

3. Джояшвили Н.А., Калилина Н.И., Белоглазова И.Б. и др. Генная терапия фактором роста гепатоцитов приводит к регрессии экспериментального фиброза печени // РЖГГК. – 2010. – №4. – С. 22–28.
4. Назар П.С., Осадча О.І., Левон М.М. Зміни біохімічних показників загального аналізу крові в осіб із алкогольним ураженням печінки // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16, №1. – С. 59–62.
5. Пат. України, № заявки U 2012 09526 Спосіб експерименту для моделювання біологічних процесів / Бубнов Р.В., Співак М.Я., Жолобак Н.М. (вх. № 975762, 06.08.2012).
6. Смольякова В.И., Плотникова М.Б., Чернышева Г.А., Иванов И.С., Просенко А.Е., Кандалинцева Н.В. Антиоксидантные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном // Экспериментальные и клинические исследования. Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №5. – С. 98–101.
7. Топчий Н.В., Топорков А.С. Эссенциальные фосфолипиды — выбираем оптимальный вариант? [Электронный ресурс]. Независимое издание для практикующих врачей. – 2013. – Режим доступа: http://www.rmj.ru/articles_8536.htm

GULKO T.P.¹, DRAGULYAN M.V.¹, RYMAR S.E.¹, KORDYUM V.A.¹, LEVKIV M.U.², BUBNOV R.V.^{3,4}

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine*

Ukraine, 03143, Kyiv, str. Akad. Zabolotnogo 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua

²*Kievsky National University Taras Shevchenko*

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str, 64

³*Institute of Microbiology and Virology. DK Zabolotny NAS of Ukraine*

Ukraine, 03143, Kyiv, str. Akad. Zabolotnogo 154

⁴*Tsentr ultrasound and sonography intervetsionnoy Clinical Hospital "Theophany" of the State Administration*

Ukraine, 036803, Kyiv, str. Akad. Zabolotnogo 21

⁵*State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine 04114, Kyiv, 67 Vishgorodska str.*

SIMULATION OF LIVER CIRRHOSIS IN RATS WISTAR DIFFERENT AGES

Aim. Getting a model of cirrhosis in male Wistar laboratory rats of different ages. **Methods.** Obtaining models of liver cirrhosis in rats of Wistar 3 and 8 months of age, and was carried out by intraperitoneal injection of 30% animal oil solution of CCl₄ (0,01 ml/kg) 1 day a week. The dynamics of the disease studied biochemical (measurement of ALT, AST), cytology (blood count), histological and radiological (SPL) methods. **Results.** Based on the analysis of a model of cirrhosis in rats of different ages, from 3-month animals were observed formation of necrosis in the second week of liver fibrosis on the fourth week, finally cirrhosis formed on the second week of the experiment. The old 8-month rat or the 2nd or the 4th week CCl₄ administration changes in the structure of the liver was observed. By the 6-week experiment histology showed the appearance of minor changes in the structure of the liver, similar to the beginning of the development of necrosis in the periphery of the body. **Conclusions.** Analysis of studying the characteristics of a model of cirrhosis of the liver in rats of different ages above mentioned methods can be considered animal model induced by 3 months of age, as close to human disease, and use it in the future for the development of more effective treatments for this disease.

Key words: hepatic necrosis, fibrosis, cirrhosis, rats Wistar, age factor.

ЄФІМЕНКО Т.С., АНТОНІЮК М.З., МАРТИНЕНКО В.С.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України

Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

СТВОРЕННЯ ЧУЖИННО-ЗАМІЩЕНИХ ТА ЧУЖИННО-ДОДАНИХ ЛІНІЙ *TRITICUM AESTIVUM* / *AEGILOPS MUTICA*

Aegilops mutica Boiss (*Amblyopyrum muticum* (Boiss) Eig), однорічний дикорослий родич пшениці, є стійким до грибних захворювань, в тому числі до листової іржі та борош-

нистої роси. На сьогодні саме борошніста роса м'якої пшениці є однією з найбільш суттєвих хвороб пшениці у країнах з помірним кліматом, в тому числі і в Україні. Сучасні сорти пшениці

