

3. Наивысшие значения уровня заселенности кустарников в условиях зеленых насаждений г. Гродно отмечены для тли *Aphis cirsiacanthoidis*, изменчивого розанного пилильщика (*Agre pagana*) и розанной моли-малютки (*Stigmella anomalella*), а уровня поврежденности – для листовых долгоносиков (Curculionidae: *Phyllobius*, *Strophosoma*), садового хрущика (*Phyllopertha horticola*), а также изменчивого розанного пилильщика.

4. Красивоплодные кустарники в условиях зеленых насаждений г. Гродно повреждаются по меньшей мере 16 видами массовых насекомых-фитофагов. В наибольшей степени от повреждений этими вредителями страдают розы и шиповники, а также бирючина и снежноягодник белый.

1. Парфенов В. И. Антропогенные изменения флоры и растительности Белоруссии. Минск, 1985.
2. Ассортимент деревьев и кустарников для зеленого строительства. Минск, 1997.
3. Панько Н. А. // Интродукция растений и охрана природы. Минск, 1969. С. 204.
4. Рыжая А. В. // Вестник ГрДУ. Сер. 2. 2008. № 73. С. 168.
5. Буга С. В., Петров Д. Л., Рыжая А. В., Сауткин Ф. В. Фитофаги – вредители древесных растений урбоценозов Минска и Гродно. Минск, 2010.
6. Буга С. В., Рыжая А. В. // Вестник ГрДУ. Сер. 5. 2011. № 2. С. 119.
7. Сауткин Ф. В., Рыжая А. В., Буга С. В. // Зоологические чтения: Материалы Респ. науч.-практ. конф. Гродно, 2012. С. 137.
8. Горленко С. В., Блинцов А. И., Панько Н. А. Устойчивость древесных интродуцентов к биотическим факторам. Минск, 1988.
9. Фасулати К. К. Полевое изучение наземных беспозвоночных. Минск, 1971.
10. Шапошников Г. Х. Наставление к собиранию тлей. М., 1952.
11. Collecting and preserving insects and mites: Techniques and tools / Ed. M. E. Schaaf. Washington, 2005.
12. Рупайс А. А. Вредители деревьев и кустарников в зеленых насаждениях Латвийской ССР. Рига, 1981.
13. Мамаев Б. М. Определитель насекомых по личинкам. М., 1972.
14. Вредители сельскохозяйственных культур и лесных насаждений: в 3 т. / Под ред. В. П. Васильева. Т. 2. Вредные членистоногие, позвоночные. Киев, 1988.
15. Определитель вредных и полезных насекомых и клещей плодовых и ягодных культур в СССР / Под ред. Л. М. Копаневой. Л., 1984.
16. Гербарное дело: Справ. руководство / Рус. изд. под ред. Д. Гельмана. Кью, 1995.
17. Гусев В. И. Определитель повреждений деревьев и кустарников, применяемых в зеленом строительстве. М., 1989.
18. Гусев В. И. Определитель повреждений плодовых деревьев и кустарников. М., 1990.
19. Насекомые и клещи – вредители сельскохозяйственных культур: в 4 т. Л.; СПб., 1972–1999.
20. Груздев Г. С., Дорожкина Л. А., Петриченко С. А. Защита зеленых насаждений в городах: Справ. М., 1990.
21. Трейвас Л. Ю. Болезни и вредители декоративных садовых растений: Атлас-определитель. М., 2008.
22. Bladmineerders van Europa [Electronic resource] / Dr. W. N. Ellis. Mode of access: <http://www.bladmineerders.nl>. Date of access: 11.03.2012.
23. British Leafminers [Electronic resource] / R. Edmunds et al. Mode of access: <http://www.leafminers.co.uk>. Date of access: 15.03.2012.
24. Бородин О. И. // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов: Материалы Междунар. науч.-практ. конф. и X Зоол. конф. Минск, 2009. Ч. 1. С. 47.

Поступила в редакцию 29.05.12.

**Федор Викторович Сауткин** – аспирант кафедры зоологии. Научный руководитель – С. В. Буга.

**Александра Васильевна Рыжая** – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и физиологии человека и животных ГрГУ им. Янки Купалы.

