

Вивчення впливу різних факторів культивування дозволило отримати гібридні проростки з зав'язей і зародків абрикоса, сливи, аличі та розробити біотехнологічні прийоми створення нових селекційних форм садових рослин.

The studying of influence of different factors of cultivation allowed to obtain the hybrid germs from ovaries and embryos of apricot, cherry-plum, plum and to work out the biotechnological methods of obtaining new selection forms of horticultural plants.

МАЛЬЦЕВ Д.И.¹, ЯМСКОВА В.П.², ИЛЬИНА А.П.¹, МАРГАСЮК Д.В.¹, ЯМСКОВ И.А.¹.

¹Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28, e-mail: mal-dima@yandex.ru

²Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Впервые биорегуляторы данной группы были обнаружены в печени млекопитающих как адгезивные белки [1]. Впоследствии присутствие этих белков было показано для многих тканей позвоночных животных [2–8]. На основании сходства их физико-химических свойств и характера биологической активности они были выделены в отдельную группу. Активность биорегуляторов характеризуется отсутствием видовой, но проявлением тканевой специфичности [5–9]. Показано, что в основе протекторного действия и ранозаживляющих свойств биорегуляторов лежит их способность активировать клеточные источники регенерации в тканях [5]. Биорегуляторы данной группы представляют собой сложные ассоциаты белков, углеводов, липидов, весьма устойчивые к воздействию ряда физико-химических факторов [4–10]. Важнейшим свойством биорегуляторов является их способность присутствовать в водных растворах в виде частиц размером 100–200 нм и проявлять свою активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих 10^{-8} – 10^{-15} мг белка/мл [3].

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование биорегуляторов, выделенных из печени крыс и печени быка. С помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии был изучен состав пептидов, входящих в их состав. На модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* было изучено протекторное действие данных биорегуляторов.

Материалы и методы

Экстракты получали по методике, ранее разработанной для биорегуляторов данной группы [2, 4]. Количественное определение белка в исследуе-

мых фракциях осуществляли с помощью колориметрического метода с использованием бицинохонината меди при 562 нм. Во время очистки во всех фракциях идентифицировали биорегуляторы с помощью адгезиометрического метода, в основе которого лежит определение их мембранотропной активности [2, 4]. Анализ молекулярной массы пептидов проводили методом MALDI-TOF на времяпролетном масс-спектрометре Ultra Flex 2 (Bruker Daltonic, Германия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в линейном режиме и режиме рефлектора. Образцы для масс-спектрометрического анализа получали упариванием досуха, с последующим разведением в 70% ацетонитриле, содержащем 0,1% ТФУ. В качестве матрицы в работе использовали а-циано-4-гидроксицианомовую кислоту. состояние ткани печени тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*.

Результаты и обсуждение

Для выделения и очистки биорегуляторов был использован экспериментальный подход, разработанный для биорегуляторов данной группы [4]. Этот метод включает выделение биорегуляторов из ткани в определенных условиях, которые заключаются в экстракции физиологическим раствором ткани, неповрежденной ферментативной и механическим воздействиями. Ранее предполагалось, что экстракция биорегуляторов является следствием их секреции клетками печени [5–10]. Получение биорегуляторов данной группы из замороженной ткани печени быка указывает на то, что биорегуляторы присутствуют в ткани, очевидно, в межклеточном пространстве, из которого “вымываются” в экстрагирующий раствор.

Исследование мембранотропной активности экстрактов печени крысы и быка показало, что оба экстракта проявляют этот тип активности, характерный для биорегуляторов данной группы [4]. В качестве примера на рис. 1 представлена диаграмма, отражающая полимодальную дозовую зависимость мембранотропной активности экстракта печени быка.

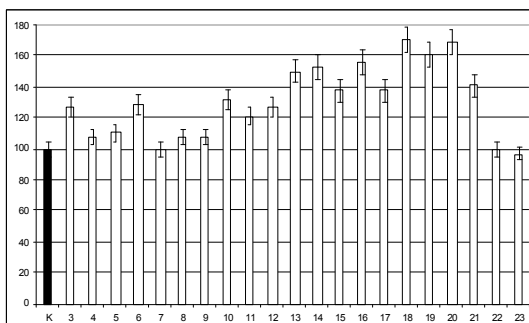


Рис. 1. Мембранотропная активность экстракта печени быка.

