

# РОССИЙСКО-АРМЯНСКИЙ (СЛАВЯНСКИЙ) УНИВЕРСИТЕТ

Составлена в соответствии с государственными требованиями к минимуму содержания и уровню подготовки выпускников по указанному направлению 33.05.01 Фармация и Положением РАУ «О порядке разработки и утверждения учебных программ».

УТВЕРЖДАЮ:



Директор ИБМиФ  
Аракелян А.А.

2023г.

Институт: Институт биомедицины и фармации

Кафедра: Медицинской биохимии и биотехнологии

Направление: 33.05.01 Фармация

*Автор:* к.б.н., доцент Оганесян Ашхен Аргашесовна

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ДИСЦИПЛИНЫ

Дисциплина: Биотехнология

ЕРЕВАН

## **1. Аннотация**

**Основы биотехнологии** - одно из самых современных направлений биологии, возникшее на стыке микробиологии, анатомии растений и животных, биохимии, иммунологии, клеточной биологии, физиологии растений и животных, экологии, генетики, биофизики, математики и много других областей естествознания, в том числе и компьютерных технологий. Сложившаяся благоприятная ситуация в биологии явилась мощным толчком в развитии современной биотехнологии, весьма важной области практического приложения результатов фундаментальных наук. Биотехнология - получение новых комбинаций генетического материала путем проводимых вне клетки манипуляций с молекулами нуклеиновых кислот и переноса созданных конструкций генов в живой организм, в результате которого достигается их включение и активность в этом организме и у его потомства. Речь идет о направленном, по заранее заданной программе конструировании молекулярных генетических систем вне организма с последующим введением их в живой организм. При этом рекомбинантные ДНК становятся составной частью генетического аппарата реципиентного организма и сообщают ему новые уникальные генетические, биохимические, а затем и физиологические свойства. Биотехнология позволяет сознательно и целенаправленно управлять сложными клеточными процессами. Данная новейшая область биологических знаний и ее последние достижения уже стали крайне важными для здоровья и благополучия человека. Например, получение «биологических реакторов» - микроорганизмов, растений и животных, продуцирующих фармакологически значимые для человека вещества, создание сортов растений и пород животных с определенными ценными для человека признаками. Методы биотехнологии позволяют провести генетическую паспортизацию, диагностировать генетические заболевания, создавать ДНК-вакцины, проводить генотерапию различных заболеваний.

Курс рассчитан на формирование теоретических и практических знаний, необходимых дипломированному специалисту для освоения современных методов получения и использования, генетически модифицированных организмов, систем молекулярно-генетической диагностики, управления внутриклеточными процессами, метаболизмом в целом.

## **2. Требования к исходным уровням знаний и умений студентов:**

Дисциплина базируется на знаниях, приобретенных студентами при изучении теоретических и методических основ фундаментальных наук (биологии, математики, физики, химии), медико-биологических наук (морфологии, физиологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии, фармакологии, генетики, биофизики и биохимии). Для усвоения курса необходимо знать основы теории молекулярной биологии, молекулярной генетики, биотехнологии.

## **3. Учебная программа**

### **3.1 Цель и задачи дисциплины**

#### ***Цель освоения дисциплины:***

1. формирование фундаментальных теоретических знаний в области генной инженерии и биотехнологии,
2. освоение практических методов генной и белковой инженерии, методов конструирования гибридных молекул ДНК и их введение в реципиентные клетки;
3. комплексное понимание основных механизмов реализации и передачи генетического материала на молекулярном и клеточном уровнях, а также методы изменения генетического материала и конструирования трансгенных организмов с заданными свойствами.

4. изучение теоретических основ генетической и клеточной инженерии и создания трансгенных организмов, освещение этических проблем и вопросов биологической безопасности, связанных с данным направлением исследований и практическим использованием генетически модифицированных организмов (ГМО).

**Задачи дисциплины:**

1. Изложить основные принципы о направлениях развития геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, биоинформатики, рассмотреть существующие инструментарий и подходы, используемые при конструировании различных векторов, клонировании генов и их экспрессии в различных типах клеток;
2. подробно рассматривать перенос генов в клетки и организмы, получения и использование трансгенных организмов;
3. проводить лекционные и практические занятия с целью углубленного изучения и приобретения навыков получения, трансформированных организмов.

2. Место дисциплины в структуре основной образовательной программы высшего профессионального образования:

данная учебная дисциплина включена в раздел "М.2.В2. Профессиональный" основной образовательной программы. Осваивается на 8 семестре.

Компетенции обучающегося, формируемые в результате освоения дисциплины /модуля. В результате освоения дисциплины формируются следующие компетенции: ОПК-11 (профессиональные компетенции), обладает способностью применять современные представления об теоретических основах и методах для принципах конструирования рекомбинантных ДНК и их введения в реципиентные клетки, основных векторах и микроорганизмах; принципах трансформации и принципах создания трансгенов и трансгенных организмов, задачах и проблемах генетической инженерии, современных средствах селекционной практики; о роли биоинженерии в современной биотехнологии; биотехнологических и биомедицинских производств, генной инженерии, нанобиотехнологии, молекулярного моделирования. ОПК-7 (профессиональные компетенции) - обладает способностью применять базовые представления об основных закономерностях и современных достижениях генетики и селекции, о геномике, протеомике. ПК-1 (профессиональные компетенции) - обладает способностью эксплуатировать современную аппаратуру и оборудование для выполнения научно-исследовательских полевых и лабораторных биологических работ.

### **3.2 Требования к уровню освоения содержания дисциплины**

В результате освоения дисциплины студент:

**1. должен знать:**

- представление о теоретических основах и методах инженерии, принципах конструирования рекомбинантных ДНК и их введения в реципиентные клетки, основных векторах и микроорганизмах, используемых в биоинженерии растений;
- принципах трансформации и методах получения трансгенных растений;
- принципах создания трансгенов и трансгенных организмов, задачах и проблемах генетической инженерии, современных средствах селекционной практики;
- о роли биоинженерии в современной биотехнологии.

