

УДК 543.9

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ – ВАЖНЕЙШИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОЙ БИОПРОДУКЦИИ

Востоков В.М., Смирнова В.М., Пачурин Г.В.

*ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный технический университет им. Р.А. Алексеева»,
Нижегород, e-mail: pachuringv@mail.ru*

Исследованы особенности количественной оценки качества и экологической безопасности промышленной биопродукции, в том числе генетически модифицированных лекарственных препаратов целевого назначения. Впервые указано на актуальную необходимость оценки качества биопродукции по двум показателям качества одновременно – по массовой доле контролируемого биологически активного вещества (БАВ) и – по величине биологической активности, зависимой не только от массовой доли БАВ, но и от других факторов влияния на ожидаемый биологический эффект. Предложена концептуально новая стратегия контроля и управления качеством ГМ-биопродукции и априорной оценки экологического риска микробиологических производств, в рамках современной методологии Prevention Pollution. Установлены научные принципы и численные критерии. Даны практические рекомендации по выбору приемлемого метода экоаналитического контроля и разработки МВИ, адекватной биопроцессу. Показана возможность априорной оценки экологического риска ГМ-биопродукции.

Ключевые слова: биологическая активность, качество и критерии качества биопродукции, априорная оценка экологического риска ГМ-биопродукции и микробиологических производств

BIOLOGICAL ACTIVITY IS THE MOST IMPORTANT QUALITY OF MEDICINAL BIOPRODUCTION

Vostokov V.M., Smirnova V.M., Pachurin G.V.

Nizhny Novgorod State Technical University R.A. Alexeev, Nizhny Novgorod, e-mail: pachuringv@mail.ru

The features of a quantitative assessment of the quality and environmental safety of industrial bioproducts, including genetically modified medicines for the intended purpose, are investigated. For the first time, the actual need to assess the quality of bioproducts by two quality indicators at the same time – by the mass fraction of the controlled biologically active substance (BAS) and – by the amount of biological activity dependent not only on the mass fraction of BAS but also on other factors influencing the expected biological effect is pointed out for the first time. A conceptually new strategy for controlling and managing the quality of GM bioproducts and a priori assessment of the environmental risk of microbiological production in the framework of the modern Prevention Pollution methodology is proposed. Scientific principles and numerical criteria have been established. Practical recommendations are given on the choice of an acceptable method of ecoanalytical control and development of the MVI, an adequate bioprocess. The possibility of an a priori assessment of the environmental risk of GM bioproducts is shown.

Keywords: biological activity, quality and quality criteria for bioproducts, a priori assessment of the environmental risk of GM bioproducts and microbiological productions

В нормах национальной «Системы сертификации ГОСТ Р» (ГСС), в «Государственной Фармакопее», как и в иных государственных нормативных документах (НД), созданных еще в эпоху плановой экономики, не находят отражения специфические особенности количественной оценки биологических объектов. Так, в единых нормах ГСС предусмотрена лишь численная оценка качества выпускаемой продукции по массовой доле ($m, \%$) некоего контролируемого, полезного или вредного ингредиента. Но, к сожалению, в действующей до сих пор национальной «Системе сертификации ГОСТ Р», созданной еще в эпоху плановой экономики, даже не предусмотрена численная оценка качества биопродукции по величине биологической активности $A_{\text{БАВ}}$ – важнейшему показателю качества биопродукции, что уже становится сдерживающим фактором развития отечественных биотех-

нологий, созданных на основе последних достижений геной инженерии и молекулярной биологии [1].

Если для оценки качества, скажем, химической продукции достаточно определить массовую долю контролируемого ингредиента – $m, \%$, то для достоверной оценки величины биологической (физиологической) активности невозможно оценить ни качество выпускаемой биопродукции, ни экологический риск биотехнологического производства. В данном случае всякий раз потребуются исследовать весь комплекс ингредиентов и факторов внешнего воздействия на ожидаемый биологический эффект.