По абсциссе — показатель степени последовательного 10-кратного разбавления исходного препарата; по ординате — значение показателя, отражающего мембранотропную активность

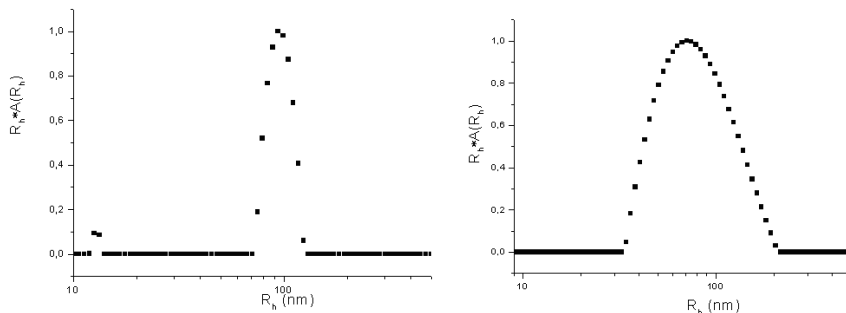


Рис. 2. Распределение частиц по гидродинамическому радиусу (метод лазерного динамического светорассеивания):

A — в растворе супернатанта экстракта печени крысы; *б* — в растворе супернатанта экстракта печени быка. По абсциссе — средний гидродинамический радиус частиц; по ординате — количество частиц с соответствующим радиусом

При высаливании тканевых экстрактов сернокислым аммонием происходит значительная очистка биорегуляторов: примесные белки переходят в осадок, а биорегуляторы остаются в растворенном состоянии [2, 4]. Действительно, осадки экстрактов печени не обладали активностью, а супернатанты экстрактов проявляли ее в СМД. Исследование супернатантов экстрактов методом динамического лазерного светорассеивания, показало, что в них присутствуют частицы, средний гидродинамический радиус которых составлял 70–150 нм. Распределение этих частиц в обеих фракциях супернатантов было унимодальным. На рис. 2 представлены кривые распределения по размеру частиц, присутствующих в супернатантах печени крысы и быка. Эти данные совпадают с результатами исследования биорегуляторов, выделенных из других тканей млекопитающих, и показывают, что на данной стадии очистки биорегуляторы печени присутствуют в виде наноразмерных частиц [5–10].

При исследовании методом MALDI-TOF масс-спектрометрии в фракции супернатанта, выделенного из экстракта печени крысы, были идентифицированы пептиды с мол. массой 3648 и 5024±2 Да, а из печени быка — 2112, 2170, 2866, 2940, 3009, 3151, 5026, 5237±2 Да. В этом аспекте обращает внимание присутствие в обоих супернатантах пептида с мол. массой 5026±2 Да. Можно предположить, что именно этот пептид входит в состав биорегуляторов печени млекопитающих двух видов, и что он отвечает за тканеспецифическую активность биорегуляторов печени. Действительно, на модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro*, разработанной для изучения специфической активности биорегуляторов, выделенных из ткани печени млекопитающих [7], было показано, что оба супернатанта оказывают практически одинаковое выраженное протекторное действие на состояние культуры срезы печени тритона.

На рис. 3 представлены гистологические срезы интактной печени тритона, а также ткани после 3-х дневного роллерного культивирования. Как

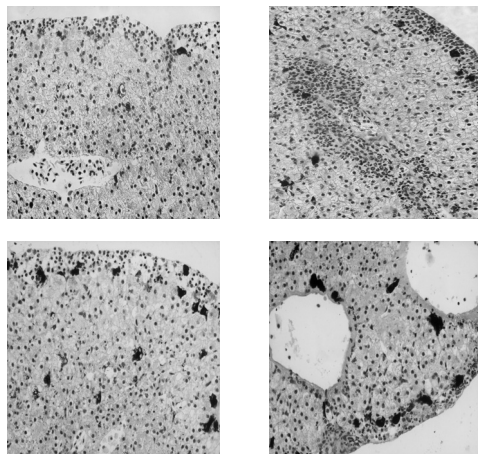


Рис. 3. Гистологические срезы печени тритона:

а — интактная печень тритона; *б* — после 3-х дневного органотипического роллерного культивирования, без добавления биорегуляторов (контроль); *в* — после 3-х дневного органотипического роллерного культивирования, при добавлении супернатанта экстракта печени быка; *г* — после 3-х дневного органотипического роллерного культивирования, при добавлении супернатанта экстракта печени крысы

видно, после культивирования в ткани печени наблюдаются процессы деградации: часть паренхиматозных клеток находится в состоянии апоптоза, нарушаются адгезионные и контактные межклеточные взаимодействия, нарушаются процессы кроветворения.

Следует отметить сохранение структуры ткани печени и кроветворных клеток при действии в СМД обоих супернатантов по сравнению с культурами контрольной серии: сохраняется балочное строение ткани печени и кроветворение в субкапсулярной области и вокруг сосудов, поддерживаются адгезионные, контактные взаимодействия между клетками, а также их жизнеспособность, то есть состояние ткани наиболее приближается к состоянию интактной печени тритона.

Кроме того при добавлении в СМД супернатантов печени быка и крысы было выявлено статистически достоверное увеличение приблизительно на 50% площади, занимаемой меланомacroфагами в ткани печени тритона, по сравнению с культурами контрольной серии ($p < 0,05$), а также по сравнению с интактной печенью тритона, в которой площадь, занимаемая пигментированными клетками соответствовала $2,9 \pm 0,4\%$ от общей площади среза ($p < 0,05$). Различия в биологическом действии обоих супернатантов не было обнаружено ($p > 0,5$) (табл.).

