

4. *Мусийчук К.А.* Бифункциональные репортерные системы для про- и эукариот на основе делеционного варианта термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*. - Автореф. на соиск. ... канд б.н. – 2001. - 20 с.
5. *Нам И.Я., Заякин В.В., Вовк В.В., Казаков И.В.* Применение методов биотехнологии для ускорения селекции ремонтантной малины // Сельскохоз. биотехнология. Избранные работы под ред. Шевелухи В.С. - Том 1. - Москва. – 2000. - С.79 – 88.
6. *Приходько Ю.Н.* О видовом составе и распространенности вирусов малины в Европейской части России // Плодоводство и ягодоводство России.– Москва, 1997. - Т. 4.– С. 97-101.
7. *Шевелуха В.С.* Проблемы, приоритеты и масштабы сельскохозяйственной биотехнологии в XXI веке / Сельскохозяйственная биотехнология. - Под ред. Шевелухи В.С. – М.: Евразия+. - 2000. – С. 3 – 16.
8. *Fiola J.A., Swartz H.J., Hassan M.A., Bors R.H., Mc Nicol R.J.* Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves // Plant cell tissue organ cult. – 1990. - V. 20. - P. 223 – 228.
9. *Graham J.A., Iasi L., Millam S.* Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars // Plant cell org. Cult.. – 1997. - V.48. - P. 167-173.

Резюме

Для создания новых сортов ремонтантной малины оптимизирован метод клонального микроразмножения *in vitro* с применением цитокининов TDZ и 4-PU. Разработана система регенерации и трансформации, что позволило перейти к созданию устойчивых к ВККМ форм малины. Метод анализа ВККМ с помощью RT-PCR позволяет проводить скрининг полевых и лабораторных растений на наличие вирусов.

For the breeding of everbearer raspberry we have optimize method of clonal micropropagation *in vitro* using cytokinins of diphenylurea – TDZ and 4-PU. Worked out regeneration and transformation system allows to obtain transgenic raspberry forms. To control RBDV content and for breeding resistant cultivars, RT-PCR method of RBDV analyses was developed.

ПАРХОМЕНКО Ю.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ПИЛИПЧУК С.Ю., ЧЕХОВСКАЯ Л.И., СТЕПАНЕНКО С.П.

*Институт биохимии им. А.В.Палладина НАН Украины,
01601 Киев, ул. Леонтовича 9, uipark@biochem.kiev.ua*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТА МЕТОВИТАН ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА К ВОЗДЕЙСТВИЮ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ФАКТОРОВ

Хроническое воздействие неблагоприятных факторов (как экзогенного, так и эндогенного происхождения) на организм человека и животных часто является причиной развития стабильного дисбаланса в клеточном метаболизме, что приводит к более серьезным последствиям для здоровья, в частности, к снижению именно статуса, обусловленному нарушениями на уровне биосинтеза белков. В связи с катастрофическим загрязнением окружающей среды на нашем континенте, такая ситуация становится довольно распространенной, и поиск способов коррекции клеточного метаболизма, направленных на повышение выживания организма в неблагоприятных условиях, не теряет актуальности. Один из таких подходов – использование поливитаминных препаратов, так как считается, что воздействие на организм неблагоприятных факторов часто сопровождается и нарушением его витаминного статуса. Однако результаты наших исследований свидетельствуют, что

для стабильного функционирования организма существенную роль играет не только уровень обеспеченности его витаминами, но и не в меньшей степени - способность тканей усваивать витамины, трансформировать их в биологически активные формы, а также присутствие других биологически активных соединений, способствующих активации обмена витаминов. При одновременном введении в организм всего набора витаминов, которые входят в состав широко рекламируемых поливитаминных препаратов, может иметь место конкуренция между отдельными витаминами на уровне их транспорта, метаболизма и даже функционирования [1]. Более рациональным мы считаем разработку витаминсодержащих препаратов, в состав которых входит ограниченное количество компонентов, синергично действующих на отдельные звенья клеточного обмена. Все вышесказанное принималось нами во внимание при создании композиции биологически активных веществ (витамины В₁, В₃, Е, метионин, соль цинка), предназначенной для повышения устойчивости организма человека к неблагоприятным факторам окружающей среды, которая составила основу комплексного препарата, получившего название «Метовитан» [2]. Направленная активация препаратом процессов транссульфирования и трансметилирования способствует повышению синтеза глутатиона – природного пептида, который является важным компонентом биохимической системы антиоксидантной защиты организма и принимает участие в реакциях детоксикации чужеродных соединений [3]. Созданные условия способствуют, в частности, более эффективному использованию в клетках витаминов, входящих в состав препарата (активируется синтез их биологически активных форм – коферментов), благодаря чему их дозы в препарате близки к физиологическим. Под влиянием препарата более эффективно усваиваются из пищи и метаболизируются в организме и витамины, не входящие в состав препарата.

