БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

Издается с января 1969 г.
(до 2017 г. – под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»)

Выходит три раза в год

2 2017

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор — **СИДОРОВ А. В.** – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: sidorov@bsu.by

Заместитель главного редактора — **ДЕМИДЧИК В. В.** – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: dzemidchik@bsu.by

Ответственный секретарь — **ХРАМЦОВА Е. А.** – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

Гельтман Д. В. Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
Давыденко О. Г. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Зинченко А. И. Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Кильчевский А. В. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
Кульчицкий В. А. Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Медведев С. С. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
Решетников В. Н. Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
Семак И. В. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Титок М. А. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
Усанов С. А. Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-chief — **SIDOROV A. V.**, doctor of science (biology), docent; professor at the department of human and animal physiology of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: sidorov@bsu.by

Deputy editor-in-chief — **DEMIDCHIK V. V.**, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: dzemidchik@bsu.by

Executive secretary — **KHRAMTSOVA E. A.**, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru

Geltman D. V. V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
Davydenko O. G. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Zinchenko A. I. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kilchevsky A. V. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Kulchitsky V. A. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
Medvedev S. S. Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
Reshetnikov V. N. Central Botanical Garden, Minsk, Belarus.
Semak I. V. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Titok M. A. Belarusian State University, Minsk, Belarus.
Usanov S. A. National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.

Физиология и клеточная биология

Physiology and cell biology

УДК 577.29:616-006.446.8

РАСШИРЯЯ ГИПОТЕЗУ «ДВУХ УДАРОВ»: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ *RUNX1-RUNX1T1*-ОПОСРЕДОВАННОГО ЛЕЙКОЗОГЕНЕЗА

И. Н. ИЛЬЮШЁНОК [1)]***, А. А. САВРИЦКАЯ*** [1)]***, Н. Н. ЯЦКОВ*** [1)]***, В. В. СКАКУН*** [1)]***, В. В. ГРИНЕВ*** [1)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

Считается, что гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1*, образующийся в результате транслокации t(8;21)(q22;q22), является одним из ключевых драйверов развития острого миелоидного лейкоза, однако, несмотря на более чем 20-летнюю историю исследований, его роль в процессе лейкозогенеза изучена не до конца. Распространенная концепция «двух ударов» предлагает рассматривать продукт *RUNX1-RUNX1T1* в качестве конкурента интактного транскрипционного фактора RUNX1, главного регулятора дифференцировки клеток крови. Между тем

Образец цитирования:
Ильюшёнок И. Н., Саврицкая А. А., Яцков Н. Н., Скакун В. В., Гринев В. В. Расширяя гипотезу «двух ударов»: молекулярные механизмы *RUNX1-RUNX1T1*-опосредованного лейкозогенеза // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 3–16.

For citation:
Ilyushonak I. M., Saurytskaya H. A., Yatskov N. N., Skakun V. V., Grinev V. V. Extending the «two-hits» hypothesis: the molecular mechanisms of *RUNX1-RUNX1T1*-mediated leukemogenesis. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 3–16 (in Russ.).

Авторы:
Илья Николаевич Ильюшёнок – магистр биологических наук; ассистент кафедры генетики биологического факультета.
Анна Андреевна Саврицкая – студентка биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Гринев.
Николай Николаевич Яцков – кандидат физико-математических наук, доцент; доцент кафедры системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиофизики и компьютерных технологий.
Виктор Васильевич Скакун – кандидат физико-математических наук; заведующий кафедрой системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиофизики и компьютерных технологий.
Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:
Ilya Ilyushonak, masters of science (biology); assistant at the department of genetics, faculty of biology.
nov.ilyushonok@gmail.com
Hanna Saurytskaya, student at the faculty of biology.
anna.kassy.s@gmail.com
Nikolai Yatskov, PhD (physics and mathematics), docent; associate professor at the department of system analysis and computer modeling, faculty of radiophysics and computer technologies.
yatskou@bsu.by
Viktor Skakun, PhD (physics and mathematics); head of the department of system analysis and computer modeling, faculty of radiophysics and computer technologies.
skakun@bsu.by
Vasiliy Grinev, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
grinev_vv@mail.ru

