МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
ХИМИКО-ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ
(ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России)

Кафедра биотехнологии

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

«СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»

Направление подготовки 19.04.01 Биотехнология
Квалификация (степень) – магистр
1 курс
1 семестр
Аудиторная трудоемкость – 32 часа

Санкт-Петербург
2016

Данные методические указания предназначены для студентов, обучающихся по специальности 19.04.01 – Биотехнология (уровень магистратуры) при изучении дисциплины «Современные проблемы биотехнологии».

На практических занятиях, проводимых в виде конференций, дискуссий, «круглых столов», студенты обсуждают современные проблемы, стоящие перед биотехнологией в целом и, в частности, медицинской и фармацевтической биотехнологией.

Методические указания обсуждены и утверждены на заседании кафедры биотехнологии 02 ноября 2016 г., протокол № 3.

Составитель: к.б.н., доцент Топкова О.В.

Зав. кафедрой биотехнологии _____ В.А. Колодязная

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
ЗАНЯТИЕ № 1 («круглый стол») **Основные области применения биотехнологии и основные ее аспекты. Национальная программа развития биотехнологий в РФ.**	5
ЗАНЯТИЕ № 2 (конференция) **Проект «Геном человека» - итоги и достижения. Масштабы и методы анализа геномов.**	11
ЗАНЯТИЕ № 3 **Правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств.**	20
ЗАНЯТИЕ № 4 («круглый стол») **Биомедицинские технологии. Биоматериалы.**	23
ЗАНЯТИЯ № 5-6 **Новые высокоспецифичные методы анализа и контроля с использованием продуктов биотехнологии**	31
ЗАНЯТИЕ № 7 (дискуссия) **Этические проблемы и потенциальные риски в биотехнологии. Государственный контроль и регулирование генно-инженерной деятельности и использования генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов.**	39
Список литературы	48

ВВЕДЕНИЕ

Методические указания к практическим занятиям по дисциплине «Современные проблемы биотехнологии» предназначения для магистрантов 1 курса факультета промышленной технологии лекарств, обучающихся по специальности 19.04.01 Биотехнология, квалификация (степень) – магистр.

Содержание методических указаний соответствует рабочей программе по дисциплине «Современные проблемы биотехнологии». Методические указания предназначены для подготовки студентов к практическим занятиям и содержат тематику проводимых занятий, краткие теоретические сведения по каждой теме, контрольные вопросы и задания для домашней работы, приведен список основной и дополнительной литературы.

ЗАНЯТИЕ № 1

ОСНОВНЫЕ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ И ОСНОВНЫЕ ЕЕ АСПЕКТЫ. НАЦИОНАЛЬНАЯ ПРОГРАММА РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ В РФ.

Цель занятия:

Раскрыть основные аспекты современной биотехнологии, ее важнейшие достижения, основные области применения.

Рассмотреть основные положения комплексной программы развития биотехнологии в России на период до 2020 г.

Темы для обсуждения:

1) Основные аспекты современной биотехнологии.

2) Основные достижения биотехнологии.

3) Области применения биотехнологии.

4) Основные положения комплексной программы развития биотехнологии России на период до 2020 г.

Занятие проводится в форме «круглого стола».

Порядок проведения «круглого стола»:

1. Краткое вводное слово преподавателя.
2. Заслушивание кратких сообщений участников «круглого стола».
3. Постановка перед участниками «круглого стола» вопросов, поступивших из аудитории.
4. Развертывание дискуссии.
5. Выработка согласованных позиций по предмету обсуждения.

Вопросы для подготовки к занятию:

1. Какие науки внесли большой вклад в развитие биотехнологии?
2. Какие продукты получают методами биотехнологии, и в каких отраслях народного хозяйства они находят применение?
3. Перечислите приоритетные направления развития биотехнологии.
4. Что такое интенсивные технологии? Приведите примеры.
5. Приведите примеры «цветных» биотехнологий.
6. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

В настоящее время условно разделяют классическую, современную и новейшую биотехнологию. Использование традиционных методов выращивания животных и растений, а также бактерий, дрожжей и грибков для производства продуктов питания, например, хлеба, пива, вина и сыра, относят к *классической биотехнологии* – бессознательный, а затем сознательный отбор.

Современная биотехнология использует отбор, гибридизацию и мутагенез для микробиологического синтеза. Значительное расширение фундаментальных знаний в области клеточной биологии и генетики позволило понять, как можно изменять и влиять на биологические процессы на молекулярном уровне. Стало возможным изменение биологических свойств микроорганизмов, растений и животных, напрямую модифицируя их генетическую информацию, закодированную в молекуле ДНК, которая является физическим носителем всех биохимических свойств организма. Эту технологию часто называют генетической инженерией. Современная биотехнология зародилась в 70-х годах прошлого столетия и дала толчок к развитию промышленных биотехнологических предприятий в начале 80-х прошлого столетия, которые сейчас выросли в успешные биотехнологические гиганты (Genentech, Biogen, Amgen, Chiron и др.).

Новейшая биотехнология охватывает различные направления, основанные на фундаментальных достижениях и открытиях в областях молекулярной и клеточной биологии, геномики, протеомики, липидомики, биоинформатики и моделирования биологических систем. В настоящее время научные достижения в этих отраслях вызывают огромный научный и коммерческий интерес и приводят к созданию новых биотехнологических предприятий и привлечению финансовых ресурсов для поддержки новых открытий и их практического внедрения.

Направления современной биотехнологии

- Фармацевтическая продукция
- Генная терапия
- Диагностика генетических заболеваний
- Трансгенные растения
- Здоровое питание
- Биологическая защита растений
- Продукты повседневного потребления
- Трансгенные животные
- Охрана окружающей среды

Различные аспекты биотехнологии как науки

Химические аспекты биотехнологии – биоорганическая химия и биохимия. Биосинтетические процессы в клетках. Синтез и выделение продуктов, установление строения, изучение взаимосвязи между химическим строением и биологической активностью (биологической функцией) соединений.

Технологические аспекты биотехнологии – биообъекты, основные биотехнологические процессы, культивирование биообъектов, контроль специфических параметров процессов культивирования.

Этические аспекты – трансгенные растения и животные, клонирование млекопитающих. Экономические взаимоотношения между развивающимися и индустриально развитыми странами. Экологические последствия развития биотехнологии.

Экономические аспекты – объем рынка продукции традиционной и генетической биотехнологии.

Современные биотехнологии различных направлений и различных уровней неразрывно связаны между собой в единую научно-производственную систему.

Технологии низкого уровня – это технологии традиционные, в известной мере, устаревшие. Они характеризуются низкой наукоемкостью, т.е. базируются на использовании рабочих систем, полученных методами традиционной селекции. Для реализации таких технологий не требуется специального оборудования и специальной подготовки материала. Такие технологии широко используются в рамках обычного сельскохозяйственного производства, в частности, в растениеводстве (тогда рабочей системой можно считать агроэкосистему, например, обрабатываемое картофельное поле). К биотехнологиям низкого уровня относятся технологии биологической очистки сточных вод, получения биотоплива, некоторые виды микробиологического синтеза.

Технологии низкого уровня с минимальными затратами материальных ресурсов, энергии и человеческого труда называются **экстенсивными**. Примером таких технологий служит повышение плодородия почв путем вывоза на поля навоза, торфа, путем запашки пожнивных остатков и/или сидератов (специально выращенных бобовых растений). Эффективность подобных технологий невелика: при их использовании продуктивность агроэкосистем мало отличается от продуктивности природных экосистем. Низкая эффективность экстенсивных технологий низкого уровня компенсируется расширением площади сельскохозяйственных угодий: вырубаются леса (при этом древесина

используется на топливо, для производства бумаги), распахиваются степи. Вырубка лесов и распашка степей неизбежно сопровождаются эрозией почв, оскудением водных ресурсов. Подобные технологии показали свою неэффективность уже в первой половине XX столетия.

Более эффективными являются **интенсивные** технологии. Их эффективность достигается, в первую очередь, путем внедрения новых интенсивных сортов растений (в животноводстве и микробиологическом синтезе – интенсивных пород животных и штаммов микроорганизмов). Однако в результате применения интенсивных технологий низкого уровня многократно усиливается локальная нагрузка на природные экосистемы, происходит механическая эрозия почв, возрастает их загрязненность минеральными удобрениями и средствами защиты растений. Возрастает и глобальная нагрузка на биосферу, в первую очередь, за счет выбросов углекислого газа: количество CO2, образовавшегося при сжигании ископаемого топлива, в несколько раз больше, чем количество CO2, ассимилированного в ходе фотосинтеза в агроэкосистемах. Одним из самых существенных недостатков интенсивных технологий является резкое снижение качества продукции (такую продукцию часто называют «экологически грязной»).

Уже в 1970-е гг. стало ясно, что использование технологий низкого уровня – это тупиковый путь. Выходом из этого тупика стало использование **прорывных технологий**. Прорывные технологии базируются на самых современных достижениях науки и техники. В качестве прорывных эти технологии они существуют недолго: то, что вчера казалось невероятным, непривычным, фантастичным – сегодня становится обыденным, рутинным. В свое время прорывными технологиями стали технологии микробиологического синтеза (в частности, получения антибиотиков), технологии клеточной инженерии (в частности, гибридизация соматических клеток и клонирование организмов), технологии генной инженерии (в частности, получение кДНК, получение векторов переноса ДНК и создание трансгенных организмов).

Прорывные, принципиально новые технологии могут быть опасными для человека и окружающей его среды, поскольку последствия их применения непредсказуемы. Внедрение прорывных технологий, как правило, сопровождается появлением новых типов продуктов и новых типов отходов. В принципе, любой новый пищевой или промышленный продукт должен проходить всестороннюю проверку на аллергенность, канцерогенность и мутагенность, на совместимость с другими продуктами, на безопасность для окружающей среды и т.д. Однако прорывные технологии, по своему определению, делают такую проверку невозможной.

В дальнейшем на основе прорывных технологий создаются **биотехнологии**

высокого уровня (или просто **высокие биотехнологии**). В противоположность технологиям низкого уровня, высокие биотехнологии характеризуются высокой наукоемкостью, т.е. использованием рабочих систем, полученных с использованием самых современных методов экологии, генетики, микробиологии, цитологии, молекулярной биологии. Материалы, применяемые в высоких биотехнологиях, часто нуждаются в специальной подготовке. Для реализации таких технологий требуется специальное технологическое оборудование, обслуживаемое квалифицированными специалистами. Из-за нехватки таких специалистов расширение высокотехнологичного производства сопровождается его автоматизацией и компьютеризацией. Такие технологии используются как в рамках обычного сельскохозяйственного производства, так и в других областях человеческой деятельности: в здравоохранении, в промышленности, в различных областях науки, при планировании и проведении природоохранных мероприятий.

Высокие биотехнологии также делятся на экстенсивные и интенсивные.

Экстенсивные высокие биотехнологии характеризуются относительно невысокой квалификацией обслуживающего персонала, относительно низкими затратами сырьевых и энергетических ресурсов. К технологиям подобного типа относится большинство микробиологических производств, технологических процессов по подготовке и переработке промышленного сырья, а также часть производства продукции на основе тканево-клеточных культур. В настоящее время эти технологии частично интенсифицируются за счет компьютеризации производства.

Интенсивные высокие биотехнологии (в противоположность экстенсивным) реализуются с привлечением специалистов высочайшей квалификации, с использованием уникального оборудования и самых современных материалов. Эти биотехнологии используются в медицине, а также для создания организмов с заранее заданными свойствами. Нужно отметить, что интенсификация высоких технологий, в отличие от интенсификации технологий низкого уровня, заключается не просто в повышении их трудоемкости и повышении уровня ресурсо- и энергозатраты, а в повышении качества ресурсного и информационного обеспечения.