захищені від ураження збудника борошнистої роси генетично, переважно генами *R (Pm)* вертикальної стійкості, які хоча і забезпечують повну резистентність рослин пшениці, проте швидко долаються новими расами збудника через постійну коеволюцію двох спряжених генетичних систем. Тому питання залучення до генофонду пшениці нових генів *Pm* не втрачає своєї актуальності. Кількість ідентифікованих генів *Pm* досягла вже 43, переважна частина їх — чу-

Матеріали і методи

Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротика, сорт озимої м'якої пшениці Аврора, гібриди F_1 , F_2 , F_3 та F_4 від схрещування Авротика х Аврора (рис. 1). Гібриди F_1 було отримано шляхом штучної гібридизації, материнською рослиною була Авротика. Гібриди наступних поколінь отримували через самозапилення індивідуальних колосів під ізоляторами. Фертильність рослин визначали на головному колосі виходячи з очікуваної кількості 2 зернівки на колосок. Індивідуальні рослини F_2 – F_4 оцінювали за стійкістю до борошнистої роси та ознаками морфології, що за ними було виявлено градації, інші, ніж у сорту Аврора: остистість, форма, щільність колосу, колір зеленої та зрілої рослини, опушення рослини, жорсткість колоскової луски та роз-

Результати та обговорення

Лінії м'якої пшениці було створено нами з застосуванням методу «змішування» хромосом двох чужинних геномів у гексаплоїдному гібриді між двома пшеничними формами, які мають однаковий субгеном AABV та розрізняються лише третім субгеномом [3]. Гексаплоїд Авротика (AABVTT) є амфідиплоїдом тетраплоїдного компоненту AABV м'якої пшениці сорту Аврора та диплоїдного егілопсу *Ae. mutica* (TT). Авротика характеризується резистентністю до польових популяцій борошнистої роси та листової іржі, а за зимостійкістю помітно перевершує всі сучасні сорти м'якої пшениці, які вирощувались у полі в однакових з нею умовах. Згідно до методу змішування геномів було отримано гібрид F_1 між Авророю та Авротикою, стійкий до борошнистої роси (рис. 1). Подальша робота з матеріалом залежала від фертильності рослин F_1 : якби вони були самостерильними, потрібно було б бекросувати їх з Авророю, як це робилося раніше при створенні інтрогресивних ліній

жінного походження. Найбільш розповсюдженими та тривалими за терміном збереження стійкості до патогену є гени егілопсів секції *Sitopsis*. Щодо *Ae. mutica*, двома дослідницькими групами підтверджено перспективу створення інтрогресивних ліній пшениці, стійких до борошнистої роси за рахунок інтрогресій від *Ae. mutica*: на базі геному *Triticum dicoccum* [1] та геному м'якої пшениці Чайніз Спринг [2].

поділ на ній пігменту, ламкість колосового стрижня. Хромосомні числа рослин F_2 – F_4 визначали у метафазі мітозу на тимчасових чавлених препаратах первинних корінців пшениці за загальноприйнятою методикою.

Геномну ДНК виділяли на методикою з буфером на основі СТАВ. Дот-блот-гібридизацію проводили у відповідності до рекомендації виробника набору реактивів (Fermentas, Литва). ПЛІР проводили: 30 мкл реакційної суміші містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокситрифосфату, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1,2 у Taq-полімерази (Fermentas, Литва), умови проходження ампліфікації — у відповідності до рекомендацій оригінатора певного SSR-локусу.

— похідних Авролати (AABVUU) та Аврозису (AABV^{sh}S^{sh}). Гібриди AABVDT виявилися самофертильними, якими були свого часу гібриди між Авродесом (AABVSS) та Авророю. Із насіння F_2 паростки вдалось отримати та визначити їх хромосомні числа в 137 випадках (табл. 1), з них в полі було вирощено лише 97 рослин, насіння від самозапилення отримали від 76 рослин з кількістю хромосом від 37 до 46. Фертильність ізольованих колосів на рослинах F_1 та таких, що залишилися без ізоляторів, була однаковою, варіюючи від 1,5% до 18% озерненості (табл. 1). Перевірка електрофоретичних спектрів гліадинів показала, що у білкових спектрах зернівок F_2 не було таких компонентів, походження яких не можна було б зв'язати з Авротикою чи Авророю, що вказує на відсутність перезапилення навіть на неізольованих колосах. Тем не менш, насіння, отримане на неізольованих колосах рослин F_1 , в подальшій роботі не використовували.