в настоящей работе акцент сделан на то, что накопленная к этому времени информация не позволяет оценивать данную гипотезу как самодостаточную в существующем виде. В частности, показано, что, помимо онкогенных свойств, этот генетический локус *RUNX1-RUNX1T1* может проявлять противолейкозную активность. Установлено, что гибридный белок способен не только подавлять, но и активировать транскрипцию генов-мишеней. Кроме того, он функционально кооперируется с интактным геном *RUNX1*. В представленном обзоре обобщаются современные данные о месте и роли онкогена *RUNX1-RUNX1T1* в развитии острого миелоидного лейкоза и предлагается несколько магистральных направлений, позволяющих усовершенствовать модели *RUNX1-RUNX1T1*-опосредованного лейкозогенеза.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз; гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1*; гипотеза «двух ударов».

Благодарность. Работа получила финансовую поддержку со стороны Министерства образования Республики Беларусь: грант № 3.08.3 (947/54).

EXTENDING THE «TWO-HITS» HYPOTHESIS: THE MOLECULAR MECHANISMS OF *RUNX1-RUNX1T1*-MEDIATED LEUKEMOGENESIS

***I. M. ILYUSHONAK*[a], *H. A. SAURYTSKAYA*[a], *N. N. YATSKOV*[a], *V. V. SKAKUN*[a], *V. V. GRINEV*[a]**

[a]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*
Corresponding author: I. M. Ilyushonak (nov.ilyushonok@gmail.com)

The fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* is a main outcome of t(8;21)(q22;q22) nonhomologous translocation. To date, this oncogene is considered as one of the key drivers of acute myeloid leukemia. However, despite more than 20 years of study, the role of *RUNX1-RUNX1T1* oncogene in development of leukemia still unclear. According to commonly accepted «two-hits» hypothesis, the fusion protein RUNX1-RUNX1T1 is dominant negative regulator of target genes for intact transcription factor RUNX1, the master regulator of hematopoietic differentiation. Meanwhile, current empirical data does not allow considering this hypothesis as self-sufficient in the existing form. In particularly, it was shown that the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* possesses anti-leukemia activity. This oncogene can also work not only as repressor but as transcription activator as well and it needs a functional cooperation with intact *RUNX1*. In this review, we considered a modern data about role of *RUNX1-RUNX1T1* oncogene in development of acute myeloid leukemia and we also proposed some general ideas how to improve a model of *RUNX1-RUNX1T1*-mediated leukemogenesis.

Key words: acute myeloid leukemia; fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*; the «two-hits» hypothesis.

Aknowlegements. This work was funded by the Ministry of Education of the Republic of Belarus: grant No. 3.08.03 (947/54).

Введение

Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) – это группа неопластических заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом популяции незрелых и аномально дифференцированных лейкоцитов, проникающих в костный мозг, кровяное русло и образующих инфильтраты в других органах и тканях [1]. В Беларуси ОМЛ в детском возрасте встречается в 14–19 % всех случаев острых лейкозов у детей (при общей доле острых лейкозов у данной возрастной группы 30–35 %). Частота острых лейкозов среди взрослого населения составляет 3 %, из них 75 % – случаи ОМЛ [2].

Наиболее часто встречающаяся цитогенетическая аномалия, ассоциированная с ОМЛ, – транслокация t(8;21)(q22;q22), которая фиксируется в 4–12 % случаев *de novo* ОМЛ у взрослых и 12–30 % – у детей [3], а также в образцах здоровых доноров [4; 5]. Ее результатом является образование гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, одного из драйверов малигнизации клеток крови при ОМЛ. Согласно традиционным представлениям он рассматривается как доминантный ингибитор функции интактного гена *RUNX1*, кодирующего один из ключевых транскрипционных факторов, управляющих дифференцировкой незрелых предшественников клеток крови. В рамках парадигмальной для онкогематологии гипотезы «двух ударов» такая мутация, блокирующая дифференцировку клеток, способна малигнизировать клетку в кооперации с мутацией – драйвером пролиферации. Однако эта достаточно простая схема, предложенная еще в 2002 г. [6], перестает быть удовлетворительной в свете накопленных за последние годы экспериментальных данных.

