

2. Koltunow A.M., Truettner K. H. Cox K.H., Wallroth M., Goldberg R.B. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development// *The Plant Cell*. 1990. V.2. P. 1201 -1 224.
3. Vysotskaya L. B., Timergalina L. N., Simonyan M. V. , Veselov S. Yu., Kudoyarova G.R. Growth rate, IAA and cytokinin content of wheat seedling after root pruning // *Plant Growth Regulation*. 2001. V. 33. P 51–57.
4. Veselov S.Yu., Kudoyarova G.R., Egutkin N.L., Gyuli-Zade V.Z., Mustafina A.R., Kof E.M. Modified solvent partitioning scheme providing increased specificity and rapidity of immunoassay for indole 3-acetic acid // *Physiol Plant*. 1992. V. 86. P. 93–96.
5. Клячко Н.Л. Фитогормоны и цитоскелет// *Физиология растений*. 2003. Т.50. №3. С.475-480.
6. Campanoni P., Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways// *Plant Physiology*. 2005. V. 137. P. 939–948.
7. Chilley P., Casson S, Tarkowski P., Hawkins N., Wang K., Hussey P., Beale M., Ecker J., Sandberg G., Lindsey K. The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling// *Plant Cell*. 2006. V. 18. № 11. P. 3058–3072.
8. Vissenberg K., Quelo A.H., Van Gestel K., Olyslaegers G., Verbelen J.P. From hormone signal, via the cytoskeleton, to cell growth in single cells of tobacco// *Cell Biol Int*. 2000. V.24. №6. P. 343-349.
9. Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Ríos G, Roig LA, Moreno V. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is genotype and procedure dependent // *Theor Appl Genet*. 2003 Jun;107(1):190. 2003

Резюме.

Были изучены морфофизиологические изменения у трансгенных растений табака при спонтанной полиплоидизации в культуре *in vitro*. Выявлены значительные отличия в уровне ИУК и суммарных цитокининов между трансгенными полиплоидными растениями с измененным фенотипом цветка и нетрансгенным контролем.

The morphophysiological changes in transgenic tobacco plants during spontaneous polyploidization coming from *in vitro* cultures were analyzed. Considerable distinctions in IAA and total cytokinin levels between polyploidy plants with altered flower phenotype and nontransgenic control plants were discovered.

ИШМУРАТОВА Н.М.¹, ИСМАГИЛОВА А.Ф.², ЯКОВЛЕВА М.П.¹, ТОЛСТИКОВ Г.А.¹

¹*Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, Россия, 450054, г. Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: insect@anrb.ru*

²*Башкирский государственный аграрный университет, Россия, 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34.*

НЕИЗВЕСТНОЕ О «МАТОЧНОМ ВЕЩЕСТВЕ» МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

Внимание ученых и практиков все больше привлекают препараты, созданные на основе доступных из природных источников биологически активных веществ и применяемые для стимулирования жизнедеятельности, повышения иммунитета, устойчивости к стрессовым факторам и лечения заболеваний пчел. Известно, что защитные силы организма состоят из неспецифического и специфического звеньев. Естественная резистентность – это первичная неспецифическая защита организма от

проникновения чужеродных агентов, способных нарушить гомеостаз. Специфический иммунитет определяет устойчивость организма против определенного заболевания. Для повышения естественной резистентности используют различные методические приемы: выведение устойчивых линий животных, оптимизацию технологического цикла, условий кормления и содержания, фармакологическую коррекцию. Для фармакологической коррекции естественной резистентности и иммунитета используют иммуностимулирующие препараты. Среди большого набора таких препаратов с разной химической структурой особый интерес вызывают соединения, являющиеся естественными метаболитами. Повышение естественной резистентности и иммунитета с использованием естественных метаболитов в условиях благополучия сопровождается усилением обменных процессов, физиологических функций, активизацией анаболизма, что приводит к увеличению роста, продуктивности и жизнеспособности животных.

Особое место среди метаболитов медоносных пчел занимают 10-гидрокси-(10-ГДК) и 9-оксо- (9-ОДК) -2Е-деценовые кислоты, входящие в состав «маточного молочка» и «маточного вещества» соответственно. Если для 10-ГДК описаны антимикробные, фунгицидные, противоопухолевые, антибиотические и антилейкимические свойства [1], то для 9-ОДК фармакологические исследования до наших работ не проводились, что, вероятно, объяснялось малой доступностью этого соединения из природного источника – пчелиной матки, содержание в которой обычно не превышает 300 мкг, и отсутствием технологических схем его синтеза.