**2. должен уметь:**



7. Расчетно-графические работы									
8. Другие методы и формы занятий **									
9. Форма текущего контроля: Устный опрос на семинаре и тестирование умений									
10. Форма промежуточного контроля: 3 письменных контрольных по темам									
11. Форма итогового контроля:								Зачет	экзамен

**3.4.1. Разделы дисциплины с указанием видов занятий (лекции, семинарские и практические занятия, лабораторные работы) и их трудоёмкость в академических часах и кредитах:**

Разделы и темы дисциплины	Всего часов	Лекции, часов	Практ. занятия, часов	Семинары, часов	Лабор. часов	Другие виды занятий, часов
1	2	3	4	5	6	7
Введение	2	1				1
<b>1.1. Этапы развития биотехнологии</b> Определение и разделы генетической инженерии. Основные методы, предпосылки и этапы развития.	8	2	2		4	
<b>1.2. Перспективы биотехнологии</b> Успехи и перспективы развития. Генетическая инженерия как раздел молекулярной биологии и как база новой биотехнологии.	8	2	2		4	
<b>2. Получение рекомбинантных конструкций</b>						
<b>2.1. Ферменты рестрикции</b> Ферменты рестрикции и модификации (рестриктазы, модифицирующие метилазы). Физическое картирование молекул ДНК. ДНК-лигазы. Репликация ДНК in vitro. Свойства ДНК – полимераз.	8	2	2		4	
<b>2.2. Полимеразная цепная реакция</b> Полимеразы (ДНК-полимераза I E. coli. ДНК-полимераза фага T4. ДНК-полимераза фага T7. Taq-полимераза. Определение первичной структуры ДНК. Сиквеназы. РНК-зависимая ДНК-полимераза. Поли(А)-полимераза. РНК-полимеразы фагов T3, T7 и SP6.	8	2	2		4	
<b>2.3. Нуклеазы</b> Нуклеазы S1, Bal31 и Mung bean. Экзонуклеаза III E. coli. Экзонуклеаза фага	8	2	2		4	

лямбда. Панкреатическая ДНКаза. Рибонуклеаза Н. Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза. Щелочные фосфатазы. Полирибонуклеотидкиназа фага Т4.						
<b>3. Векторы для клонирования</b>						
<b>3.1. Классификация векторов</b> Общая характеристика и классификация векторов. Общие и дополнительные свойства векторов. Выбор между плазмидными или фаговыми векторами. Плазмидные векторы E. coli. Репликация плазмид.	8	2	2		4	
<b>3.2. Плазмиды и векторы</b> Векторы серии pBR и pUC. Векторы для прямой селекции рекомбинантов. Векторы для клонирования промоторов и терминаторов, для секреции чужеродных белков из клетки. Физиология и генетика фага лямбда. Генетическая и физическая карты лямбда. Транскрипционная программа. Установление лизогенного состояния. Специфическая трансдукция. Репликационная программа. Упаковка ДНК в головку фага. Векторы, сконструированные на основе ДНК фага лямбда. Sp1 – фенотип. Векторы внедрения и замещения. Сборка фагов in vitro.	8	2	2		4	
<b>3.3. Векторы на основе ДНК нитевидных фагов.</b> Векторы, созданные на базе ДНК нитевидных фагов. Жизненный цикл фага M13. Векторные мутанты на основе M13. Идентификация рекомбинантных клонов. Гибридные векторы (фагмиды, космиды, фазмиды). Фагово – специфичная транскрипция. Векторы для экспрессии с использованием T7, T3 и SP6 РНК – полимераз	8	2	2		4	
<b>4.1. Операции на ДНК</b> Подготовка фрагментов ДНК для клонирования. Способы получения фрагментов ДНК определенного размера. Объединение фрагментов ДНК. Выбор концентрации фрагментов ДНК для их объединения. Использование линкеров и	8	2	2		4	

адаптеров при объединении фрагментов ДНК. Коннекторный метод объединения фрагментов ДНК. Синтез олигонуклеотидов и генов. Направленный мутагенез. Сайт-специфический мутагенез.						
<b>4.2. Системы клонирования.</b> Трансформация клеток и сферопластов E. coli. Особенности клонирования в других видах бактерий. Клонирование кДНК. Обратная транскриптаза. Клонирование продуктов полимеразной цепной реакции.	8	2	2		4	
<b>5. Банки генов и геномов</b>						
<b>5.1. Геномные библиотеки</b>	8	2	2		4	
Проблемы создания геномной библиотеки и банков генов. Создание банков генов с помощью фаговых и космидных векторов.	8	2	2		4	
<b>6. Экспрессия клонируемых генов в бактериях</b>						
<b>6.1. Оптимизация генной экспрессии</b> Особенности экспрессии прокариотических и эукариотических генов. Слитные белки и проблема рамки считывания. Синтез нативных чужеродных белков. Оптимизация экспрессии генов на уровне транскрипции и трансляции. Структура промотора, регулируемые промоторы. Гибридные опероны.	8	2	2		4	
7. Особенности генной инженерии растений	8	2	2		4	
8. Особенности генной инженерии животных	8	2	2		4	
9. Особенности генной инженерии микроорганизмов	9	3	2		4	
10. Генная терапия	9	3	2		4	
<b>ИТОГО</b>	<b>138</b>	<b>36</b>	<b>34</b>		<b>68</b>	

### **3.6. Модульная структура дисциплины с распределением весов по формам контролей**

	Вес формы текущего контроля в результирующей оценке текущего контроля	Вес формы промежуточного контроля в итоговой оценке промежуточного контроля	Вес итоговых оценок промежуточных контролей в результирующей оценке	Вес оценки посещаемости, результирующей оценки

							промежуточно о контроля	промежут. контролей и оценки итог. контроля в результату ющей оценке итогового контроля
<b>Вид учебной работы/контроля</b>	<b>M1<sup>1</sup></b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>		
Контрольная работа					0,5	0,5		
Тест								
Курсовая работа								
Лабораторные работы								
Письменные домашние задания								
Эссе (реферативного типа)								
Устный опрос (семинарс.)		0,5	0,5					
Реферат								
Вес результирующей оценки текущего контроля в итоговых оценках промежут. Контролей					0,5	0,5		
Вес итоговой оценки 1-го промежуточного контроля в результирующей оценке промежут. контролей								
Вес итоговой оценки 2-го промежуточного контроля в результирующей оценке промежут. контролей							0,5	
Вес итоговой оценки 3-го промежуточного контроля в результирующей							0,5	

<sup>1</sup> Учебный Модуль



оценке промежут. контролей т.д.								
Вес результирующей оценки промежуточных контролей в резульtir. оценке итогов. контроля								1.0
Экзамен/зачет (оценка итогового контроля)								0
	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$	$\Sigma = 1$

#### **4.2 Содержание дисциплины**

Введение. Определение предмета, целей, задач биотехнологии. Взаимосвязь биологических процессов с жизнедеятельностью различных групп микроорганизмов - бактерий, вирусов, дрожжей, микроскопических грибов и т.д. и их особенности.