Цель настоящего обзора – попытка расширить концепцию «двух ударов» и скорректировать устоявшиеся представления о роли *RUNX1-RUNX1T1* в процессах лейкозогенеза.

Структура гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*

В результате негомологичной реципрокной транслокации t(8;21)(q22;q22), в процессе которой хромосомы 8 и 21 человека обмениваются участками, образуются две деривативные хромосомы – der8 и der21. Это сопряжено с объединением двух неродственных геномных локусов, кодирующих белки RUNX1 (хромосома 21) и RUNX1T1 (хромосома 8) (рис. 1, *а*). Два гибридных гена, получающихся путем такого объединения, называются *RUNX1-RUNX1T1* и *RUNX1T1-RUNX1*. Последний локализован на der21 и является молчащим [7].

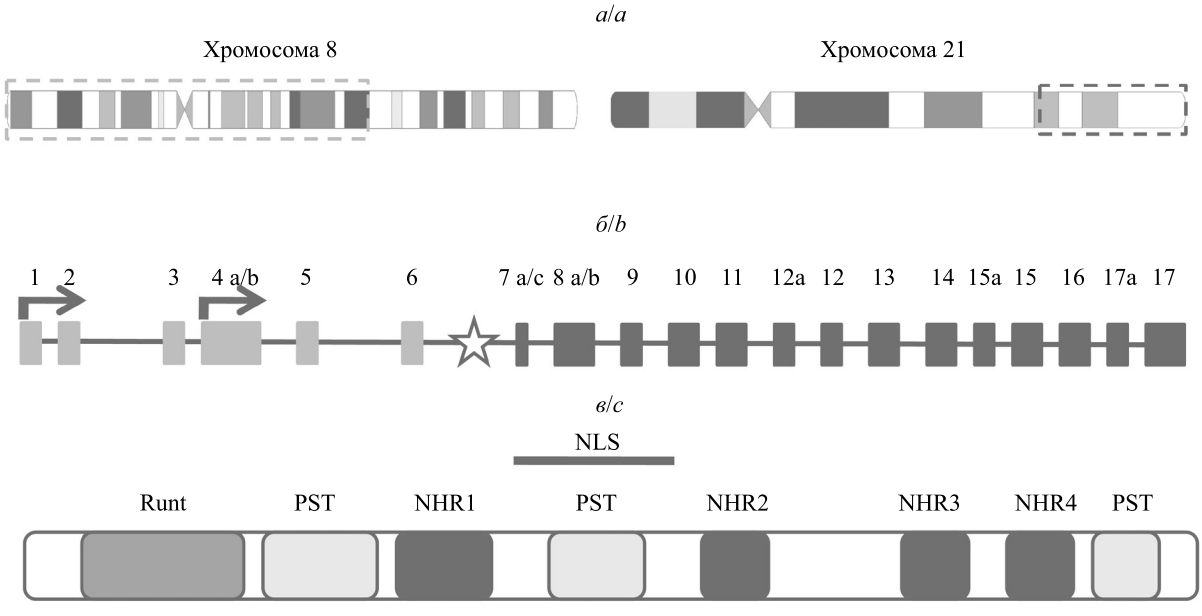


Рис. 1. Организация геномного локуса, кодирующего гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1*:
а – идеограммы 8-й и 21-й хромосом человека, участвующих в транслокации. Прерывистой линией отмечены фрагменты хромосом, образующие der8; *б* – структура гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*. Экзоны *RUNX1*-части показаны серыми прямоугольниками, экзоны *RUNX1T1*-части – черными прямоугольниками. Точка разрыва-воссоединения обозначена звездочкой, канонические промоторы – черными стрелками; *в* – доменная структура полноразмерного белка RUNX1-RUNX1T1