Трудности и особенности количественной оценки величины биологической активности и экологического риска лекарственных средств, витаминов, белково-витаминных, пищевых, кормовых добавок

и иных биологически активных веществ (БАВ), бесспорно, сдерживают процесс реализации в биопроизводство современных систем менеджмента качества – СМК.

На необходимость гибкого и системного подхода к решению актуальных задач выходного контроля и сертификации промышленной биопродукции указывал еще нобелевский лауреат по химии (1965 г.), американский профессор Роберт Вудворд, который в своих работах по стехиометрии равновесных процессов органического синтеза витамина B_{12} впервые применил научный термин «биологическая активность», установил влияние биохимического синергизма и метаболизма БАВ на величину $A_{\text{БАВ}}$ и ее зависимость от факторов внешнего воздействия на ожидаемый биологический эффект [2, 3].

Выводы проф. Вудворда, сделанные им по результатам блестяще выполненных экспериментальных работ по стехиометрии органического синтеза некоторых лекарственных средств – хинина, витамина B_{12} , антибиотиков и иных БАВ, были затем реализованы в новых биотехнологиях и в современных системах экоаналитического контроля и менеджмента качества выпускаемой биопродукции. Результаты фундаментальных исследований, полученные Р.Б. Вудвордом, в корне изменили взгляд на существующие стереотипы экоаналитического контроля биопроизводства. В частно-

сти, вместо устаревших, но пока действующих методов и средств контроля, созданных на заре развития отечественной микробиологической промышленности, сегодня востребованы эффективно действующие СМК, оснащенные методами и средствами контроля, адекватными биопроцессу.

Научные принципы Р.Б. Вудворда, как и предложенные в данной работе результаты научно-технических разработок в сфере контроля и управления качеством биопродукции, безусловно, внесут определенный вклад в развитие нового научного направления аналитической химии – «Анализ БАВ. Методы и средства экоаналитического контроля целевой, генетически модифицированной биопродукции». Так, по результатам ранее выполненных работ [4, 5] были выявлены и систематизированы научные принципы и критерии количественной оценки биологических объектов, представленные в табл. 1.

Хотя указанные принципы имеют лишь рекомендательный характер, но с их помощью нетрудно сделать выбор оптимального метода экоаналитического контроля и создать МВИ, адекватную биопроцессу. Затем, после проверки указанной МВИ по численному критерию адекватности биопроцессу (ф.1), МВИ можно реализовать в комплексной, эффективно действующей системе менеджмента качества современного биопроизводства (СМК).

Таблица 1

Научные принципы и критерии количественной оценки БАВ, реализованные в гибридных МВИ физико-химической диагностики биоматериалов

Принципы и условия количественной оценки БАВ	Область применения	Реализованы в методах анализа
● Принцип объективной оценки качества биопродукции по двум показателям: массовой доле контролируемого БАВ и его биоактивности одновременно	Экоаналитический контроль биопродукции	Гибридные методы ТСХ + флуориметрия ТСХ+фотометрия ВЭЖХ и т.д.
● Принцип предварительного разделения на две условных категории: БАВ-электролитов и БАВ-неэлектролитов	Анализ водных и неводных растворов БАВ	Инструментальная титриметрия Жидкостная хроматография
● Принцип выполнения всех аналитических операций в предельно «мягких» условиях жидкой фазы, близких к условиям естественного течения биологического процесса	Контроль и диагностика биоматериалов	Физико-химический жидкофазный анализ
● Аргументированный выбор оптимального метода диагностики биоматериалов, по численным и атрибутивным критериям, с учетом специфических особенностей анализа исследуемой биосистемы	Экомониторинг и диагностика биоматериалов	Гибридные методы анализа. Титриметрия. Хроматография. ВЭЖХ, ТСХ
● Выбор оптимального метода контроля, по численному критерию его адекватности биопроцессу, $K_{\text{А/м}} = A_{\text{БАВ}}/m_{\text{БАВ}}$. Применение высокоинформативных методов анализа и гибридных МВИ диагностики биоматериалов, адекватных биопроцессу	Новые аналитические технологии	ТСХ и ВЭЖХ Неводное титрование. Экстракционные методы фотометрии и флуориметрии

В работе [4] приведены убедительные доказательства того, что контролируемая величина биологической активности $A_{\text{БАВ}}$ строго соответствует $m_{\text{БАВ}}$ лишь в случае реализации в экоаналитическом контроле биопроизводства приемлемой МВИ, адекватной биопроцессу.

