапии рака.

Некоторое время назад считалось, что геном эмбриональных клеток в процессе дифференцировки соматических клеток (стадия образования разных тканей организма) не изменяется, а все разнообразие форм и функций дифференцированных клеток относится к различиям в экспрессии одних и тех же генов. Однако в дальнейшем было показано, что разнообразие молекул антител, которые образуются зрелыми лимфоцитами, связано с так называемой «активной перетасовкой» нескольких сотен генов в клетках-предшественниках лимфоцитов. Причем именно степень активности этой «перетасовки» и обуславливает широчайшее разнообразие антител.

Было также показано, что рекомбинация ДНК позволяет изменять геном клетки, направляя ее метаболизм (клеточную специализацию) на увеличение генетического разнообразия. Как известно, молекула антитела является результатом сборки из нескольких белковых цепей, а синтез любого белка определяется

соответствующим геном. Соответственно предполагалось, что должны существовать миллионы генов, кодирующих синтез определенных молекул антител, вырабатываемых организмом млекопитающих.

Однако было установлено, что в геноме клеток последних из сотен тысяч генов только незначительная их часть вызывает синтез антител в результате того, что так называемые стволовые (эмбриональные) клетки не содержат полного набора генов всех антител, а обладают лишь набором генетических элементов, которые способны очень быстро перестраиваться в процессе дифференцировки и созревания клеток иммунной системы (В-лимфоцитов), что, собственно, и приводит к образованию миллионов клеточных линий, вырабатывающих разные антитела.

Что касается молекулы самого антитела (иммуноглобулина), то она состоит из двух «легких» (L) и двух «тяжелых» (H) белковых цепей, которые соединены расположенными в строго определенных местах дисульфидными мостиками и водородными связями (рис. 22). Каждая цепь имеет постоянную (константную) и переменную области. N-концевые участки (L) и (H) цепей образуют антигенсвязывающий сайт. Отдельные домены (области) молекулы антитела выполняют разные функции, что облегчает манипуляции с генами антител. Антигенсвязывающие сайты состоят из трех участков CDR — complementarity-determining regions, определяющих комплементарность антител к антигену и образующих переменные ( $V_H$  и  $V_L$ ) области на N-концах (H) и (L) цепей. Для CDR характерна очень высокая изменчивость последовательности аминокислот, поэтому их называют еще гиперпеременными.

Легкие цепи идентичны у всех видов животных, а тяжелые цепи представлены пятью типами ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  и  $\alpha$ ), которые и определяют пять классов иммуноглобулинов, обнаруженных у млекопитающих: IgM, IgD, IgG, IgE и IgA.

При контролируемом ферментативном гидролизе иммуноглобулинов образуются фрагменты двух типов: Fab и Fc, причем N-концевая часть Fab фрагмента, называемая  $F_V$ -фрагментом, обладает антигенсвязывающей активностью, присущей интактной молекуле антитела. Существуют около миллиона разных специфических антител, что обеспечивает определение практически любых биологически активных веществ как природного, так и синтетического происхождения. Например, в антителах класса IgM все тяжелые цепи имеют одинаковую постоянную область  $\mu$ , переменные же области у разных молекул антител различны и отражают их антигенные свойства. Таким образом, константная (постоянная) область тяжелых цепей определяет способ действия антитела в организме: если она, например,  $\delta$ -типа, т. е. антитело принадлежит к классу IgD, то оно является связанным с поверх-

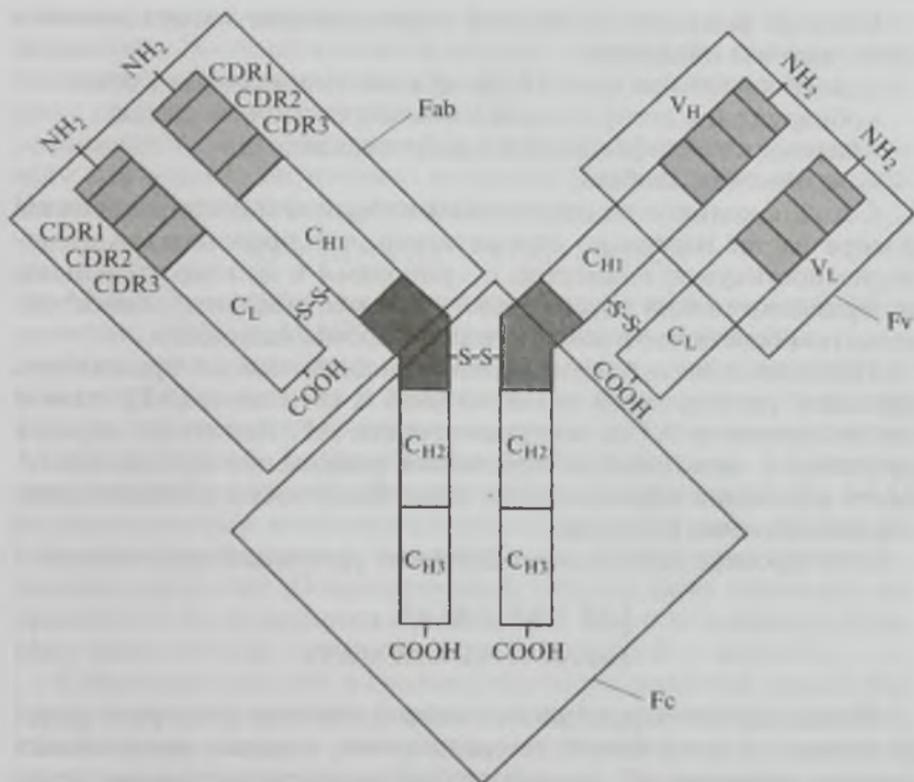


Рис. 22. Строение молекулы антитела. Н- и L-цепи состоят из переменных ( $V_H$  и  $V_L$ ) и константных (постоянных) доменов ( $C_L$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ). Переменные домены содержат CDR-участки (CDR1, CDR2 и CDR3)

ностью синтезирующей его клетки; если же тяжелая цепь, например  $\epsilon$ -типа, то соответствующее антитело IgE может связываться с поверхностью специализированной клетки, способной выделять гистамин, что приводит к появлению симптомов астмы или лихорадки, когда антитело взаимодействует с антигеном (например, с пылью какого-либо растения).

Моноклональные антитела с успехом применяются для дифференциальной диагностики многих инфекционных и неинфекционных заболеваний, а также для стандартизации определения групп крови путем иммунохимического анализа. Именно с помощью моноклональных антител были идентифицированы индивидуальные маркеры многих возбудителей инфекционных заболеваний как вирусной, так и бактериальной природы. Изучение генетических механизмов многих заболеваний стало возможным благодаря уникальной специфичности моноклональных антител. Так, методом иммуносцинтиграфии опухолей можно идентифицировать локализацию опухоли с ее метастазами размером 0,5 — 1,0 см.

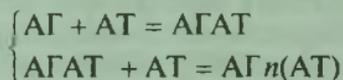
Самыми важными областями использования иммунохимического анализа являются:

- контроль банков крови и продуктов из донорской крови;
- обнаружение возбудителей в объектах внешней среды;
- диагностика инфекционных заболеваний;
- диагностика диабета.

Сегодня количество проводимых иммунохимических анализов в мире растет настолько стремительно, что производство иммунодиагностикумов совместно с приборами и вспомогательными материалами можно рассматривать уже как отдельную, самостоятельную область биотехнологической промышленности.

Принципы иммунохимического анализа можно представить реакцией растворимого антигена (АГ) с антителом (АТ), зная о двухвалентности АТ и поливалентности АГ. Антитело, образуя комплекс с антигеном, обеспечивает уникальное по специфичности узнавание определяемого вещества в любых сложных многокомпонентных системах.

Этот процесс описывается системой уравнений двух стадий:



Первая стадия характеризует взаимодействие активного центра антител с антигенной детерминантой, которая представляет участок молекулы АГ, способного связываться с активным центром специфического АТ. Здесь проявляется свойство АТ «склеивать» антигены (АГ). Причем размеры антигенных детерминант (эпитопов), например, для белковых антигенов составляют всего несколько аминокислот.

Вторая стадия характеризуется образованием комплексов сложного состава, когда двухвалентная молекула АТ способна связаться лишь с двумя молекулами АГ в комплекс, который в свою очередь может связать еще одно АТ и т. д. Образующиеся агрегаты таких комплексов обнаруживаются либо по возникающей мутности раствора, либо по выпадению в осадок.

Такая реакция взаимодействия белковых антигенов с антителами лежит в основе определения групп крови, когда происходит «склеивание» эритроцитов антителами той или иной специфичности. Эта реакция получила название гемагглютинации и очень широко используется на практике. Этот метод также широко применяется при определении белков плазмы крови в концентрации до 1 мг/л. Однако методы агглютинации вследствие довольно низкой точности относятся только к качественным или полуколичественным методам анализа.