Fig. 1. Organization of the *RUNX1-RUNX1T1* genomic locus:
a – ideograms of chromosomes 8 and 21. Parts of chromosomes that form der8 are marked by dashed boxes; *b* – the structure of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. *RUNX1* exons are shown as gray rectangles, *RUNX1T1* exons are depicted by black rectangles. The breakpoint is marked with asterisk and canonical transcription start sites are located with black arrows; *c* – domain organization of the full-length RUNX1-RUNX1T1 fusion protein

Считывание гена *RUNX1-RUNX1T1* осуществляется с минус-цепи der8. На его 5’-конце, до точки разрыва-воссоединения, локализован участок, содержащий первые шесть экзонов гена *RUNX1*. Ниже точки разрыва-воссоединения расположена область, содержащая ген *RUNX1T1* начиная с экзона 7a (см. рис. 1, *б*).

Экспрессия гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* находится под контролем двух промоторов гена *RUNX1*. Для мРНК, которые транскрибируются с внешнего промотора, 5’-концевым является экзон 1, с внутреннего промотора – экзон 4a. Различия в структуре 5’-конца не приводят к различиям в структуре функциональных областей транслируемых белков, однако такие мРНК задействуют разные механизмы инициации трансляции: обычную кэп-зависимую инициацию в случае внешнего промотора и IRES-зависимую – для внутреннего промотора [8]. Обе промоторные области важны для нормального функционирования интактного гена *RUNX1* в процессе эмбриогенеза [9; 10] и сохраняют активность в лейкозных бластах, при этом наиболее активной является область внутреннего промотора [11]. Кроме того, существуют экспериментальные данные, которые подтверждают наличие у гибридного онкогена дополнительных, неаннотированных промоторных областей, лежащих вблизи от точки рекомбинации между двумя хромосомами [12].

RUNX1-локус кодирует N-концевую часть белка RUNX1, содержащую Runt-домен. Данная область способна связываться с ДНК в специфических сайтах, а также взаимодействовать с рядом белков. На С-конце гибридный белок несет в себе фактически полноразмерный белок RUNX1T1 (см. рис. 1, *в*).

Его основными функциональными участками являются четыре области NHR, гомологичные белку Nervy *D. melanogaster*. NHR1 имеет структурные сходства с TAF-белками, кофакторами базального фактора транскрипции TFIID [13]. Область NHR2 обеспечивает гомо- и гетеродимеризацию белков семейства RUNX1T1. Считается, что олигомеризация критична для функционирования гибридного белка [14–16]. Это позволяет рассматривать NHR2 как мишень для разработки противолейкозных молекулярных терапевтиков [16]. NHR3 и NHR4 содержат в себе специфические домены, обеспечивающие взаимодействие с другими белками. Для NHR3 это домен типа *coiled coil*, для NHR4 – типа «цинковые пальцы» [17]. Эта же область включает в себя три пролин-серин-треонин богатых участка PST, являющихся потенциальными мишенями киназного фосфорилирования [18], и сигнал ядерной локализации NLS.

Разнообразие альтернативных транскриптов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*

Традиционно внимание исследователей было сосредоточено на немногих мажорных изоформах мРНК гибридного онкогена. Разнообразие альтернативных сплайсинговых событий в их *RUNX1*-части обусловливается главным образом различиями в точке начала транскрипции. При синтезе с внешнего промотора в состав мРНК входят экзоны *RUNX1* с 1-го по 6-й, при транскрипции с внутреннего промотора – с 4-го по 6-й. В последнем случае в мРНК включается вариант 4-го экзона, обозначаемый как 4a. Он имеет большую длину с 5’-конца [17].

В *RUNX1T1*-части гибридного онкогена обнаружены дополнительные кассетные экзоны 12a, 15a и 17a, включение которых в мРНК приводит к образованию преждевременных стоп-кодонов. Белок, транслирующийся с мРНК 17a, лишен домена «цинковые пальцы», кодируемого NHR4, и обладает сниженной репрессорной активностью [19]. Напротив, экспрессия сплайсингового варианта 15a, кодирующего лишенный NHR3 и NHR4 белок, ассоциирована с быстрым развитием лейкоза [20–22]. Наконец, включение в мРНК экзона 12a приводит к добавлению в состав зрелого белка, помимо Runt-домена, лишь области NHR1 [23].