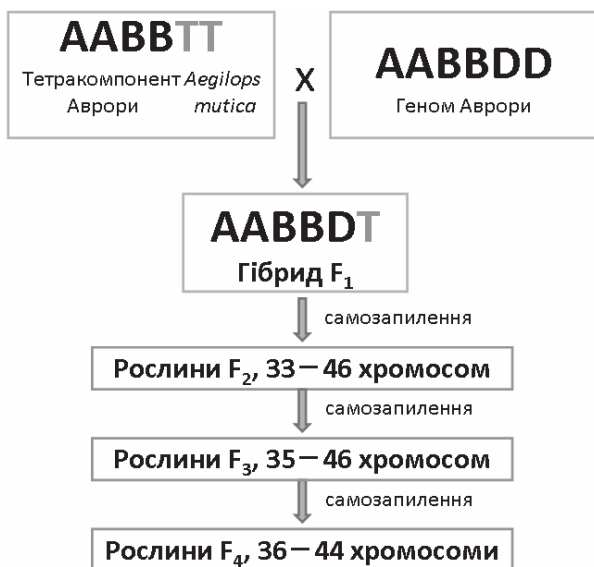


Рис. 1. Схема створення ліній *T. aestivum* / *Ae. mutica* методом «змішування» хромосом третього субгеному у гібриді F₁ між сортом м'якої пшениці (Аврора) та генотипом амфідиплоїдом Авротика, геном якого містить тетраплоїдний компонент AABB сорту Аврора та геном TT егілопса

Цитогенетичний механізм формування ліній, де цілі хромосоми егілопса заміщують хромосоми пшеничного субгеному D або додаються до повного геному пшениці, полягає у наступному. Теоретично, в M1 мейозу МКП рослин F₁ з генотипами формулами AABBDT або AABBDS має бути 14 бівалентів та 14 унівалентів, оскільки хромосоми геному D не мають кон'югувати з хромосомами T або S. У анафазі для будь-якого унівалента реалізується одна з трьох імовірностей: залишитися у цитоплазмі (за даними літератури, 0,5), відійти до одного полюсу веретена поділу (0,25), відійти до іншого полюсу (0,25). В двох останніх випадках унівалент бере участь у створенні гамет, проте різних. Оптимальна умова формування гексаплоїдної зиготи — об'єднання 21-хромосомних гамет, а це за вказаних умов є подією низькоімовірною. Саме тому гібриди F₁ з різними третіми субгенами характеризуються самостерильністю, якщо не працює якийсь механізм, який дозволяє кон'югувати хромосомам D з хромосомами егілопса. У M1 мейозу МКП гібрида AABBDT

спостерігали збільшення кількості бівалентів проти очікуваної та формування насіння від самозапилення рослинами F₁. Раніше, коли створювали чужинно-заміщені лінії на основі Авродесу, появу у метафазі 1 мейозу МКП F₁ зайвих бівалентів можна було пояснити наявністю у гібриді F₁ AABBDS геному S, який пригнічує дію гена *Ph1* та сприяє тим самим кон'югації гомеологічних хромосом. Про геном T відомо, що при схрещуванні *Ae. mutica* з видами егілопсу, які несуть геном D, у гібридах F₁ хромосоми T геному кон'югують з хромосомами геному D майже регулярно [4, 5]. Саме цим слід пояснювати збільшення кількості бівалентів проти очікуваних 14 у гібридах F₁ між Авророю та Авротикою. Мультивалентів у M1 МКП таких гібридів не спостерігали, так що немає підстав вважати, що геном T сприяє кон'югації негомологічних хромосом. Можливо, що саме кон'югацією хромосом T та D в гібридах F₁ та F₂ від схрещування Авротика x Аврора пояснюється висока самофертильність гібридних рослин і велика кількість 42-хромосомних паростків F₃ та F₄.