Для расширения пределов чувствительности и повышения специфичности иммунохимических тестов в один из компонентов

системы вводят маркер, концентрацию которого можно легко определять. После отделения продуктов реакции от исходных компонентов находят концентрацию АГАТ и по калибровочному графику рассчитывают содержание АГ.

Концентрацию антигена определяют из принципа конкурентного связывания антителами меченого и немеченого антигенов. Происходит следующая реакция:



где АГ и АГ\* — определяемый антиген без метки и с меткой; АТ — антитела; АТАГ и АТАГ\* — соответствующие комплексы.

Итак, если в пробирку с раствором, содержащим постоянную концентрацию антител и меченого антигена, добавить разные количества немеченого антигена, то концентрация комплекса АТАГ\* (с меткой) будет обратно пропорциональна концентрации немеченого антигена. Для того чтобы отделить комплексы АТАГ от несвязавшихся компонентов анализируемой смеси, АТ или АГ ковалентно связывают с твердой фазой, например с полистироловыми шариками. После промывки твердой фазы отделяют связавшиеся и несвязавшиеся компоненты. Такой тип анализа называют гетерогенным (принцип двух фаз: твердой и жидкой).

С большим успехом в гинекологическую практику вошел экспресс-метод определения беременности по уровню хориогонического гонадотропина в моче. Тесты таких типов можно проводить не только в специальных лабораториях, но и в домашних условиях. В качестве практического примера использования твердофазного иммуноферментного анализа ELISA можно рассмотреть метод определения хорионического гонадотропина. В этом методе на полистирольные шарики сорбируются моноклональные антитела к хорионическому гонадотропину. К сенсibilизированным шарикам добавляют исследуемую пробу (мочу) и конъюгат, состоящий из маркера и моноклональных антител, меченных пероксидазой. В результате иммунологической реакции хорионический гонадотропин связывается одной детерминантой с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности шариков, а другой — с моноклональными антителами конъюгата с маркером. Затем шарики отмывают от всех несвязавшихся компонентов мочи и определяют активность фермента в составе иммунных комплексов с помощью субстрат-хромогенной смеси. При этом степень окраски раствора будет прямо пропорциональна количеству хорионического гонадотропина в образце мочи.

Лекарственный мониторинг также осуществляется посредством использования методов иммунохимического анализа. Необходимость контроля за концентрацией лекарственного препарата в процессе терапии у больного возникает при следующих ситуациях:

- длительных курсовых приемах лекарственных средств;

- низком терапевтическом эффекте или полном его отсутствии;
- возникновении побочных явлений в случае превышения терапевтической дозы препарата;
- трудно определяемом фармакологическом эффекте;
- особых обстоятельствах (например, при лечении новорожденных).

Лекарственный мониторинг может применяться, например, при терапии такими препаратами, как бронхолитик теofilлин, сердечный гликозид дигоксин и т.д. Известно, что успешный клинический результат зависит не от дозы препарата, а от его концентрации в плазме крови. Поэтому при достижении одного и того же лечебного эффекта у разных больных лекарственная дозировка препарата может различаться в десятки раз. Совершенно очевидно, что в этих случаях необходим индивидуальный подбор доз для каждого пациента. Кроме того, мониторинг лекарственных средств исключает передозировку лекарственного препарата и, соответственно, проявления токсических эффектов.

Рентабельными, экспрессными методами определения низкомолекулярных соединений в плазме крови являются иммуноаналитические методы, которые отличаются универсальностью (применимы к любому веществу, способному к индукции антител), высокой селективностью и чувствительностью; не требуют предварительной обработки образцов и имеют сравнительно низкую стоимость.

Известно, что иммунизация низкомолекулярными веществами не может вызывать иммунный ответ, поэтому для получения антител нужно предварительно лекарственный препарат ковалентно связать с иммуногенным высокомолекулярным носителем. Сначала лекарственное вещество делают реакционноспособным, вводя разные функциональные группы, которые затем взаимодействуют с соответствующими функциональными группами белка и образуют так называемый синтетический конъюгированный антиген. При иммунизации животного таким комплексным антигеном будут образовываться поликлональные антитела, т.е. антитела к антигенным детерминантам самого белка и к антигенным детерминантам лекарственного средства.

В настоящее время иммунодиагностические тест-системы с использованием поликлональных антител созданы практически для всех лекарственных препаратов. При проведении лекарственного мониторинга с использованием методов иммунохимического анализа в качестве «маркеров» применяются:

- радиоактивные метки (радиоиммунный анализ с использованием радиоактивных атомов — трития, радиоактивного йода и др.);
- ферментные метки (если ферменты стабильны, активны и действуют в минимальных концентрациях);

• субстратные метки (АТФ и НАД), которые «пришиваются» к молекуле антигена через адениновый остаток и сохраняют способность взаимодействия с ферментом.

В качестве примера можно привести радиоиммунный метод количественного определения инсулина, основные принципы которого рассмотрим более подробно.

Общеизвестно, что инсулин влияет на концентрацию глюкозы в крови. В лабораторных условиях при наличии животных можно по снижению уровня глюкозы в крови сравнивать отдельные препараты инсулина. Но этот путь совершенно неприемлем для определения инсулина в крови больных, учитывая, что в контроле фактически нуждается если не миллионный, то многотысячный контингент больных. Клиническая лаборатория обязана определять количество эндогенного инсулина в крови больных, которым предписано введение инсулина извне. В противном случае возможны передозировки инсулина. Метод отличается высокой избирательностью (на результаты не влияют любые белки крови) и высокой точностью. В качестве лабораторного оборудования необходимы стандартный гамма-счетчик (например ГСБ-1) и коммерческий набор реагентов (в него входят меченый (по йоду) инсулин, у которого кодированы остатки тирозина и гистидина; антисыворотка к инсулину (антитела к инсулину), получаемая из крови кроликов, которым вводили инсулин).

У больного отбирается проба крови, где количество эндогенного (немеченого) инсулина неизвестно ( $x$ ). Создается реакционная смесь: меченый инсулин + антисыворотка (фиксированное количество), т.е. комплекс антигена с антителом, который затем осаждается. Количество метки в осадке, определяемое радиометрическим методом, соответствует количеству меченого инсулина. Принцип анализа: если в реакционную смесь одновременно с меченым инсулином вводится проба крови с эндогенным инсулином, то количество метки в осадке будет тем меньше, чем больше  $x$ . В данной ситуации возникает конкуренция за антитело между меченым и немеченым инсулином. Количество немеченого инсулина не должно резко превышать количество меченого, иначе возможны погрешности в точности измерения. В соответствии с этим пробы крови принято разводить:  $x$ ,  $x/2$ ,  $x/4$  и т.д. Избыток меченого инсулина помешать не может, так как метка определяется в осадке — там, где находится только связанный с антителом меченый инсулин. Расчеты проводятся по калибровочным кривым. Метод пригоден для определения числа микрограммов инсулина в 1 мл крови и не требует предварительных препаративных процедур. Один счетчик типа ГСБ-1 дает возможность анализа нескольких сотен проб в неделю. Радиоиммунный анализ удобен для мониторинга не только инсулина, но и многих других биологически активных агентов.

Существуют гетерогенные и гомогенные иммуноферментные методы: с разделением компонентов после проведения иммунохимической реакции (роль пассивного маркера выполняет фермент, не меняющий своей активности в ходе реакции) и без разделения компонентов (также используется ферментная метка, активность которой в ходе иммунной реакции меняется).

Гетерогенный иммуноферментный анализ основан на конкурентной реакции антител с исследуемым веществом и меченым веществом с последующим отделением антител и измерением активности фермента, связавшегося с ними.

Гомогенный иммуноферментный метод основан на способности антител модулировать активность некоторых ферментов, ковалентно связанных с измеряемым веществом. Антитела влияют на конформацию активного центра фермента, а добавление свободного вещества восстанавливает активность фермента. Чувствительность гомогенных методов, как правило, меньше, чем гетерогенных, но вполне достаточна для определения практически всех лекарственных препаратов и даже некоторых гормонов. Гомогенные методы достаточно просты; анализ проводится в одну стадию и длится несколько минут.

Также в иммуноанализе используют липосомы, содержащие метку. Существует множество модификаций этого метода, например, на мембране липосом находится антиген, взаимодействующий с антителами в присутствии комплемента и вызывающий лизис липосом с последующим высвобождением метки.

Существуют также и неинструментальные полуколичественные методы экспресс-анализа на бумаге, например на многослойных целлюлозных полосках, которые пропитывают разными реагентами иммунохимической реакции и затем склеивают вместе на пластике. Такой же принцип последовательного взаимодействия находится в основе еще одного полуколичественного метода — иммунохроматографического. На полоску бумаги сорбируют антитела. Затем конец этой полоски вносится в раствор пробы и конъюгата. В процессе диффузии раствора вверх по полоске меченый и свободный лекарственный препарат конкурентно взаимодействует с антителами, вызывая их насыщение. Чем больше концентрация препарата в пробе, тем выше будет зона насыщения. Затем следует проявление (детекция) полоски в растворе субстрата. Высота окрашенного столбика определяет концентрацию препарата в исследуемом образце (пробе).