Методы конструирования гибридных молекул ДНК in vitro. Векторные молекулы ДНК. Векторы для генетического клонирования – особенности их молекулярной организации. Типы генетических библиотек. Анализ генетических библиотек. Векторы для экспрессии генов – особенности их молекулярной организации. Экспрессия и повышенная продукция рекомбинантных белков в микробных клетках.

Микроорганизмы, используемые в генетической инженерии. Взаимосвязи вектор-хозяин. Проблемы гетерологичной экспрессии. Причины возможной неидентичности генно-инженерных белков и их природных аналогов.

Методы определения нуклеотидной последовательности ДНК.

Методы сайт-направленного мутагенеза.

Технологии, основанные на индикации нуклеиновых кислот: методы амплификации нуклеиновых кислот, компоненты и условия проведения полимеразной цепной реакции, методы анализа продуктов амплификации, микрочипы. Примеры решения конкретных диагностических задач. Технологии, основанные на индикации белков и других биомолекул. Иммуноферментный анализ.

Задачи и проблемы генетической инженерии растений. Плазмиды агробактерий и перенос T-ДНК растений (неоплазия у растений, структуры Ti-плазмид). Ri -плазмиды A. rhizogenes (характеристика опухолей, образование дифференцированной ткани). Опины Ri-плазмид (регенерация растений, T-ДНК Ri-плазмид как вектор). Модели транспозиции T-ДНК. Векторы генетической инженерии растений: векторы на основе Ti-плазмид, векторы на основе хлоропластной и митохондриальной ДНК, транспозируемых элементов растений, вирусов растений, вирионной РНК. Прямой перенос генов в растения. Экспрессия генов в растениях. Процессинг мРНК, проблемы гетерологичной экспрессии. Методы регенерации. Маркеры генетической инженерии и ее достижения.

**Введение генов в клетки млекопитающих**

*Характеристика векторов для переноса генов в животные клетки*

Манипуляции с клетками млекопитающих можно разделить на 2 большие группы: эксперименты с соматическими клетками и эксперименты по трансформации половых клеток. В последнем случае конечный результат – получение трансгенных организмов.

### ***Характеристика векторов для переноса генов в животные клетки***

Одними из лучших носителей для введения чужеродной информации в животную клетку являются векторы на основе ретровирусов, например, на основе вируса лейкоза мышей. Они обеспечивают высокоэффективный перенос генов и их стабильное встраивание в хромосому клеток-мишеней. В основном трансформации животных клеток осуществляют либо с помощью ретровирусов (около 40% от всех трансформаций), либо путем упаковки ДНК в липосомы (25%), реже используют аденовирусы, так как они могут вызывать сильный иммунный ответ, кроме того, невозможно их повторное введение.

Если проблема доставки чужеродной ДНК *in vitro* практически решена, а ее доставка в клетки-мишени разных тканей *in vivo* успешно решается (главным образом путем создания конструкций, несущих рецепторные белки, в том числе и антигены, специфичные для тех или иных тканей), то другие характеристики существующих векторных систем – стабильность интеграции, регулируемая экспрессия, безопасность — все еще нуждаются в серьезных доработках.

Прежде всего это касается стабильности интеграции. До настоящего времени интеграция в геном достигалась только при использовании ретровирусных либо аденоассоциированных векторов. Повысить эффективность стабильной интеграции можно путем совершенствования генных конструкций типа рецептор-опосредованных систем, либо путем создания достаточно стабильных эписомных векторов (то есть ДНК-структур, способных к длительной персистенции внутри ядер).

В последнее время особое внимание уделяется созданию векторов на базе искусственных хромосом млекопитающих (МАС - mammalian artificial chromosomes). Благодаря наличию основных структурных элементов обычных хромосом такие мини-хромосомы длительно удерживаются в клетках и способны нести полноразмерные (геномные) гены и их естественные регуляторные элементы, которые необходимы для правильной работы гена, в нужной ткани и в должное время. Такие искусственные хромосомы уже созданы для дрожжей (YAC), так как геном дрожжей полностью картирован.

Для идентификации модифицированных клеток, необходимы маркеры. Если трансформируют соматические клетки, то применяют обычно селективные маркеры. Аксель с коллегами из колледжа терапии и хирургии Колумбийского университета исправили таким образом генетический дефект клеток мыши. Они взяли фрагмент ДНК, содержащий ген тимидинкиназы (ТК), который получен из вируса герпеса, смешали эту ДНК с несколькими миллиграммами ДНК-носителя из спермы лосося и осадили ДНК на культуру L-клеток мыши, в которых ген ТК отсутствовал (ТК-). С частотой 1 на 100000 клетки приобретали ген ТК, поэтому на селективной среде, которая не позволяла расти ТК-клеткам, росли и нормально размножались ТК+ - клетки.

Другой селективный маркер - ген, кодирующий дигидрофолатредуктазу (ДГФР), можно использовать при трансформации немутантных линий клетки. Благодаря экспрессии многих копий этого гена животная клетка вместе с плазмидой приобретает устойчивость к высоким концентрациям ингибитора фермента, и таким образом трансформантов можно отбирать при высоких концентрациях ингибитора.

Разработано еще два универсальных вектора, содержащих генные маркеры, работающие в нормальных клетках. Они построены по одному и тому же принципу: прокариотические гены, определяющие фенотип трансгенных клеток, соединены с эукариотическими регуляторными сигналами.

Один из векторов состоит из прокариотического гена устойчивости к антибиотику неомицину, встроенного в раннюю область генома SV-40. Эукариотические клетки чувствительны к аналогу неомицина G 418, который инактивируется продуктом гена. Таким образом клетки, прошедшие трансфекцию приобретают способность расти на среде, содержащей G 418.