Цветовая классификация биотехнологий

- **«красная» биотехнология** – биотехнология, связанная с обеспечением здоровья человека и потенциальной коррекцией его генома, а также с производством биофармацевтических препаратов (протеинов, ферментов, антител);
- **«зеленая» биотехнология** - направлена на разработку и создание генетически

модифицированных (ГМ) растений, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам, определяет современные методы ведения сельского и лесного хозяйства;

- **«белая» биотехнология -** промышленная биотехнология, объединяющая производство биотоплива, биотехнологии в пищевой, химической и нефтеперерабатывающей промышленности;
- **«серая» биотехнология -** связана с природоохранной деятельностью, биоремедиацией;
- **«синяя» биотехнология** – связана с использованием морских организмов и сырьевых ресурсов.

План обсуждения «Национальной программы развития биотехнологий в РФ на период до 2020 года»

1. Обоснование необходимости принятия нац. программы.
2. Основные цели и задачи, поставленные в программе.
3. Этапы реализации программы.
4. Реализация программы, промежуточные итоги реализации (на момент обсуждения).

ЗАДАНИЕ НА ДОМ: подготовка сообщений и презентаций:

1. История проекта «Геном человека».
2. Сторонники и противники проекта.
3. Итоги работы над проектом «Геном человека».
4. Прогноз развития медицины и биологии в постгеномную эру.
5. Геномные библиотеки и картирование генома,
6. Геном прокариот и геном эукариот
7. Векторы. Клонирование ДНК.

ЗАНЯТИЕ № 2
ПРОЕКТ «ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА» - ИТОГИ И ДОСТИЖЕНИЯ

Цель занятия:

- Рассмотреть основные предпосылки возникновения, полученные итоги и достижения проекта «Геном человека».
- Ознакомиться с методами секвенирования ДНК, идентификации и клонирования генов.
- Ознакомиться с понятием «геномная библиотека» и принципами ее создания.

Темы для обсуждения:

1. История проекта «Геном человека».
2. Сторонники и противники проекта.
3. Итоги работы над проектом «Геном человека».
4. Прогноз развития медицины и биологии в постгеномную эру.
5. Геномные библиотеки и картирование генома,
6. Геном прокариот и геном эукариот
7. Векторы. Клонирование ДНК.

Занятие проводится в форме конференции. В формате конференции проходит совместное обсуждение всеми слушателями актуальных вопросов изучаемой темы. Слушатели выступают с заранее подготовленными сообщениями, затем все участники конференции задают докладчику вопросы и обсуждают эти сообщения. Все слушатели в ходе занятия обладают равными статусом и правами. Каждый может высказать свою точку зрения по теме конференции, затем происходит обсуждение мнений участников, неясных или спорных моментов.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

При изучении генома человека исследователи ограничены в экспериментальных данных, так как генетические испытания на человеке недопустимы. В то же время в результате демографического взрыва в современном обществе (по сравнению с доисторической эпохой и последующим периодом) в настоящее время население Земли составляет 6 % от всех людей, когда-либо живших на нашей планете. Современная

популяция предоставляет ученым разнообразный генетический материал. Анализ ДНК членов больших семей, проводимый в течение нескольких десятилетий, позволил построить карты хромосом и локализовать на них гены, отвечающие за сотни различных наследственных заболеваний. Однако установление четких генетических маркеров для человека остается очень трудной задачей. Геном человека имеет размер около 3 млрд. п.н., ДНК распределена между 23 хромосомами. Лишь несколько процентов геномной ДНК содержит последовательности, необходимые для синтеза белка. Значительная часть генома представлена тандемными повторами, функция которых до сих пор не установлена.

С 1990 г. началась реализация международного проекта, целью которого стало определение нуклеотидной последовательности всего генома человека. Из обширной геномной библиотеки (около 300000 BAC-клонов), содержащей клоны с ДНК различных хромосом, методами рестриктного анализа, «прогулке по хромосоме»и STS-идентификации удалось отобрать клоны, содержащие участки ДНК, расположенные рядом на хромосоме. Такие участки были секвенированы, и полученные данные были внесены в компьютер, где подлинность результатов секвенирования была еще раз подтверждена их полным совпадением с результатом генетического картирования.

С 1996 года началась работа по секвенированию более 50000 EST-экспрессирующихся ДНК-маркеров. В 1998 г. частная исследовательская фирма Celera предложила альтернативный метод создания физической карты генома человека с использованием стратегии «дробовика» (shotgun). Согласно этой методике, ДНК человека разрезали на 60 млн фрагментов длиной около 2000 п.н. или на 10 млн фрагментов длиной около 10000 п.н. Затем для каждого фрагмента секвенировали концевые участки по 500 п.н. В ДНК человека встречаются тандемные повторы длиной до 5000 п.н., поэтому секвенирование концевых участков крупных фрагментов (10000 п.н.) должно было гарантировать правильное взаиморасположение таких повторов на создаваемой карте генома. В настоящее время показано, что даже при использовании такого подхода возможны ошибки. Полная длина секвенированной ДНК в этом случае составила 35 млрд. п.н., что соответствует 12-кратной избыточности. Оба проекта были завершены и в 2001 г. была опубликована полная последовательность генома человека. Неожиданным оказался тот факт, что на всей ДНК человека удалось идентифицировать лишь 30000 генов.

Что можно ждать от геномных исследований в ближайшие 40 лет? Вот как сформулировал прогноз **Ф.Коллинз,** руководитель программы**"Геном человека"** (США).

2010 год

Генетическое тестирование, профилактические меры, снижающие риск заболеваний, и генная терапия до 25 наследственных заболеваний. Медсестры начинают

выполнять медико-генетические процедуры. Широко доступна преимплантационная диагностика, яростно обсуждаются ограничения в применении данного метода. В США приняты законы для предотвращения генетической дискриминации и соблюдения конфиденциальности. Не всем доступны практические приложения геномики, особенно в развивающихся странах.

2020 год

На рынке появляются лекарства от диабета, гипертонии и других заболеваний, разработанные на основе геномной информации. Терапия рака, прицельно направленная на свойства раковых клеток. Фармакогеномика становится общепринятым подходом для создания многих лекарств. Изменение способа диагностики психических заболеваний, появление новых способов их лечения, изменение отношения общества к таким заболеваниям. Демонстрация безопасности генотерапии на уровне зародышевых клеток при помощи технологии гомологичной рекомбинации.

2030 год

Определение последовательности нуклеотидов всего генома отдельного индивида станет обычной процедурой, стоимость которой менее 1000 $. Каталогизированы гены, участвующие в процессе старения. Проводятся клинические испытания по увеличению максимальной продолжительности жизни человека. Лабораторные эксперименты на человеческих клетках заменены экспериментами на компьютерных моделях. Активизируются массовые движения противников передовых технологий в США и других странах.

2040 год

Все общепринятые меры здравоохранения основаны на геномике. Определяется предрасположенность к большинству заболеваний (при/до рождения). Доступна эффективная профилактическая медицина с учетом особенностей индивида. Болезни детектируются на ранних стадиях путем молекулярного мониторинга. Для большинства заболеваний доступна генная терапия. Замена лекарств продуктами генов, вырабатываемыми организмом при ответе на терапию. Средняя продолжительность жизни достигнет 90 лет благодаря социоэкономическим мерам. Проходят серьезные дебаты о воз можности человека контролировать собственную эволюцию.

Неравенство в мире сохраняется, создавая напряженность на международном уровне.

МАСШТАБЫ И МЕТОДЫ АНАЛИЗА ГЕНОМОВ. КЛОНИРОВАНИЕ ДНК.

Для определения первичной структуры ДНК используют один из двух методов: метод химического секвенирования ДНК, предложенный Максамом и Гилбертом, или

ферментативный метод, разработанный Сэнгером и Коулсоном. Оба метода позволяют секвенировать фрагменты ДНК размером до 600 нуклеотидов. Для определения нуклеотидной последовательности более крупных фрагментов ДНК необходимо получить набор перекрывающихся фрагментов, в совокупности соответствующих длине полной ДНК. Секвенирование целых геномов проводят с использованием автоматических секвенаторов, в которых вместо традиционного рабиоактивного мечения используют флуоресцентную метку. Особое значение имеет сравнение результатов секвенирования с уже имеющимися компьютерными базами данных.

Метод Сэнгера-Коулсона. Для того, чтобы получить исследуемый фрагмент ДНК в однонитевой форме, его встраивают в вектор, созданный на основе генома фага М13. После выделения одноцепочечной ДНК достраивают вторую цепь с помощью фрагмента Кленова или Т7-ДНК-полимеразы. В реакционную смесь добавляют dATP, dTTP, dGTP, dCTP и короткий синтетический олигонуклеотид – праймер. Пробу разделяют на 4 части, и в каждую добавляют один из четырех дедозоксинуклеотидов: ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP – для обрыва цепи (после присоединения дедозоксинуклеотида рости цепи прекращается). Концентрацию дедезоксинуклеотидов подбирают таким образом, чтобы полученная смесь представляла собой статистический набор олигонуклеотидов разной длины, заканчивающихся на 3/-конце нуклеотидом, комплементарным соответствующему нуклеотиду в исходной матрице. Разделение продуктов реакции по длине с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) позволяет прочитать всю последовательность нуклеотидов исследуемого фрагмента. Для того чтобы результаты секвенирования можно было зафиксировать на рентгеновской пленке, один из дезоксинуклеотидов, вводимых в реакционную смесь, метят радиоактивным изотопом ^{32}P или ^{35}S.

Метод Максама и Гилберта. В современных исследованиях метод химического секвенирования ДНК применяется редко, однако ранее он широко использовался благодаря простоте и надежности. Метод заключается в химической модификации в четырех разных реакциях одного из четырех оснований ДНК и последующим расщеплением сахарофосфатной цепи в местах модификации. При этом образуется набор меченых молекул разной длины, которые разделяют в ПААГ и читают последовательность

нуклеотидов на полученной авторадиограмме. Использование твердофазного процесса и флуоресцентной метки позволило автоматизировать эту методику.

В основе ***автоматического секвенирования*** лежит уже упоминавшийся выше

метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих ddNTP. Как и классический вариант Сэнгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций и разделение продуктов этих реакций с помощью электрофореза. Как правило, автоматизирована лишь вторая стадия, т.е. разделение меченных фрагментов ДНК в ПААГ, получение спектра эмиссии флуорофоров и последующий обсчет собранных данных. Таким образом, автоматическое секвенирование идеологически отличается от современного ему ручного секвенирования только типом используемой метки.

Флуоресцентную метку включают либо в праймер, либо в терминатор транскрипции согласно следующим схемам: меченный праймер (четыре разных красителя) и немеченые терминаторы; меченный праймер (один краситель) и немеченые терминаторы; меченные терминаторы (каждый тип терминатора своим красителем) и немеченый праймер. Использование меченных праймеров предполагает проведение четырех независимых реакций (отдельно с каждым из терминаторов) для каждого секвенируемого образца. Использование меченных терминаторов позволяет совместить все четыре реакции в одной пробирке. Если используется единственный краситель, то разделение продуктов сиквенсовой реакции в геле проводят на четырех разных дорожках. Использование четырех разных красок позволяет разгонять продукты реакции(й) на одной дорожке.

Даже такие небольшие геномы, как у фагов или вирусов, оказываются слишком велики для прямого секвенирования. Для изучения структуры генома его расщепляют на мелкие фрагменты, определяют нуклеотидную последовательность фрагментов путем секвенирования, а затем с помощью компьютерных методов создают полную ДНК- или РНК-карту генома. Генетический код избыточен, поэтому для изучения структуры генома (генетического картирования) необходимо иметь соответствующие маркерные участки (маркеры), как правило, это – ДНК-маркирующие сайты STS (sequence-tagged sites).

Геномная библиотека – это множество клонированных фрагментов ДНК, в совокупности охватывающих весь геном. Для получения библиотеки геном расщепляют на фрагменты, а затем полученные фрагменты встраивают в векторы. Для облегчения процедуры упорядочивания фрагменты должны быть достаточно крупными, поэтому для ферментативного расщепления используют такие рестриктазы, сайты которых встречаются в геноме относительно редко. Необходимо учитывать, что частота встречаемости той или иной последовательности в геноме зависит от GC-состава ДНК и от частоты повторяемости участков ДНК.