Рассмотрим более подробно вакцины и сыворотки, а также биотехнологические методы их получения. Как уже отмечалось, вакцины относятся к группе активных специфических препаратов и применяются с целью профилактики или лечения. Вакцинация способствует формированию у реципиента иммунитета к патогенным микроорганизмам и тем самым защищает его от инфек-

ции. В ответ на пероральное или парентеральное введение вакцины в организме человека или животного вырабатываются антитела к патогенному микроорганизму, которые при последующей инфекции приводят к его инактивации (нейтрализации или гибели), блокируют его пролиферацию и не позволяют развиваться заболеванию. Эффект вакцинации открыл в 1796 г. врач Э. Дженнер. Он доказал экспериментально, что человек, перенесший коровью оспу (не очень тяжелую болезнь крупного рогатого скота), становится невосприимчивым к оспе натуральной.

Вакцина — сложный иммунобиотехнологический препарат, в состав которого входят:

- действующий компонент, представляющий специфические антигены (живые ослабленные микроорганизмы, убитые микробные клетки или вирусные частицы, извлеченные из микроорганизма антигенные структуры, продукты жизнедеятельности микроорганизмов — токсины как вторичные метаболиты);

- консервант, который определяет стабильность вакцины при ее хранении и не допускает размножения случайно попавшей в препарат микрофлоры (мертиолят 1 : 10 000, формалин и другие antimикробные препараты);

- стабилизатор, предохраняющий антиген от разрушения и продлевающий тем самым срок годности вакцины (сахарозо-агар-желатина и др.);

- адъювант, повышающий иммуногенность антигена, т.е. его свойство вызывать иммунный ответ (полимерный носитель, минеральный сорбент, липиды и эмульгаторы).

В зависимости от природы, характера и способа получения вакцины классифицируются (по А. А. Воробьеву) на *живые* (аттенуированные, дивергентные, рекомбинированные (векторные)); *неживые* или *инактивированные* — корпускулярные (цельноклеточные, цельновирсионные, субклеточные, субвирсионные) и молекулярные (биосинтетические природные и генно-инженерные, химически синтезированные); *комбинированные* (из живых и неживых вакцин).

Можно классифицировать вакцины по виду лекарственной формы на инъекционные (жидкие), пероральные (таблетки, капсулы, драже), ингаляционные (аэрозоли).

**Живые вакцины.** Половина из всех применяемых в настоящее время вакцин относится к живым вакцинам различного происхождения. Это вакцины как бактериального происхождения, применяемые для профилактики сибирской язвы, чумы, туберкулеза, так и вирусного происхождения, применяемые для профилактики оспы, кори, гриппа, краснухи, полиомиелита и других заболеваний.

*Аттенуированные вакцины* представляют собой препараты, полученные из естественных штаммов микроорганизмов с ослабленной для человека вирулентностью (аттенуированных). Аттенуацию (ослабление) проводят путем длительного воздействия ан-

тигенов на штамм химических (мутагены) и физических (температура, радиация) факторов или путем длительных пассажей на невосприимчивых животных или других биообъектах (эмбрионы птиц, культуры клеток).

В качестве живых вакцин можно использовать *дивергентные* штаммы, т. е. непатогенные для человека микробы, имеющие общие протективные антигены с патогенными для человека возбудителями инфекционных болезней. Классическим примером дивергентных живых вакцин является вакцина против натуральной оспы человека, в которой используется непатогенный для человека вирус оспы коров. К дивергентным вакцинам также относится БЦЖ-вакцина, в которой используются родственные в антигенном отношении микобактерии бычьего типа.

Существует четыре основных стадии получения живых бактериальных вакцин:

- выращивание чистых ослабленных культур на жидкой питательной среде в ферментере вместимостью 1 — 2 м<sup>3</sup>;
- стабилизация;
- стандартизация;
- лиофильное высушивание.

*Рекомбинантные вакцины* также относятся к живым вакцинам. В качестве примера можно привести получение рекомбинантной вакцины гепатита В. Как известно, вирус гепатита В не размножается *in vitro* (в искусственных условиях). Для получения вакцины гепатита В выделенный ген этого вируса вставляют в дрожжевую клетку или в клетку *E. coli*. Затем уже промышленным способом эту культуру выращивают в ферментере на обогащенных питательных средах в аэробных условиях, получая значительные количества рекомбинантного белка, содержащего антиген вируса гепатита В. Введение такой вакцины приводит к образованию антител против гепатита В и создает иммунную защиту организма человека от этого тяжелого заболевания.

**Неживые (инактивированные) вакцины.** Инактивированные *корпускулярные* вакцины в качестве действующего начала включают убитые химическим или физическим методом культуры патогенных бактерий или вирусов (*цельноклеточные, цельновирионные* вакцины) или же извлеченные из патогенных микробов (иногда вакцинных штаммов) комплексы, содержащие протективные антигены (*субклеточные, субвирионные* вакцины). Для инактивации бактерий и вирусов применяют формальдегид, спирт, фенол или температурное воздействие, ультрафиолетовое облучение, ионизирующую радиацию. Для выделения из бактерий и вирусов антигенных комплексов (гликопротеинов, белков) применяют трихлоруксусную кислоту, фенол, ферменты, ультрацентрифугирование и т. д. Получают инактивированные вакцины путем выращивания на искусственных питательных средах

патогенных бактерий или вирусов, которые затем подвергают инактивации или разрушению (в случае необходимости) и выделению антигенных комплексов. Далее проводят очистку и конструирование в виде жидкого или лиофильно высушенного препарата, в который обязательно добавляют консервант, иногда — адъюванты.

В *молекулярных* вакцинах антиген находится в молекулярной форме или же в виде фрагментов его молекул, определяющих специфичность антигенности, т. е. в виде эпитопов, детерминант. Протективный антиген в виде молекул можно получить биологическим синтезом в процессе культивирования природных патогенных микробов, например токсинных бактерий дифтерии, столбняка, ботулизма и др. Синтезируемый этими бактериями токсин в молекулярной форме превращают затем в анатоксин, т. е. нетоксичные молекулы, сохраняющие специфическую антигенность и иммуногенность. Также антиген в молекулярной форме, особенно его детерминанты, можно получить химическим синтезом. Этим способом уже синтезированы детерминанты многих бактерий и вирусов, в том числе ВИЧ. Однако химический синтез антигенов более трудоемок и имеет ограниченные возможности по сравнению с биосинтезом.

Молекулы антигенов или их эпитопы сами по себе обладают низкой иммуногенностью, что, по-видимому, связано с деструкцией их в организме ферментами, а также недостаточно активным процессом их адгезии иммунокомпетентными клетками, из-за относительно низкой молекулярной массы антигенов. В связи с этим ведутся поиски повышения иммуногенности молекулярных антигенов путем искусственного укрупнения их молекул, т. е. создания комплекса, состоящего из антигена или его детерминанты, а также полимерного носителя и адъюванта. Часто носитель совмещает в себе роль адъюванта. Вакцины, созданные на таком принципе, получили название *синтетических*, например, вакцина против гриппа на полиоксидонии.

**Комбинированные вакцины.** Как следует из названия, они комбинируются из отдельных вакцин, превращаясь при этом в поливакцины, которые способны иммунизировать сразу от нескольких инфекций. В качестве примера можно назвать поливакцину АКДС, содержащую дифтерийный и столбнячный анатоксины, а также коклюшные корпускулярные антигены. Эта вакцина, как известно, широко применяется в детской практике.

**Сыворотки.** К группе препаратов для образования пассивного иммунитета (специфической иммуностимуляции) относят сыворотки, которые содержат поликлональные антитела против инфекционных агентов и микробных токсинов. При введении сыворотки больному его организм получает уже готовые антитела.

Получают сыворотки путем иммунизации домашних животных (ослов, лошадей). Забор крови у этих животных производят в пе-

риод максимального содержания антител, однако для этого необходимо постоянно контролировать кровь по такому показателю, как титр антител, что представляет определенные технические трудности. Из крови животных выделяют плазму, затем из нее удаляют фибрин и получают сыворотку.

Приготовленные таким способом сывороточные препараты характеризуются относительно низкой активностью и существенным количеством примесей. Сыворотки можно получать также из культивируемых на искусственной питательной среде животных клеток. Однако главной проблемой в этом случае является обеспечение стабильного роста животных клеток вследствие их генетической нестабильности, непостоянства генетических экспрессий и старения.

Основные области применения сывороток:

- профилактика и лечение инфекционных заболеваний;
- в случае отравления ядами микробов или животных — при столбняке, бугулизме, дифтерии;
- при укусах змей — для инактивации экзотоксинов в ядах кобры, гадюки и др.;
- для диагностических целей (создание разных диагностических наборов, например в тестах на определение беременности).