В данной ситуации соотношение контролируемых величин $A_{\text{БАВ}}/m_{\text{БАВ}} = \text{const}$, то есть оно сохраняет постоянное численное значение. Следовательно, указанная константа $K_{A/m}$ может быть использована в качестве численного критерия адекватности МВИ биопроцессу:

$$K_{A/m} = A_{\text{БАВ}} / m_{\text{БАВ}}.$$

Необходимо сказать, что выбор метода или средства контроля по критерию адекватности контролируемому биотехнологическому процессу зачастую бывает определяющим. Так, например, крупнейшее бройлерное объединение «Линдовская птицефабрика-племзавод» приобрело за рубежом уникальный прецизионный ИК-спектроскоп целевого предназначения, с встроенным микропроцессором и программным обеспечением. Прибор был предназначен для непрерывного контроля аминокислотного состава поступающего на птицефабрику комбикормового сырья. Но программное обеспечение прибора, рассчитанное на анализ лишь соевого белка, не позволяло расшифровать аминокислотный состав других растительных белков. В данном случае высокоточный и чувствительный анализатор белка оказался практически непригодным из-за неадекватности данной МВИ биотехнологическому процессу кормления животных и птицы.

Можно рассмотреть другой весьма показательный пример непрофессиональной оценки качества и экологической чистоты комбикормов, премиксов, кормовых концентратов и витаминно-минеральных добавок, обогащенных витамином D , поступающих на с/х предприятия АПК, а именно на птицефабрики, фермы для крупного рогатого скота, свиноводческие комплексы и пр. Кстати, аналогичные ошибки и промахи, обусловленные неадекватностью МВИ биопроцессу, могут случиться при оценке качества лекарственной продукции, что вообще недопустимо. Речь идет о хроматографическом анализе комбикормов или премиксов на содержание витамина D , в состав которого могут входить два метаболита, обладающих наиболее высокой D -витаминной активностью – эргокальциферол (D_2) и холекальциферол (D_3). Так как оба провитамина имеют близкие молекулярные массы и почти одинаковые физико-химические свойства,

то на хроматограмме ВЭЖХ они идентифицируются одним пиком, что позволяет определить общую массовую долю витамина D , которую можно пересчитать на суммарную D -витаминную активность. Однако подобная оценка D -витаминной активности справедлива при составлении правильных рационов кормления птицы, хорошо усваивающей D_2 и D_3 , уже недопустима при кормлении сычужовых животных, которые усваивают лишь витамин D_2 . Кроме того, холекальциферол (D_3) не только не усваивается сычужовыми животными, но он просто опасен для них, являясь токсикантом.

Еще больше проблем возникает при неверной оценке качества лекарственной биопродукции по массовой доле биологически активных компонентов. Кстати, передозировка тех же жирорастворимых витаминов – A , D и E не менее опасна, чем их недостаток. А что уж говорить об ошибках при оценке биологической активности антибиотиков, гормональных средств и т.д. Не случайно по числу летальных исходов от передозировки лекарственными средствами они вышли на третье место после исходов от сердечно-сосудистых и канцерогенных заболеваний.

Что касается обязательной сертификации лекарственной биопродукции на ее соответствие ФС, СанПиН или иным НД, то она в плане достоверной оценки величины биологической активности не имеет смысла. Также бессмысленно оценивать экологический риск фармацевтического производства по результатам глобального экомониторинга «в поле», поскольку данный весьма дорогостоящий проект может превратиться в пустую формальность. Здесь наиболее опасным загрязнителем окружающей природной среды (ОПС) является сама недоброкачественная и порой генетически модифицированная биопродукция, которая, распространяясь по различным регионам и природно-климатическим зонам, способна оказать двойное – токсическое и генетическое воздействие на объекты биосферы.