При создании геномной библиотеки фрагменты ДНК встраивают в ***векторы***, а

затем полученные ДНК-конструкции вводят в клетки. В таком виде фрагменты ДНК доступны для выделения, анализа и амплификации. Чем крупнее геном, тем большим количеством клонов представлена полная геномная библиотека. Для больших эукариотических геномов наиболее подходящими векторами являются космиды или дрожжевые/бактериальные искусственные хромосомы YAC/BAC (yeast/bacterial artificial chromosomes). В эти векторы можно встраивать фрагменты ДНК размером до 2 млн. п.н., однако для прямого секвенирования такие фрагменты слишком велики. Субклонирование осуществляют, используя векторы на основе генома фага λ, например, космиды, позволяющие встраивать фрагменты ДНК размером 30-45 тысяч п.н.

Картирование генома

Карта — это графическая схема, позволяющая вычислить, где вы располагаетесь и как добраться туда, куда вы хотите попасть. Карта генома, соответственно, — это графическая схема, которая помогает исследователям ориентироваться в геноме, искать в нем места, которые могут быть важны и интересны.

Карта генома может содержать различную информацию: расположение специфических генов или регуляторных сайтов, но она также содержит большие пробелы, потому что постоянно пересматривается в соответствии с новыми данными о геноме, которые получают ученые.

В простейшем виде карта генома представляет собой прямую линию, как и молекулы ДНК, которые составляют геном. По всей длине расположены различные ориентиры, помеченные буквами и цифрами, которые позволяют исследователям идентифицировать отдельные признаки.

Карта — не одно и то же, что и последовательность оснований генома. Расположение некоторых генов на карте можно вычислить без определения последовательности оснований. Фактически, карта помогает секвенировать геном, давая ключи к взаимному расположению специфических фрагментов ДНК в мозаике генома.

Кроме того, карта обеспечивает ценную информацию, которую не может предоставить секвенирование генома. Секвенс генома — это всего лишь последовательность из одних и тех же четырех букв в бесконечной отупляющей вариации. Даже ученый не сможет, взглянув на последовательность оснований ДНК, мгновенно вычислить ее функцию. Вставив последовательность оснований на правильное место карты, можно получить ключ к разгадке функции этой последовательности, если только она существует.

Классический метод картирования генома основан на наблюдении за наследованием сцепленных фенотипических признаков.

Вот один из способов использования учеными генетической карты. Предположим, что они хотят выяснить расположение определенного гена, вызывающего заболевание. Сначала обследуют несколько семей, страдающих этим заболеванием, чтобы узнать, с какими генетическими признаками связана болезнь. Гены любых признаков, имеющих тенденцию наследоваться вместе с предрасположенностью к болезни, с большой вероятностью могут быть локализованы на одной хромосоме рядом с генами, вызывающими болезнь. Они могут служить маркерами для искомого гена болезни.

Определив несколько маркеров с известным расположением па хромосоме, ученые могут с большой точностью, до нескольких миллионов пар оснований, установить расположение гена, вызывающего болезнь. Затем они могут сфокусировать усилия на части генома, несущей указанный ген, и искать ген, который имеет различную последовательность оснований у здоровых и больных люден, или ген, функции которого могут быть связаны с болезнью.

Именно так были идентифицированы гены, связанные с фиброзом мочевого пузыря и болезнью Гантингтона. Однако этот путь долог и трудоемок, поэтому целью генетиков остается разработка более детальных карт геномов. Использование таких карт позволит исследователям с точностью находить в геноме последовательности, которые им нужны.

Существует два типа генетических карт: карты генетического сцепления и физические карты.

Карты генетического сцепления показывают порядок расположения генов на хромосоме и относительные расстояния между ними. Это карты, аналогичные карте А.Х. Стюртеванта. Карта Стюртеванта была построена на генетических признаках, физически видимых у плодовых мушек, с которыми он работал. Сегодня гораздо более сложные карты сцепления генов строятся на определении наследования специфических последовательностей ДНК.

Физические карты показывают количество оснований ДНК между двумя генетическими метками. Они основаны на сайтах (точках), помеченных определенными последовательностями оснований (STS). STS — это специфические участки в ДНК размером 100 – 500 п.н., которые встречаются в геноме всего один раз. Они могут быть частью гена, но это не обязательно. Поскольку STS встречается только в одном месте генома, то как только она попадается во фрагменте ДНК при секвенировании, вы можете определить расположение фрагмента в геноме.

Новые геномные карты совмещают черты обоих типов карт. Карты, которые включают последовательности и расположение всех генов организма, построены для более 150 организмов. Однако большинство из них — вирусы с очень маленькими

геномами, что указывает на сложности, с которыми сталкиваются «картографы» геномных карт.

Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. Как правило, продукты расщепления ДНК анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или акриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных ферментов, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК. Большое разнообразие существующих эндонуклеаз рестрикции (ЭР) позволяет проводить расщепление ДНК по более чем 150 сайтам узнавания. Рестрикционный анализ проводится для самых различных ДНК, начиная от небольших фрагментов длиной несколько десятков нуклеотидных пар, и вплоть до целых геномов эукариот размерами более 1 млрд. пар оснований.

Секвенирование простых геномов

Для определения нуклеотидной последовательности (т. е. первичной структуры) конкретного района ДНК в первую очередь необходимо упростить ее, что достигается путем разрезания ее на относительно короткие фрагменты. Сделать это можно, например, с помощью специальных «скальпелей» для ДНК — ферментов рестриктаз.

При секвенировании простейших организмов, у которых геном относительно невелик, обычно используют процедуру, называемую условно «сверху вниз». Всю ДНК «разрезают» на кусочки с помощью уже упоминавшихся выше ферментов рестриктаз, затем секвенируют эти кусочки по отдельности, а после «склеивают» из них полный геном. «Склеивание» оригинала осуществляется за счет того, что нуклеотидные последовательности разных кусочков перекрываются друг с другом, т. е. одинаковы по концам. Эта методология получила название «дробовика». Суть данной процедуры отражена на рисунке.

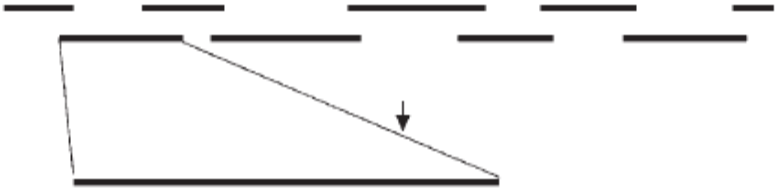
Геномная ДНК

Рестрикция и клонирование крупных фрагментов

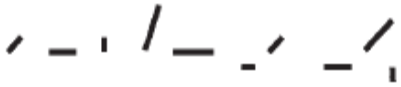
Геномная библиотека

Ранжирование рестрикционных фрагментов на основании их перекрывания

Контиг



Рестрикция и клонирование мелких фрагментов



Секвенирование

Последовательности фрагментов

.....ААТГГЦАЦЦГТААГГГГТЦЦГЦЦАТААЦЦГТТГЦ

ТАТТГГЦААЦГААТТААЦГГАЦГГАТ.....

Результирующая нуклеотидная последовательность

.....ААТГГЦАЦЦГТААГГГГТЦЦГЦЦАТААЦЦГТТГЦААТТААЦГГАЦГГАТ.....

ЗАНЯТИЕ № 3

ПРАВИЛА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОАНАЛОГОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Цель занятия: ознакомиться с принципами доказательства биоаналогичности.

Ознакомиться с общей схемой производственного процесса получения биоаналогов.

Ознакомится с правилами проведения исследований биоаналоговых препаратов.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Биоаналоги – это аналоги биофармацевтических лекарственных средств, с близкой, но не идентичной исходной молекулой. Термин «биоаналог» используется в странах ЕС, наряду с такими определениями, как «биосимиляр» и «биодженерик». В США их называют модифицированными биофармацевтическими препаратами (биопрепараты). На сегодняшний день рынок биоаналогов активно развивается и имеет очень хорошие перспективы роста. По данным специалистов фармацевтической отрасли, в ближайшие годы биопрепараты составят не менее 50% всех лекарственных средств.

Биофармацевтические препараты имеют трехмерную сложную пространственную высокомолекулярную белковую формулу, что затрудняет производство биоаналогов, полностью идентичных оригиналу. Однако технология их производства предусматривает многоуровневую систему исследований, которые подтверждают их безопасность и эффективность. В 2006 году компания Sandoz впервые в истории современной медицины получила разрешение и выпустила на рынок первый биоаналог – рекомбинированный гормон человеческого роста. Сейчас в портфеле компании 3 зарегистрированных препарата и около 10 молекул находится в разработке.

Дженерики	**Биоаналоги**
Характеристика: Состоят из сравнительно небольших молекул. Стабильны. Имеют четко установленную химическую формулу.	Характеристика: Состоят из больших и сложных по своему строению молекул. Стабильность достигается не всегда. Имеют трехмерную сложную пространственную высокомолекулярную белковую структуру.
Производство: Производятся путем химического синтеза.	Производство: Производятся методом биосинтеза с использованием живых клеток. Ввиду невозможности точного воспроизводства биоаналогов не могут быть полной копией оригинального препарата.
Разработка:	Разработка:

Дженерики	Биоаналоги
Проходят упрощенную процедуру клинических испытаний.	При регистрации биоаналогов обязательно проводится полный цикл доклинических и клинических испытаний.
Регистрация: Применяется упрощенная процедура регистрации в странах ЕС и США. Проверяются на взаимозаменяемость.	Регистрация: Процедура регистрации контролируется EMEA (Европейским агентством по лекарственным средствам) и BLA (Biologic Licensing Application). Проверяются на соответствие.
Распространение: Можно заменить оригинальным препаратом без ущерба для процесса лечения.	Распространение: Замена другими биофармацевтическими препаратами невозможна.

Определение биосимиляра дается в директиве Евросоюза 2003 года. Согласно ей, биосимиляр — это биотехнологическое лекарственное средство, схожее с произведенным впервые оригинальным лекарственным средством и представленное на регистрацию после истечения срока действия патента оригинального препарата.

В российском законодательстве понятие биосимиляра отсутствует, и подобные препараты регистрируются, согласно процедуре, аналогичной процедуре регистрации дженериков (воспроизведенных лекарственных средств). Однако за рубежом процесс регистрации биосимиляров в корне отличается от регистрации дженериков. Например, в Европе, чтобы вывести на рынок биосимиляр, необходимо провести клинические испытания, которые по объему и тщательности сопоставимы с испытаниями оригинального препарата.

Процесс производства биотехнологического препарата очень сложен. Для создания белка, который будет использован в качестве действующего вещества в биотехнологическом препарате, используется уникальная линия живых клеток. Процесс производства включает более 5000 критических этапов, а для контроля качества препарата используется более 2000 тестов. При производстве биосимиляра точно воспроизвести всю сложнейшую технологию производства действующего вещества, мягко говоря, очень сложно.

Процесс производства уникален, и отличия на каждом этапе могут влиять на эффективность и безопасность препарата. В каждом производственном процессе используют свою оригинальную комбинацию растворителей, ферментов, материалов для колонок, буферных растворов. В результате в полученном действующем веществе остаются индивидуальные «отпечатки» примесей. Практически невозможно создать два абсолютно идентичных банка клеток для производства препарата. Также на качество

конечного продукта может повлиять любое изменение условий культивирования клеток, методы очистки вещества и другие этапы производства. В итоге на выходе биосимиляр должен быть очень сходным с оригинальным препаратом.

Именно в связи с этими специфическими свойствами биотехнологических лекарственных препаратов в Евросоюзе на сегодняшний день детально проработано законодательство, регламентирующее допуск в сферу медицинского применения биотехнологических препаратов и их воспроизведенных копий — биосимиляров. Не все биосимиляры, которые предоставляются для регистрации в Евросоюзе, проходят этапы экспертизы до конца. Например, EMA в 2007 году отказало в регистрации трем биоаналогам инсулина, произведенным компанией Marvel, также было отказано в регистрации препарата «Интерферон альфа» компании Bio Partners.