### ***Генетическая трансформация соматических клеток млекопитающих***

Культуры трансформированных клеток млекопитающих используют для получения различных веществ. Хотя культуры клеток животных, особенно при массовом выращивании, гораздо менее экономичны, чем бактериальные дрожжевые культуры, они обладают существенным преимуществом - способностью осуществлять мелкие, но весьма важные модификации белков - продуктов гена млекопитающих. Например, для эффективного функционирования ряда белков необходимо присоединение к ним цепочек из молекул углеводов или липидов. Образование и присоединение таких цепочек - обычный процесс для клеток млекопитающих, тогда как бактериальная клетка не способна производить подобные модификации.

Помимо создания клеток-продуцентов, трансформация соматических клеток млекопитающих позволяет изучать тонкие механизмы регуляции экспрессии генов и целенаправленно модифицировать генетический аппарат клетки животных, а при необходимости и человека, что имеет огромное значение для медицинской генетики.

Культуры клеток млекопитающих могут оказаться эффективным источником выделения некоторых вирусных антигенов с целью получения вакцин для животных и человека. Получение таких вакцинных культур клеток осуществимо при помощи техники рекомбинантных ДНК и эффективных векторов экспрессии для клеток млекопитающих и человека. При использовании **ДНК-вакцин** в организм вводится не антиген, а ген, кодирующий синтез этого антигена. Ген встраивается в плазмиду, а плазида вводится организм путем обыкновенной инъекции.

ДНК-вакцины имеют хорошие перспективы в животноводстве. Фибер – белок вирусной оболочки. Эпитоп фибера кодирует синтез протективных антител. Одно из заболеваний птиц – синдром снижения яйценоскости (ССЯ) вызывается вирусом. После анализа ДНК этого вируса был выделен ген, кодирующий фибер, проклонирован и встроен в плазмиду. Рекомбинантная вакцина при введении ее в организм принесет ДНК фибера в клетку, выработка вирусного белка спровоцирует синтез специфических антител, т. е. вызовет иммунный ответ.

Достоинством таких вакцин является очень маленький объем – для иммунизации одной мыши достаточно 10-50 мкг плазмиды, одной коровы – 200-300 мкг. Плазида сохраняется в организме до 1 года. В стадии клинических испытаний в настоящее время находятся ДНК-вакцины против микоплазм, возбудителя туберкулеза, сальмонеллеза, лейшманиоза.

Развитие злокачественной опухоли в организме обычно подавляет иммунитет. Проблема в том, чтобы подхлестнуть иммунную систему в целом и направить ее действие против раковых клеток. Исследователи из Медицинской школы в Энн-Арборе (Мичиган) придумали метод борьбы с раком. В опухолевые клетки толстой кишки подопытных мышей ввели гены, кодирующие белки другой линии мышей. Это можно осуществить с помощью липосом или вируса. После появления на внешней стороне клеточной мембраны этих белков иммунная система атаковала такие клетки. 20% больных мышей выздоровели, у 70% опухоль уменьшилась, в контрольной группе все умерли. Лимфоциты боролись не только с «мечеными» клетками опухоли, но и клетками метастаз, следовательно, иммунная система «проснулась». В настоящее время ведутся эксперименты на людях с раком кожи

## **Генотерапия**

Лечение заболеваний с помощью генов получило название генотерапии. Сейчас в мире насчитывается порядка 400 проектов, посвященных лечению с помощью генотерапии.

Разработке программы генной терапии предшествуют тщательный анализ тканеспецифической экспрессии соответствующего гена, идентификация первичного биохимического дефекта, исследование структуры, функции и внутриклеточного распределения его белкового продукта, а также биохимический анализ патологического процесса. Все эти данные учитываются при составлении соответствующего медицинского протокола.

Апробацию процедуры генокоррекции наследственного заболевания проводят на первичных культурах клеток больного, в которых в норме функционально активен данный ген. На этих клеточных моделях оценивают эффективность выбранной системы переноса экзогенной ДНК, определяют экспрессию вводимой генетической конструкции, анализируют ее взаимодействие с геномом клетки, отработывают способы коррекции на биохимическом уровне. Используя культуры клеток, можно разработать систему адресной доставки рекомбинантных ДНК, однако проверка надежности работы этой системы может быть осуществлена только на уровне целого организма. Поэтому такое внимание в программах по генной терапии уделяется экспериментам *in vivo* на естественных или искусственно полученных моделях соответствующих наследственных болезней у животных.

Успешная коррекция генетических дефектов у таких животных и отсутствие нежелательных побочных эффектов генной терапии являются важнейшей предпосылкой для разрешения клинических испытаний. Таким образом, стандартная схема генокоррекции наследственного дефекта включает серию последовательных этапов. Она начинается созданием полноценно работающей (экспрессирующей) генетической конструкции, содержащей смысловую (кодирующую белок) и регуляторную части гена. На следующем этапе решается проблема вектора, обеспечивающего эффективную, а по возможности и адресную доставку гена в клетки-мишени. Затем проводится трансфекция (перенос полученной конструкции) в клетки-мишени, оценивается эффективность трансфекции, степень коррегируемости первичного биохимического дефекта в условиях клеточных культур (*in vitro*) и, что особенно важно, *in vivo* на животных - биологических моделях. Только после этого можно приступать к программе клинических испытаний.

Существует два типа генотерапии: *заместительная* и *корректирующая*.

Заместительная генотерапия заключается во вводе в клетку неповрежденного гена. Внесенная копия заменит по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК.

При корректирующей терапии предполагается замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Пока этот метод на стадии лабораторных испытаний, так как эффективность его еще очень низка, но последние исследования показывают успехи в лечении некоторых заболеваний.