### **Контрольные вопросы**

1. Что включает понятие «антигены»?
2. Какие способы усиления иммунного ответа существуют?
3. Что такое толерогены?
4. Какие методы используют для облегчения доставки лекарственного препарата к месту его действия?
5. Что такое гибридомная технология?
6. Каковы области применения моноклональных антител?
7. Из чего состоит молекула антитела?
8. Какие виды вакцин существуют?
9. Каковы особенности получения сывороток?

**Автолиз** — самораспад (лизис) клеток микроорганизмов под действием внутриклеточных гидролитических ферментов.

**Агар** — смесь полисахаридов, получаемых из красных морских водорослей; после расплавления и охлаждения образует плотный гель; в качестве основы для питательных сред используется в микробиологии.

**Аденин** — пуриновое основание, комплементарное тимину и урацилу, одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав РНК и ДНК.

**Актиномицеты** — многоклеточные бактерии со сложным циклом развития. Среди почвенных актиномицетов часто встречаются штаммы-антагонисты, т.е. продуценты антибиотиков.

**Альгинат** — полисахарид, синтезируемый разными водорослями, состоящий из остатков  $\beta$ -D-маннуроната и  $\alpha$ -L-гулуроната.

**Амбисом** — липосомальный препарат антифунгального антибиотика амфотерицина В, используемый при лечении системных микозов, с пониженной токсичностью по сравнению со «свободным» амфотерицином В.

**Амикацин** — полусинтетический аминогликозидный антибиотик на основе канамицина, не подвергается инаktivации защитными ферментами резистентных к аминогликозидам штаммов бактерий — фосфотрансферазами, трансферазами, ацетилтрансферазами (независимо от того, на какие функциональные группы действуют эти ферменты).

**Аминоацил-тРНК** — молекула транспортной РНК; к ее 3'-концу присоединена аминокислота, в 3'-положении.

**6-Аминопенициллановая кислота (6АПК)** — бициклическое ядро пенициллиновой молекулы, получаемое в биотехнологической промышленности из бензилпенициллина путем ферментативного отщепления радикала при С-6; служит ключевым соединением для получения на ее основе новых (полусинтетических) пенициллинов, нечувствительных к бета-лактамазам, с более широким спектром действия, реагирующих с другим пенициллинсвязывающим белком и т.п.; получение новых пенициллинов связано с химическим или ферментативным замещением свободной аминогруппы в 6АПК.

**7-Аминоцефалоспоровая кислота (7АЦК)** — бициклическое ядро цефалоспорины С, получаемое в биотехнологической промышленности химическим или ферментативным путем; на основе 7АЦК при использовании биотрансформации получают ряд полусинтетических цефалоспоринов (цефалотин, цефазолин, цефалоридин, цефоперазон и др.).

**Анабиоз** — состояние организма, характеризующееся почти полным, но обратимым прекращением жизнедеятельности; одна из форм приспособительных реакций микроорганизмов к крайне неблагоприятным условиям внешней среды.

**Антибиоз** — термин, введенный в литературу в 1890 г. и используемый для обозначения явления микробного антагонизма — между грибами и бактериями и между разными видами бактерий.

**Антивитамины** — вещества, близкие по своей химической природе к соответствующим витаминам, но не обладающие их свойствами. В основе действия антивитаминов лежит вытеснение соответствующего витамина из его комплекса в ферментативной системе; в результате образуется неактивный фермент, нарушается обмен веществ и возникает тяжелое заболевание. Примером антивитаминов могут служить сульфаниламидные препараты, близкие по химической структуре с парааминобензойной кислотой (предшественник фолиевой кислоты).

**Антибиотик** — термин, введенный З. Ваксманом в 1941 г. — химическое вещество, образуемое микроорганизмами, подавляющее рост и разрушающее бактерии и другие микроорганизмы, даже находясь в разбавленных растворах. К антибиотикам относят низкомолекулярные химические структуры — вторичные метаболиты микроорганизмов, т. е. появляющиеся в определенной фазе роста культуры. Антибиотики не только подавляют рост микроорганизмов, но и являются сигнальными молекулами, участвующими в перестройке метаболизма своего продуцента при изменении питательной среды (например, при отсутствии в ней источников углерода, азота, фосфора); не являются продуктами матричного синтеза.

**Антибиотики полусинтетические** — производные природных антибиотиков, получаемые путем химической трансформации, а также антибиотические структуры, при получении которых сочетаются методы как химической, так и биологической трансформации; это цефалоспорины, пенициллины, макролиды, аминогликозиды, рифамицины, антрациклины, тетрациклины и т. д.

**Антиген** — генетически чужеродное вещество, образуемое другим видом организма, взаимодействующее со специфическими рецепторами Т- и В-лимфоцитов и вызывающее иммунный ответ — выработку антител; обычно в роли антигена выступают чужеродные частицы (клетки, бактерии и др.) или крупные молекулы (белки, полисахариды) чужого организма, однако в ряде случаев антигенами могут быть мелкие молекулы (гаптены).

**Антисыворотка** — жидкая составляющая крови, содержащая антитела.

**Антитело** — белок (иммуноглобулин), синтезируемый В-лимфоцитами клетками в ответ на проникновение в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующий. Антитела — сывороточные глобулины. Обладают свойством специфически связываться с антигеном, активировать комплемент, усиливать фагоцитарную активность макрофагов и нейтрализовать бактериальные токсины.

**Антикодон** — триплет каждой транспортной тРНК, специфически взаимодействующий в рибосомно-матричной системе с определенным

кодоном матричной мРНК; в результате этого взаимодействия аминокислотная цепь синтезируемой полипептидной цепи соответствует последовательности кодонов в мРНК, и происходит передача генетического кода (на стадии трансляции).

**Апоптоз** — запрограммированная гибель части популяции клеток многоклеточного организма; общебиологическое явление, отвечающее за поддержание необходимого и достаточного количества клеток, элиминацию клеток, ненужных на данной стадии онтогенеза. Морфологически апоптоз проявляется в уплотнении ядерного хроматина, с более поздним распадом ядра на фрагменты и образованием апоптозных телец, подвергающихся фагоцитозу. В аспекте фармации важен поиск агентов как избирательно тормозящих процессы, включенные в апоптоз (например, в случае болезни Альцгеймера, т. е. при старческой дегенерации нейронов), так и стимулирующих апоптоз (например, в случае опухолевых клеток или клеток с внутриклеточными паразитами; последние, например хламидии, могут продуцировать ингибиторы апоптоза для предотвращения гибели клетки).

**Ауксин** — специфический фактор роста растительной клетки и регулятор синтеза вторичных метаболитов растений — производных индолилуксусной кислоты (индолил-3-уксусная кислота, нафтилуксусная кислота и др.).

**Биообъект** — средство производства для получения лекарственных, профилактических, диагностических препаратов; может существовать как организм или фермент (промышленный биокатализатор).

**Биотрансформация** — процесс превращения веществ с помощью микроорганизмов в определенные продукты с ценными практическими свойствами.

**Блок-мутанты** — мутанты, получаемые из продуцента антибиотика, лишенного способности синтезировать определенный фрагмент антибиотической молекулы.

**Вакцины** — препараты для создания активного искусственно приобретенного иммунитета с целью профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Основные требования к вакцинным препаратам: высокая или умеренная иммуногенность, безопасность, низкая реактогенность, стабильность при хранении, стандартизуемость, возможность включения в ассоциированные вакцины.

**Валидация** — термин, использующийся в правилах GMP, означающий особенно тщательную и многостороннюю проверку технологии в целом или части технологической цепочки на производстве. В отношении биотехнологического производства лекарственных средств валидация проводится, в частности, при замене штамма-продуцента целевого продукта и при изменении состава питательной среды.

**Варибельные домены** — участки полипептидных цепей иммуноглобулина, имеющие неодинаковую аминокислотную последовательность у молекул разных иммуноглобулинов и отвечающие за антигенную специфичность последних.

**Вектор** — часть рекомбинантной ДНК, обеспечивающая ее проникновение в клетку и репликацию в этой клетке; вектор конструируется на основе плазмид, фагов, космид.

**Вирион** — внеклеточная, покоящаяся форма вирусной частицы; выполняет функцию переноса генома вируса из одной клетки в другую или из одного организма в другой.

**Вирулентность** — характеристика патогенности микроорганизма, свойственна только грамотрицательным бактериям.

**Витамины** — низкомолекулярные органические соединения разной химической природы, абсолютно необходимые в небольших количествах для нормальной жизнедеятельности организмов человека и животных. Природные источники витаминов — главным образом растения и микроорганизмы.