К чему может привести изменения структуры действующего вещества в биотехнологических препаратах? Последствия могут быть очень серьезными — от снижения эффективности препарата до возникновения аллергических реакций. Например, в 2008 году было опубликовано исследование рекомбинантных эритропоэтинов, которое выявило, что некоторые биосимиляры этого препарата имели другую фармакокинетику, скорость выведения из организма, биологическую и терапевтическую активность и иммуногенность.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ (работа проводится в малых группах – 2-4 студента).

1) Используя материал лекции и дополнительные материалы (Интернет, научные статьи и т.п.), составьте общую блок-схему производственного процесса получения биоаналогового лекарственного препарата.
2) На примере терапевтического белка опишите критические показатели качества готового продукта.
3) Укажите основные характеристики биоаналога как лекарственного средства.
4) Опишите этапы доклинического исследования биоаналога.

ЗАДАНИЕ НА ДОМ: подготовить сообщения и презентации на темы: «Стволовые клетки и их использование в клеточной терапии», «Генетическая диагностика», «Современные биоматериалы и их получение».

ЗАНЯТИЕ № 4
БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ. БИОМАТЕРИАЛЫ.

Цель работы:

Ознакомиться с основными видами современных биомедицинских технологий.

Ознакомиться с современными биоматериалами, способами их получения и областью применения.

Темы для обсуждения.

1. Виды биомедицинских технологий.
2. Законодательство в области биомедицинских технологий.
3. Получение современных биоматериалов и их использование в медицине.
4. Биодеградация материалов.

Занятие проводится в виде «круглого стола» (см. Занятие № 1).

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Накопленный к настоящему времени научно-методический потенциал в сфере клеточной биологии, генетики и молекулярной биологии является основой для разработки современных, патогенетически и этиологически ориентированных методов и средств профилактики, диагностики и лечения широкого спектра заболеваний человека. В настоящее время в ряде зарубежных стран разработаны и проходят клинические испытания новые методы диагностики и лечения ряда тяжелых и социально значимых заболеваний, основанные на применении следующих биомедицинских технологий: терапия стволовыми клетками и клеточными продуктами (лечение аутоиммунных заболеваний, диабета 2 типа, инфаркта, травм спинного мозга); генетическая диагностика (определение предрасположенности, донозологическое тестирование, подбор лекарственной терапии); генная терапия (лечение иммунодефицитов, муковисцидоза, болезни Гоше, некоторых форм рака и СПИДа). Отмечается серьёзный прогресс в лечении болезни Паркинсона.

В Российской Федерации научно-исследовательскими организациями Минздрава России, РАМН, РАН и ФМБА России проводятся исследования по разработке методов клеточной и генной терапии при лечении некоторых онкологических заболеваний (лимфом, миелом, лейкемии), аутоимунных заболеваний (множественного склероза, волчанки, ревматоидного артрита, склеродермита, болезни Крона), серповидно-клеточной анемии, иммунодефицитных состояний, повреждений роговицы, инсульта, инфаркта,

болезни Паркинсона, язвы желудка и 12-ти перстной кишки, травм спинного мозга, терапии печеночной недостаточности. Разработана технология лечения радиационных поражений кожи с применением мезенхимальных стволовых клеток. Кроме того, в отечественную практику здравоохранения активно внедряется методический арсенал персонифицированной медицины, основанный на подборе индивидуальных норм и способов лечения с учетом генетического профиля пациента. Это предполагает персональное планирование здоровья, индивидуальный выбор методов профилактики, обнаружения и лечения заболеваний, а также выявление индивидуальной подверженности профессиональным и средовым факторам риска. Отдельным направлением персонифицированной медицины является фармакогеномика — клиническая и научная дисциплина, изучающая индивидуальную генетическую предрасположенность для выбора оптимальной лекарственной терапии.

В отличие от зарубежных стран, в нашей стране разработка и внедрение биомедицинских технологий в значительной мере сдерживается в связи с отсутствием нормативной базы. В настоящее время порядок разработки и применения биомедицинских технологий косвенно регулируется:

- Приказом Минздрава РФ «Об организации выдачи разрешений на применение медицинских технологий»
- Приказом Минздрава РФ «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации»
- Временной инструкцией о порядке исследований в области клеточных технологий и их использования в учреждениях здравоохранения
- Указанием МЗ РФ «О признании утратившими силу документов о клеточных препаратах»
- Приказом МЗ РФ «О создании Экспертного Совета по рассмотрению научных исследований в области развития клеточных технологий и внедрению их в практическое здравоохранение»
- Законом РФ «О временном запрете на клонирование человека»
- Кодексом врачебной этики
- Этическим кодексом Российского врача
- Приказом МЗ РФ № 301 от 28 декабря 1993 г., разрешающим практику искусственной фертилизации
- Законом РФ «О трансплантации органов и (или) тканей человека»

В настоящее время Минздравсоцразвития России разрабатывает федеральный закон «О применении биомедицинских технологий в медицинской практике», который вызвал

диссонанс мнений медицинской общественности.

Виды биомедицинских технологий

- Клеточная терапия — биомедицинская технология, основанная на использовании стволовых клеток или их продуктов.
- Генетическая диагностика — биомедицинская технология, позволяющая определить наличие наследственных заболеваний, вероятность их носительства; осуществлять предиктивную диагностику и определять предрасположенность к некоторым заболеваниям; осуществлять генетически обоснованный выбор средств лекарственной терапии
- Генная терапия — биомедицинская технология, использующая методы генной инженерии в медицинской практике
- Биоинформатика — биомедицинская технология, позволяющая изучать биологические процессы *in silico*
- Биоинженерия — биомедицинская технология, направленная изменение, усовершенствование и создание новых биообъектов в целях медицинского применения.

Биоматериалы

Биоматериалы – синтетические или природные материалы, которые либо используются для замены отдельных частей живых организмов, либо предназначены для функционирования в тесном контакте с тканями живых организмов.

К биоматериалам можно отнести эндопротезы в травматологии и ортопедии, пломбировочные материалы в стоматологии, имплантаты в челюстно-лицевой хирургии, медико-косметические средства и слуховые аппараты.

Биоматериалы должны обладать совместимостью с тканями организма и не причинять им вред. Наш организм наделен особым механизмом самозащиты: посторонние предметы или живые тела, попавшие в тело, воспринимаются как угроза, и организм сразу старается нейтрализовать их или избавиться от них с разными способами. Поэтому любой вставленный в тело материал оценивается как угроза и незамедлительно отторгается. Биосовместимость – это отсутствие реакций со стороны иммунной системы, приводящее к отторжению помещенного в тело материала. Иными словами, биосовместимость предполагает беспрепятственную работу биоматериала. Если в тело вставляется биоматериал, со временем может возникнуть множество разных реакций: взаимодействие биоматериала и белков в тканях, реакция иммунной системы, рост числа лейкоцитов, прилипание друг к другу кровяных пластинок и возникновение опухоли. Такие реакции серьезно влияют на работу биоматериалов в теле человека.

Высокая степень устойчивости к коррозии является одним из требований к биоматериалу: отсутствие коррозии означает отсутствие нежелательных химических реакций металла с тканями и межтканевыми жидкостями. В результате этих реакций металл делится на оксиды, гидроксиды и другие химические соединения. Тканевая жидкость в теле человека с содержащимися в ней водой, растворенным кислородом, белками и многими ионами являет собой благоприятную среду для коррозии. Поэтому коррозионная стойкость биоматериала очень важна. Например, в первых протезах для тела человека использовался виталлиум – сплав на основе кобальта. Но исследования показали, что его коррозионная стойкость весьма низка, что ставит под угрозу здоровье человека. Вместо него стали использовать другие материалы, например, нержавеющую сталь и титановые сплавы.

Биоматериалы также должны обладать механическими свойствами, схожими со свойствами заменяемого ими органа или конечности. Например, протез, который будет вставлен вместо кости, должен обладать со схожими с костью свойствами. Костная ткань является сложным природным композитом из мягкого и твердого костных коллагенов (белковые вещества в составе волокон соединительной ткани), белков и хрупкого апатита (минерала класса фосфатов). Кость также является анизотропным материалом – материалом, отличающимся неодинаковыми (механическими, оптическими, магнитными и др.) свойствами по различным направлениям.

Благодаря своим превосходным механическим и химическим свойствам металлы и сплавы используются в качестве биоматериала во многих областях жизнедеятельности человека. В частности, они широко применяются в зубных и ортопедических протезах, мышечной и скелетной системах, и сердечных клапанах. Из применяемых в зубных пломбах, мостиках и протезах биоматериалов можно выделить нержавеющую сталь, кобальтовые и хромовые сплавы, зубные амальгамы и популярные в последнее время титановые сплавы. По сравнению с другими биоматериалами в последнее время титан стал более предпочитаемым биоматериалом из-за своей легкости, отсутствия кислотных реакций с тканями и биосовместимости.

Другим примером металлического биоматериала является сплав никеля с титаном, обладающий «эффектом памяти», а также высокой коррозионной и эрозионной стойкостью. Этот сплав (нитинол) обладает свойством «помнить свое прошлое», а точнее, принимать после деформации и соответствующей обработки свою прежнюю форму. Этот «умный» материал применяется в производстве оправ для очков и некоторых автомобильных запчастей. А в медицине он широко применяется, в частности, в лечении сердечнососудистых заболеваний и производстве зубных брекетов. Также он используется

в производстве сейсмологических амортизаторов. Термин «сплав с памятью формы» используется для металлических материалов, обладающих способностью принять заранее заданную форму при нужной термической обработке. Стент (проволочный цилиндрический каркас или пористая трубочка), который вводится в кровеносные сосуды для устранения сужения, является биоматериалом с памятью формы. После вставления в проток в виде трубки он под действием температуры тела принимает форму сосуда, чем помогает устранить сужение в сосуде.

Биокерамика является другим видом биоматериала. Сегодня она широко применяется в качестве протеза поврежденного или изношенного органа в таких областях медицины, как стоматология, ортопедия и челюстно-лицевая хирургия. В качестве примеров биокерамики можно назвать оксидную керамику, биокерамику на основе фосфатов кальция, стекло и стеклокерамику. Биокерамика широко применяется особенно при лечении таких болезней, как остеопороз у пожилых людей. Биостеклянные протезы также применяются вместо костей среднего уха у больных с проблемами слуха.

Сегодня биоматериалы на основе природных или синтетических полимеров активно применяют во многих областях. Например, в фармацевтике, генной инженерии, производстве диализных препаратов, хирургических шовных нитей, искусственных кровеносных сосудов, пакетов крови и протезов. Ибо их легко изготовить, они дешевы, и им легко придать нужную форму. Поэтому они предпочтительнее металла и керамики.

Ученые продолжают трудиться над разработкой новых видов биоматериалов. Ширится также и спектр их применения. В будущем ученые надеются разработать такой биоматериал, который будет восстанавливать все ткани, которые утратили способность выполнять свои функции. При этом они полагаются на функцию самообновления нашего организма. Но каким бы головокружительным не был технологический прогресс, все-таки биоматериалы не в состоянии заменить или выполнять все функции заменяемого ими органа или ткани.

Множество биологических молекул можно использовать в качестве лекарственных препаратов или средств их доставки к биологическим мишеням – определенным молекулам в составе клеток или их оболочек. В силу своей совместимости с тканями человека и способности распадаться после выполнения своих функций биологические молекулы обладают существенным преимуществом перед разработанными в добиотехнологическую эру медицинскими материалами и средствами доставки препаратов.