**Амавроз Лебера** - врожденная слепота, редкая форма наследственного заболевания, которое проявляется уже в младенчестве. Из-за дефектного гена (Retinal Pigment Epithelium, 65 kDa) в сетчатке умирают и не восстанавливаются светочувствительные клетки. По статистике, от амавроза Лебера страдает один человек на 81 тысячу. Болезнь сопровождается ослаблением или полной потерей зрения без анатомического нарушения структуры органов. Повреждение гена RPE65 приводит к прекращению синтеза определенных ферментов, участвующих в выработке светочувствительного пигмента, и

дегенерации фоторецепторов. Врожденный амавроз Лебера впервые был описан в 1869 году немецким ученым-офтальмологом Теодором Лебером, однако этиология и патогенез этой группы болезней до настоящего времени остаются не до конца изученными. Клиническими критериями диагностики ВАЛ являются: значительное снижение остроты зрения (от отсутствия реакции на свет и светоощущения до сотых долей), у большинства детей отмечаются плавающие движения глаз, нистагм, окуло-пальцевой симптом, косоглазие, могут встречаться деструкция стекловидного тела и частичное врожденное помутнение хрусталиков. Характерным является резкое снижение скотопических и фотопических показателей суммарного потенциала фоторецепторов сетчатки на электроретинографии (ЭРГ), вплоть до ее отсутствия, при нормальной офтальмоскопической картине глазного дна. Кроме того, отмечаются нарушения цветоощущения от красно-зеленой дисхроматопсии до ахроматопсии, сужение полей зрения до 30-10 градусов, значительное повышение порога электрической чувствительности.

Традиционная лекарственная терапия бессильна в борьбе с этим заболеванием. На помощь пришла генотерапия. Исследователи из США и Англии делали инъекцию вирусного вектора, содержащего исправленный ген в один глаз пациентов, страдающих амаврозом Лебера. Вектор содержал фермент, необходимый для продукции светочувствительного пигмента и вводился в эпителий пигментного слоя сетчатки. В первом исследовании у всех 12 пациентов светочувствительность в "пролеченном" глазу вернулась. У 4 детей зрение восстановилось до такой степени, что они могли заниматься спортом и нормально учиться в школе. Кроме того, были проведены исследования на саймири (белитчи обезьянки), страдающих дальтонизмом. Инъекция "исправленных" генов вернула им полное цветовое зрение.

В зависимости от способа введения экзогенных ДНК в геном пациента генная терапия может проводиться либо в культуре клеток (*ex vivo*), либо непосредственно в организме (*in vivo*). Клеточная генная терапия или терапия *ex vivo* предполагает выделение и культивирование специфических типов клеток пациента, введение в них чужеродных генов, отбор трансфицированных клеток и реинфузию их тому же пациенту.

Примером может служить лечение комбинированного иммунодефицита. **Комбинированный иммунодефицит** может быть результатом дефекта гена аденозиндезаминазы. Это заболевание клинически и иммунологически характеризуется дефектом как Т-, так и В-лимфоцитов. Диагностируется заболевание обычно в раннем возрасте, а признаками служат тяжелые, потенциально смертельные инфекции, глубокое нарушение клеточного иммунитета и дефицит антител, лимфопения, в основном за счет Т-лимфоцитов. Клинические проявления обычно включают задержку и отсутствие прогресса физического и моторного развития, персистирующие, вяло текущие и необычно упорные инфекции, вызванные низковирулентными оппортунистическими микроорганизмами (например, *Candida*, *Pneumocystis carinii*, *cytomegalovirus*). Тяжелые комбинированные первичные иммунодефициты классифицируются далее в зависимости от патогенеза, когда он известен (например, дефекта фермента), типа наследования и уровня нарушения дифференцировки.

Одной из форм комбинированного иммунодефицита является тяжелая комбинированная иммунная недостаточность ТКИИ, или англоязычное (*severe combined immunodeficiency - SCID* или "bubble boy" disease). Обнаружены как X-сцепленная, так и аутосомно-рецессивная формы SCID. В случаях SCID с нормальным количеством В-лимфоцитов обычно наблюдается X-сцепленное наследование. Впервые попытка лечения такого больного методами генотерапии была предпринята в США в 1990 г. У больного ребенка

извлекли Т-лимфоциты, трансформировали ретровирусным вектором, введя нормальный ген аденозиндезаминазы и вернули клетки в организм. Введение приходилось повторять. Более эффективна аналогичная трансформация стволовых клеток костного мозга.

В январе 2009 года итальянские ученые опубликовали данные о полном излечении 8-ми летнего мальчика, страдающего этим заболеванием. Кроме того, 8 из 10 участвовавших в клиническом испытании не нуждаются более в ферментозаместительной терапии и живут теперь нормальной жизнью. Никаких серьезных побочных эффектов от применения генотерапии обнаружено не было.

X-сцепленная аденолейко дистрофия (АДЛ) - дегенеративное заболевание белого вещества головного мозга. Поражает мальчиков с частотой примерно 1/17 000. Оно убивает их еще до того, как наступит подростковый возраст. Заболевание обусловлено дефектом обмена жирных кислот. В результате нарушается миелинизация нервных клеток. Клиническая картина выражается в интеллектуальной, поведенческой недостаточности, расстройстве памяти, нарушении походки, расстройстве зрения вплоть до атрофии зрительных нервов.

В экспериментах французских исследователей скорректированный ген вставляли в клетки крови 7-летнего мальчика, страдающего АДЛ, некоторые клетки начинали продуцировать необходимый для обмена жирных кислот протеин, а также, по видимому, мигрировали в мозг. По крайней мере, спустя 2 года прогрессирующее повреждение мозга, характерное для этой болезни, прекратилось. В этих экспериментах гены доставлялись в клетки с помощью инактивированного вируса иммунодефицита человека (HIV). Компания Genetix Pharmaceuticals, специализирующаяся на соматической генной терапии, также сообщила в ноябре 2009 года о создании препарата для лечения АДЛ на основе собственных гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, «зараженных» модифицированным вирусом ВИЧ (лентивирусный вектор), несущим в себе ген, которого недостает в организме больного АДЛ. Такой препарат уже ввели двум юным пациентам (после миелоабляции), спустя 15 месяцев прогрессирование болезни прекратилось.

Генная терапия *in vivo* основана на прямом введении клонированных и определенным образом упакованных последовательностей ДНК в специфические ткани больного. В настоящее время не существует общедоступного метода культивирования клеток легких, поэтому при легочных заболеваниях единственный способ доставить чужеродный ген - это ввести его прямо в организм.

**Муковисцидоз** - весьма распространенное среди людей белой расы тяжелое наследственное заболевание легких, которое поражает, например, в семьях из Центральной Европы одного новорожденного из 2500 и для которого установлен дефектный ген, кодирующий белок-регулятор трансмембранной проводимости. Основное проявление дефектного гена – пневмония. Поражаются все эпителиальные клетки. Основная проблема – как доставить ген в клетки, покрытые слизью, которая препятствует трансформации. Неповрежденную копию "гена заболевания", включенную в аденовирусный вектор или липосому, вводят в форме аэрозоля в дыхательные пути больного.