Однако потенциальное разнообразие альтернативных сплайсинговых событий для мРНК гибридного онкогена не исчерпывается немногими альтернативными экзонами, указанными выше. Транскрипция с неканонических промоторных областей, вероятно, может приводить к образованию полноразмерных *RUNX1T1*-транскриптов, лишенных Runt-домена [12]. Кроме того, обнаружено большое количество сплайсинговых вариантов, включающих в себя экзоны с делециями, экзоны, использующие альтернативные 5’- и 3’-сайты сплайсинга, а также мРНК с выпадениями нескольких экзонов подряд.

Комбинируясь, указанные события могут порождать более 130 изоформ транскриптов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* [24; 25]. При этом число уникальных событий сплайсинга, в которых может принимать участие экзон, распределяется согласно степенному закону: около 80 % экзонов имеют небольшое количество потенциальных соседей (не превышающее трех), в то время как оставшиеся 20 % способны сплайсироваться с четырьмя и более различными экзонами [25]. Тем не менее уровень экспрессии многих изоформ, вероятно, в большинстве случаев остается сравнительно невысоким. Так, в клетках модельной клеточной линии ОМЛ Kasumi-1 по результатам анализа данных RNA-seq не менее 60 % суммарной фракции мРНК гибридного онкогена составляют всего два альтернативных транскрипта [26].

Механизмы *RUNX1-RUNX1T1*-опосредованной регуляции клеточных процессов

Эффекты гибридного белка RUNX1-RUNX1T1 могут реализовываться с помощью двух механизмов: взаимодействия с регуляторными областями генов-мишеней и непосредственного белок-белкового взаимодействия с продуктом целевого гена. Рассмотрим их более детально.

Взаимодействие белка RUNX1-RUNX1T1 с ДНК, по сути, представляет собой связывание с ней *RUNX1T1*-части белка через Runt-домен. За счет NHR-областей гибридный белок способен рекрутировать к ДНК корепрессоры mSin3A и NCoR/SMRT, образующие комплексы с HDAC [27–29]. HDAC деацетилирует гистоны, тем самым вызывая гетерохроматинизацию области связывания и репрессию транскрипции целевого гена. Показательно, что обработка ингибиторами HDAC снимает арест клеточного цикла, индуцируемый эктопической экспрессией гибридного белка в некоторых типах клеток [30]. HDAC могут рекрутироваться и непосредственно самим гибридным белком без участия NCoR/SMRT. Однако, несмотря на это, точечные мутации, приводящие к нарушению связывания NCoR и RUNX1-RUNX1T1, снижают способность последнего репрессировать экспрессию генов [31].

Лейкозогенные свойства гибридного белка зависят от ацетилирования по Lys24 и Lys43, которое осуществляется ацетилтрансферазами p300/CBP, также способными ацетилировать гистоны [32–35].

Установлено, что p300 колокализуется с гибридным белком в промоторных областях, которые, в свою очередь, у активных генов-мишеней RUNX1-RUNX1T1 имеют повышенный уровень ацетилирования. Связывание же гибридного белка в дистальных регуляторных областях ассоциировано с репрессией транскрипции и более низкими уровнями ацетилирования. Интересно, что ChIP-seq-профили посадки на ДНК связанных с гибридным белком HDAC и p300 оказываются идентичными [36]. Среди других белков-модификаторов, опосредующих RUNX1-RUNX1T1-зависимую активацию транскрипции, присутствуют метилтрансфераза аргинина PRMT1 [37], рекрутируемая к промотору гибридным белком, транслирующимся с включающей в себя экзон 9a мРНК, и деметилаза гистонов JMJD1C [38].