Последнее можно ценить как стимулирование в печени тритона защитной функции ткани, которая развивается в ответ на повреждающие условия культивирования.

Площадь пигментированных клеток в печени тритона при роллерном культивировании

Исследованная фракция	Площадь, занимаемая пигментированными клетками в % от общей площади среза
Контроль (физ. раствор)	2,54±0,23
Супернатант экстракта печени крысы	4,27±0,46
Супернатант экстракта печени быка	3,8±0,33

Из литературных источников известно, что у хвостатых амфибий при неблагоприятных условиях (изменение температуры, интоксикация, гипоксемия и др.) меланомакрофаги печени, являющиеся аналогами клеток Купфера млекопитающих, способны образовывать крупные скопления [11]. Эти клетки располагаются как в кортикальном слое, так и в паренхиме печени, часто по периферии сосудов и в лимфатических щелях, в основном, в виде скопленный темно-бурого или черного цвета, окруженных соединительнотканными клетками, идентичными кортикальным. Основной функцией меланомакрофагов печени амфибий, как и купферовских клеток у млекопитающих, является фагоцитоз различных бактерий, вирусных частиц, клеточного детрита и другие частицы размером до 10 нм, а также осуществление процессов детоксикации организма [11–14]. При неблагоприятных условиях внешней среды, а также при интоксикации организма у амфибий в печени увеличивается площадь кластеров меланомакрофагов [11]. Поэтому экспериментально установленный факт влияния биорегуляторов, выделенных из печени млекопитающих двух видов, на площадь пигментированных клеток в печени тритона еще раз подтверждает гепатопротекторное действие этих эндогенных веществ.

Литература

1. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. // Молекул. биология.— 1977.— Т.11.— №5.— С. 1147–1154.
2. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биологии.— 1991.— Т.52.— №2.— С. 181–191.
3. Ямскова В.П., Скрипникова В.С., Краснов М.С., Ямсков И.А. // Биохимия.— 2009.— Т.74.— №9.— С. 1195–1203.
4. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н. и др. // Рос. Хим. Журн.— 1999.— Т.43, №5.— С. 34–39.
5. Margasyuk, D.V., Krasnov, M.S., Blagodatskikh, I.V. et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 47–59.
6. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. (2007) // In Biochemical Physics Frontal Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 28–37.
7. Borisenko, A.V., Yamskova, V.P., Krasnov, M.S et al . et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 35–46.
8. Yamskova, V.P., Krasnov, M.S., Rybakova, E.Yu., Vecherkin., et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 71–78.

9. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S. et al // In: New Trends in Biochemical Physics Research, NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 73–82.

10. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V. et al // In Biochemical Physics Frontal Research.— NY, Nova Science Publishers Inc.— 2007.— P. 57–70.

11. Sichel G., Scalia M., Corsaro C. // Microsc. Res. Tech.— 2002.— V.57.— P. 477–490.

12. Cicero R, Sciuto S, Chillemi R, Sichel G. // Comp Biochem Physiol.— 1982.— V.73A.— P. 477–479.

13. Corsaro C., Scalia M., Blanco A.R., et al // Pigment. Cell Res.— 1995.— V.8.— P. 279–282.

14. Corsaro C., Scalia M., Leotta N., et al // J. Anat.— 2000.— V.196.— P. 249–261.

Резюме

Показано, что биорегуляторы, выделенные из печени быка и крысы, оказывают в сверхмалых дозах гепатопротекторное действие на экспериментальной модели роллерной органоспецифической культуры печени тритона *Pleurodeles waltl*. В состав данных биорегуляторов входит пептид с молекулярной массой 5026±2 Да, ответственный за их тканеспецифическую активность.

It was shown that bioregulators isolated from bovine and rat livers, hepatoprotective effect at ultra low doses on the experimental model roller organotypic liver culture of newt *Pleurodeles waltl*. There is a peptide with molecular weight of 5026±2 Da, responsible for tissue-specific activity of bioregulators in their composition.

Показано, що біорегулятори, виділені з печінки быка і пацюка, мають у надмалих дозах гепатопротекторну дію на експериментальній роллерній моделі органоспецифічної культури печінки тритона *Pleurodeles waltl*. До складу даних біорегуляторів входить пептид з молекулярною масою 5026±2 Да, відповідальний за їх тканинспецифічну активність.

**МАТВЕЕВА А.Ю.¹, КОРЖ Л.П.¹, ХРИСТАН О.О.¹, МОРГУН Б.В.²,
ТИЩЕНКО Е.Н.¹**

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltuko@gmail.com

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148

АНАЛИЗ КОМПЕТЕНЦИИ К AGROBACTERIUM-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСА ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ

Для кукурузы (*Zea mays* L.) предложен ряд способов генетического улучшения этой культуры современными биотехнологиями [1–5], которые показали, что при разработке системы методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в качестве экспланта целесообразно использовать незрелые зародыши или апикальные меристемы побега. Несмотря на то,