Но если последствия токсического воздействия еще можно оценить по результатам экологического мониторинга «в поле», то по результатам экомониторинга невозможно проследить за последствиями генетического загрязнения объектов ОПС, так как непредсказуемые мутации возникают не сразу, а зачастую во втором или третьем поколении. К тому же опасен лишь острый мутагенез, ведущий к гибели всей популяции. А незначительные (фоновые) мутации не опасны. Наоборот, они являются неотъемлемой составной частью естественного эволюционного процесса, без которого

живой организм не способен приспособиться к новым, непривычным условиям существования.

Исходя из данной позиции, разработана новая стратегия и тактика экоаналитического контроля качества и безопасности лекарственной ГМ-биопродукции, включая априорную оценку экологического риска фармацевтического производства, в рамках современной методологии *Prevention Pollution* [4–6], что уже позволяет предупреждать угрозы возможных экологических катастроф, управляя качеством по результатам выборочного контроля [7].

В настоящее время проблема априорной оценки генетического риска микробиологических производств, становятся все более актуальной. Без ее скорейшего решения человечество вряд ли сумеет противостоять катаклизмам природы или непредсказуемым последствиям антропогенного воздействия заводов БВК и ГДЗ на объекты ОПС. Особую озабоченность вызывают бурно развивающиеся в XXI веке генно-инженерные технологии производства дрожжевого белка (кормовых дрожжей); альтернативного биотоплива; генетически модифицированных лекарственных средств и иной ГМ-продукции целевого предназначения, где в качестве рабочих штаммов широко применяются генетически модифицированные микроорганизмы (ГМО).

Сдерживающим фактором развития современных нанобиотехнологий является риск загрязнения биосферы ГМ-биопродукцией. Но ее воздействие на природу пока недостаточно изучено. За почти полувековую практику производства ГМ-биопродукции до сих пор не было получено убедительных доказательств ее прямого генетического воздействия на живые организмы. Тем не менее угроза надвигающейся экологической катастрофы всегда остается, так как вызывает опасение постепенное накопление чужеродных ГМО в биотехнофере, что в итоге может привести к нарушению генетического баланса в живой природе, со всеми непредсказуемыми последствиями.

Поэтому научные разработки по достоверной оценке генетического риска микробиологических производств становятся весьма актуальными [8].

В работах [4, 5] впервые показана реальная возможность априорной оценки генетического риска микробиологического производства ГМ-модифицированных кормовых дрожжей – целевой продукции гидролизно-дрожжевых заводов по производству кормового белка, а именно, Астраханского ГДЗ, Волжского ГДЗ и Кировского БХЗ, построенных по одному проекту.

В табл. 2 представлены сравнительные результаты испытаний образцов целевой продукции указанных заводов на содержание белка, определяемого двумя методами, отличающихся по селективности и достоверности результатов контроля.

Неселективным методом Барнштейна определяют массовую долю белка, – m_b , включающую фракцию истинного белка (протеина) – m_{π} и нуклеотидную фракцию белка – $m_{\text{нкл}}$. Селективным, фотометрическим методом, по реакции Лоури, определяют массовую долю протеинов – m_{π} . По разности $m_b - m_{\pi} = m_{\text{нкл}}$ нетрудно вычислить массовую долю генетически модифицированных нуклеотидов [4], из которых, как известно, формируются нуклеиновые кислоты – ДНК и РНК, ответственные за генетический код наследственности. Согласно высказанной нами [5] научной гипотезе уровень (степень) генетической модифицированности кормового белка косвенно зависит от массовой доли генно модифицированных нуклеотидов – $m_{\text{нкл}}$. А по содержанию нуклеотидов в белке (табл. 2) можно оценить качество и степень модификации дрожжей, выпускаемых ГДЗ [5].