В данной статье приводятся примеры использования препарата для повышения выживания животных в условиях гипоксии, отравлении алкоголем и при эпидемии паратифа (телята).

Материалы и методы

Модель гипоксии вызывали с помощью барокамеры. Для биохимических исследований животных (крысы) - 347 -в барокамере поднимали на условную высоту 9 тыс.м (давление - 230 мм рт.ст.) на 20 мин, после чего давление снижали и крыс брали в эксперимент. Препарат вводили животным на протяжении 7 дней до подъема их на условную высоту в дозе 25 мг на 1 кг массы, в качестве препарата сравнения использовали комплексный витаминный препарат «Декамевит». При получении модели хронического алкоголизма (ХА) в эксперимент брали крыс, которые при предоставлении выбора вода-этанол предпочитали этанол, далее их содержали на 15% растворе этанола на протяжении 5 месяцев, контрольные животные получали воду. За неделю до конца опыта животных с моделью ХА переводили с этанола на воду (модель абстиненции) и делили на 2 группы: крысам одной из этих подгрупп на протяжении 3-х или 5-ти дней до конца опыта ежедневно вводили перорально суспензию препарата «Метовитан» в физиологическом растворе (доза препарата – 25 мг на 1 кг массы), другой подгруппе животных, которая служила контролем на модель абстиненции, аналогичным образом вводили физраствор

Анализ отдельных биохимических показателей, приведенных в данной работе, а именно, концентрация восстановленного глутатиона, скорость образования малонового диальдегида, содержание убихинона (Q), фолиевой кислоты, отношение РНК/ДНК, активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионредуктазы (ГлР) проводили согласно методам, описанным ранее [4].

Результаты и обсуждение

Гипоксия. При воздействии неблагоприятных факторов на организм первый удар принимает на себя система антиоксидантной защиты. Влияние Метовитана на ферментную систему антиоксидантной защиты мы изучали на модели гипоксической

гипоксии. Данные, приведенные в Табл.1, свидетельствуют, что введение препарата животным до условного подъема их на высоту 9 тис. м в значительной мере предупреждало в ткани мозга снижение активности ферментов антиоксидантной защиты, которое отмечалось у животных, подвергшихся действию гипоксии без введения препарата. Активность СОД и КАТ в ткани мозга животных, которым до опыта ввели Метовитан, по окончании опыта оставалось практически на уровне нормы, в то время как введение в тех же условиях поливитаминового препарата Декамевит не предупреждало снижения активности этих ферментов под действием гипоксии.

Табл. 1

Активность СОД (ед. за мин. на 1 мг Нв), КАТ (мкмоль за мин. на 1 мг Нв), глутатионредуктазы (ГлР., мкмоль за мин. на 1 мг белка), содержание малонового диальдегида (МДА, мкмоль на 1 мг белка) в цитоплазматической фракции клеток мозга при различных условиях.

| Показатель | Группа животных | | | |
|--------------------------------------|-----------------|-----------|-----------------------|-----------------------|
| | Контроль | Гипоксия | Гипоксия + Метовитан | Гипоксия + Декамевит |
| СОД | 79,6±2,1 | 15,2±1,1* | 75,2±3,5** | 14,1±1,2* |
| КАТ | 85,5±4,2 | 58,6±3,0* | 83,2±2,1** | 69,7±3,1* |
| ГлР | 15,9±0,4 | 4,7±0,3* | 6,8±0,2** | 7,1±0,3* |
| МДА | 0,6±0,1 | 2,7±0,1* | 0,9±0,1** | 1,8±0,1* |
| Срок выживания животных при гипоксии | | 23,0±1.5 | 36,0±2.1* p < 0.05 | 29,2±1.9* p < 0.05 |

**/здесь и далее эта пометка указывает на данные, которые достоверно отличаются от таких же данных в контрольной группе животных при p<0,05; **/- указывает на данные, которые достоверно отличаются от данных в группе животных, подвергшихся действию неблагоприятного фактора при p<0,05;*

Аналогичные результаты получены при анализе сыворотки крови тех же животных. Для того, чтобы оценить, как вышеуказанное действие препарата на метаболические процессы сказывается на жизнеспособности организма животных, был проведен эксперимент по оценке срока выживания крыс в условиях гипоксии без введения препарата и после его введения. Как видно из Табл.1, предварительное введение животным препарата в вышеуказанной дозе продлевало срок жизни животных в условиях гипоксической гипоксии более чем в полтора раза.