Таблиця 1. Самофертильність та розкид хромосомних чисел у поколіннях F₂ – F₄ від схрещування Авротика x Аврора

Покоління	Фертильність		Кількість паростків з кількістю хромосом													
	мін.	макс.	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
F ₂	1,5	18	2	2	7	4	5	17	12	31	24	17	8	6	1	1
F ₃	8,5	49,5	—	—	—	—	8	12	10	44	92	36	28	8	3	—
F ₄	20,5	80	—	—	—	1	1	13	24	81	142	47	12	6	—	—

Для створення чужинно-заміщених ліній становлять інтерес лише рослини з такими числами хромосом, від яких у перспективі можна отримати 42-хромосомні еуплоїди. Розкид хро-

мосомних чисел у рослин F₂, що визначали у первинних корінцях паростків, був від 33 до 46 хромосом, хоча не всі були життєздатними та фертильними. Для вирощування та отримання

насіння генерації F_3 добирали рослини з кількістю хромосом не меншою, ніж 40, найбільш перспективних для створення гексаплоїдних ліній. 40-хромосомна рослина може бути подвійним моносоміком, який є потенційним засновником двох різних чужинно-заміщених ліній, лише б був життєздатним та самофертильним. Однак процес формування гібридних геномів не обмежується лише сортуванням хромосом двох різних геномів, він може супроводжуватися між- та

–внутрішньохромосомними перебудовами у гібридному геномі. Це припущення частково засвідчується вже простим спостереженням метафазних пластинок. Крім гексаплоїдних рослин з наявністю, за даними дот-блот гібридизації, чужинного хроматину, зустрічаються паростки, хромосомний набір яких включає телоцентрики, три супутникові хромосоми замість двох, телоцентрики з супутниками (рис. 2).



а)



б)

Рис. 2. Метафазні пластинки у клітинах корінців паростків F_4 . а) 42 хромосоми, одна з яких є телоцентричною; б) 44 хромосоми, в тому числі один телоцентрик та три хромосоми із спутниками

З 92 рослин F_3 , оцінених у польових умовах 2010 року, 44 були стійкими до борошнистої роси. Від 32 з них отримали насіння, у паростках яких визначили кількість хромосом, що варіювала від 40 до 42. Три рослини виявилися 42-хромосомними стійкими лініями, що не розщеплюються за кількістю хромосом.

Загалом, розмах варіювання за кількістю хромосом у F_4 був 36–44, сім рослин серед них були такими, що дали тільки 42-хромосомних нащадків. Проведення процедури дот-блот гібридизації з зондом, виготовленим із ДНК *Ae. mutica*, свідчить, що всі вони дають позитивну реакцію гібридизації своєї геномної ДНК з таким зондом, тобто мають у складі геному хроматин геному T. З цими 42-хромосомними рослинами вже можна починати роботу з визначення кількості чужинних заміщень та їхнього обсягу через вивчення асоціації хромосом у M1 МПК мейозу. Після цього можна переходити до ідентифікації гомологічної належності чужинних включень [6]. Для цього планується застосування хромосомно-специфічних біохімічних генів-маркерів та SSR-маркерів, локалізованих, за літературним і даними у хромосомах геному

D м'якої пшениці. На сьогодні перевірено можливість застосування мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5-ої гомологічної групи пшениці для пошуку поліморфізму серед рослин F_4 у порівнянні з Авророю та Авротикою та показано, що кілька таких локусів цілком придатні для скринування матеріалу, з яким працюємо (рис. 3).

Рослини з кількістю хромосом більше 42 залишали для подальшого самозапилення як цінне джерело множинних чужинних заміщень. Під лініями з множинними чужинними заміщеннями ми маємо на увазі такі лінії, які мають більше однієї чужинної хромосоми, яка замістила хромосоми субгеному D. Власне саме для цього Є.Г. Жировим і було запропоновано та розроблено метод змішування хромосом в одному з трьох субгеномів гексаплоїдного гібриду від схрещування двох гексаплоїдів, які відрізнялися один від одного лише одним з трьох субгеномів. Необхідність створення інтрогресивних ліній з множинними інтрогресіями можна пояснити наступними міркуваннями. Далеко не всі ознаки, за якими ми прагнемо покращити м'яку пшеницю, використовуючи для цього чужинні