**Сергей Владимирович Буга** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой зоологии.

УДК 546.723-319+576.3

Е. А. ПЕТРОВА, Н. П. ДРАЖИНА, Е. М. СЕМЕНОВА, С. А. ВОРОБЬЕВА

## ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ МАРКИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

The process of mesenchymal stem cells labeling with 5,9 nm maghemite nanoparticles stabilized by oleic acid and triethanolamine has been studied. The effects of the method and duration of labeling as well as the concentration of magnetic nanoparticles on the cell viability, adhesion and proliferation were investigated. It was established that the obtained magnetic nanoparticles are characterized by low cytotoxicity and can be used as an effective agent for mesenchymal stem cells labeling for subsequent transplantation and magnetic resonance imaging.

Исследования в области наномедицины, посвященные изучению и использованию уникальных свойств наноматериалов для создания лекарств нового поколения, существенного повышения чувствительности и точности диагностики, а также эффективности терапии, в том числе и клеточной, приобретают все большую актуальность в современном научном мире.

Благодаря относительной простоте получения в больших количествах, а также низкой цитотоксичности [1] наиболее многообещающими материалами для наномедицины являются оксиды железа [2]. Известно, что магнитные наночастицы можно использовать для маркировки как мезенхимальных [3], так и нейрональных стволовых клеток [4] для их выделения из клеточной суспензии [5], концентрирования [6], а также для визуализации и мониторинга методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) [7–9], что имеет исключительное значение в случае трансплантации стволовых клеток [10, 11].

Целью настоящей работы явилось получение магнитных наночастиц и исследование процесса маркировки ими мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для последующей трансплантации и визуализации методом МРТ.

### Экспериментальная часть

Магнитные наночастицы получали гидролизом солей двух- и трехвалентного железа и модифицировали смесью олеиновой кислоты и триэтаноламина при нагревании до  $50 \div 60$  °С. Синтез проводили на водяной бане в течение 2 ч. Спустя сутки коллоидный раствор центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин, супернатант, представляющий собой вязкую жидкость черного цвета с зеркальным блеском, переносили в емкость из темного стекла и хранили при 4 °С.

Содержание дисперсной фазы в магнитной жидкости определяли весовым методом. Морфологию частиц дисперсной фазы исследовали на просвечивающем электронном микроскопе ЭМ-125. Рентгенофазовый анализ образца проводили на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3, используя  $\text{CoK}_\alpha$ -излучение в интервале углов  $2\theta = 6 \div 90^\circ$ .

Для стерилизации магнитную жидкость перед использованием пропускали через бактериальный фильтр с диаметром пор 22 мкм, а затем разбавляли полной питательной средой на основе среды Игла в модификации Дульбекко с 10 % содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), глутамином (1 %, 20 мМ) и антибиотиками (50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл неомицина). Конечные (при инкубации с клетками) разведения магнитной жидкости составляли 1000, 1500 и 2000 раз, при этом концентрация магнитных наночастиц равнялась 0,0137, 0,0091 и 0,0069 мас. % соответственно.

Культуры МСК получали из костного мозга половозрелых белых аутбредных крыс, как было описано в [12–14]. Маркирование клеток проводили на 1–4 пассажах двумя способами: в суспензии клеток (при их переводе в следующий пассаж) и в монослое на пластике. При маркировании в суспензиях клеток МСК костного мозга крысы снимали с культурального пластика инкубацией с 0,025 % трипсином-ЭДТА (5 мин, 37 °С), реакцию останавливали добавлением избытка фосфатно-солевого буфера (ФСБ) с 5 % ЭТС и дважды отмывали этим же раствором. Полученный осадок клеток ресуспендировали в полной культуральной среде. Суспензии МСК ( $2 \cdot 10^4$  клеток) и магнитных наночастиц общим объемом 1 мл вносили в лунки 24-луночного планшета. Инкубацию клеток проводили при 37 °С,  $95 \div 99$  % влажности и 5 % содержания углекислого газа. С целью определения оптимального срока культивирования чашки помещали в инкубатор на 12, 24, 36 и 48 ч. Затем среду полностью удаляли, дважды промывали лунки ФСБ с ЭТС и заливали чистой питательной средой. Далее полную смену среды проводили через 3–4 сут.

При маркировании МСК в монослое на пластике культуральную среду удаляли полностью, чашки промывали ФСБ от неадгезированных погибших клеток и клеточного дебриса. В лунки вносили полную питательную среду, содержащую 0,0069 мас. % магнитных наночастиц. Через сутки культуральную среду с наночастицами полностью удаляли, дважды промывали лунки ФСБ и вносили 1 мл полной среды.