Алкоголизм. Хроническое употребление алкоголя является причиной серьезных нарушений метаболических процессов в клетках, которые тяжело восстанавливаются после отмены алкоголя и могут стать причиной необратимых изменений в тканях [4, 5]. Учитывая целенаправленное действие препарата Метовитан на активацию процессов трансметилирования и транссульфирования в тканях, мы проверили его влияние на нормализацию некоторых показателей, связанных с эффективностью функционирования этих процессов, а именно: содержание глутатиона в тканях мозга и печени, содержание убихинона в сердечной мышце (отображает синтез кофермента Q, который существенно зависит от процессов трансметилирования), содержание фолиевой кислоты, обмен которой, в частности, всасывание, также страдает при хроническом алкоголизме и которая необходима для переноса одноуглеродных радикалов, и отношение РНК/ДНК (отображает интенсивность синтеза белков). Биологически активная форма фолиевой кислоты принимает непосредственное участие в реакциях трансметилирования, поэтому существенное снижение ее концентрации в тканях негативно сказывается на многих процессах. Глутатион играет ключевую роль в биологической системе антиоксидантной защиты организма, поэтому, можно считать, что его уровень в тканях является показателем функционирования этой системы при разных физиологических условиях. Хроническое употребление алкоголя приводит к достоверному снижению уровня глутатиона (в

среднем на 20%) в тканях мозга и печени. При этом если в печени через 3 и 7 дней после отмены алкоголя этот показатель почти не отличается от такового в контроле, то в ткани мозга его нормализация происходит только при введении препарата.

Как свидетельствуют данные табл. 2, содержание коэнзима Q, убихинона, отношение РНК/ДНК также критически снижаются при продолжительном действии алкоголя на организм и почти не восстанавливаются через 7 дней после его отмены без введения препарата. Введение препарата Метовитан значительно ускоряет нормализацию этих показателей.

Табл. 2

Содержание кофермента Q (убихинона) в сердечной мышце (мкг на 1 г ткани), фолиевой кислоты (мкг на 1 г ткани) в крови, отношение РНК/ДНК в ткани печени разных групп подопытных животных, $M \pm m$, n=5-6

| Группа животных | Показатель | | |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Содержание убихинона | Содержание фолиевой кислоты | Отношение РНК/ДНК (печень) |
| Контрольная | 36,00 ± 8,86 | 0,790±0,105 | 18,1 ± 1,40 |
| + 15% раствор алкоголя | 7,15 ± 3,52* | 0,250±0,016* | 11,8 ± 2,3* |
| Отмена алкоголя 3 дня | 8,93 ± 3,42* | 0,283±0,033* | 13,5 ± 2,2 |
| Отмена алкоголя 3 дня + препарат | 18,80 ± 4,46 | 0,336±0,028* | 17,7 ± 2,00** |
| Отмена алкоголя 7 дней | 10,56 ± 4,50* | 0,307±0,050* | - |
| Отмена алкоголя 7 дней + препарат | 26,85 ± 5,15** | 0,550±0,074** | - |

Проверка действия препарата на телятах. Исследование проводилось в животноводческом хозяйстве на двух группах телят по 8 особей в каждой в период эпидемии парагриппа. Препарат давали телятам опытной группы в дозе 0,1 г на 1 кг массы тела ежедневно на протяжении 1 недели. Телята контрольной группы не получали препарата Метовитан, в остальных условиях содержания были одинаковы. Наблюдение продолжалось в течение 30 дней. Согласно заключению специалистов, телята контрольной группы переносили заболевание тяжело, на 2-3-й день развивался сильный понос, двое особей из 8 погибло (25%). Телята опытной группы переносили заболевание в легкой форме, поноса не наблюдалось, все особи остались живы.