Например, гиалуронат – полисахарид, синтезируемый рядом организмов и представляющий собой эластичные водорастворимые молекулы, используется для

предотвращения формирования послеоперационных шрамов при удалении катаракты, облегчения боли и улучшения подвижности суставов пациентов с остеоартритом, предотвращения агрегации тромбоцитов на поверхностях таких медицинских приспособлений, как катетеры и стенты (устройства для восстановления просвета в полых органах). Гель из коллагена и эластина – белков, составляющих основу внеклеточного матрикса, обеспечивающего взаимодействие клеток, используется для ускорения заживления ожогов. Марлеподобные лоскуты, сплетенные из длинных волокон фибриногена – белка, запускающего процесс свертывания крови, – могут использоваться для остановки кровотечений в экстренных ситуациях. Адгезивные белки, синтезируемые живыми организмами, могут заменить хирургические нити и скобы, используемые для наложения швов. Они быстро и прочно склеивают живые ткани, а со временем адсорбируются и рассасываются.

Биотехнология позволяет усилить естественную способность организма к самовосстановлению. Человеческое тело обладает большим набором инструментов для содержания организма в порядке. В этот набор входят многочисленные белки и различные популяции стволовых клеток, способные излечивать заболевания, восстанавливать повреждения и обновлять изнашивающиеся со временем фрагменты организма.

Тканевая инженерия сочетает в себе достижения клеточной биологии и материаловедения и тем самым позволяет создавать в лабораторных условиях полусинтетические ткани и органы. Такие ткани состоят из биосовместимого каркаса, который в организме постепенно разлагается и адсорбируется, и живых клеток, выращенных с помощью методов культивирования клеточных культур. Конечной целью этого направления науки является возможность выращивания полноценных органов, состоящих из разных типов клеток и способных заменить органы, поврежденные в результате болезни или травмы.

В наиболее простых подходах тканевой инженерии для изготовления каркасов используются биологические материалы, такие как коллаген. Например, при изготовлении двухслойного кожного трансплантата коллагеновый гель инфильтрируется клетками соединительной ткани, после чего создается защитный поверхностный слой, состоящий из более устойчивых к внешним воздействиям клеток. Другие методы заключаются в создании жесткого каркаса из синтетического полимера, придании ему необходимой формы и последующей имплантации. Возможен также синтез полимеров из натуральных соединений. Такие полимеры обеспечивают создание более гибких каркасов, подходящих для создания кровеносных сосудов и полых органов. После имплантации такого каркаса в организм происходит его заселение клетками окружающих тканей. Другие варианты

терапии подразумевают заселение каркаса выращенными в лабораторных условиях клетками перед проведением процедуры имплантации.

Первыми в лабораторных условиях были созданы простые ткани, такие как кожа и хрящ. Недавно ученым удалось создать биогибридную почку, которая способна поддержать жизнедеятельность пациента, страдающего острой почечной недостаточностью, в течение времени, требующегося для восстановления пораженной почки. У группы пациентов, вероятность выживания которых при лечении традиционными методами оценивалась в 10-20%, полностью восстановились функции почек и они покинули больницу в весьма удовлетворительном состоянии благодаря тому, что трансплантация биогибридных почек предотвратила развитие симптомов, характерных для острой почечной недостаточности: инфицирования, сепсиса, нарушения работы других органов. Гибридная почка состоит из полых трубочек, засевающихся почечными стволовыми клетками, которые пролиферируют до тех пор, пока полностью не покроют внутреннюю поверхность трубочек. Впоследствии эти клетки дифференцируются в клетки почек, способные синтезировать ряд гормонов и участвующие в фильтрации крови. Кроме выполнения непосредственных метаболических функций почки, гибридная почка способна адекватно реагировать на сигналы, посылаемые другими органами и тканями организма.

В человеческом организме синтезируется целый набор небольших белков, получивших название факторов роста. Эти белки стимулируют рост и деление клеток, а также, в некоторых случаях, управляют их дифференцировкой. Эти естественные белки, управляющие регенерацией тканей, могут использоваться при лечении ран, восстановлении поврежденной ткани, а также в тканевой инженерии, описанной выше. Белковая природа этих веществ дает возможность их крупномасштабного производства с помощью трансгенных микроорганизмов, растений или животных и последующего использования в качестве терапевтических агентов.

К наиболее важным факторам роста относятся:
– **факторы роста эпидермиса**, которые стимулируют деление клеток кожи и могут использоваться для ускорения заживления ран;

– **эритропоэтин**, способствующий продукции эритроцитов и известный как один из первых биотехнологических продуктов;

– **фактор роста фибробластов**, стимулирующий рост клеток и использующийся при лечении ожогов и язв, а также для стимуляции роста новых кровеносных сосудов у пациентов с блокадой коронарных артерий;

– **трансформирующий фактор роста-бета**, помогающий эмбриональным клеткам

дифференцироваться в различные ткани и запускающий рост новых тканей во взрослом организме;

– **фактор роста нервов**, способствующий росту нервных клеток и являющийся потенциальным терапевтическим агентом для лечения пациентов с повреждениями головного и спинного мозга, а также дегенеративными заболеваниями нервной системы, например, болезнью Альцгеймера.

Процесс разложения нежизнеспособных материалов при контакте с живыми тканями, клетками и биологическими (телесными) жидкостями получил название ***биодеградация.***

Биодеградация свойств биоматериала в конечном счете приводит к снижению его биомеханических характеристик. Разрушение полимерных материалов и гидроксиапатита (ГА) происходит за счет растворения, биодеградации с участием клеток, метаболитов и специфических ферментов (протеазы, гидролазы, эластазы, коллагеназы и др.). Кроме того, существенный вклад в этот процесс принадлежит реакциям окисления и восстановления, которые дезинтегрируют ковалентные связи, образуя свободные радикалы, принимающие участие во вторичных реакциях. Для полимеров, содержащих в своем составе гетероатомы, связанные эфирными или амидными связями, деградация идет за счет деполимеризации свободными радикалами и изменением поликонденсации. Следует подчеркнуть, что восприимчивость к разрушению характерна для всех полимеров, содержащих восприимчивые к гидролизу нестабильные группы. В отношении полиэтилена со сверхвысоким молекулярным весом, используемого в эндопротезах, деградация возникает в процессе плавления или под действием кислорода в сочетании с механическими и тепловыми силами. Возникающие при этом радикалы снижают порог для наступления его биодеградации.

В некоторых случаях деградация бывает необходима, в частности, для высвобождения из материала лекарственных, антимикробных и иных средств. Возможно, что этот принцип можно использовать и для некоторых типов ГА покрытий для нужд травматологии и ортопедии. Вероятно, локальное высвобождение кальция и фосфора, антимикробных средств и стимуляторов роста ткани будет способствовать пополнению запасов вышеуказанных веществ при их дефиците, создающемся, например, при сложных переломах длинных трубчатых костей. Кроме того, кристаллы ГА могут играть роль активной матрицы для конденсации необходимых ростовых факторов и костных клеток.

ЗАНЯТИЯ № 5-6
НОВЫЕ ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА И КОНТРОЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИИ

Занятие № 5. «Полимеразная цепная реакция (ПЦР)»

Темы для обсуждения.

1. Общая схема ПЦР, параметры реакции.
2. Температурные циклы ПЦР, компоненты реакции.
3. Принцип подбора праймеров.

Практическое занятие проводится в лаборатории клеточных технологий (кафедра технологии рекомбинантных белков) ЗАО «Биокад».

Занятие № 6. «Биосенсоры и биомаркеры»

Темы для обсуждения.

1. Экспресс-методы определения различных веществ в биологических жидкостях.
2. Экспресс-диагностика онкологических и инфекционных заболеваний.
3. ДНК-анализ.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

ПЦР: метод и его практическое применение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) представляет собой метод ферментативной наработки in vitro определенных, сравнительно коротких, двуцепочечных фрагментов ДНК. В основе реакции лежит механизм, который в природе реализован при внутриклеточном удвоении (репликации) молекул ДНК ферментом ДНК-полимеразой.

Для протекания этой реакции необходимы следующие ключевые компоненты:

- исходная молекула ДНК (матрица для репликации);
- фермент ДНК-зависимая-ДНК-полимераза;
- дезоксирибонуклеотидтрифосфаты;
- короткие одноцепочечные ДНК-затравки (праймеры), комплементарные матричной ДНК.

ПЦР осуществляется в 3 стадии:

1. При 94 ^{0}С цепи ДНК расходятся (ДНК денатурирует).
2. При понижении температуры до 40-60 ^{0}С праймеры присоединяются к комплементарным им участкам ДНК-матрицы (отжиг праймеров).

3. При повышении температуры до 72 ^{0}C происходит синтез новых цепей ДНК (достраивание праймеров).

При последующем повышении температуры до 94 ^{0}C новосинтезированные и матричные цепи ДНК снова расходятся, и при охлаждении каждый фрагмент служит новой матрицей для синтеза. В автоматическом режиме каждый такой цикл повторяется 25-40 раз и за несколько часов количество исходной ДНК достигает $2^{25\text{-}40}$ копий. Повторение циклов ПЦР возможно только в том случае, если используемая ДНК-полимераза сохраняет стабильность при повышенных температурах. Поэтому ферменты для ПЦР получают из клеток термофильных бактерий: Thermus aquaticus, Pyrococcus furiosus и Thermotoga maritime (Taq-, Pfu- и Tma-полимеразы соответственно). Вероятность ошибочного включения нуклеотида (частота мутаций на пару нуклеотидов на цикл удвоения) у Taq-полимеразы составляет примерно $8 \cdot 10^{-6}$. Другие названные полимеразы осуществляют более точный синтез ДНК, так как в отличие от Taq-полимеразы проводят дополнительный контроль правильности синтеза. Молекулярную массу и количество продуктов ПЦР проводят методом гель-электрофореза по завершении амплификации («по конечной точке») или непосредственно в ходе реакции по увеличению количества метки («в реальном времени») (на приборе Light-cycler).

С помощью ПЦР можно быстро клонировать и секвенировать выбранные фрагменты ДНК. ПЦР успешно применяется в судебной медицине, археологии и палеонтологии. В клинической диагностике метод ПЦР также находит широкое применение: для многих инфекционных болезней, а также большого числа наследственных патологий уже выявлена связь между последовательностью нуклеотидов в ДНК и наблюдаемой клинической картиной. Обнаружение материала трансгенных растений и выявление возбудителей инфекционных заболеваний – примеры использования ПЦР в анализе пищевых продуктов и экологическом мониторинге.

Если известна консервативная последовательность аминокислот, характерная для определенного семейства белков, то используя соответствующие праймеры, можно осуществлять поиск новых членов этого семейства (обратная генетика).

ПЦР можно применять для внесения в ген мутаций: для этого используют праймер, не полностью комплементарный матрице, или искусственно увеличивают вероятность ошибочного включения нуклеотидов в ходе реакции.

Матрицей в ПЦР может служить не только ДНК, но и РНК: обратная транскриптаза синтезирует копию РНК – кДНК, которая амплифицируется по стандартной схеме. Этот метод называется ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) и часто применяется при определении количественного соотношения между различными мРНК, а также для

обнаружения РНК-содержащих вирусов, например, вируса ВИЧ.

Метод ПЦР позволяет применить амплификацию ДНК при решении многих молекулярно-генетических задач:

- Введение в ДНК функциональных элементов (сайты узнавания рестриктаз, стоп- или старт-кодоны, tag-последовательности).
- Копирование и амплификация РНК (ОТ-ПЦР).
- Соединение двух фрагментов ДНК.
- Встраивание новых участков в последовательность ДНК.
- Удаление фрагментов ДНК из генов.
- Сайт-направленный мутагенез

Биосенсоры

Под термином "биосенсор" следует понимать устройство, в котором чувствительный слой, содержащий биологический материал: ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены / антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК, непосредственно реагирующий на присутствие определяемого компонента, генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Конструктивно биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей, или трансдьюсеров, - биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. Биохимический преобразователь, или биотрансдьюсер, выполняет функцию биологического элемента распознавания, преобразуя определяемый компонент, а точнее, информацию о химических связях в физическое или химическое свойство или сигнал, а физический преобразователь это свойство фиксирует с помощью специальной аппаратуры. В данном случае реализуется принципиально новый способ получения информации о химическом составе раствора. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким дополнительным операциям, связанным с использованием других реагентов, концентрированием и т. д. (отсюда и название - безреагентные методы анализа).