Для оценки влияния магнитного поля на маркированные клетки после 24-часового инкубирования МСК с магнитными наночастицами часть клеток культивировали в постоянном магнитном поле в течение 24 и 48 ч.

Для качественного определения железа (магнитных наночастиц) в клетках использовали реакцию с желтой кровяной солью ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), протекающую с образованием темно-синей «берлинской лазури» ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ). Для окрашивания брали маркированные культуры МСК после двукратной смены среды и промывки ФСБ. Клетки фиксировали на пластике 10 % водным раствором формалина в течение 15 мин, а затем дважды промывали дистиллированной водой. Смесь 5 % раствора соляной кислоты и 5 % раствора желтой кровяной соли в соотношении 1:1 вносили в лунки и инкубировали в течение 20 мин при 20 °С, после чего лунки дважды промывали дистиллированной водой. Для визуализации ядер клеток препарат окрашивали  $10^{-5}$  М раствором флуоресцентного красителя

Хёкст 33342 в течение 10 мин и затем промывали водой. Полученные препараты заливали 50 % раствором глицерина в ФСБ и хранили при комнатной температуре в темноте.

Для визуализации лизосом в живых клетках использовали витальный краситель нейтральный красный: 0,5 % водный раствор красителя вносили в лунки и через 20 мин визуально оценивали расположение лизосом в клетках.

Мониторинг культур осуществляли при помощи микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200 в технике косоого освещения. Для фотографического документирования использовали камеру Carl Zeiss AxioCam MRm.

Для трансплантации маркированные клетки отмывали ФСБ и снимали с пластика раствором трипсина с ЭДТА. После этого двукратно отмывали клеточную суспензию: первый раз в ФСБ с 5 % ЭТС, затем в ФСБ, потом клетки ресуспендировали в физиологическом растворе. Перед трансплантацией для подтверждения внутриклеточного накопления магнитных наночастиц вносили подготовленную суспензию в камеру Горяева и визуально определяли наличие в клетках магнитных наночастиц. Оценку жизнеспособности полученных культур проводили методом исключения трипанового синего. Для этого клеточную суспензию смешивали с раствором трипанового синего в соотношении 1:1, вносили в камеру Горяева и проводили микроскопический учет окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток во всей камере.

Пробирки с суспензиями клеток помещали на лед и в течение часа трансплантировали самкам белых беспородных крыс массой 200±250 г. Клеточную суспензию в 1–2 мл физиологического раствора вводили внутривенно (в хвостовую вену), а в 0,5 мл физиологического раствора – подкожно (в область лопатки), внутрибрюшинно и внутрикожно (в латеральную часть брюха). Для наркоза применяли 1 % раствор тиопентала натрия (внутрибрюшинно). Зафиксированных животных подвергали магнитно-резонансной томографии (МРТ) на томографе Philips (1,5 Тл) в T-1 и T-2 режимах с толщиной среза 2 мм до и после введения суспензии маркированных МСК. МРТ-сканирование проводили через 2 и 24 ч, через 7 и 21 сут после введения клеток. Анализ изображений осуществляли с помощью программы Philips DICOM Viewer R2.5 Version 1 Level 1 (Нидерланды).

#### Результаты и их обсуждение

В соответствии с результатами весового анализа содержание оксида железа в полученной магнитной жидкости составляло 13,7 мас. %, причем дисперсная фаза последней, как следует из данных электронно-микроскопических исследований, образована наночастицами сферической формы с основным диаметром 5,9 нм ( $\sigma = 0,2$ ). Рентгенограмма дисперсной фазы магнитной жидкости характеризуется дифракционными максимумами, соответствующими маггемиту  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , при углах 35,3, 41,7, 50,8, 63,4, 67,8 и 74,7° от кристаллографических плоскостей (206), (119), (0012), (2212), (1115) и (4012) соответственно. Очевидно, в процессе длительного нагревания на воздухе на стадии стабилизации наночастиц магнетита олеиновой кислотой и триэтаноламином произошло окисление магнетита  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  до маггемита  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

Полученные культуры МСК сохраняли типичную фибробластоподобную морфологию и высокий пролиферативный потенциал на протяжении 4 пассажей (рис. 1). Количество клеток возрастало в 5÷10 раз за 1 пассаж.