Функционирование RUNX1-RUNX1T1 как репрессора реализуется также через прямые белок-белковые взаимодействия. Как правило, в таком случае он использует механизм замещения коактиваторов, например упомянутого выше p300. Однако возможны исключения. Так, блокирование активности белков семейства E (E2A, HEB и E2-2) осуществляется двояко [39–41]: во-первых, через замещение p300/CBP; во-вторых, RUNX1-RUNX1T1 способен связываться с особой DES-областью белков и механически препятствовать посадке на промотор целевого гена базального фактора транскрипции TFIID.

Мишени регуляции *RUNX1-RUNX1T1*

Как упоминалось выше, в рамках концепции «двух ударов» онкоген *RUNX1-RUNX1T1* рассматривается в качестве ингибитора дифференцировки незрелых гемопоэтических предшественников. Действительно, гибридный белок подавляет нормальное функционирование ряда ключевых факторов гемопоэтической дифференцировки (как на уровне транскрипции, так и на уровне прямых взаимодействий с белком). К таким белкам относятся следующие:

- SPI1 (PU.1), опосредующий функционирование путей дифференцировки моноцитов и взаимодействующих с коактиватором c-Jun [42; 43];
- фактор гранулоцитарной дифференцировки C/EBPα, нуждающийся в коактивации p300/CBP [44; 45];
- GATA-1, опосредующий эритроидную и мегакариоцитарную дифференцировку и также взаимодействующий с p300/CBP [43; 46];
- члены упомянутого выше семейства E-белков, задействованные в программировании развития B-клеток и созревания T-клеток [47].

Однако подавлением дифференцировки вклад RUNX1-RUNX1T1 в малигнизацию клетки не ограничивается. Например, RUNX1-RUNX1T1 негативно регулирует экспрессию генов систем репарации, таких как *RAD51*, *OGG1*, *POLE*, *BRCA1*, *BRCA2* и *ATM* [48–50]. Это увеличивает скорость накопления мутаций в лейкозных клетках [51] и в конечном итоге способствует прогрессированию малигнизации.

Экспрессия *RUNX1-RUNX1T1* может также изменять паттерн альтернативного сплайсинга в клетке [52]. Точные механизмы этого явления неизвестны, но, по всей вероятности, один из них реализуется через взаимодействие с белком SON [53; 54]. Наконец, кооперируясь с HIF1α, гибридный белок RUNX1-RUNX1T1 активирует транскрипцию гена ДНК-метилтрансферазы DNMT3a, что приводит к гиперметилированию ДНК [55].

Ряд мишеней регулируются белком RUNX1-RUNX1T1 непосредственно, путем связывания с регуляторными участками ДНК, в то время как экспрессия других мишеней контролируется опосредованно, через сигнальные пути и кластеры регуляторных микроРНК (как, например, miR-24 и miR-126) [56]. Рассмотрим это на примере двух классов генов – мишеней гибридного онкогена: протоонкогенов и супрессоров опухолей. Белок RUNX1-RUNX1T1 является антагонистом интактного RUNX1 в отношении транскрипции гена $p14^{ARF}$, экспрессия которого ускоряет старение клеток и, как следствие, тормозит их рост и снижает выживаемость. Он ингибирует транскрипцию этого гена, связываясь с его областью промотора [57]. Прямая активация транскрипции гена γ-катенина (понтина), одного из компонентов сигнального пути Wnt, опосредует экспрессию протоонкогена *C-MYC* и гена циклина D1, что, напротив, усиливает клеточный рост [58]. Аналогично, через активацию компонентов тромбопоэтинового сигнального пути, в t(8;21)-положительных клетках запускается экспрессия гена супрессора апоптоза *Bcl-xL* [59]. В то же время, как ни парадоксально, белок RUNX1-RUNX1T1 положительно регулирует экспрессию супрессора опухолей EGR1 [60; 61].

Кооперация t(8;21) и других мутаций

Исследования, выполненные на клеточных линиях и модельных животных, демонстрируют неспособность гибридного онкогена индуцировать злокачественную трансформацию клеток без кооперации с дополнительными мутациями [62–66]. Несмотря на то что вопрос о природе таких мутаций остается дискуссионным, генетические аномалии, ассоциированные с t(8;21)-положительной формой ОМЛ, можно разделить на три большие категории.