гени, контролюються одним геном, який можна перенести у одному фрагменті чужинної хромосоми, тобто у транслокації. До таких генів відносяться перш за все гени вертикальної стійкості до стресових чинників біотичної природи. У нашому випадку, при роботі з Авротикою, дуже бажаним є створення гексаплоїдних ліній, стійких до борошнистої роси та листової іржі. Можна йти звичайним шляхом, тобто створити окремі лінії, одна з яких буде стійкою до борошнистої роси, а інша – до листової іржі, а потім схрещувати їх з сучасними сортами м'якої пшениці, прагнучи об'єднати дві транслокації в од-

ному генотипі. А можна спробувати відібрати лінію з двома чужинними хромосомами або транслокаціями, одна з яких несе ген стійкості до борошнистої роси, а інша – до листової іржі. Тобто, у даному випадку є вибір між двома шляхами роботи з лініями, і який з них дасть кращі результати, покаже лише практика. Все ж, першим кроком у такій роботі є створення гексаплоїдних ліній з чужинними інтрогресіями, які будуть схрещуватися з м'якою пшеницею без обмежень та давати фертильні гібриди, серед нащадків яких ми будемо шукати рослини з бажаними властивостями.

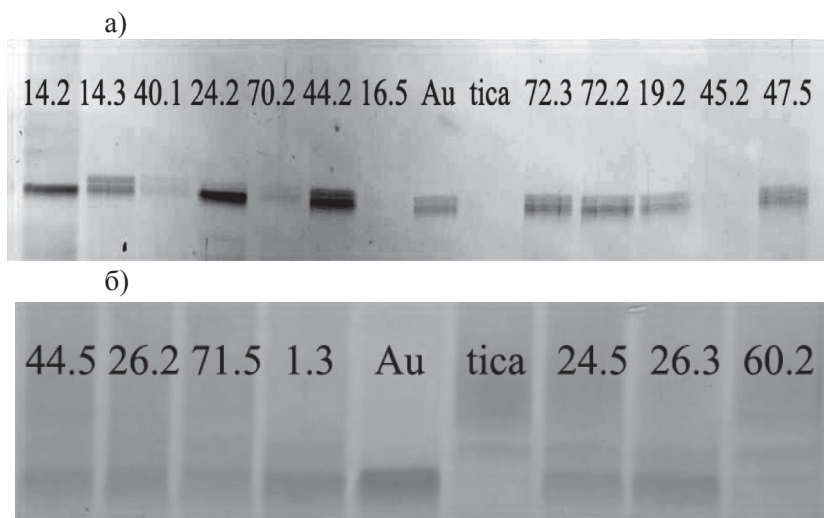


Рис. 3. Поліморфізм за алелями мікросателітних маркерів між генотипами Аврора (Au), Авротика (tica) та серед гексаплоїдних ліній: а) локус *Xcfd189-5D*, лінії 40.1, 70.2, 16.5, 45.2 подібні до Авротики; б) локус *Xbarc205-5D*, лінія 60.2 подібна до Авротики

Проте є інші важливі агрономічні ознаки, покращити за якими м'яку пшеницю також було б бажано. Це ознаки стійкості до стресових чинників абіотичної природи. Про такі ознаки вже добро відомо, що їхній генетичний контроль практично ніколи не буває моногенним, а здійснюється в результаті експресії принаймні кількох генів, які утворюють так звані генні мережі. Щоб перенести у геном хоча б кілька ключових генів, що утворюють такі мережі, навіть теоретично потрібно починати роботу з таким геномом, який має кілька чужинних заміщень. Авротика на відміну від усіх інших геномно-заміщених амфідиплоїдів, створе-

них свого часу Жировим та Терновською [3], характеризується видатною зимо-морозостійкістю. Чи пояснюється ця її властивість генами, що їх несе власне субгеном Т, чи має місце взаємодія між генами егілопсу та генами, що їх містить тетраплоїдний компонент ААВВ генотипу Аврора, який входить до складу генома Авротики, на це питання відповіді поки ще немає. І шукати його потрібно через створення інтрогресивних ліній, які за зимо-морозостійкістю будуть наближатися до Авротики, суттєво перевищуючи за цим показником сорти м'якої пшениці.