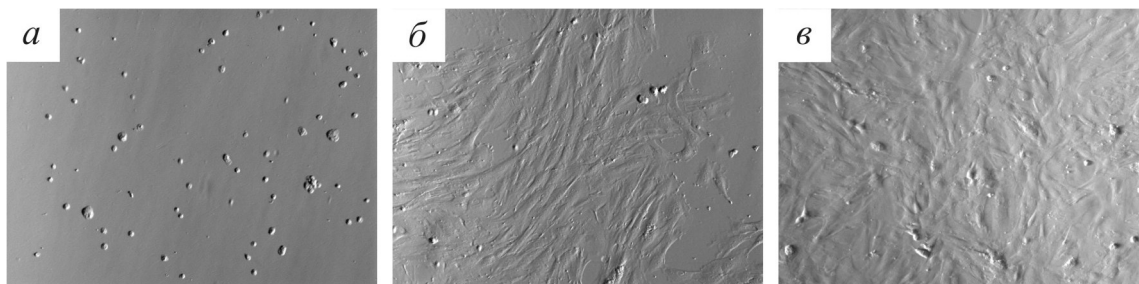


Рис. 1. Культура МСК 4-го пассажа на 2-е (а), 5-е (б) и 12-е сут (в) культивирования

Оптимальным способом маркирования МСК магнитными наночастицами является инкубация монослоя клеток с магнитной жидкостью, разбавленной в 2000 раз культуральной средой, в течение 24 ч. На рис. 2 видно, что культуры МСК, инкубированные с суспензией магнитных наночастиц, представляли собой адгезированные распластаные клетки, содержащие везикулы с магнитными наночастицами. Кроме того, в среде присутствовали агрегаты непоглощенных частиц. Отметим, что при разбавлении полной питательной средой магнитная жидкость коагулировала в течение 5 мин,

а при разведении бессывороточной средой сохраняла относительную стабильность в течение 30 мин. Данное наблюдение позволяет предположить, что основной причиной агрегации магнитных наночастиц, сопровождающейся выпадением осадка, является их адсорбция на белках, присутствующих в ЭТС. В связи с этим во всех экспериментах по маркированию МСК магнитную жидкость разбавляли культуральной средой непосредственно перед началом маркирования.

Инкубация МСК в питательной среде, содержащей магнитные наночастицы, несмотря на выраженную агрегацию последних, приводила к интенсивному поглощению частиц клетками. Наблюдаемый эффект, по-видимому, обусловлен продолжительностью инкубации, достаточной для эффективного поглощения клетками наночастиц  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ . Поскольку при инкубации МСК с магнитными наночастицами более 24 ч интенсивность окрашивания клеток практически не изменялась, можно предположить, что за сутки достигается максимальное насыщение клеток наночастицами и дальнейшее увеличение срока культивирования нецелесообразно, несмотря на низкую токсичность магнитной жидкости.

При посеве МСК в присутствии магнитных наночастиц в концентрации 0,0069 мас. % не было выявлено их значительного влияния на способность стволовых клеток к адгезии и расплыванию (около 90÷95 % клеток прикреплялись к пластику, все неприкрепленные клетки были погибшими).

За 24 ч инкубации магнитные наночастицы частично накапливались на мембранах клеток, образовывали оседающие на дно лунки крупные агрегаты с белком и проникали в клетки, где аккумулировались в цитоплазматических везикулах (фаголизосомах, лизосомах). Локализация магнитных наночастиц в лизосомах подтверждалась как характерным расположением органелл, так и окрашиванием витальным красителем нейтральным красным, который избирательно накапливается в лизосомах живых клеток, где окрашивает их содержимое, имеющее  $\text{pH} < 7$ , в красный цвет.

Факт проникновения магнитных наночастиц в МСК также был подтвержден цветной реакцией на  $\text{Fe}^{3+}$ -ионы. Так, при выдерживании МСК, маркированных магнитными наночастицами, в кислом растворе желтой кровяной соли в течение 15 мин появлялось характерное синее окрашивание, обусловленное присутствием в клетках соединений железа, тогда как обработка немаркированных культур МСК указанным раствором не приводила к изменению их окраски. Кроме того, было обнаружено, что скопления магнитных наночастиц, окрашенные в синий цвет «берлинской лазурью», располагались на мембране и в цитоплазматических везикулах клеток, не проникая в ядра. При исследовании маркированных МСК методом флуоресцентной микроскопии после окрашивания ядерной ДНК красителем Хёкст 33342 подтвердилось, что магнитные наночастицы расположены вне ядра.