Первая группа – это гены клеточного сигналинга, среди которых особо стоит выделить протоонкоген *KIT*, кодирующий мембранный рецептор фактора роста тучных клеток. Его мутации присутствуют не менее чем в 20 % случаев *RUNX1-RUNX1T1*-положительного ОМЛ [56]. Более того, гемопоэтические стволовые клетки с мутациями в этом гене, вероятно, элиминируются в ходе терапии и не обнаруживаются у пациентов в стадии устойчивой ремиссии [67]. К данной категории также относятся *KRAS*, *NRAS*, *JAK2*, *FBL*, мутантные варианты *FLT3* и ген тирозиновой фосфатазы *PTPN11* [68].

Вторую группу составляют гены эпигенетических регуляторов, среди которых модификаторы хроматина ASLX1 и ASLX2, относящиеся к семейству Polycomb, а также ген деоксигеназы метилцитозина TET2 [69].

К третьей группе относятся крупные хромосомные аберрации, такие как потеря Х-хромосомы [70]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что именно нарушения в функционировании клеточного сигналинга и систем эпигенетической регуляции в кооперации с *RUNX1-RUNX1T1* обеспечивают формирование лейкозного фенотипа.

RUNX1-RUNX1T1 и интактный RUNX1: конкуренция или кооперация?

Традиционная точка зрения на взаимодействие интактного RUNX1 и гибридного белка подразумевает их конкуренцию за сайты связывания в регуляторных областях генов, причем RUNX1 рассматривается как активатор транскрипции, а RUNX1-RUNX1T1 – как доминантный репрессор по отношению к его мишеням [17; 71]. Эту идею подкрепляют несколькими группами аргументов: 1) гибридный белок гетерохроматинизирует регуляторные участки мишеней интактного гена через рекрутирование HDAC; 2) изменения профилей экспрессии генов в клетках с нокдауном *RUNX1* и *RUNX1-RUNX1T1* отрицательно коррелируют друг с другом [72]; 3) индуцируемая *RUNX1-RUNX1T1* эмбриональная смерть у мышей фенотипически напоминает гибель лишенных интактного RUNX1 зародышей. Однако накопленные к настоящему моменту данные рисуют более сложную картину взаимодействия этих белков.

Во-первых, как указывалось выше, белок RUNX1-RUNX1T1 способен не только блокировать транскрипцию целевых генов, но и активировать ее. Во-вторых, было обнаружено, что, в отличие от других супрессоров опухолей, при развитии лейкозов *RUNX1* никогда не инактивируется в двух копиях [73]. Это может свидетельствовать о неких неизвестных функциях интактного белка, обеспечивающих успешную малигнизацию клетки и/или ее выживание в ходе этого процесса. Действительно, выяснилось, что нокдаун интактного гена *RUNX1* приводит к подавлению и последующему апоптозу *RUNX1-RUNX1T1*-положительных клеток [72]. Вероятно, связывание RUNX1 и ERG в промоторных областях гена *RUNX1-RUNX1T1* балансирует его экспрессию в лейкозных клетках, что необходимо для предотвращения гибели клеток [36]. Наконец, с помощью ChIP-seq-анализов было установлено, что профили геномной локализации белков RUNX1 и RUNX1-RUNX1T1 не перекрываются целиком. Более того, белки могут узнавать отличающиеся друг от друга консенсусные последовательности [36; 75–77]. Помимо областей, за связывание в которых белки могут конкурировать между собой, существуют уникальные для каждого белка сайты, причем часть из них обнаруживается лишь в клетках с нокдауном *RUNX1-RUNX1T1*. Скорее всего, *in vivo* оба белка могут колокализовываться в одних и тех же областях хроматина и даже взаимодействовать друг с другом за счет Runt-доменов [77]. В качестве примера функциональной кооперации двух белков можно привести подавление экспрессии сериновой протеазы катепсина G, разрушающей гибридный белок [78].