Висновки

Показано ефективність застосування методу «змішування» хромосом третього субгеному для створення гексаплоїдних ліній *T. aestivum* / *Ae. mutica* з хромосомами егілопса, які замістили хромосоми пшениці. Факт наявності чужинних інтрогресій у складі геному інтрогресивних ліній засвідчується перш за все наяв-

ністю чужинних градацій ознак морфології рослин та стійкістю до борошнистої роси. Дот-блот гібридизація геномної ДНК ліній та геномної ДНК *Ae. mutica* підтверджує наявність чужинного хроматину у геномі ліній. Самофертильність гібридів між Авротикою та Авророю починаючи з F₁ полегшує процес створення та сприяє збе-

реженню чужинних хромосом у гібридних геномах завдяки відсутності беккросування з рекурентним генотипом Аврора, яке є

обов'язковим елементом методу при самостерильності гібридів.

Література

1. Panayotov I., Tsujimoto H., Fertility restoration and NOR suppression caused by *Aegilops mutica* chromosomes in alloplasmic hybrids and lines // *Euphytica*. – 1997. Vol. 94, №2. – P. 145–149.
2. Eser V. Characterisation of powdery mildew resistant lines derived from crosses between *Triticum aestivum* and *Aegilops speltoides* and *Ae. mutica* // *Euphytica*. – 1998. – Vol. 100. – P. 269–272.
3. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // *Вестник с.-х. науки*. – 1984. – №10. – С. 58–66.
4. Jones J.K., Majisu B.N. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. // *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. – 1968. – Vol. 10, №3. – P. 620–626.
5. Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes // *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* – 1991. – №137. – P. 1–116.
6. Антонюк М.З., Терновська Т.К. Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом “змішування” хромосом у межах одного субгеному // *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Том 2*. – Київ: Логос, 2001. – С. 368–375.

T.S. IEFIMENKO, M. Z. ANTONYUK, V.S. MARTYENKO

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

DEVELOPMENT OF ALIEN-SUBSTITUTION AND ALIEN-ADDITION *TRITICUM AESTIVUM* / *AEGILOPS MUTICA* LINES

Aims. Development of *T. aestivum* / *Ae. mutica* introgressive lines and their assessment for powdery mildew resistance and morphological characters. **Methods.** Artificial hybridization, determination of chromosome numbers at mitosis metaphase, PCR, dot-blot hybridization of genome DNA. **Results.** AABBDT hybrid was sufficiently self-fertile; therefore, progeny derived from its self-pollination were used for the development of introgressive lines, according to chromosome mixing method. Avoidance of backcrossing to recurrent parent provided maximal retention of *Aegilops* chromosomes in progeny used for introgressive lines development. **Conclusions.** Derived introgressive lines are appropriate for the following identification of quantity and amount of alien introgressions and determination of their homoeological identity.

Key words: wheat introgressive lines, *Ae. mutica*, powdery mildew, frost resistance.

КОВАЛЬЧУК М.В.¹, ГУЛЬКО Т.П.^{1,2}

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины*

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150, e-mail: kovmv@ukr.net

² *ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»*

Украина, 04114, Киев, ул. Вишгородская, 67

МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ICR, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОЙ К СПОНТАННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ

Онкозаболевания занимают одно из первых мест в структуре заболеваний во всем мире. Несмотря на успехи в изучении механизмов канцерогенеза и усилия по разработке методов ранней диагностики и лечения, онкопатологии остаются одними из важнейших проблем современной медицины. Разработка новейших технологий лечения требует предварительных тщательных экспериментальных исследований, не-

заменимую роль в которых выполняют лабораторные животные. Поэтому создание адекватных моделей карцерогенеза на животных является актуальным.

Тот факт, что клетки приобретают генетические и эпигенетические нарушения, способствующие опухолевой прогрессии, является доказанным [1]. Известно, что изменение ряда факторов окружающей среды приводит к дестаби-