Для коррекции нарушения при прогрессирующей мышечной дистрофии Дюшенна (заболевании мальчиков, связанном с дефектами X-хромосомы) нормальный ген, кодирующий белок дистрофии, пытались прямо вкалывать в мышечные волокна, используя либо "голую" ДНК, либо аденовирусный вектор. Другие исследователи трансплантировали больному миобласты после генетической коррекции. Ранее неподвижный ребенок приобретал способность двигаться! К сожалению, во всех этих опытах удается получить только временный терапевтический эффект, и процедура введения гена должна неоднократно повторяться.

Список наследственных заболеваний, которые пытаются или планируют лечить генами, велик. Это и ревматоидный артрит, и фенилкетонурия, и заболевания, связанные с недостатком гормонов (инсулина, эритропоэтина, гормона роста). В случае хронической анемии, связанной с дефицитом эритропоэтина, на основании опытов на животных предлагается принципиально новый подход к лечению. Так как каждая из наших клеток содержит один и тот же геном, можно заставить фибробласты кожи, которые в норме не производят эритропоэтина, синтезировать этот гормон. Для этого нужно ввести в геном новую контролируемую область и тем самым снять запрет со считывания (экспрессии) гена эритропоэтина, присутствующего, но "молчащего" в фибробластах.

Практически в любой области медицины либо начаты клинические испытания лечения наследственных заболеваний с помощью генотерапии, либо в опытах на животных разрабатываются подходы к такому лечению. По мере усовершенствования методов доставки генов и контроля их экспрессии список заболеваний, к которым можно применять генотерапию, будет безусловно расширяться.

Генотерапия применима не только к наследственным заболеваниям. Предстоит решить проблему лечения генами "чумы XX века" — синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД), возникающего при заражении вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). ВИЧ представляет собой ретровирус, поражающий Т-лимфоциты и макрофаги. Болезнь удалось бы победить, если бы были найдены новые гены, введение которых в зараженные ВИЧ лимфоциты останавливало бы дальнейшее размножение вируса. Предложено множество хитроумных способов борьбы со СПИДом с помощью привнесенных генов. Все они основаны на новейших данных о строении и функционировании генома ретровируса. Например, вводя прямо в мышцы больного ретровирусные векторы, несущие отдельные гены ВИЧ, ученые рассчитывали на то, что гены ВИЧ после внедрения в ДНК хромосом хозяина смогут дать информацию для синтеза вирусных белков и произойдет "противоСПИДная" иммунизация больного этими белками. Однако еще не получено ощутимых результатов, которые сулили бы успех в борьбе с вирусом дикого типа, коварство которого заключается в его изменчивости.

Огромные перспективы открывает использование генотерапии для лечения онкологических заболеваний. Многолетние усилия ученых привели к пониманию того, что рак — это генетическое заболевание и его развитие происходит многостадийно, в результате серии генетических нарушений, накапливающихся в клетке. Следовательно, каждый из таких отдельных генетических эффектов может стать точкой приложения генотерапевтического подхода.

В настоящее время в мире около 400 проектов по генной терапии находятся на различных стадиях клинических испытаний: 261 из них проходит первую стадию (оценка токсичности), 133 - вторую (испытание на небольшой группе тяжелобольных пациентов) и только 3 проекта (два по лечению рака мозга и один по гемофилии) - на заключительной третьей стадии (масштабные клинические испытания). Пока генная терапия применяется в основном в онкологии (более 60% проектов). Примерно по 15% приходится на генную терапию инфекционных (СПИД, гепатит В, туберкулез) и моно генных заболеваний (муковисцидоз, семейная гиперхолестеринемия, мукополисахаридозы, гемофилия А и др.).

Методы генной терапии позволяют лечить различные генетические патологии в период внутриутробного развития.

Генная терапия успешно применяется для лечения не только наследственных, но и значительно более распространенных мультифакториальных болезней (диабет, остеопороз, ревматоидный артрит, различные опухоли). Для лечения таких заболеваний применяется не

одна, а сразу много генетических конструкций, исправляющих дефекты различных стадий течения патологического процесса.

### ***Получение трансгенных животных***

Если вводить ДНК в клетки многоклеточного организма, то результатом трансформации будет изменение свойств лишь небольшого числа клеток, которые приобрели новый ген или гены. Следовательно, для изменения свойств всего организма следует изменять геном половых клеток, которые перенесут новые свойства потомкам. У растений и животных целесообразно изменять такие свойства, как скорость роста, устойчивость к заболеваниям, способность адаптироваться к новым внешним условиям. В качестве маркеров в этом случае можно использовать полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (AFLP), анализ мини-сателлитов, анализ микросателлитной ДНК (SSR), гибридизацию и т.д.

Разработаны способы введения генов в эмбриональные клетки млекопитающих, мух и некоторых растений. От работы с довольно крупными яйцами амфибий перешли к изучению яйцеклеток и эмбрионов мыши, которая представляет наиболее изученное в генетическом отношении млекопитающее.

Микроинъекцию клонированных генов производят в один или оба пронуклеуса только что оплодотворенной яйцеклетки мыши. Чаще выбирают мужской пронуклеус, принесенный сперматозоидом, так как его размеры больше. После инъекции яйцеклетку немедленно имплантируют в яйцевод приемной матери, или дают возможность развиваться в культуре до стадии бластоцисты, после чего имплантируют в матку.

Можно вводить ген в сперматозоиды и затем проводить ими оплодотворение. Таким образом были инъецированы гены интерферона и инсулина человека, ген  $\beta$ -глобина кролика, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса и кДНК вируса лейкемии мышей. Число молекул, вводимое за одну инъекцию, колеблется от 100 до 300 000, а их размер - от 5 до 50 кб. Выживает обычно 10 - 30% яйцеклеток, а доля мышей, родившихся из трансформированных яйцеклеток варьирует от нескольких до 40%. Таким образом, реальная эффективность составляет около 10%.