Для маркировки клеток достаточным является разведение полученной магнитной жидкости в 2000 раз до концентрации магнитных наночастиц 0,0069 мас. %. Более концентрированные разведения нецелесообразны, так как, несмотря на то что частицы в этом случае находятся в избытке, интенсивность окрашивания клеток практически не изменяется по сравнению с культурой МСК, маркированной при более низкой концентрации наночастиц  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (рис. 3).

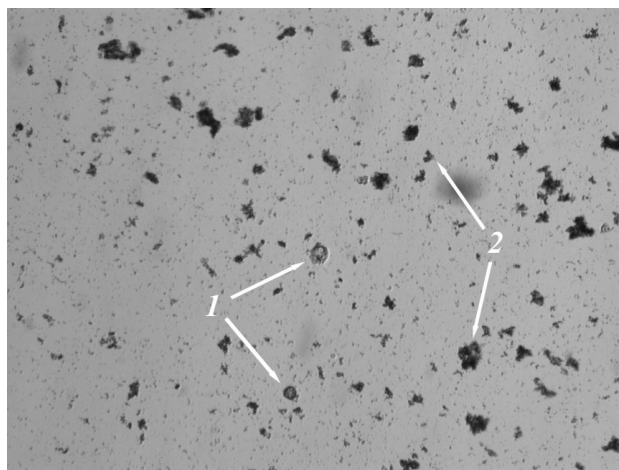


Рис. 2. Культура МСК, инкубированная с суспензией магнитных наночастиц в культуральной среде в течение 1 ч:  
1 – адгезированные нераспластавшиеся клетки, 2 – агрегаты частиц

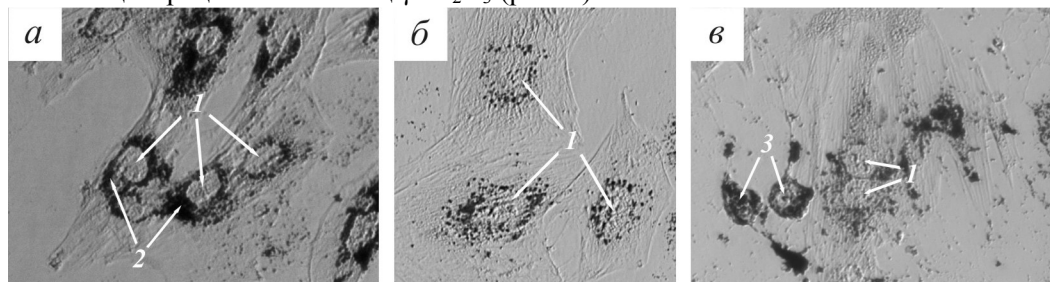


Рис. 3. Культуры МСК, маркированные 0,0137 (а), 0,0091 (б) и 0,0069 мас. %  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (в), на 3-и сут культивирования:  
1 – ядра клеток, 2 – скопления частиц в цитоплазме, 3 – неадгезированные клетки, содержащие магнитные наночастицы

Жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток после проведения маркировки магнитными наночастицами в концентрациях 0,0137, 0,0091 и 0,0069 мас. % в течение одних суток составляла 90 %, т. е. высокое содержание магнитных наночастиц в питательной среде не оказывает значимого токсического эффекта на клетки, что свидетельствует о высокой степени биосовместимости олеиновой кислоты и триэтаноламина, используемых для стабилизации магнитных наночастиц.

На рис. 3 приведены результаты 24-часовой инкубации МСК с суспензией магнитных наночастиц различной концентрации на 3-и сут культивирования, причем на рис. 3 в представлены дочерние клетки после завершения митоза. Отметим, что магнитные наночастицы оставались в клетках при пассировании. Кроме того, МСК, маркированные магнитными наночастицами, сохраняли не только способность к адгезии и распластыванию, но и митотическую активность, а магнитные наночастицы при делении распределялись между дочерними клетками вместе с цитоплазмой (см. рис. 3 в).

Слабое внешнее магнитное поле не оказывало заметного отрицательного воздействия на жизнедеятельность маркированных клеток.