Существует большое разнообразие физических трансдьюсеров: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические, трансдьюсеры на поверхностных акустических волнах и т.п. В настоящее время наибольшее распространение получили электрохимические преобразователи. Одни из них генерируют потенциал на специальном электроде, на поверхность которого нанесен слой биоматериала, другие генерируют электрический ток реакции продукта превращения

определяемого вещества на поверхности электрода, вызванного биоматериалом. Другими словами, существуют потенцио- и амперометрические биосенсоры. Если физический преобразователь использует изменение светопоглощения в области биослоя, то такой биосенсор называется, например, оптоволоконным, поскольку измеряемый сигнал будет передаваться измерительному прибору по оптическому волокну. Соответствующий физический преобразователь по аналогии с электродом называют оптродом. По названию преобразователя можно сделать вывод о характере физического свойства, которое измеряется аппаратно, причем, как правило, при таком измерении используется микропроцессорная техника, позволяющая сделать устройство достаточно компактным.

Первое упоминание об аналитических устройствах на основе ферментов или ферментсодержащих материалов появилось сравнительно недавно, в 60-х годах 20-го столетия. Затем в обиход вошло понятие ***"биосенсор"*** или "биочип". Функционально, таким образом, биосенсоры сопоставлены с датчиками живого организма - биорецепторами, способными преобразовывать все типы сигналов, поступающих из окружающей среды, в электрические.

Принцип работы биосенсора достаточно прост. Определяемое вещество диффундирует через полупроницаемую мембрану в тонкий слой биокатализатора, в котором и протекает ферментативная реакция. Поскольку в данном случае продукт ферментативной реакции определяется с помощью электрода, на поверхности которого закреплен фермент, то такое устройство еще называют ферментным электродом. Таким образом, определения "биосенсор" и "ферментный электрод" в данном случае синонимы.

Следует отметить, что характер ферментативной реакции зависит от природы фермента, типа его каталитического действия. Среди ферментов можно выделить оксидоредуктазы, осуществляющие реакции окисления и восстановления, гидролазы, катализирующие гидролиз, трансферазы, вызывающие перенос ацильных, гликозидных и т.п. остатков и т.д. Многие ферменты сейчас доступны, их чистые препараты включены в каталоги ряда фирм-производителей. Важно отметить, что при конструировании биосенсора увеличение продолжительности действия фермента становится основной задачей. Дело в том, что нативный фермент сохраняет свои свойства лишь в течение относительно короткого времени. Поэтому была разработана операция так называемой иммобилизации фермента. В ходе иммобилизации с помощью специальных реагентов фермент "закрепляют" либо на поверхности адсорбентов, например силикагеля, угля или целлюлозы, либо вводят в пленку пористого полимера, либо ковалентно, то есть с помощью химических связей, "пришивают" к какой-либо подложке. При этом фермент закрепляется, перестает быть подвижным, не вымывается из биослоя, а его

каталитическое действие сохраняется. Как видно, при иммобилизации ферментов используют разнообразные способы их закрепления, в том числе и комбинированные. Биосенсоры могут быть сконструированы и по так называемой объемной технологии, при которой индивидуальные компоненты, составляют как бы единый физический ансамбль. Хотя такие биосенсоры в настоящее время и применяются на практике, они имеют недостатки, есть трудности и при их изготовлении.

Успехи в области развития средств микроэлектроники подтолкнули разработчиков конструкций биосенсоров к новым решениям. Оказалось перспективным использовать так называемую планарную технологию (фотолитографию, полупроводниковую технику покрытий и т. д.), по которой можно изготовить так называемый ***биочип***, объединяющий сенсорную систему, трансдьюсер, аналого-цифровой преобразователь и микропроцессор для измерения аналитического сигнала и расчета результатов анализа. Хотя такие биочипы могут тиражироваться, основной проблемой в данном случае будет являться воспроизводимость состояния, то есть микроструктуры поверхности с нанесенным слоем биологически активного фермента. Трудной задачей представляется в данном случае и оптимизация такой структуры в отличие от объемной технологии, реализованной присутствием в конструкции сенсорной части нескольких молекулярных слоев. Тем не менее "молекулярный дизайн" при конструировании биосенсоров будущего может составить реальную конкуренцию объемному их варианту.

Многие ферменты дороги и быстро теряют свою активность, использование выполненных на их основе биосенсоров не может быть экономически целесообразным. Поэтому применение бактерий, микроорганизмов и биологических тканей различного происхождения более предпочтительно, поскольку в данном случае отпадает необходимость в предварительном получении и очистке ферментов. К существенным недостаткам таких биосенсоров можно отнести низкую селективность определения вследствие того, что клетки живых организмов фактически являются источником самых разнообразных ферментов. Помимо этого время отклика биосенсоров на основе тканей и микроорганизмов может быть достаточно большим, что также уменьшает их практическую ценность. Тем не менее в последнее время наблюдается повышенный интерес к разработке конструкций электродов, содержащих не сами ферменты в очищенном виде, а их первозданные источники - биологические материалы. Так, было установлено, что тканевые срезы в биосенсорах могут выполнять функцию источников каталитической активности. Например, создан биосенсор на аскорбиновую кислоту, состоящий из платинового электрода и пластины кожуры огурца или тыквы, служащей источником аскорбиноксидазы. Активность фермента в такой природной матрице

достаточна для проведения 50-80 определений аскорбиновой кислоты в различных объектах. Установлено, что пластины биоматериала могут храниться без потери активности в течение года в 50%-ном глицерине.

Интерес представляют биосенсоры на основе иммобилизованных на мембране микроорганизмов, служащих элементом так называемого микробного сенсора. В качестве примера таких устройств можно упомянуть амперометрический сенсор на аммиак (в сточных водах) на основе иммобилизованных нитрифицирующих бактерий и кислородного электрода. Такой биосенсор полезен при решении вопросов охраны окружающей среды, и в частности при контроле степени очистки промышленных стоков.

Можно отметить также использование биосенсоров на основе гидролаз - ферментов, являющихся катализаторами гидролитического расщепления субстратов. Эти биосенсоры предназначаются, как правило, для эколого-аналитического контроля остаточных количеств пестицидов класса фосфорорганических соединений, а также для определения некоторых ОВ. Если при гидролизе какого-либо субстрата ферментом класса гидролаз образуется электрохимически активное соединение, то, контролируя содержание последнего, можно контролировать ферментативную реакцию так же, как в предыдущих случаях. Однако в присутствии веществ, являющихся ингибиторами, активность фермента уменьшается, что и обнаруживается по сигналу, регистрируемому электродом. Интересно отметить высокую чувствительность такого определения: эффект изменения активности фермента доступен для измерения уже при действии ультраследовых количеств ингибитора - на уровне пико- и фемтограмм.

В настоящее время биосенсоры находят самое широкое применение в медицине. Ферменты все больше используются для рутинного автоматизированного анализа содержания метаболитов, лекарств и гормонов в биологических жидкостях человека. Это особенно необходимо для клинической диагностики. Благодаря использованию биосенсоров снижается риск ошибок при постановке диагноза, а также уменьшаются затраты, поскольку биосенсоры широко распространены и доступны. Диагностика с помощью биосенсоров позволяет врачам-терапевтам проводить анализы непосредственно в их кабинетах, не прибегая к услугам лабораторий. При этом экономятся деньги, и пациентам не нужно повторно приходить к врачу за диагнозом. Кроме того, можно быстрее начать лечение. Еще одно преимущество состоит в том, что труднее перепутать, потерять или загрязнить пробу. Это особенно важно при анализах на содержание допинга у спортсменов. Полицейские и врачи уже используют специальные наборы для выявления небольших количеств наркотиков в крови людей. Т.к. многие ферментативные реакции сопровождаются выделением тепла то для их определения также можно воспользоваться

биосенсорами. Термобиосенсоры регистрируют изменения температуры в 0,0001 °С. Их можно использовать для обнаружения молочной кислоты.

Белковые и ДНК-чипы

ДНК-чипы (ДНК-зонды) позволяют одновременно анализировать результаты гибридизации большого числа проб. ДНК-чипы используют в следующих целях:

- исследование процессов регуляции генов в различных типах клеток (функциональная генетика);
- секвенирование ДНК;
- быстрое определение полиморфизмов.

В настоящее время существуют коммерческие «генные фильтры» из нейлона или нитроцеллюлозы, на которые нанесена кДНК фрагментов генома дрожжей, мыши, человека или других организмов.

Метод основан на том, что с помощью фотолитографии на небольшой поверхности размещают огромное число олигонуклеотидов (например, все 65536 вариантов восьминуклеотидных фрагментов или все десятинуклеотидные фрагменты для исследования известной последовательности гена).

В обычном ДНК-микрочипе зонды ковалентно прикрепляются к твёрдой поверхности — стеклянному или кремниевому чипу. Другие платформы используют микроскопические шарики вместо больших твёрдых поверхностей.

Вместо ДНК на микрочипы можно наносить изучаемые белки. В настоящее время ведутся попытки использовать рекомбинантные антитела или аптамеры при анализе протеомов.

Вопросы по теме.

1. Что такое ПЦР? Изложите принцип проведения реакции.
2. Какое оборудование и реактивы необходимы для проведения ПЦР?
3. В чем преимущества ПЦР перед другими методами диагностики заболеваний?
4. В каких областях (кроме медицины) используется ПЦР-анализ?

ЗАДАНИЕ НА ДОМ: подготовка в занятию «Этические проблемы и потенциальные риски в биотехнологии. Государственный контроль и регулирование генно-инженерной деятельности и использования генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов».

Выполнение самостоятельной работы:

Цель: изучить по этикеткам состав пищевых продуктов, купленных в магазине, наличие в них ГМ сырья, определить по таблицам их пищевую ценность, влияние

содержащихся в продуктах веществ на здоровье человека.

Оборудование: собранные упаковки продуктов питания (5-10 этикеток), таблицы «Состав пищевых продуктов и их калорийность», «Перечень химических обозначений пищевых добавок».

Ход работы:

1. выберите 1-2 продукта из групп пищевых продуктов (молочные продукты, кондитерские изделия, хлебо-булочные продукты, безалкогольные напитки и др.)
2. соберите 5-10 упаковок от пищевых продуктов, снимите торговые этикетки, наклейте их на альбомный лист бумаги.
3. Рассмотрите, изучите и проанализируйте торговые этикетки, выявите состав продуктов: питательные вещества (белки, жиры, углеводы), минеральные соли, витамины, наличие пищевых добавок (красителей, консервантов, антиокислителей, загустителей, эмульгаторов, усилителей вкуса). Обратите внимание на указание в этикетках о наличии в продуктах ГМ сырья.
4. Используйте табличные данные при оценке выбранных продуктов питания (табл. «Состав пищевых продуктов и их калорийность», «Перечень химических обозначений пищевых добавок»).
5. Оформите результаты исследований в виде таблицы:

Состав продуктов питания, их пищевая ценность,
воздействие на организм пищевых добавок

Название продукта	**Питательные и минеральные вещ-ва, витамины**	**Пищевые добавки**	**Наличие сведений о ГМ сырье**	**Калорийность пищевых продуктов**	**Воздействие добавок на организм**

6. Ответьте на вопросы:

1. Почему не все этикетки на продуктах питания содержат полный перечень ингредиентов?
2. Каково влияние пищевых добавок на здоровье человека?
3. Как вы относитесь к тому, что не все этикетки содержат информацию о наличии ГМ сырья?
4. Какой процент продуктов питания по вашим подсчетам содержит информацию о наличии ГМ сырья?

ЗАНЯТИЕ № 7

ЭТИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РИСКИ В БИОТЕХНОЛОГИИ. ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОНТРОЛЬ И РЕГУЛИРОВАНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОРГАНИЗМОВ (ГМО) И ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НИХ ПРОДУКТОВ.