Если принять за норму качества дрожжей гидролизного производства массовую долю ГМ-нуклеотидов в кормовом белке, равную 10%, то сравнивая норму качества с найденной долей нуклеотидов (табл. 2), можно сделать вывод о том, что ГМ-продукция указанных заводов в целом отвечает заданным требованиям, в отношении ее генетического риска.

Астраханский ГДЗ выпускает кормовые дрожжи высокого качества, а его генетический риск не превышает допустимых пределов. В кормовых дрожжах Волжского и Кировского заводов обнаружено повышенное содержание нуклеотидов, что указывает на незначительный генетический риск. Возможно, что это не потребует серьезной коррекции технологии микробиологического производства, а лишь потребует внести коррективы в систему управления качеством микробиологического производства.

Подобная численная оценка уровня модифицированности дрожжей, непосредственно на производстве, в рамках методологии *Prevention Pollution*, безусловно, позволит выявить основные факторы влияния на генетический риск других ГДЗ, выпускающих кормовые дрожжи. В данном случае критерием качества выпускаемых кормовых дрожжей является низкий уровень их генетической модификации, который может быть установлен по результатам выходного контроля, непосредственно, в ЗЛ микробиологического производства кормового белка [5].

Таблица 2

Оценка содержания нуклеотидов по разности результатов определения белка методом Барнштейна и фотометрическим методом

Контролируемые заводы	Массовая доля в «истинного» белка и протеинов, %		Массовая доля нуклеотидов в дрожжах, %	Доля нуклеотидов в белке, %	Примечания
1	2		3	4	5
Астраханский ГДЗ	52,54	48,94	3,60	6,8	Генетический риск отсутствует
Волжский ГДЗ	33,36	30,02	3,34	10,2	Повышенный генетический риск
Кировский БХЗ	40,40	35,94	4,46	11,0	

Но в случае промышленного микробиосинтеза лекарственной ГМ-продукции, где исходным сырьем являются ГМ-дрожжи, меняются приоритеты и показатели качества указанных дрожжей. Так, дрожжи с высоким уровнем генетической модификации, признанные непригодными в рационах кормления животных и птицы, уже являются питательной средой в технологиях микробиосинтеза ГМ-антибиотиков целевого предназначения. С целью повышения качества и физиологической активности ГМ-лекарственных веществ, получаемых на ГМ-дрожжевой питательной основе, достаточно повысить уровень генетической модификации указанных биотических средств, путем применения в качестве питательной среды ГМ-дрожжей, с высоким уровнем генетической модификации. Однако данная гипотеза требует дальнейшей практической проверки.

Список литературы

1. ГОСТ 32044.1-2012 (ISO 5983-1:2005) Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Определение массовой доли азота и вычисление массовой доли сырого протеина. Часть 1. Метод Кьельдаля; – Введ. 2014-07-01. – М.: Стандартинформ, 2014. – 15 с.
2. Woodward R.B. The stoichiometry of the vitamin B₁₂ / R.B. Woodward // Pure Appl. Chem. – 1973. – V. 33 – P. 145–177.
3. Смит Л. Витамин В₁₂. Пер. с англ. – М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. – 175 с.
4. Востоков В.М. Оценка экологического риска биопроизводства / В.М. Востоков, В.М. Смирнова, Г.Л. Дегтяренко // Тр. НГТУ им. Р.Е. Алексеева. – 2011. – № 1(86). – С. 243–251.
5. Востоков В.М., Смирнова В.М., Пачурин Г.В. Особенности экоаналитического контроля качества биопродукции и оценки экологического риска биопроизводства // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9. – С. 2516–2625.
6. Салимова Т.А. Управление качеством учеб. по специальности «Менеджмент организации» / Т.А. Салимова. – 2-е изд., стер. – М.: Издательство «ОмегаЛ», 2008. – 414 с.
7. Коростелева Л.А., Кошаев А.Г. Основы экологии микроорганизмов. – СПб.: Изд-во «Лань», 2013. – 240 с.
8. Василов Р.Г., Трубников В.И. О Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2012. – Т. 8, № 3. – С. 46–52.