Все типы введения (внутривенное, внутрикожное, подкожное и внутрибрюшинное) экспериментальным животным МСК, маркированных магнитными наночастицами, не приводили к эмболии, не оказывали выраженного острого токсического эффекта и не вызвали развития значительной локальной или системной воспалительной реакции.

Через 2 и 24 ч после введения МСК методом МРТ-сканирования были выявлены области локализации маркированных клеток, введенных крысам подкожно и внутрикожно. Зоны локализации магнитного материала выявлялись как темные зоны со светлым контуром. После введения маркированных МСК на 7-е и 21-е сут проводили мониторинг состояния очагов, который показал постепенное перераспределение магнитных наночастиц, обусловленное, вероятно, их транспортом фагоцитирующими клетками.

При внутрибрюшинном и внутривенном введении маркированных клеток концентрация магнитного вещества оказалась недостаточной для детектирования с помощью МРТ. Данное наблюдение указывает на необходимость увеличения дозы магнитного вещества в организме, что может быть достигнуто только за счет роста количества вводимых клеток, так как число магнитных наночастиц, поглощенных одной клеткой, вероятно, лимитировано.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что полученные магнитные наночастицы в концентрации 0,0069 мас. % характеризуются низкой цитотоксичностью и эффективно маркируют мезенхимальные стволовые клетки при инкубации в течение 24 ч. Полученные данные свидетельствуют о том, что магнитные наночастицы локализуются в везикулах в цитоплазме клеток и сохраняются в них при пассировании, не оказывая негативного влияния на способность клеток к адгезии, распластыванию и пролиферации, причем при делении клеток магнитные наночастицы распределяются между дочерними клетками. Экспериментально подтверждено, что маркированные магнитными наночастицами стволовые клетки могут быть детектированы *in vivo* с помощью магнитно-резонансной томографии.

Полученные магнитные наночастицы, стабилизированные олеиновой кислотой и триэтаноламином, обладают рядом преимуществ по сравнению с известными материалами на основе наноразмерных оксидов железа, требующими длительной инкубации со стволовыми клетками [15] или дополнительного использования транспортных агентов, например протамин сульфата [7], а также отрицательно влияющими на способность стволовых клеток к дифференцировке [16].

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект № Б11М-103).

1. Cen L., Neoh K. G., Sun J., Hu F. et al. // *Adv. Funct. Mater.* 2009. Vol. 19. № 8. P. 1158.
2. Solanki A., Kim J.D., Lee K.-B. // *Nanomedicine.* 2008. Vol. 3. № 4. P. 567.
3. Wang L., Neoh K.-G., Kang E.-T. et al. // *Biomaterials.* 2010. Vol. 31. № 13. P. 3502.
4. Song M., Moon W. K., Kim Y. et al. // *Korean J. Radiol.* 2007. Vol. 8. № 5. P. 365.
5. Odabaş S., Sayar F., Güven G. et al. // *J. Chromatogr. B.* 2008. Vol. 861. № 1. P. 74.
6. Ito A., Hibino E., Honda H. et al. // *Biochem. Eng. J.* 2004. Vol. 20. № 2-3. P. 119.
7. Saldanha K. J., Piper S. L., Ainslie K. M. et al. // *Eur. Cells Mater.* 2008. Vol. 16. P. 17.
8. Hsiao J. K., Tai M.-F., Chu H.-H. et al. // *Magnet. Reson. Med.* 2007.
9. Riegler J., Wells J. A., Kyrtatos P. G. et al. // *Biomaterials.* 2010. Vol. 31. № 20. P. 5366.
10. Zhu J., Wu X., Zhang H. L. // *Curr. Drug Targets.* 2005. Vol. 6. № 1. P. 97.
11. Schmidtke-Schrezenmeier G., Urban M., Musyanovych A. et al. // *Cytotherapy.* 2011. Vol. 13. № 8. P. 962.

12. Friedenstein A. J., Gorskaja J. F., Kulagina N. N. // Exp. Hematol. 1976. Vol. 4. № 5. P. 267.
13. Friedenstein A. J., Chailakhjan R. K., Lalykina K. S. // Cell Tissue Kinet. 1970. Vol. 3. № 4. P. 393.
14. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. // Cytotherapy. 2006. Vol. 8. № 4. P. 315.
15. Sykova E., Jendelova P. // Prog. Brain Res. 2007. Vol. 161. P. 367.
16. Kostura L., Kraitchman D. L., Mackay A. M. et al. // NMR Biomed. 2004. Vol. 17. № 7. P. 513.