Интеграция чужеродных генов неспецифична по отношению к хромосомам, а число копий чужеродного гена может различаться от нескольких штук до 100 и более. Эти гены образуют группу тандемных повторов, объединенных по типу "голова к хвосту". Чужеродная ДНК после инъекции была обнаружена как в соматических, так и в половых клетках. Это означает, что интеграция проходит на самых ранних стадиях развития зиготы.

В нескольких случаях гетерологичная ДНК наследовалась в трех поколениях мышей, что свидетельствует о стабильной интеграции. Интегрировавшая в половые клетки ДНК передается как менделевский ген. Установлено, что уровень экспрессии чужеродного гена зависит от места интеграции ДНК с хромосомами и от степени ее метилирования, а также от дифференцировки тканей. В некоторых случаях удалось получить тканеспецифическую экспрессию. Важно отметить что специфические чужеродные гены можно встраивать в геном клетки таким образом, что они подчиняются нормальным регуляторным сигналам.

В 1981 году Константины и Лэси (Оксфорд) провели инъекцию в яйцеклетки мыши фрагменты хромосомной ДНК кролика длиной 19 килобаз. Эти фрагменты содержали ген  $\beta$ -глобина кролика. Яйцеклетки культивировали до стадии бластоцисты и имплантировали в матку. У 24 мышей, родившихся в результате развития имплантированных яйцеклеток, проведены частичная гепатэктомия. Анализ ДНК из клеток печени показал, что у 9 мышей встречается от 1 до 20 копий на клетку гена  $\beta$ -глобина. После спаривания 4 трансформированных самцов с нормальными самками получили потомство из 18 животных. 6 из них также имели ген  $\beta$ -глобина. Установлено, что интеграция гена в клетки



млекопитающих происходит случайным образом и не связана с конкретными областями хромосомы. Ген нестабилен, может быть утрачен или стать неактивным. Вместе с геном необходимо вводить регуляторные последовательности.

Метод введения генов в эмбриональные клетки имеет ограничения. Не всегда удается встроить чужеродную ДНК в заданный участок хромосомы. Разработанные методические примы пока не позволяют заменить имеющийся в геноме ген, вытесняя его, не всегда удается подчинить новый ген системе регуляции организма.

При трансгенозе могут возникать неожиданные проблемы. Например, одни из первых работ по генетической трансформации животных проводились путем встраивания генов гормона роста. Перенос гена гормона роста крысы мышам увеличивал рост мышей в 2 раза. Эксперименты по трансгенозу генов гормона роста быка кроликам также увенчались успехом. А вот аналогичные эксперименты по модификации крупного рогатого скота привели к увеличению прироста всего на 10-20%. Очевидно, это связано с тем, что у мышей сохраняется широкая норма реакции, и встраивание генов, увеличивающих количество гормона, заставляет генотип реализоваться максимально полно. У домашнего скота в результате направленной селекции организмы работают на верхнем пределе нормы реакции, отсюда ожидаемый эффект не проявился.

В нашей стране получены свиньи, несущие ген соматотропина. Они не отличались по темпам роста от нормальных животных, но изменение обмена веществ сказалось на содержании жира. У таких животных ингибировались процессы липогенеза и активировался синтез белка. К изменению обмена веществ приводило и встраивание генов инсулиноподобного фактора. Такие трансгенные свиньи были созданы для изучения цепочки биохимических превращений гормона, а побочным эффектом явилось укрепление иммунной системы.

Самая мощная белоксинтезирующая система находится в клетках молочной железы. Если поставить гены чужих белков под контроль казеинового промотора, то экспрессия этих генов будет мощной и стабильной, а белок будет накапливаться в молоке (животное-ферментер). Уже получены трансгенные коровы, в молоке которых содержится человеческий белок лактоферрин. Этот белок планируют применять для профилактики гастроэнтерологических заболеваний у людей с низкой иммунорезистентностью. Это больные СПИДом, недоношенные младенцы, больные раком, прошедшие радиотерапию. Ведутся клинические испытания такого молока. Уже сейчас корпорация Genzyme Transgenics планирует исследования с целью создания трансгенного крупного рогатого скота, содержащего в молоке человеческий альбумин. Был куплен патент на получение эмбрионов, содержащих геном клеток соединительной ткани (фибробластов), включающий ген, ответственный за синтез человеческого белка. Подобная технология позволяет увеличить эффективность создания трансгенных молочных животных, так как при обычном впрыскивании генов в оплодотворенную яйцеклетку рождается от только 5 - 10% трансформированных животных, из них - несколько самцов, не дающих молока.

Использование новой технологии клонирования позволяет получать животных только женского пола, дающих трансгенный протеин. Альбумин используется в терапии для поддержания осмотического давления в крови. Ежегодно в мире требуется около 440 тысяч литров плазмы крови для выделения этого белка (стоимость около 1,5 млрд. \$). Каждая молочная корова может произвести 80 кг рекомбинантного человеческого альбумина ежегодно. Genzyme Transgenics занимается разработкой аналогичных методов получения человеческого гормона роста и  $\beta$ -интерферона.

В Англии созданы трансгенные овцы, молоко которых содержит фактор свертывания крови.

В нашей стране были попытки создать овец, продуцирующих химозин (фермент для сыроварения). Было получено 2 овцы, у одной – ген не экспрессировался, у второй содержание химозина достигало 300 мг/л. Однако потомство этой овцы давало низкие удои – порядка 50 кг за период лактации. Причина заключалась в том, что химозин вырабатывается в виде предшественника – прохимозина, который превращается в активный фермент при рН=5. Было запланировано получать именно прохимозин, но в каких-то участках вымени происходило снижение рН, что приводило к активации химозина непосредственно в организме. Активный химозин свертывал молоко, а оно закупоривало протоки вымени. Сейчас пытаются решить эту проблему.

В Подмоскowie получены кролики, выделяющие  $\gamma$ -интерферон, эритропоэтин, но кролики не являются традиционными продуцентами молока. Эксперименты же по трансформации сельскохозяйственных животных очень дорогостоящи – одно трансгенное животное стоит десятки и сотни тысяч долларов.

Трансгенных животных получают и для целей ксенотрансплантации. Одним из любимых доноров органов являются свиньи, так как имеется анатомическое сходство органов и сходство иммунологических свойств. Реакции отторжения при трансплантации имеют сложный механизм. Одним из сигналов для атаки организма на чужой орган являются белки, локализованные на внешней поверхности мембраны. У трансгенных свиной эти белки заменены на человеческие.