Цель занятия:

Ознакомиться с производством генномодифицированных продуктов из трансгенных растений и животных; ознакомиться с проблемами биобезопасности в биотехнологии.

Ознакомиться с критериями, показателями и методами оценки биобезопасности генетически модифицированных организмов (ГМО) и получаемых из них продуктов.

Ознакомиться с основными документами по биобезопасности и биоэтике.

Темы для обсуждения.

1. Генномодифицированные растения и продукты питания.
2. Взгляд оптимиста на использование ГМО в пищевой промышленности.
3. Взгляд пессимиста на использование ГМО в пищевой промышленности.
4. Стандартизация продуктов питания на содержание веществ из трансгенных растений.
5. Картахенский протокол по биобезопасности.

Занятие проводится в формате **групповой дискуссии.** Проходит совместное обсуждение всеми студентами актуальных вопросов изучаемой темы. Студенты выступают с заранее подготовленными сообщениями, затем все участники обсуждают эти сообщения. Все студенты в ходе занятия обладают равными статусом и правами. Преподаватель – модератор, он контролирует и направляет ход обсуждения. Каждый студент высказывает свою точку зрения по теме дискуссии, затем происходит обсуждение мнений участников, неясных или спорных моментов.

КРАТКИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СВЕДЕНИЯ

Организация Объединенных Наций (ООН) объявила нынешнее столетие веком биотехнологии. Это связано с тем, что в последнее время появились выдающиеся достижения в области молекулярной биологии и генетической инженерии, которые во всем мире приобрели приоритетное значение. В связи с развитием генно-инженерной

деятельности появились новые пути решения таких глобальных проблем человечества, как лечение болезней, борьба с голодом, защита окружающей среды. С помощью методов генетической инженерии созданы новые типы высокопродуктивных сортов растений и пород животных, устойчивые к болезням, вирусам, вредителям, неблагоприятным факторам среды, в наследственную структуру которых введены высокоэффективные гены от других видов. Также организовано массовое производство биологически активных и лекарственных препаратов, разрабатываются методы генной терапии наследственных болезней. Однако развитие генной инжененрии в последние десятилетия, кроме прогресса в ряде случаев связано с риском негативного влияния на здоровье человека и окружающую среду. Это обуславливает довольно неоднозначное восприятие процесса расширения сфер использования продукции с генно-модифицироваными составляющими как специалистами различных отраслей науки и производства, представителями управленческих государственных структур, так и широкими слоями населения. Негативное отношение части общественности к достижениям генной инженерии связаны прежде всего с отсутствием научно обоснованных гарантий безопасности генно-модифицированных организмов.

Представляется, что одним из механизмов с помощью которых можно снизить возможные негативные последствия генно-инженерной деятельности, предупредить нарушение прав граждан (права на жизнь, права на охрану здоровья, права на экологическую информацию) является надлежащее правовое регулирование отношений в сфере генно-инженерной деятельности. Именно правовые нормы могут стать тем фактором, которые с одной стороны стимулируют дальнейшее развитие данного направления, с другой стороны – помогают минимизировать возможные неблагоприятные последствия использования генно-инженерных организмов на человека и окружающую среду в целом.

Начало дискуссии по проблеме биобезопасности в науке и обществе положили основатели нового направления биоинженерии. В 1974 году 11 ведущих молекулярных биологов мира во главе с отцом генной инженерии американцем П. Бергом, создавшим первую рекомбинантную молекулу ДНК, обратились к мировому сообществу с письмом через журнал «Science», в котором предложили отказаться от экспериментов с рекомбинантными ДНК до проведения международной конференции по этой проблеме. Однако уже в 1975 году на конференции в Асиломаре (США) ученые пришли к выводу о том, что эксперименты в области генной инженерии новейшей биотехнологии не более опасны, чем аналогичные работы в других отраслях, но при этом, как и везде, необходим строгий контроль за соблюдением мер безопасности. В 1976 году в США были приняты

первые правила, регламентирующие работу с рекомбинантными микроорганизмами, которые запрещалось выпускать за стены лабораторий. В конце 70-х годов в большинстве стран мира было разработано соответствующее законодательство. Постепенно эти правила корректировались в сторону смягчения жесткости требований, так как 30 лет интенсивных работ по генетической инженерии свидетельствуют о безопасности этих исследований. Микробиологи целенаправленно ведут работы по усилению или ослаблению вирулентных и других свойств бактерий, в целом решая ряд важных проблем медицинской биобезопасности и защиты государства от бактериологического оружия и агрессии. К сожалению, мировой терроризм не останавливается перед выбором средств для своих преступлений, используя крайне опасные для жизни людей биоресурсы. Мировому сообществу предстоит срочно выработать и осуществить систему самых эффективных мер по пресечению и недопущению использования в зловещих целях достижений биологической науки.

Встраивание в ДНК реципиентной клетки чужеродного донорского гена сопряжено с определенными трудностями, главными из которых являются обеспечение точной адресной вставки гена или группы генов, а также их нормального функционирования экспрессии. Эта проблема существует постоянно и ее решение во многих случаях пока носит в значительной степени случайный характер. Еще более важной является проблема генетического риска, возможного получения мутантов с содержанием токсичных или аллергенных для человека белков или других опасных соединений. Все это дает основание считать теоретически возможным возникновение при трансгенозе генотипов, опасных для здоровья и жизни человека. Риск получения таких мутантов значительно возрастает при использовании искусственных, синтетических генов для получения трансгенных растений, животных и микроорганизмов с улучшенными и принципиально новыми свойствами. Именно эти обстоятельства в определенной мере оправдывают тревогу многих людей и их настойчивое требование запретить создание и особенно использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и получаемых из них пищевых и других продуктов. К двум вышесказанным причинам можно добавить и третью спонтанный перенос с пыльцой в другие растения генов-модификаторов, при взаимодействии которых возможно появление новых генотипов с опасными свойствами для человека и окружающей среды. В то же время доказана многолетняя стабильная биобезопасность в биоинженерии, которая обусловлена следующими основными явлениями и закономерностями: использованием природных генов, которые на протяжении всей эволюции участвовали и участвуют в рекомбиногенезе, подвергаются отбору и элиминации, вследствие чего выработались механизмы на всех уровнях организации

биологических объектов, обеспечивающие устойчивый характер репарации нарушенных процессов биосинтеза белков; разработкой и постоянным применением эффективных методов мониторинга за качеством получаемых трансгенных организмов и прежде всего за составом и свойствами белковых компонентов вновь созданных генотипов, что позволяет заблаговременно, на этапе создания ГМО выявлять опасные для человека и окружающей среды генотипы и не допускать их выпуска из лаборатории для использования в производстве и продовольственном обороте; отбором известных, проверенных природных генов и их регуляторных генетических структур и созданием на их основе векторов, обеспечивающих получение трансгенов с заданными свойствами. В целом ситуация с генно-инженерными исследованиями и работами по трансгенозу должна находиться под строжайшим контролем ученых и государства. По мнению большинства генных инженеров, методическая оснащенность мониторинга за качеством ГМО нуждается в дальнейшем совершенствовании. Должны быть разработаны новые методики для углубленного и своевременного выявления токсичных и аллергенных веществ у трансгенных объектов.

Манипуляции с растительными и животными клетками и их органеллами, а также с одноклеточными микроорганизмами осуществляют в научных лабораториях медицинской, пищевой и других видов промышленности, и они основаны на фундаментальных исследованиях биологии и цитологии клеток и тканей, открытии явления тотипотентности клеток (способность регенерировать взрослые организмы), а также на выявлении способности соматических клеток к слиянию (соматическая гибридизация), обмену органеллами, дифференциации и дедифференциации. в клеточных биотехнологиях необходим постоянный мониторинг за спектром соматической вариабельности, появлением мутантов с положительными и отрицательными признаками. В большинстве случаев соматическая вариабельность не выходит за рамки положительных или слабых отрицательных изменений и позволяет получать материал для селекции растений с улучшенными или исходными свойствами в границах обеспечения биобезопасности. Главное, чего добиваются клеточные биотехнологи, получение комплексно устойчивых генотипов сельскохозяйственных растений. Распространение в производстве неустойчивых к вредным организмам и абиотическим факторам среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений может привести к большим потерям урожая. В этой связи лабораторный и полевой контроль за полученными клеточными регенерантами растений является крайне важным с точки зрения экологической безопасности при использовании в производстве. Система государственного испытания и регистрации сортов и гибридов при строгом соблюдении утвержденных методов и критериев оценки позволяет значительно

ограничить подобную опасность. Технология получения продуктов вторичного метаболизма в биореакторах на основе культуры клеток и суспензий дает возможность непрерывно автоматически контролировать и своевременно выявлять различные отклонения от нормы по основным параметрам и качеству получаемой продукции, не допускать возникновения опасных нарушений в любом звене технологического процесса. Биотехнологи, работающие с клетками (их суспензиями) и тканями животных, отмечают случаи накопления токсичных веществ в последних при нарушении техники и технологии их хранения и использования. Таким образом, в растениеводстве в целом складывается безопасная ситуация при использовании клеточных биотехнологий в селекции, получении продуктов вторичного метаболизма для фармацевтической и пищевой промышленности. В то же время в животноводстве требуется проводить более жесткий контроль за производством и качеством продукции, получаемой на основе клеточных и тканевых технологий.

Важным этапом оценки биобезопасности ГМО и полученных из них пищевых и других продуктов является санитарно-гигиеническая экспертиза, которую проводят в Институте питания РАМН по ряду показателей: химическому составу исходных и трансгенных растений; биологической ценности и усвояемости приготовленных из ГМО продуктов; выявлению токсичных, канцерогенных, мутагенных и аллергенных веществ в продуктах, полученных на основе использования ГМО; оценке влияния ГМО на репродуктивные функции животных и человека. Испытания генетически измененных растений на биобезопасность проводятся также в Центре биоинженерии РАН, ВНИИ фитопатологии РАСХН и ВНИИ биологической зашиты растений РАСХН по следующим направлениям: проверка генов, интегрированных в геном растений, на способность наследования в потомстве и их переноса в другие организмы; оценка влияния новых генов на устойчивость растений к болезням и вредителям; выявление и анализ характера изменчивости почвенной микрофлоры и других составляющих биоценоза под влиянием трансгенных растений. Обязательной и крайне важной является медико- биологическая оценка пищевой продукции, полученной из ГМО. Так, разработаны методические указания «Медико-биологическая оценка пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников», которые введены в действие Минздравом РФ 1 июня 2000 года. В методических указаниях установлены порядок гигиенической экспертизы и государственной регистрации пищевой продукции, полученной из ГМО, а также утверждены методики медико-гигиенической, медико-биологической оценки и клинических испытаний новых видов пищевой продукции, полученных на основе ГМО. Методические указания являются официальным изданием и их выполнение должно строго

контролироваться Министерством здравоохранения РФ, а также соответствующими юридическими и правовыми органами РФ.