**Внешняя мембрана** — компонент оболочки грамотрицательных бактерий, отделенный от клеточной стенки периплазматическим пространством. Наружная поверхность внешней мембраны состоит из полисахаридов и соприкасается со средой, внутренняя — из фосфолипидов и обращена в периплазматическое пространство. Внешнюю мембрану пересекают пориновые каналы. Внешняя мембрана определяет природную резистентность некоторых видов грамотрицательных бактерий к определенным антибиотикам. Локализованный на наружной поверхности внешней мембраны липид А вместе с присоединенными к нему полисахаридными цепями является эндотоксином, играющим важную роль в патогенезе инфекций; также липид А служит объектом воздействия лекарственных средств.

**Время генерации** — время, за которое в популяции одноклеточных организмов удваивается число клеток.

**Вторичный метаболит** — вещество, не являющееся обязательным для роста или функционирования клетки, но синтезирующееся в стационарной фазе (обычно участвует в защите клеток или микроорганизмов от воздействий).

**Гель-фильтрация** — способ разделения веществ по размеру их молекул, основанный на использовании молекулярных сит.

**Генетика** — наука о наследственности и ее изменчивости.

**Генетика формальная** (генетика символов) — ее основу составляют классические законы Менделя.

**Генетика молекулярная** относится к началу 1950-х гг. после установления Дж. Уотсоном и Ф. Криком структуры ДНК как двойной спирали и решения вопроса о природе гена.

**Генная иммунизация** — индукция организмом иммунного ответа путем включения в клетки гена, кодирующего белок-антиген.

**Геномика** — новая научная дисциплина, возникшая в конце XX в. с целью познания генома, т.е. всей совокупности генов в организме. Применительно к фармации геномика позволяет выявлять новые гены — мишени для действия лекарственных средств или гены, с продуктами которых могут взаимодействовать лекарства.

**Геномика сравнительная** — установление степени близости по последовательности нуклеотидов в генах, полученных из разных источников.

**Геномика структурная** — установление полной последовательности нуклеотидных пар в гене, хромосоме (хромосомах).

**Геномика функциональная** — определение функций белка, кодируемого каждым отдельным геном, и роли этого белка в метаболизме.

**Ген** — единица наследственности; участок ДНК, содержащий специфическую для каждого гена последовательность нуклеотидов.

**Гибридома** — гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителообразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток; обладает способностью к неограниченному росту *in vitro* и синтезу моноклональных антител.

**Гуанин** — пуриновое основание, комплементарное цитозину; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав РНК и ДНК.

**Индукция фермента** — увеличение скорости синтеза фермента в ответ на появление в среде индуктора (индукция фермента связана с индукцией гена, кодирующего этот фермент).

**Инокулятор** — небольшой ферментер для стерильного выращивания посевного материала (инокулята), обычно — герметичная емкость с мешалкой, барботером и терморубашкой.

**Интерлейкины** — большая группа белков (ИЛ-1 — ИЛ-18), включенных в системы передачи сигналов при иммунном ответе.

**Интерфероны** — группа белковых молекул, вырабатываемых клетками крови организма в ответ на введение вирусов и вирусных антигенов; с их помощью клетки иммунной системы обмениваются информацией (сигналами), а также обеспечивают защиту организма от вирусных инфекций.

**Интроны** — участки гена эукариот, которые транскрибируются, но в отличие от экзонов в зрелую мРНК не входят.

**Капсид** — белковая оболочка вирусной частицы.

**Каспазы** — семейство цистеиновых протеаз, участвующих в апоптозе, которые в нормальной клетке находятся в неактивном состоянии; в процессе активации (протеолитический механизм) включается так называемый «каспазный каскад»; для активации необходимы также апоптозные «шапероны» — белки, меняющие конформацию других белков; активированные каспазы участвуют в деструкции клетки.

**Катаболическая репрессия** — явление «глюкозного эффекта», заключающееся в том, что глюкоза как наиболее быстро усваиваемый субстрат вызывает разной силы, но постоянную репрессию катаболических ферментов; в биотехнологическом производстве может отрицательно влиять на синтез целевых продуктов — вторичных метаболитов.

**Катионный белок нейтрофилов** — ВР1 — белок с молекулярной массой 55 кДа, нейтрализующий эндотоксин грамотрицательных бактерий.

**Кетолиды** — полусинтетические антибиотики, производные эритромицина (телитромицин).

**Клавулановая кислота** — бета-лактаманная структура, в которой сера в пятичленном кольце заменена на кислород; комбинируется с амоксициллином и защищает его от ферментативной инактивации (препараты «амоксиклав», «аугментин»).

**Клеточная линия** — популяция клеток, поддерживаемая в культуре путем пересевов.

**Клетки миелоидного ряда** — фагоциты костномозгового происхождения, в том числе нейтрофилы, эозинофилы и моноциты.

**Клон** — генетически однородное потомство одной клетки.

**Комплемент** — белковый комплекс сыворотки крови, одна из составляющих врожденного иммунитета. Принимает участие в регуляции воспалительных процессов, активации фагоцитоза и литическом действии на клеточные мембраны.

**Коферменты** — специфические низкомолекулярные органические соединения, необходимые для активации многих витаминов и их производных.

**Конъюгация** — процесс генетического обмена, обусловленный переносом генетической информации от клетки донора в клетку реципиента при непосредственном контакте клеток (у некоторых микроорганизмов это аналог полового процесса).

**Конъюгативные плазмиды** — плазмиды с генами, детерминирующими перенос плазмиды в другую клетку путем конъюгации.

**Космида** — плазида, несущая *cos*-участок (липкие концы ДНК фага R) и являющаяся вектором с высокой емкостью и легким проникновением в клетку.

**Кукурузный экстракт** — основной компонент ферментационной среды при выращивании микроорганизмов в промышленных целях, содержащий широкий набор аминокислот и витаминов, а также большое количество молочной кислоты.

**Лигаза** — фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами, что позволяет восстанавливать за счет ковалентной связи углеводно-фосфатный «хребет» ДНК.

**Лизис** — растворение клеток микроорганизмов под влиянием разных агентов, например ферментов, бактериофагов, антибиотиков.

**Лизоцим** — фермент, катализирующий расщепление гликозидной связи между N-ацетилглюкозаминном и N-ацетилмурамовой кислотой в полисахаридных «хребтах» пептидогликана (муреина) бактерий.

**Лимфокины** — обобщающее название молекул, относящихся к иммуноглобулинам и образуемых лимфоцитами. Включены в системы передачи сигналов между клетками иммунной системы.

**Лиофильное высушивание (лиофилизация)** — метод высушивания целевого продукта из замороженного состояния под вакуумом. В биотехнологии лиофилизация широко используется для длительного хранения культур микроорганизмов, живых вакцин, плазмы, сыворотки крови и ее препаратов, образцов исследуемого материала без существенного изменения исходных свойств. Преимущество лиофилизации перед высушиванием из водных растворов или суспензий состоит в том, что после сублимации формируется сухая пористая масса, лишенная свободной воды и почти сохранившая объем и структуру исходного вещества.

**Макрофаги (А-клетки)** — фагоцитирующие элементы лимфоидной ткани, способные кооперироваться с Т- и В-лимфоцитами, первыми контактируют с антигеном, перерабатывают его и, взаимодействуя с Т-лимфоцитами, передают информацию об антигене В-лимфоцитам.

**Меласса** — отход сахарного производства, содержащий около 50 % сахаров, широко используемый в качестве источника углерода в микробиологическом производстве.

**Миелома** — лимфома, образующаяся из лимфоцитов В-клеточной линии.

**Мобилизация** — перенос неконъюгативных плазмид и хромосомных генов в другую клетку в виде коинтегратов с конъюгативными плазмидами.

**Моноклональные антитела** — однотипные антитела, строго специфичные в отношении одного эпитопа (антигенной детерминанты), синтезируемые гибридомами — клеточными гибридами, полученными при слиянии нормальных антителообразующих клеток с миеломной опухолевой клеткой, способной к неограниченному росту.

**Мурамовая кислота** — эфир молочной кислоты и N-ацетилглюкозамина, являющийся частью состава пептидогликана клеточной стенки бактерий.

**Мутант** — организм с измененными наследственными признаками, полученными в результате мутации.

**Мутант с конститутивным ферментом** — у которого произошла мутация, нарушившая либо образование репрессора, либо его связывание с оператором.

**Мутация** — изменение генотипа, передающиеся по наследству.

**Мутация внутригенная** — изменение последовательности оснований ДНК в пределах одного гена.

**Мутация индуцированная** — мутация, возникающая после обработки культуры клеток мутагенами (физическими или химическими).

**Мутация-миссенс** — мутация, приводящая к изменению смысла — приводящая к замене одной аминокислоты в кодируемом белке на другую.

**Мутация-нонсенс** (бессмысленная мутация) — возникновение кодона, не кодирующего никакой аминокислоты, когда синтез белка прерывается.

**Мутация спонтанная** — мутация, причина которой неизвестна.

**Мутасинтон** — консервативный фрагмент молекулы антибиотика, модифицированный химически, вносимый в среду, где культивируется блок-мутант с целью образования мутасинтетического антибиотика.