С середины 90-х годов на базе лаборатории биорегуляторов насекомых Института органической химии Уфимского научного центра РАН были начаты исследования по разработке технологичных методов синтеза 9-ОДК и 10-ГДК и созданию специальных препаративных форм различного функционального назначения. Дальнейшие совместные работы с сотрудниками Башкирского государственного аграрного университета и ВНИИ Ветеринарной энтомологии и арахнологии (г. Тюмень) по выявлению биологической активности различных композиций на основе 9-ОДК, 10-ГДК и синтетических компонентов пахучей железы Насонова привели к созданию целой группы запатентованных в Российской Федерации препаратов («Апимил», «Меллан», «Кандисил», «Аписил», ТОС-3, «Уфамил», «Опылил» и «Биосил») для регулирования поведения и жизнедеятельности медоносных пчел [2].

При создании этих препаратов предполагалась их экологическая безопасность и нетоксичность для пчел и человека, поскольку они составлены из полных синтетических аналогов природных соединений, используемых пчелами в своей жизнедеятельности.

С целью доказательства этого предположения на кафедре внутренних незаразных болезней, клинической диагностики и фармакологии Башгосагроуниверситета были исследованы острая токсичность и фармакологическая активность основного компонента вышеназванных феромонных препаратов – 9-ОДК.

Материалы и методы

Острую токсичность 9-ОДК определяли общепринятыми методами на 36 белых беспородных калиброванных мышах массой 18-20 г. Перед опытом животные выдерживались в одинаковых условиях кормления и содержания в течение 10 дней. На каждую испытываемую дозу препарата брали не менее 6 животных, подобранных по принципу аналогов. Исследуемое соединение использовали в виде водного раствора и применяли перорально при помощи специальной поилки. После приема за опытными животными вели наблюдение в течение 7-10 дней с регистрацией времени наступления токсикоза и гибели. На основании данных гибели животных от разных доз исследуемого соединения, методом интегрирования по Беренсу устанавливали абсолютно смертельную дозу (LD_{100}) и максимально переносимую дозу (LD_0). Значения LD_{16} и LD_{84} , найденные по построенной на основании интегрированных данных характеристической кривой, использованы для определения коэффициента вариабельности смертельных доз. Дозу,

вызывающую гибель половины животных LD_{50} , рассчитывали по формуле Кербера. Среднюю ошибку LD_{50} определяли по формуле Гаддэма.

Для воспроизведения острых воспалительных отеков у мышей массой 18-20 г в качестве флоготических агентов использовали 2%-ный раствор лидокаина гидрохлорида, 10%-ный раствор яичного белка и 3%-ный раствор формалина в дозах 0.05 мл субплантарно в лапку. Водный раствор 9-ОДК вводили внутривенно (0.1-0.3 мг/кг) при помощи зонда по следующей схеме: за 1 ч до введения флоготического агента, непосредственно после его введения, а также через 1 и 2 ч после. Через 3 ч проводили измерение угнетения отека лапок мышей. Животным контрольной группы внутрь вводили 1 мл дистиллированной воды. Препаратом сравнения служил ортофен (8 мг/кг).

Противовоспалительную активность рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ угнетения воспаления} = \frac{V_0 + V_k}{V_k} ,$$

где V_0 — среднее увеличение объема лапки в опытной группе, V_k — среднее увеличение объема лапки в контрольной группе.

Иммуноотрадные свойства водного раствора 9-ОДК (0.1-0.4 мг/кг перорально) и препарата сравнения оксиметилурацила (50 мг/кг) определяли по влиянию на количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке иммунизированных самцов белых неинбредных мышей массой 18-20 г с помощью метода локального гемолиза в жидкой фазе. Для иммунизации животных в качестве антигена использовали эритроциты барана, трижды отмытые физиологическим раствором. Антиген вводили внутривенно в оптимальной дозе 2×10^8 клеток на 20 г массы животного. Определение числа АОК производили на 5 сутки после введения эритроцитов барана. Забой животных проводили под эфирным наркозом путем цервикальной дислокации. Из навески селезенки, используя гомогенизатор и среду 199, получали взвесь спленоцитов, которую смешивали в равных объемах (по 0,1 мл) с 10% взвесью эритроцитов барана и комплементом. Сухой комплемент предварительно разводили в 5 мл среды 199. В работе использовали те же эритроциты, которыми проводилась иммунизация животных. Специальные камеры, предварительно изготовленные из предметных и покровных стекол, заполняли смесью спленоцитов, эритроцитов барана и комплемента. Камеры герметизировали парафином, укладывали в чашки Петри, на дне которых находилась влажная фильтровальная бумага, и помещали в термостат при температуре 37.0°C на 1 ч. Во время инкубации секретируемые антитела фиксировались на эритроцитах барана, вызывая в присутствии комплемента иммунный гемолиз. Вокруг клеток, образующих антитела, возникали прозрачные зоны гемолиза, подсчет которых проводили с помощью лупы, дающей 5-кратное увеличение. Для оценки иммунного ответа проводили подсчет количества АОК в селезенке на 10^6 клеток и на весь орган, используя следующие формулы:

1. Количество АОК на 10^6 спленоцитов = число АОК во всей селезенке / число спленоцитов, в млн.

2. Количество спленоцитов во всей селезенке = число спленоцитов в 1 мм^3 (1 мкл) \times 5000.

Антибактериальные свойства 9-ОДК изучали на моделях инфекций, вызываемых золотистым стафилококком, протеем, кишечной и синегнойной палочками у белых неинбредных мышей. Водные растворы изучаемого соединения выпаивали в дозах 0.1-0.4 мг/кг ежедневно в течение 7 дней до заражения и последующие 3 дня. На 7-й день лабораторных животных заражали суточной культурой патогенных микроорганизмов введением ее суспензии внутривенно в объеме 0.5 мл физиологического раствора. Золотистый стафилококк вводили в дозе 2.5 млрд. микробных тел на 20 г массы, кишечную палочку – 1,5 млрд., протей – 2,0 млрд., синегнойную палочку – 2,5 млн. Лабораторные животные находились под наблюдением 10 дней. Эффективность антибактериального действия водных растворов 9-ОДК оценивали по выживаемости и продолжительности жизни лабораторных животных. В качестве препарата сравнения

применяли мастаэрозоль.

Ранозаживляющее действие 9-ОДК в форме 0,3-, 0,4-, 0,5%-ных мазей на основе смеси вазелина и ланолина, содержащей 5% диметилсульфоксида, изучали на моделях лоскутной раны и термического ожога на белых беспородных крысах массой 180-200 г. Для сравнения применяли 5%-ную мазь метилурацила.

Для воспроизведения лоскутной раны на боковой поверхности тела крысы удаляли шерстный покров и участок кожи площадью 10 x 10 мм² до фасции. Для воспроизведения ожогов пользовались кипящей водой, время экспозиции – 10 сек. На следующий день на кальку срисовывали раны (ожоги) и определяли исходные средние площади. Спустя 5, 10, 15 и 20 дней рассчитывали индексы заживления ран или ожогов (ИЗР) по формуле :

$$\text{ИЗР} = 3.14 \times \frac{\sum \text{диаметров}}{4} ;$$

При изучении антитоксических (антидотных) свойств 9-ОДК и 10-ГДК соответственно в качестве ксенобиотиков были выбраны широко используемые в сельском хозяйстве пестициды – фунгицид Дивидент и гербицид Банвел [3], вводимые перорально в виде водных растворов в дозах 648-3885 и 885-3540 мг/кг массы тела соответственно. Исследовали 216 белых беспородных калиброванных мышей массой 18-20 г. Перед опытом животные прошли карантин: в течение 10 дней условия их кормления и содержания были одинаковыми. Предварительно на 60 мышах были установлены параметры общей токсичности Банвела и Дивидента, что позволило выбрать дозы пестицидов для последующих экспериментов. В следующей серии опытов изучались антитоксические свойства 9-ОДК и 10-ГДК при остром отравлении животных вышеназванными пестицидами. С этой целью мышам за сутки до эксперимента, а также в течение недели после дачи ядохимиката вместо питьевой воды выпаивали водный раствор 9-ОДК и 10-ГДК в дозе 0,3 мг/кг. В контрольной группе мыши получали только воду. Наблюдения за животными осуществляли в течение двух недель, обращая внимание на наступление клинических признаков отравления, их характер, сроки гибели, число павших животных в группах.

Результаты и обсуждение

Так, при изучении антибактериальной активности 9-ОДК на экспериментальную инфекцию, вызванную золотистым стафилококком, в группе животных, получавших 9-ОДК в дозе 0,3 мг/кг, выжило на 3-й и 10-й дни по 18 из 20 животных. При применении препарата сравнения *мастаэрозоля*, соответственно 13 и 7 животных. В контрольной группе на 3-й день выжили две мыши, а на 10-день погибли все животные. Аналогичные, подтверждающие антимикробную активность 9-ОДК данные, получили также на животных, зараженных протеем, кишечной и синегнойной палочками.