Во всех государствах с развитой генно-инженерной инфраструктурой в науке и производстве в настоящее время приняты законы и другие государственные акты, создающие нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии. В большинстве своем национальные законы различных государств адаптированы по главным принципиальным вопросам к международным требованиям и правилам в этой области науки и производства, что зафиксировано в документах ООН, ФАО, ЮНЕСКО и других международных организаций соответствующего профиля. В России Федеральный Закон «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» принят Государственной думой и подписан президентом РСФСР 5 июня 1996 года за 86-ФЗ. Закон является рамочным, прямого и непрямого действия, и регулирует отношения в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечения экологической безопасности при генно-инженерной деятельности с биологическими объектами, за исключением человека, его клеток и тканей, которые регулируются специальным законодательством. В законе отражены задачи и основные направления государственного регулирования, а также системы безопасности в области генно- инженерной деятельности в России. Правительство Российской Федерации постановлением 120 от 16 февраля 2001 года утвердило положение «О государственной регистрации генно-инженерномодифицированных организмов», предназначенных для первого на территории Российской Федерации выпуска в окружающую среду, промышленного использования или импорта. Регистрацию ГМО и ведение сводного государственного реестра правительство возложило на Министерство промышленности, науки и технологий (Минпромнауки) РФ. Биобезопасность, применительно к указанному положению, означает отсутствие фактического или прогнозируемого нежелательного воздействия на окружающую среду модифицированных организмов по сравнению с исходными немодифицированными формами. Срок действия свидетельства (5 лет со дня даты включения ГМО в реестр) может быть продлен по заявлению его владельца на следующие 5 лет. При появлении в период срока действия свидетельства новых научно обоснованных данных о биобезопасности ГМО Минпромнауки РФ может по представлению экспертного совета принять решение о перерегистрации без проведения экспертизы; в случае выявления негативного воздействия ГМО на окружающую среду, подтвержденного экспертизой, регистрация может быть аннулирована. В соответствии с этим постановлением Минпромнауки РФ приказом 264 от 10 июля 2001 года был создан Экспертный совет по вопросам биобезопасности и утверждено положение, согласно которому этот совет

является постоянно действующим органом, обеспечивающим объективность и надлежащее качество проверки представляемых заявителями сведений о биобезопасности генно-инженерномодифицированных организмов. Экспертный совет организует и проводит экспертизу представленных заявителями в Минпромнауки РФ сведений, дает, по согласованию с Межведомственной комиссией по проблемам генно-инженерной деятельности, заключение о биобезопасности модифицированных организмов и возможности их государственной регистрации либо об отказе в такой регистрации или аннулировании государственной регистрации и представляет его в установленном порядке в Департамент науки о жизни и земле Минпромнауки РФ. Экспертный совет решает и другие важные вопросы, связанные с оценкой биобезопасности модифицированных организмов. Состав Экспертного совета формируется из числа ведущих ученых и высококвалифицированных специалистов в области генно-инженерной деятельности.

Обязательным требованием для производства и реализации всех товаров в стране должна быть их стандартизация. Госстандарт России предложил создать федеральную программу «Проблемы производства и реализации продуктов питания, полученных из генно-модифицированных источников пищи», одной из главных задач которой будет нормативное и нормативно-методологическое обеспечение качества и генетической безопасности генно- модифицированных продуктов питания и продовольственного сырья. Для этого должны быть проведены соответствующие научные разработки и стандартизация документов, регламентирующих их производство, методы испытания, хранения и реализацию. Основным приоритетным направлением научных исследований в области нормативного обеспечения Госстандарт России считает разработку «Концепции стандартизации генно- модифицированных продуктов». При этом необходимо внести изменения в действующие нормативные документы на пищевую продукцию, продовольственное сырье и методы испытания в части включения дополнительных требований по генетической чистоте, нормам использования и методам испытания, идентификации и маркировке генно- модифицированных продуктов питания, а также на пороговые уровни потребления последних в качестве продуктов питания человека. Перед наукой ставятся также задачи по разработке и совершенствованию правил и порядка оценки соответствия генетически модифицированных продуктов питания требованиям генетической безопасности, а также нормативных документов по государственному контролю и надзору за производством, хранением, реализацией и обращением таких продуктов.

Россия, к сожалению, очень отстала в развитии биотехнологии и биоинженерии. В нашей стране до сих пор не зарегистрировано ни одного отечественного генно-

модифицированного сорта или гибрида какой-либо сельскохозяйственной культуры. Создалась реальная опасность длительного отставания России в XXI веке в области биоинженерии от мирового уровня. По этому поводу нами направлено специальное письмо президенту страны. С целью быстрейшего преодоления этого отставания в этом письме предложено Минпромнауки РФ разработать «Концепцию развития биотехнологии в России», реализация которой должна быть направлена на быстрейшее преодоление отставания России в этой важной области науки. В концепции необходимо предусмотреть решение следующих важнейших задач: создание и реализация утвержденной федеральным законом научной программы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности; признание важнейшим приоритетом XXI века ядерной биологии, стратегической части биотехнологии; приоритетное финансовое обеспечение развития биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности; восстановление деятельности ранее созданных в стране биотехнологических центров; оснащение биоинженерных научных учреждений и лабораторий современным научным оборудованием; привлечение для выполнения федеральной программы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности молодых талантливых исследователей, создание им оптимальных производственных, жилищных и финансовых условий; обеспечение постоянного объективного информирования всего населения страны о содержании и результатах исследований по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности; совершенствование законодательной и другой нормативно-правовой базы по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности; создание в стране специального Федерального совета по биотехнологии, биоинженерии и биобезопасности. Наиболее острой и экономически важной для России является проблема вывода из глубокого экономического кризиса продовольственного цеха страны сельского хозяйства, без чего практическое использование достижений биотехнологии невозможно. Вопросы биобезопасности могут и должны быть обеспечены на основе углубленных научных исследований и строжайшего выполнения законов, правительственных постановлений и высокой ответственности ученых и специалистов, а также практиков, работающих в области биотехнологии и биоинженерии, В решении этих задач очень важным является развитие международного сотрудничества на уровне государств, научных организаций и ученых. Выполнение совместных международных проектов позволит нашей стране преодолеть отставание и стать в этой области науки и производства в ряд с высокоразвитыми государствами мира.

Эпоха научно-технического и технологического прогресса, в которой обитает современное человечество, дополнилась в последние годы стремительным развитием генной инженерии -биотехнологии, связанной с использованием биологических систем,

живых организмов или их производных для изготовления или изменения продуктов с целью их конкретного использования. Генная инженерия расширяет наши границы и открывает новые перспективы в познании явлений природы, в решении актуальных проблем медицины, в совершенствовании и модернизации многочисленных отраслей промышленности и сельского хозяйства, в разрешении многих экологических и социальных проблем. Успех генно-инженерных исследований уже способствовал появлению многих полезных веществ, и он несомненно приведет и в дальнейшем к созданию и применению нового поколения вакцин, современных лекарственных препаратов и диагностических средств, пищевых продуктов и пищевых добавок, других необходимых в различных отраслях народного хозяйства веществ, а также к получению и выращиванию трансгенных (содержащих в себе не свойственные данному виду гены) микроорганизмов, растений или животных с нужными человеку признаками, к разработке новых оптимальных способов охраны окружающей среды. Модификация генетических структур с целью направленного совершенствования биологических объектов затрагивает коренные механизмы формирования важнейших свойств живых организмов наследственности, изменчивости, энерго- и массообмена, адаптации и устойчивости, продуктивности и качества. Серьезное беспокойство людей во многих странах Западной Европы и мира, в том числе и в России, вызывает то обстоятельство, что последствия такого вмешательства не всегда могут быть точно и своевременно выявлены и спрогнозированы. Движение защитников природы и человека против использования генетически модифицированных растений, животных, микроорганизмов и вирусов становится заметной общественной силой, которая может оказать отрицательное влияние на темпы развития биотехнологии и прежде всего ее стратегического ядра биоинженерии как науки и резко уменьшить экономический эффект от использования результатов и достижений этих исследований.

Вопросы по теме:

1. В чем сущность понятия «биологическая безопасность»?
2. Перечислите современные источники биологической опасности.
3. Какие международные документы создают нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии?
4. Какие вопросы рассматривает международная Конвенция о биологическом разнообразии?
5. Почему современные технологии создания ГМО служат источником биологических и экологических рисков?
6. Перечислите основные законы РФ по контролю безопасности ГМО. В чем их смысл?
7. В чем сущность понятия «биологическая этика» применительно к биотехнологии?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

а) основная литература:

1. Сазыкин Ю.О. Биотехнология: учеб. пособие для студ. вузов / Ю.О.Сазыкин, С.Н.Орехов, И.И.Чакалева / под.ред. А.В.Катлинского. - 3-е изд., стер. - М.: Изд. центр «Академия», 2008. - 256 с.
2. Тихонов, И.В. Биотехнология : учебник /под ред. Е.С.Воронина. - СПб. : ГИОРД, 2008. - 792 с.
3. Примроуз С. Геномика. Роль в медицине [Электрон. ресурс] / С. Примроуз, М. Тваймен; пер. с англ. – 2-е изд. (эл.). – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 277 с. – Доступ: http: //www.rucont.ru/

б) дополнительная литература:

1. Албертс Б. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис. - М.: Мир, 1994. Т.1-3.
2. Анализ генома. Методы / Под ред. К.Дейвиса. - М.: Мир, 1990. - 246 с.
3. Баранов В.С. Генная терапия - медицина XXI века // Соросовский образовательный журнал. - № 3. - 1999. - С.3-68.
4. Бекер М.Е. Биотехнология / М.Е.Бекер, Г.К.Лиепиньш, Е.П.Райпулис. - М.: Агропромиздат, 1990. - 334 с.
5. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернера [и др.]. - М.: Мир, 1992. - 614 с.
6. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
7. Журнал «Биотехнология и трансгенетика» - М.: ООО Изд-во «Агрорус».
8. Журнал «Ремедиум» - М.: ГК «Ремедиум»
9. Загоскина Н.В. Биотехнология : теория и практика / Н.В.Загоскина, Л.В.Назаренко, Е.А.Калашникова. - М.:Оникс, 2009. - 496 с.
10. Кларк Д. Молекулярная биология: простой и занимательный подход / Д. Кларк, Л. Рассел. - М.: ЗАО Компания КОНД, 2004. - 472 с.
11. Корочкин Л.И. Клонирование животных // Соросовский образовательный журнал. - № 4. - 1999. - С.10-16.
12. Лещинская И.Б. Генетическая инженерия // Соросовский образовательный журнал. - № 1. - 1996. - С.33-39.
13. Лещинская И.Б. Современная промышленная микробиология // Соросовский образовательный журнал. - № 4. - 2000. - С.14-18.
14. Машкина О.С. Генетическая инженерия и биобезопасность / О.С.Машкина, А.К.Буторина. - Воронеж: ВГУ, 2005. - 71 с.
15. Основы молекулярной медицины : В 2 т. : Пер с англ. / Под ред. Дж. Джеймсона. - М.: Мир, 2002. - Т.1 - 444с.; Т.2. - 346 с.
16. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник. / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева и др.; Под ред. В.С. Шевелухи. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Высш. шк., 2008. - 710 с.
17. Сойфер В.Н. Международный проект «Геном человека» // Соросовский

образовательный журнал. - № 12. - 1998. - С.4-11.

18. Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения.– М.: Академкнига, 2005.- 415 с.
19. EMA. Guideline on Similar Biological Medicinal Products. The European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use; EMA: London, UK, 2005; EMEA/CHMP/437/04.
20. EMA. Revision of the Guideline on Similar Biological Medicinal Product; EMA: London, UK, 2013; CHMP/437/04 Rev 1.
21. EMA. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology derived proteins as active substance: quality issues (revision 1); EMA: London, UK, 2014; EMA/CHMP/BWP/247713/2012
22. EMA. Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing BiotechnologyDerived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues; EMA: London, UK, 2006; EMEA/CHMP/BMWP/42832.
23. EMA. Revision of the Guideline on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Non-Clinical and Clinical Issues (Draft); EMA: London, UK, 2013; EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1.
24. Правила проведения исследований биоаналогов. Финальная версия. 10 сентября 2014. [Электрон. ресурс]. – URL: *www.pharmvestnik.ru/images/files/723/pravila_bioanalogi.pdf* (дата обращения 17.12.2016)

Интернет-ресурсы:

- http://cyberleninka.ru/article/c/biotehnologiya - научная электронная библиотека «КИБЕРЛЕНИНКА»;

- http: //www.rucont.ru – Электронная библиотека Руконт

- http://biomolecula.ru/ - Научно-популярный сайт о молекулярных основах современной биологии

- http://www.biotechnolog.ru/ - Биотехнология. Учебник on-line.

- http://cbio.ru/ - Коммерческая биотехнология. Интернет-журнал.

- http://molbiol.edu.ru/project.html - Практическая молекулярная биология - общедоступная гипертекстовая информационная база данных, предназначенная обеспечить решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач в области биологии и биомедицины.