**Мутасинтез** — получение с помощью блок-мутантов и мутасинтонов полусинтетических антибиотиков.

**Мутагенез *in vitro*** — обработка мутагенами выделенного фрагмента ДНК («локализованный» мутагенез) с усилением вероятности мутаций конкретного гена (частота мутаций может возрастать за счет использования высоких доз мутагена, которые не допустимы *in vivo* из-за летальных мутаций).

**Несовместимость плазмид** — неспособность плазмид существовать стабильно в одной и той же клетке, однако плазмиды одной группы могут быть несовместимы между собой и совместимы с плазмидами из других групп.

**НК-клетки** — нормальные (естественные) киллерные клетки — популяции лимфоцитов, обладающих природным свойством распознавать и разрушать некоторые инфицированные вирусами и опухолевые клетки.

**Нормофлоры** — препараты, которые обеспечивают оптимальное функционирование резидентной микрофлоры ЖКТ (бифидумбактерины, молочнокислые и колибактерии).

**Оболочка бактериальной клетки** — термин, объединяющий внешнюю мембрану, клеточную стенку и внутреннюю плазматическую мембрану. В структуру оболочки грамотрицательных бактерий входит также периплазматическое пространство (между внешней и внутренней мембранами), имеющее структуру геля и пептидогликан (собственно клеточная стенка). У грамположительных бактерий отсутствует внешняя мембрана, а клеточная стенка гораздо толще (многослойный пептидогликан), чем у грамотрицательных. Периплазматическое пространство не имеет четкого оформления, как у грамотрицательных бактерий, ввиду отсутствия внешней мембраны.

**Олигонуклеотид** — короткий (15—20 нуклеотидов) сегмент одноцепочечной ДНК. Обычно получают химическим путем.

**Оператор** — участок ДНК, расположенный рядом со структурным геном; в него входит промотор — место «посадки» РНК-полимеразы и место между промотором и структурным геном, на котором находится белок-репрессор.

**Оперон** — «генетическая единица», содержащая более одного структурного гена, с которой транскрибируется единая, полистронная мРНК; биологический смысл оперона — в образовании сразу нескольких белков (ферментов), включенных в один многоступенчатый биологический процесс.

**Отжиг** — процесс реассоциации молекул ДНК с образованием водородных связей между комплементарными основаниями.

**Парадигма** — философский термин, означающий концепцию с выработанным критерием, признаваемую всеми исследователями в данной области науки.

**Пассаж** — пересев, перенос или пересадка клеток из одной культуральной среды в другую; число пересевов клеток равно числу пассажей.

**Пассивный иммунитет** — вид иммунитета, возникающий при введении в организм сыворотки, содержащей антитела, выработанные другим организмом в результате активной иммунизации.

**Пенициллиназа** — фермент, расщепляющий беталактамное кольцо у пенициллина и некоторых других беталактамных антибиотиков, обуславливает резистентность бактерий к пенициллину; ген пенициллиназы используется в генной инженерии как ген-маркер при конструировании векторов и отборе рекомбинантных штаммов.

**Пептид** — короткая цепочка аминокислот, соединенных пептидными связями.

**Пептидная связь** — ковалентная связь между свободной карбоксильной группой при  $\alpha$ -углеродном атоме одной аминокислоты и свободной карбоксильной группой при таком же атоме соседней аминокислоты в полипептидной цепи.

**Пептидогликан** — полимер, составляющий жесткую основу клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий; пептидогликановый слой у грамположительных бактерий толще, чем у грамотрицательных. Пептидогликан как гигантская сверхмолекула охватывает всю клетку (пептидогликановый саккулус) и содержит длинные полисахаридные нити, состоящие из перемежающихся остатков N-ацетил-

глюкозамина и мурамовой кислоты, с отходящими от последней короткими пептидными цепочками. Цепочки параллельных полисахаридных нитей замыкаются и образуют поперечные (перекрестные) мостики, благодаря которым пептидогликан превращается в непрерывную сеть.

**Периплазматическое пространство** — пространство между внешней мембраной и цитоплазмой у грамотрицательных бактерий, имеющее структуру геля, в котором локализованы защитные системы микробной клетки, например бета-лактамазы и ферменты, инактивирующие аминокликозидные антибиотики.

**Пиримидины** — азотистые основания, входящие в состав нуклеиновых кислот (тимин, цитозин и урацил). Другой тип азотистых оснований — пурины (аденин и гуанин).

**Плазмида** — внехромосомный генетический элемент. Известны разные классы плазмид: одно-, многокопийные, кольцевые (замкнутые) и линейные. Размеры плазмид меньше, чем у хромосомы. Они могут содержать несколько десятков генов, в том числе гены антибиотикорезистентности. На основе плазмид конструируются векторы.

**Полимеразная цепная реакция** — метод, с помощью которого могут быть размножены *in vitro* фрагменты ДНК, в том числе отдельные гены. Для осуществления полимеразной цепной реакции используется термостабильная ДНК-полимераза и олигонуклеотидные ДНК-зонды, комплементарные тем последовательностям противоположных цепей ДНК, которые фланкируют (четко обозначают) границы гена, фрагмент которого должен быть размножен. Последовательность стадий: денатурация ДНК, отжиг зондов, синтез ДНК.

**Полинуклеотид** — линейный полимер, состоящий из 20 и более нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями. Полинуклеотидами являются, например, молекулы ДНК и РНК.

**Полипептид** — линейный полимер, состоящий из аминокислот, соединенных пептидными связями. Полипептидом является, например, белковая молекула.

**Полиэтиленгликоль** — поверхностно-активное вещество, которое используется при слиянии (фузии) протопластов.

«**Помпы**» — системы активного (энергозависимого) выброса чужеродных для клеток бактерий веществ, например антибиотиков, которые локализованы в цитоплазматической мембране.

**Прион** — изоформа нормального белка нервной ткани с молекулярной массой 27—30 кДа, включенного в регуляцию циркадных ритмов активности и покоя, участвующего в передаче нервных импульсов; белок с самоинфицирующей способностью, который не является для человека чужеродным белком, поэтому иммунотерапия в этом случае не эффективна.

**Прокариоты** — микроорганизмы без оформленного ядра и митохондрий, хромосома которых, содержащая генетическую информацию, находится в цитоплазме клетки. Клетки прокариот по размеру значительно меньше, чем клетки эукариот.

**Протеолиз** — ферментативное расщепление белков. Одним из способов регуляции метаболизма, когда активная и неактивная форма фер-

мента могут различаться по количеству аминокислотных остатков в ферментном белке, является ограниченный протеолиз.

**Протеолитические ферменты (протеазы)** — ферменты, расщепляющие пептидные связи в белковых молекулах.

**Протопласт** — микробная или растительная клетка, лишенная клеточной стенки. Оболочку составляет только цитоплазматическая мембрана. Протопласты стабильны только в гипертонической среде (например, в 20 % сахарозе).

**Пили** — ворсинки на поверхности клетки донора, через которые в клетку реципиента при конъюгации переходит генетическая информация.

**Пориновые белки** — компоненты структуры внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Тримеры пориновых белков формируют заполненные водой пориновые каналы, через которые низкомолекулярные вещества (например, антибиотики) проникают в периплазматическое пространство клетки, минуя барьер внешней мембраны.

**Протопластирование** — удаление клеточной стенки у микробных и растительных клеток.

**Рапамицин** — иммуносупрессор макролидной структуры, образуемый *Streptomyces hygroscopicus*, действует на более поздний этап ответа на чужеродный антиген, чем циклоспорин А, прерывая каскад ответных реакций на сигнал извне на уровне фосфатидилинозитолкиназы.

**Ревертант** — мутант, появляющийся в результате реверсии (возвращения) к исходному фенотипу с восстановлением в ДНК исходной последовательности нуклеотидов.

**Резистентность множественная лекарственная (полирезистентность)** — применительно к эпидемиологии антибиотикорезистентности означает наличие в плазмиде или в хромосоме ряда генов, обуславливающих резистентность к ряду разных антибиотиков.

**Рекомбинантная ДНК** — молекула ДНК, полученная объединением *in vitro* разнородных, нигде в природе вместе не существующих фрагментов ДНК.

**Рекомбинантный белок** — белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК.

**Рестриктаза** — фермент, расщепляющий углеводно-фосфатную цепь нуклеотидов в ДНК.

**Рибонуклеиновая кислота, РНК** — нуклеиновая кислота, состоящая из рибонуклеотидов, у которых сахаром является рибоза, а одним из пиримидинов — урацил (вместо тимина в ДНК).

**Секрещия** — выведение вещества из клетки во внешнюю среду.

**Система комплемента** — серия последовательных процессов активации комплемента (сложного белкового комплекса сыворотки крови) и ферментативных реакций, запускаемых в ответ на образование комплекса антиген — антитело.