Выводы

Приведенные материалы свидетельствуют, что препараты, включающие комплексы отдельных витаминов с другими биологически активными соединениями, созданные с учетом целенаправленного и синергического действия компонентов на определенные участки клеточного метаболизма, более эффективны в поддержании жизнедеятельности организма, чем поливитаминные препараты, содержащие полный набор витаминов. Разработанный авторами по такому принципу препарат Метовитан может быть с успехом применен для повышения устойчивости организма человека и животных к действию неблагоприятных факторов.

Литература

1. Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М. и др. Обеспеченность жителей г. Киева витаминами С и В₁ и Эффективность комплексных витаминно-минеральных препаратов в профилактике весенних авитаминозов/ Укр. Биохим. Журн., 2000, № 6, С.
2. Пархоменко Ю.М., Донченко Г.В., Протасова З.С и др. "Препарат для підвищення життєстійкості організму". Патент України № 39228 від 15.06. 2001 р. , Бюл.№5
3. Кулинский В. И. Глутатион // Успехи биол. химии. –1990. – № 30. – С. 157–180.
4. Ю.М.Пархоменко, Г.В.Донченко, Пилипчук С.Ю., С.П.Степаненко, Л.И.Чеховская, К.П.Клименко. Характерные метаболические нарушения в тканях крыс, вызванные длительным приемом алкоголя/ Укр. Биохим. Журнал, 2007. - т. 79, № 3. - С. 61-69.

5. Schweinsburg BC, Alhassoon OM, Taylor MJ, et al. Effects of alcoholism and gender on brain metabolism /Am J Psychiatry. 2003 Jun;160(6):1180-3.

Резюме

Действие препарата Метовитан в организме направлено на активацию процессов транссульфирования и трансметилирования, что ведет к усилению биохимической системы антиоксидантной защиты и реакций детоксикации ксенобиотиков. Позитивный эффект препарата показан на крысах с моделями гипоксии и алкогольной интоксикации и подтвержден в производственных условиях на телятах в период эпидемии парагриппа.

Дія препарату Метовітан в організмі спрямована на активацію процесів транссульфування та трансметилування, що веде до посилення біохімічної системи антиоксидантного захисту та реакцій детоксикації ксенобіотиків. Позитивний ефект препарату продемонстровано на моделях гіпоксії та алкогольної інтоксикації на щурах і підтверджено в промислових умовах на телятах під час епідемії парагрипу.

The action of drug Metovitan is directed on activation of processes of transsulfurizing and transmethylation in cells that promotes increase of a biochemical system of antioxidation protection and reactions of xenobiotics detoxication. The positive effect of Metovitan on living organism had been shown on models of a hypoxia and alcoholic intoxication. The effect is confirmed on calfs during epidemic of a paraflu under production conditions.

ПОГОРЕЛКО Г.В., ФУРЦОВА О.В., ОГАРКОВА О.А., ТАРАСОВ В.А.

Институт Общей Генетики РАН

ул. Губкина д.3, 119991, Москва, Россия, e-mail: gpogorelko@yandex.ru

НОВЫЙ ПОДХОД В ИЗУЧЕНИИ СУПЕРЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МУТАНТОВ *A.thaliana*

Расшифровка полной нуклеотидной последовательности генома *Arabidopsis thaliana* в конце 2000г. позволила реально перейти к решению центральной проблемы молекулярной генетики высших растений – идентификации функции генов.

В последние 10-15 лет были разработаны методы для эффективного массового получения инсерционных мутантов *A. thaliana* (Feldmann et. al., 1987, Bechtold et. al., 1993). В результате были созданы представительные коллекции мутантных линий *A. thaliana*, семена которых собраны в коллекционных центрах ABRC, NASC, SALK и GABI.

Однако большинство созданных коллекций инсерционных мутантов содержат линии, несущие *loss-of-function* мутации – связанные с потерей функции генов, которые позволяют изучать функции только стабильно экспрессирующихся в ходе развития растений генов. Этим обусловлен интерес к индукции мутаций другого типа, например, мутаций, вызывающих суперэкспрессию генов. Индукция мутаций такого рода достигается с помощью векторов, Т-ДНК которых содержит около одного из бордеров сильный промотор (или энхансер) (Weigel et al., 2000).

Однако когда структура инсерции содержит энхансер, могут возникать мутации двух типов: *loss-of-function* мутации, связанные с инактивацией гена при встраивании в него инсерции, и мутации, обусловленные наличием энхансера в структуре инсерции. При массовом получении и анализе инсерционных мутаций, полученных с помощью такого рода векторов, необходимо иметь относительно простую и эффективную систему идентификации *loss-of-function* мутаций и мутаций, связанных с