Испытания 9-ОДК в качестве иммуномодулятора, проведенные традиционным методом оценки изменения В-звена иммунитета – определением числа антителобразующих клеток (АОК) в селезенке, показали, что исследуемое соединение стимулирует образование АОК, проявляя в дозе 0,3 мг/кг максимальную активность, превышающую в 4,2 раза таковую для широко используемого в медицине *оксиметилурацила* (в дозе 50 мг/кг).

Изучение скоростей заживления лоскутных ран и термических ожогов также выявило высокую биологическую активность 9-ОДК как ускорителя клеточного размножения в процессах восстановительной регенерации. Например, полное заживление ран в группе животных, ежедневно обрабатываемых 0,3%-й мазью 9-ОДК, наступило на 16-й ($\pm 0,2$) день; 5%-я мазь *метилурацила* (препарат для сравнения) обладала меньшими репаративными свойствами – полное заживление произошло на 20-й ($\pm 0,4$) день; у контрольных животных заживление ран наступило лишь на 27-й ($\pm 0,2$) день. Аналогичные исследования по заживлению термических ожогов также подтвердили высокую эффективность 0,3%-й мази 9-ОДК.

Кроме того установлена высокая противовоспалительная активность 9-ОДК на моделях формалинового, белкового и лидокаинового воспалений, по сравнению с контролем, а также более высокая антифлогистическая активность на двух последних моделях по сравнению с *ортофеном* – официальным препаратом, широко применяемым в ветеринарии и медицине.

Водные растворы 9-ОДК- и 10-ГДК в дозе 0,3 мг/кг, заменяющие питьевую воду во время отравления пестицидами, увеличивают среднесмертельные дозы Банвела (в 2,8 и 2,04 раза соответственно) и Дивидента (в 2,3 и 1,6 раза соответственно) и обладают значительным антидотным действием.

В заключение можно высказать вполне достоверное предположение, что подкормка пчел феромонными композициями «Аписил» и «Кандисил» (на основе 9-ОДК) и «Биосил» (10-ГДК) будет способствовать оздоровлению пчелиных семей и повышению их устойчивости к отравлениям, что определяется значительной фармакологической и антидотной активностью их составляющих.

Выводы

Совместными исследованиями ученых – химиков и ветеринаров выявлен целый комплекс ранее неизвестных замечательных фармакологических свойств полного синтетического аналога «маточного вещества» - многофункционального феромона медоносных пчел.

Литература

1. Кузьмина К. А. Лечение пчелиным медом и ядом // Изд-во Саратовского университета. – 1973. – 90 с.
2. Иимуратов Г. Ю., Иимуратова Н. М., Толстиков Г. А.. Наступит ли феромонный бум в России? // Вестник РАСХН. – 2002. – № 6. – С. 81-82.
3. Лужников Е.А. Клиническая токсикология.- М.: Медицина, 1982.- 327 с.

Резюме

Joint research of chemists and veterinary scientists revealed a set of formerly unknown remarkable pharmacological properties which are synthetic fully analogous to “queen-cell matter” – multifunctional pheromone of honey bee.

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.¹, КОЧЕТОВ А.В.¹, КИРСАНОВА С.Н.²

¹Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090, факс (383)333 12 78, e-mail: jana_k@bionet.nsc.ru

²ГНУ Всероссийский институт картофельного хозяйства РАСХН, Московская область, Россия

ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫЕ РАСТЕНИЯ ТАБАКА (*Nicotiana tabacum* L.) И КАРТОФЕЛЯ (*Solanum tuberosum* L.), ХАРАКТЕРИЗУЮЩИЕСЯ ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЗАСОЛЕНИЮ

Различные абиотические стрессы, такие как холод, засуха, засоление, затопление, воздействие критических температур, токсические концентрации тяжелых металлов, высокая кислотность или щелочность почв, повышенное содержание озона, дефицит элементов минерального питания, изменение уровня освещенности и т.д. снижают продуктивность сельскохозяйственных растений в два раза и более, а при высокой выраженности и достаточно долгой продолжительности стресса приводят их к гибели.

В стрессовых условиях у растений происходит индукция генов, контролирующих синтез соединений, вызывающих ответную реакцию растений на абиотические стрессы (осмопротекторов и нейтрализаторов свободных радикалов (Bohnert, Sheveleva, 1998); белков поздних стадий эмбриогенеза (Ingram, Bartels, 1996;