**Скорость роста** — показатель интенсивности роста культуры, равный отношению прироста биомассы в экспоненциальной фазе к соответствующему интервалу времени.

**СПИД** — синдром приобретенного иммунодефицита — антропонозная инфекционная болезнь, вызываемая вирусом иммунодефицита человека

(ВИЧ), поражающего иммунную систему. Вирус, проникнув в кровь, разносится кровью и лимфой по всем органам и тканям, поражает клетки иммунной системы. Это приводит к нарушению защитной функции иммунной системы, угнетению реакций иммунитета на антигены, угнетению синтеза антител к ВИЧ, фагоцитозу, снижению продукции интерферона, интерлейкинов, комплемента. ВИЧ-инфекция отличается тотальным поражением Т-, В- и А-клеток иммунной системы. Для антигенов ВИЧ характерна большая изменчивость. Специфическая профилактика отсутствует.

**Сплайсинг** — удаление (вырезание) после транскрипции из мРНК интронов (участков, не несущих информации) и связывание оставшихся экзонов за счет ковалентной связи.

**Сидерофор** — низкомолекулярное соединение, являющееся переносчиком железа в микробную клетку иногда даже против градиента концентраций.

**Сигма-фактор** — субъединица РНК-полимеразы, которая играет роль в узнавании этим ферментом промотора и является аллостерическим эффектором. После инициации транскрипции сигма-фактор отделяется от РНК-полимеразы.

**Скрининг** — отбор и первичная оценка на биологическую активность природных веществ.

**Секвенирование** — определение последовательности нуклеотидных пар в ДНК; ключевая операция для характеристики геномов разных организмов.

**Стенка (клеточная стенка) бактерий** — жесткая опорная структура оболочки, обуславливающая форму клеток и расположенная над цитоплазматической мембраной. Клеточная стенка противодействует лизису клеток вследствие различия осмотических давлений цитоплазмы клетки и внешней среды. Основной полимер клеточной стенки — пептидогликан.

**Суспензионная культура** — тип культуры, в которой клетки размножаются в толще жидкой питательной среды в виде суспензии.

**Телитромицин** — новый макролидный антибиотик — производное эритромицина. Обладает высокой активностью против эритромицинорезистентных штаммов кокковых бактерий.

**Т-лимфоциты (Т-клетки)** — лимфоциты, дифференцируемые главным образом в тимусе, выполняющие ключевые функции в развитии и регуляции иммунного ответа.

**Транспозон** — фрагмент ДНК, имеющий функции генетического элемента, перемещающийся из одного репликона в клетке в другой и из одного места в репликоне в другое место. В транспозон часто включены гены резистентности к антимикробным агентам.

**Тимин** — пиримидиновое основание, одно из четырех азотистых оснований в составе ДНК.

**Токсоиды (анатоксины)** — бактериальные токсины (например, дифтерии и столбняка), инактивированные формалином, но сохранившие при этом антигенность.

**Трансдукция** — осуществляемый фагом перенос генетического материала, хромосомного или внехромосомного происхождения, из клетки в клетку.

**Урацил** — пиримидиновое основание, одно из четырех азотистых оснований в составе РНК.

**Фагоциты** — клетки разных типов (разная морфология, продолжительность жизни и т. д.), имеющие общие сходные свойства: направленное передвижение, способность к фагоцитозу (поглощению и уничтожению микробных клеток), продукции активных форм кислорода, многих бактерицидных белков и пептидов, медиаторов иммунного ответа; к фагоцитам относятся дифференцирующиеся в макрофаги полиморфоядерные нейтрофилы с короткой продолжительностью жизни и мононуклеарные клетки с длительной продолжительностью жизни.

**Фрагмент** — **Fab-ф.** — антигенсвязывающий фрагмент; фрагмент молекулы иммуноглобулина Ig, взаимодействующий с антигеном.

**Хламидия** — грамотрицательная патогенная бактерия, внутриклеточный паразит, размножающийся только внутри животных клеток. Система экскреции белков у хламидий обеспечивает ее инвазию в клетку макроорганизма и разрушение защитных механизмов последней. Клеточная стенка хламидий содержит аналог пептидогликана, синтез которого чувствителен к бета-лактамам антибиотикам.

**Циклоспорин А** — циклопептид, состоящий из 11 аминокислотных остатков, обладает иммуносупрессорными свойствами; реагирует с цитозольным белком циклофилином, после чего их комплекс инактивирует кальций-нейрин и прерывает на этой стадии сигнальную трансдукцию — каскад ответных реакций на чужеродный антиген; подавляет отторжение трансплантатов и используется при пересадке органов и тканей.

**Цистрон** — эквивалент гена; термин, используемый в молекулярной биологии и биохимии, например полицистронная мРНК.

**Цитозин** — пиримидиновое основание, одно из четырех азотистых оснований в составе РНК и ДНК.

**Цитокины** — обобщающее название для секретируемых лейкоцитами и другими клетками иммунной системы молекул при иммунном ответе.

**Штамм** — культура генетически однородных микроорганизмов.

**Экспрессия** — «выражение себя», реализация своего предназначения.

**Экспрессия гена** — транскрипция и трансляция (выражение своей «сущности» в матричной РНК — транскрипция, а затем в белке — трансляция).

**Эзоны** — несущие информацию участки генов эукариот, которые сохраняются в транскрипте после удаления (вырезания) из него интронов. Последовательность экзонов составляет зрелую мРНК. Наличие экзонов и интронов в генах эукариот является проблемой для генных инженеров, если в задачу последних входит перенос гена человека в бактериальную клетку. В этом случае ген не должен содержать интронных участков. С помощью обратной транскриптазы зрелая мРНК гена «переписывается» на ДНК, и такой искусственный, состоящий только из экзонов ген, включается в вектор, а потом и в бактериальную клетку.

**Электрофорез** — классический биохимический метод разделения несущих заряд молекул (белка, нуклеиновых кислот и др.), основанный на разной для разных молекул скорости их движения в электрическом поле. В настоящее время метод двухмерного электрофореза является основным, используемым в протеомике, позволяя вести мониторинг белков

во время любого цикла развития клетки, при реагировании клетки на внешнее воздействие и т. д.

**Эндотоксины** — токсические субстанции, входящие в структуру бактерий (обычно в клеточную стенку) и высвобождающиеся из них после лизиса. Чаще это название применяют по отношению к липополисахаридам клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

**Эпитоп (антигенная детерминанта)** — фрагмент молекулы (молекул) антигена, локализующийся внутри или на поверхности молекулы, индуцирующий иммунный ответ и определяющий его специфичность.

**Эргостерин** — исходный продукт производства жирорастворимого витамина D<sub>2</sub>. Источником эргостерина являются фитопланктон, бурые и зеленые водоросли, но особенно богаты эргостерином дрожжи и плесневые грибы. Бактерии, как правило, синтезируют незначительные количества стероидов.

**Эффектор аллостерический** — общее обозначение регуляторных молекул, ингибирующих или активирующих аллостерические ферменты.

**Эукариот** — организм с оформленным ядром и с более сложной, чем у прокариот, организацией клетки; низшие эукариоты — грибы, дрожжи, простейшие; высшие — растения, животные.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Биология : учебник / [Н. В. Чебышев и др.]. — М. : ВУНМЦ, 2000. — 592 с.
- Биотехнология лекарственных средств : учеб. пособие / под ред. В. А. Быкова, М. В. Данилина. — М. : Медбиозкономика, 1991. — 303 с.
- Биотехнология: Принципы и применение / под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Дж. Джайса ; пер. с англ. — М. : Мир, 1998. — 485 с.
- Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак ; пер. с англ. — М. : Мир, 2002. — 589 с.
- Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. — 11-е изд. — М. : Медицина, 1990. — 398 с.
- Дебабов В. Г. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. Биотехнология. Кн. 2 : учеб. пособие для вузов / В. Г. Дебабов, В. А. Лившиц. — М. : Высш. шк. — 1988. — 208 с.
- Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. — М. : Наука, 2004. — 525 с.
- Елинов Н. П. Основы биотехнологии / Н. П. Елинов. — СПб. : Наука, 1995. — 600 с.
- Иммобилизованные клетки и ферменты / под ред. Дж. Вудворта ; пер. с англ. — М. : Мир, 1998. — 321 с.
- Иммобилизованные клетки микроорганизмов / [А. П. Синицин и др.]. — М. : МГУ, 1994. — 288 с.
- Иммобилизованные ферменты. Биотехнология. Кн. 7 : учеб. пособие для вузов / [И. В. Березин и др.]. — М. : Высш. шк. — 1987. — 159 с.
- Инженерная энзимология. Биотехнология. Кн. 8 : учеб. пособие для вузов / [И. В. Березин и др.]. — М. : Высш. шк. — 1987. — 143 с.
- Катлинский А. В. Лекарственные препараты направленного действия: история создания и механизмы действия / А. В. Катлинский. — М. : Изд-во Димитрейд график групп, 2003. — 228 с.
- Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник / под ред. А. А. Воробьева. — М. : Медицинское информационное агентство, 2004. — 691 с.
- Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. Биотехнология. Кн. 6 : учеб. пособие для вузов / [В. А. Быков и др.]. — М. : Высш. шк. — 1987. — 143 с.
- Молекулярные и клеточные аспекты биотехнологии / под ред. С. Г. Инге-Вечтомова. — Л. : Наука, 1986. — 256 с.
- Морозкина Т. С. Витамины / Т. С. Морозкина, А. Г. Моисеенок. — Минск : Асар, 2002. — 112 с.