Еще одно направление трансгеноза – получение устойчивых к болезням животных. Животноводство держится на вакцинах, так как селекция ведется преимущественно на хозяйственно ценные признаки – шерстистость, молочность и т. д. Повышение устойчивости – дело генных инженеров. К защитным белкам относятся интерфероны, поэтому ген интерферона встраивали различным животным. Трансгенные мыши получили устойчивость, они не болели или болели мало, а вот у свиной такого эффекта не обнаружено.

Другое направление – введение генов, кодирующих антисмысловую РНК. Для животноводства острой проблемой являются лейкозы, вызываемые РНК-вирусами. Трансгенные кролики, несущие гены, отвечающие за присутствие в клетке антисмысловой РНК, были устойчивы к лейкозам.

Трансгенных животных можно использовать для изучения наследственных заболеваний мозга и нервной системы. Гены болезни Альцгеймера (отложение белка  $\beta$ -амилоида приводит к образованию характерных бляшек) и гены, отвечающие за развитие эпилепсии, болезней мозга вводятся в геном нормальных животных; при этом получают трансгенных животных-моделей, на которых можно испытывать различные терапевтические приемы.

Трансгенных животных стали использовать для исследования воспалительных и иммунологических заболеваний человека, например, ревматоидного артрита. Моделируются болезни, связанные с липидным обменом.

## **5. Образовательные технологии, включая интерактивные формы обучения**

Освоение дисциплины предполагает использование как традиционных (лекции, практические занятия с использованием методических материалов), так и инновационных образовательных технологий с использованием в учебном процессе активных и интерактивных форм проведения занятий: лекции визуализации, практические занятия: мозговые штурмы, дискуссии, выполнение ряда практических заданий с использованием профессиональных программных средств создания и ведения электронных баз данных; мультимедийных программ, включающих подготовку и выступления студентов на семинарских занятиях.

## **6. Оценочные средства для текущего контроля успеваемости, промежуточной аттестации по итогам освоения дисциплины и учебно-методическое обеспечение самостоятельной работы студентов**

**Тема 1.** Предмет и содержание клеточной и генной инженерии, взаимосвязь с другими предметами. История развития предмета и основные достижения современного этапа.

**Тема 2.** Биообъекты как средство производства лекарственных, профилактических и диагностических средств.

**Тема 3.** Сохранение биоразнообразия жизни: банк биоматериалов. Методы криоконсервации биологического материала.

**Тема 4.** Метод клонирования - теоретические основы и перспективы применения.

**Тема 6.** Биопрепараты применяемые в медицине. Гликопротеиды - лектины их структура и биологическое действие. Получение антител, интерферона и интерлейкина, съедобных вакцин: свойства и использование, клонирование и экспрессия, производство.

**Тема 7.** Использование растений как зеленые ферментеры по производству биологически активных соединений. Методы повышения синтеза вещества-интереса в культуре клеток и тканей растений.

**Тема 8.** Создание искусственных живых систем и самоуправляемые биосистемы.

**Тема 9.** Структура и транскрипция эукариотических генов

**Тема 10.** Экспресс-диагностика, анализ и оценка генетически реконструированного материала.

**Тема 11.** Можно ли использовать трансгенные технологии для создания новых видов биологического оружия? Явление биотерроризма.

## **Литература**

### **Основная литература:**

1. **Наноструктуры в биомедицине** [Электронный ресурс] / под ред. К. Гонсалвес, К. Хальберштадт, К. Лоренсин, Л. Наир; пер. с англ. - 2-е изд. (эл.). - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013.- 519 с.: <http://znanium.com/bookread.php?book=477298>  
ЭБС  
"Знаниум"
2. **Биотехнология: теория и практика**/ Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А.Живухина; под ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. - М.: Оникс, 2009. - 492 с. - 57 экз.
3. Оганесян А., Вардапетян Г./ «Зеленая биотехнология», **Культуры растительных клеток и тканей в биологии и медицине**. Издательство «Асогик» 2017. Проект ВМЕ-ЕНА “Темпус инициатива в сфере Биомедицинского инженерного образования в регионе Восточного Соседства”. ISBN 978-9939-50-352-3.
4. Bernard R. Glick, T. L. Delovitch, Cheryl L. **Patten Medical Biotechnology**, ASM Press, 2014

### **Интернет-ресурсы:**

Каталог русскоязычных медицинских сайтов и статей - <http://www.medlook.ru/>

Molbiol.ru - <http://molbiol.ru/>

Научно-информационный журнал ?Биофайл? - <http://biofile.ru/bio/5241.html>

Научные журналы по биологии - <http://www.jcbi.ru/links/journals.htm>

Онлайн Книги - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Books>

8. Материально-техническое обеспечение дисциплины(модуля)

Освоение дисциплины предполагает использование следующего материально-технического обеспечения: наличие соответствующего лабораторного оборудования, комплекты необходимой литературы в соответствии с требованиями государственных образовательных стандартов с соблюдением авторских и смежных прав. мультимедийный проектор, компьютер с доступом в интернет.

Для проведения лекционных занятий необходимы: мультимедийный проектор, ноутбук и экран.

Лаборатория включает перечень оборудования, необходимого для обеспечения преподавания дисциплины и проведения НИР .

1. Компьютер с монитором.
2. Центрифуга лабораторная медицинская ОПн — 8 (ШХ 2 779.040 ПС);
3. Мини центрифуга/вортекс Микроспин FV-2400 (Biosan);
4. Холодильник;
5. Морозильник;
6. Весы технические AND HL-400;
7. Весы настольные механические Beurer MS01 ;
8. Ламинарный Бокс;
9. Устройство для очистки и стерилизации воздуха;
10. Дистиллятор;
11. Автоклав;
12. Климатический шкаф;
13. Магнитная мешалка с нагревом «Biosan MSH-300»;
14. Камера для вертикального;
15. Камера для горизонтального электрофореза SE — 2 (ООО «Компания Хеликон» г.Москва,Россия);
16. Автоматические дозаторы 0.2-2/ 2- 20/ 20-200/ 200-1000/ 1000-10000 мкл.
18. рН- метр.