Поступила в редакцию 09.02.12.

**Елена Александровна Петрова** – аспирант лаборатории физиотерапии и курортологии Института физиологии НАН Беларуси. Научный руководитель – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Т. И. Терпинская.

**Наталья Петровна Дразина** – аспирант кафедры нервных и нейрохирургических болезней БГМУ. Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор А. Л. Усс.

**Екатерина Михайловна Семенова** – научный сотрудник НИИФХП БГУ.

**Светлана Александровна Воробьева** – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник НИИФХП БГУ.

УДК 604.6:635.21

Д. В. САВЧИН, А. С. ПАНИЮШ, Н. А. КАРТЕЛЬ

### РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОТБОРА И АНАЛИЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ГЕНОМ *GOX PENICILLIUM FUNICULOSUM*

Glucose oxidase (GOX) enzyme can generate  $H_2O_2$  by the oxidation of glucose in the presence of molecular oxygen.  $H_2O_2$  has the potential to enhance biotic and abiotic stress tolerance of higher plants. The gene encoding glucose oxidase was isolated from the genomic DNA of *Penicillium funiculosum*. The GOX gene was cloned under the control of a CaMV 35S promoter into the plant transformation vector pBI121. Potato was transformed via an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure by selecting for kanamycin resistance. Stable integration and expression of GOX gene in the transgenic potato lines were ascertained by molecular and biochemical tests. Transgene integration in the transformants was confirmed by PCR for GOX gene and multiplex PCR for GOX gene, NOS-terminator, actin gene, VirE2 gene. Histochemical analyses for  $H_2O_2$  production were studied using starch-KI medium. The transgenic plant lines will be used in further investigation.

Фермент глюкозооксидаза ( $\beta$ -D-глюкозо:  $O_2$ -1-оксидоредуктаза, КФ 1.1.3.4) катализирует реакцию окисления  $\beta$ -D-глюкозы до  $\beta$ -D-глюконо- $\delta$ -лактона и сопряженное восстановление молекулярного кислорода до пероксида водорода.

Пероксид водорода, супероксид-анион и другие активные формы кислорода (АФК), образующиеся в результате возникновения биотического (при атаке патогенов) или абиотического стресса, являются сигнальными молекулами, способствующими запуску защитных реакций растений [1]. Продукция и аккумуляция в большом количестве пероксида водорода приводит к ряду физиологических эффектов: клеточной гибели при гиперчувствительном ответе; формированию системной приобретенной устойчивости; закрытию устьичных щелей; образованию окислительных сшивок между белками и другими полимерами растительных клеточных стенок, а также их лигнификации, в результате чего повышаются их барьерные свойства [2, 3]. Пероксид водорода характеризуется также и прямым антимикробным эффектом. Множество мицелиальных грибов, в первую очередь *Aspergillus* и *Penicillium*, секретируют в окружающую среду глюкозооксидазу, ингибирующую или подавляющую развитие других организмов [4]. Возможно также участие пероксида водорода и в непосредственном ингибировании ферментных систем патогенов, участвующих в деградации растительных клеточных стенок [5].

Таким образом, можно предположить, что созданные трансгенные растения картофеля с нативным геном глюкозооксидазы (*gox*) *Penicillium funiculosum* будут характеризоваться повышенной устойчивостью к разнообразным стрессовым факторам внешней среды, в том числе и к воздействию патогенных организмов.

С целью изучения влияния экспрессии гена глюкозооксидазы на образование и аккумуляцию пероксида водорода и усиление защитных реакций растений созданы векторные конструкции с геном глюкозооксидазы *P. funiculosum* и осуществлена агробактериальная трансформация растений картофеля.

Анализ отобранных на селективной среде регенерантов растений картофеля проводили методами ПЦР, мультиплекс-ПЦР и с использованием биохимического теста.

#### Материал и методика

**Создание векторных конструкций с геном *gox*.** Нативный ген *gox* клонирован из высокоактивного грибного штамма 46.1 *P. funiculosum*. Молекулярная масса фермента глюкозооксидазы *P. funiculosum* составляет  $140 \pm 10$  кДа, молекулярная масса каждой субъединицы – порядка 70 кДа. Фермент