Производство белковых веществ. Биотехнология. Кн. 5 : учеб. пособие для вузов / [В. А. Быков и др.]. — М. : Высш. шк. — 1987. — 142 с.

Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. — М. : Высш. шк., 1989. — 687 с.

*Ройт А.* Иммунология / А. Рейт, Дж. Бростофф, М. Мейл ; пер. с англ. — М. : Мир, 2000. — 824 с.

*Сазыкин Ю. О.* Антибиотики как биохимические реагенты / Ю. О. Сазыкин. — М. : ВИНТИ, 1984. — 203 с.

*Саруханов А. В.* Оборудование микробиологических производств : справочник / А. В. Саруханов, В. А. Быков. — М. : Колос, 1993. — 384 с.

*Северин С. Е.* Биохимия и медицина — новые подходы и достижения / С. Е. Северин. — М. : Русский врач, 1998. — 94 с.

Современная генетика / под ред. Ф. Айала, Д. Кайчур. — М. : Мир, 1987. — 705 с.

*Шилова С. В.* Организация производства лекарственных средств с учетом правил GMP. Химико-фармацевтическое производство, обзорная информация / С. В. Шилова, С. М. Пузакова. — М. : ВНИИСЭНТИ, 1990. — 36 с.

Biopharmaceutical Drug Design and Development / eds W.U.-Pong, S. Rojana Sacyl. — N. Y. : Humana Press, 1999. — 435 p.

|                |   |
|----------------|---|
| Введение ..... | 3 |
|----------------|---|

## РАЗДЕЛ I ОБЩАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Глава 1. Биообъекты: способы их создания и совершенствования</b> .....   | <b>7</b>  |
| 1.1. Понятие «биообъект» .....  | 7         |
| 1.2. Совершенствование биообъектов методами мутагенеза и селекции .....   | 9         |
| 1.3. Совершенствование биообъектов методами клеточной инженерии .....   | 14        |
| 1.4. Создание биообъектов методами генетической инженерии .....   | 19        |
| 1.4.1. Общая характеристика .....   | 19        |
| 1.4.2. Рекомбинантные белки как лекарственные средства .....  | 24        |
| 1.5. Инженерная энзимология. Имобилизованные биообъекты .....   | 30        |
| <b>Глава 2. Геномика и протеомика</b> .....   | <b>39</b> |
| 2.1. Общая характеристика .....   | 39        |
| 2.2. Геном человека .....   | 47        |
| 2.2.1. Проект «Геном человека» .....  | 47        |
| 2.2.2. Генотерапия .....  | 48        |
| 2.2.3. Антисмысловые олигонуклеотиды .....  | 52        |
| 2.2.4. Конформационные болезни .....  | 53        |
| <b>Глава 3. Молекулярные механизмы внутриклеточной регуляции и их использование в биотехнологическом производстве</b> ..... | <b>56</b> |
| 3.1. Индукция и репрессия синтеза ферментов .....   | 56        |
| 3.2. Ретроингибирование и преодоление этого явления .....   | 58        |
| 3.3. Строгий аминокислотный контроль метаболизма микроорганизмов и его значение при получении лекарственных средств .....   | 60        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.4. Регуляция усвоения азотсодержащих соединений .....                                      | 63        |
| 3.5. Катаболическая репрессия в создании<br>и производстве лекарственных средств .....       | 65        |
| 3.6. Транспорт веществ через мембранные<br>структуры клетки и его регуляция .....            | 66        |
| 3.7. Молекулярные механизмы защиты продуцентов<br>от веществ с «суицидным эффектом» .....    | 70        |
| <b>Глава 4. Основные этапы биотехнологического процесса .....</b>                            | <b>74</b> |
| 4.1. Общая характеристика .....  | 74        |
| 4.2. Подготовка и стерилизация технологического<br>воздуха .....                             | 77        |
| 4.3. Герметизация и стерилизация оборудования .....  | 79        |
| 4.4. Стерилизация питательных сред .....   | 80        |
| 4.5. Подготовка посевного материала .....  | 81        |
| 4.6. Процесс биосинтеза. Классификация<br>по технологическим параметрам .....                | 82        |
| <b>Глава 5. Система GMP производства и контроля качества<br/>лекарственных средств .....</b> | <b>85</b> |
| <b>Глава 6. Экологические аспекты биотехнологии .....</b>                                    | <b>93</b> |
| 6.1. Понятие «экология» .....  | 93        |
| 6.2. Эколого-биохимические взаимодействия<br>в организменных сообществах .....               | 95        |
| 6.3. Экологические аспекты биотехнологического<br>производства .....                         | 96        |

## РАЗДЕЛ II ЧАСТНАЯ BIOTEKHOЛOГИЯ

|  |            |
|--|------------|
| <b>Глава 7. Проблемы поиска, создания и применения антибиотиков<br/>в медицинской практике .....</b> | <b>102</b> |
| 7.1. Антибиотики как вторичные метаболиты<br>и их продуценты .....                                   | 102        |
| 7.2. Механизмы биосинтеза антибиотиков .....   | 114        |
| 7.3. Биотехнология антибиотиков .....  | 117        |
| 7.4. Механизмы действия антибиотиков .....   | 125        |
| 7.4.1. Классификация механизмов .....  | 125        |
| 7.4.2. Ингибиторы образования клеточной стенки<br>бактерий .....                                     | 126        |
| 7.4.3. Ингибиторы белкового синтеза у бактерий .....   | 127        |
| 7.4.4. Ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот .....   | 128        |
| 7.4.5. Ингибиторы функций цитоплазматической мембраны<br>микробной клетки .....                      | 130        |
| 7.5. Антибиотикорезистентность .....   | 132        |
| 7.5.1. Молекулярные механизмы .....  | 132        |

|  |            |
|--|------------|
| 7.5.2. Поиск новых природных беталактамов<br>и целенаправленная трансформация беталактамной<br>молекулы .....                    | 142        |
| 7.5.3. Пути борьбы с антибиотикорезистентностью .....  | 145        |
| <b>Глава 8. Лекарственные препараты, получаемые<br/>в фармацевтической промышленности биотехнологическими<br/>методами .....</b> | <b>149</b> |
| 8.1. Стероиды .....  | 149        |
| 8.2. Витамины .....  | 157        |
| 8.3. Аминокислоты .....  | 168        |
| 8.4. Пробиотики .....  | 182        |
| 8.5. Ферменты .....  | 192        |
| <b>Глава 9. Биотехнология лекарственных средств<br/>на основе культур растительных клеток и тканей .....</b>                     | <b>204</b> |
| 9.1. Общая характеристика .....  | 204        |
| 9.2. Трансгенные растения .....  | 212        |
| <b>Глава 10. Иммунобиотехнология лекарственных средств .....</b>   | <b>219</b> |
| Краткий терминологический словарь .....  | 237        |
| Список литературы .....  | 252        |

*Учебное издание*

**Сазыкин Юрий Осипович,  
Орехов Сергей Николаевич,  
Чакалёва Ирина Исааковна**

**Биотехнология**

**Учебное пособие**

Редактор *А. В. Савенков*  
Технический редактор *О. Н. Крайнова*  
Компьютерная верстка: *О. В. Пешкетова*  
Корректоры *А. П. Сизова, Л. В. Гаврилина*

Изд. № 103112124. Подписано в печать 04.06.2008. Формат 60 × 90/16.  
Гарнитура «Таймс». Печать офсетная. Бумага офсетная № 1.  
Усл. печ. л. 16,0. Тираж 2 500 экз. Заказ № 1760.

Издательский центр «Академия». [www.academia-moscow.ru](http://www.academia-moscow.ru)  
Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.02.953.Д.004796.07.04 от 20.07.2004.  
117342, Москва, ул. Бултерова, 17-Б, к. 360. Тел./факс: (495)330-1092, 334-8337.

Отпечатано с электронных носителей издательства.  
ОАО «Тверской полиграфический комбинат», 170024, г. Тверь, пр-т Ленина, 5.  
Телефон: (4822) 44-52-03, 44-50-34, Телефон/факс: (4822) 44-42-15  
Home page - [www.tverpk.ru](http://www.tverpk.ru) Электронная почта (E-mail) - [sales@tverpk.ru](mailto:sales@tverpk.ru)