Таким образом, можно предположить, что жизнеспособность лейкозных бластов, содержащих транслокацию t(8;21), зависит от активности как гибридного белка RUNX1-RUNX1T1, так и интактного белка RUNX1, между эффектами которых поддерживается сложное равновесие.

Двойственная роль *RUNX1-RUNX1T1* в лейкозогенезе

Экспрессия онкогена *RUNX1-RUNX1T1* существенно влияет на ключевые процессы, обеспечивающие формирование лейкозного клона. Прямо или косвенно гибридный белок подавляет нормальное функционирование главных факторов дифференцировки гемопоэтических клеток, способствуя накоплению в организме незрелых бластов. Он активирует экспрессию протоонкогена *C-MYC* и подавляет экспрессию супрессора опухолей $p14^{ARF}$, одновременно стимулируя транскрипцию обладающих антиапоптотическим эффектом *BCL2* и *BCL-xL*. Ингибирование белков, участвующих в процессах репарации и рекомбинации, приводит к росту скорости накопления мутаций, что способствует окончательному перерождению клеток. Наконец, некоторые из альтернативных транскриптов гена индуцируют быстрое развитие лейкоза.

Однако некоторые исследования свидетельствуют о том, что определенные эффекты данного онкогена способствуют не развитию, а, наоборот, подавлению лейкозного фенотипа. Так, эктопическая экспрессия

RUNX1-RUNX1T1 в клетках U937 стимулирует арест клеточного цикла в G1-фазе и последующий апоптоз [79–81], а также остановку роста в клетках фибробластов [82]. Кроме того, экспрессирующие его $CD34^+$-клетки подвержены *p53*-зависимому апоптозу и высокочувствительны к повреждающим ДНК агентам [49]. В лейкозных клетках гибридный онкоген участвует в запуске индуцированного гипоксией апоптоза [83]. Среди его мишеней для активации присутствует как минимум один ген – супрессор опухолей, а именно *EGR1*, обладающий проапоптотической активностью [61]. В клетках ОМЛ линии Kasumi-1 нокдаун экспрессии гибридного онкогена приводит к активации ряда проапоптотических генов и подавлению экспрессии *KIT*, что угнетает рост клеток. В то же время снятие репрессии с ряда мишеней гибридного онкогена может активировать генные сети, обеспечивающие прямо противоположные эффекты: усиление пролиферации, повышение жизнеспособности и блокирование апоптоза [84]. Наконец, просто повышение уровня экспрессии *RUNX1-RUNX1T1* также стимулирует апоптоз [36].

Эти данные позволяют предположить существование дихотомии про- и противолейкозной активности гибридного гена [79]. Настоящий тезис не содержит в себе противоречия. Метафора эволюции как «мастера-самоучки», предложенная Ф. Жакобом [85], подразумевает, что естественный отбор не формирует некие тщательно спланированные и инженерно безупречные биологические системы, а комбинирует существующий в его распоряжении подручный материал вне зависимости от качества последнего, чтобы создать механизм, который способен хоть в какой-то степени функционировать.

Если экспрессия гибридного онкогена оказывает смешанное влияние на клетку, вполне возможно, что даже небольшой перевес, повышающий вероятность малигнизации, может быть выгоден для лейкозогенеза [86]. Воздействие же побочных функций, тормозящих процесс перерождения клетки, в таком случае может быть компенсировано за счет контекста, в котором функционирует данный ген: возникновения дополнительных мутаций или использования эпигенетических модификаций.

Заключение

Устоявшаяся точка зрения на роль гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* в процессе лейкозогенеза предполагает его функционирование как доминантного ингибитора экспрессии мишеней RUNX1, блокирующего дифференцировку гемопоэтических предшественников в зрелые клетки крови. В рамках концепции «двух ударов» такая мутация относится к классу II и нуждается в дополнительных мутациях, которые обеспечат усиленную пролиферацию незрелых бластов [67]. Данная модель хорошо объясняет неспособность гибридного белка инициировать развитие лейкоза самостоятельно. Однако приходится констатировать, что эта упрощенная схема нуждается в расширении (рис. 2).

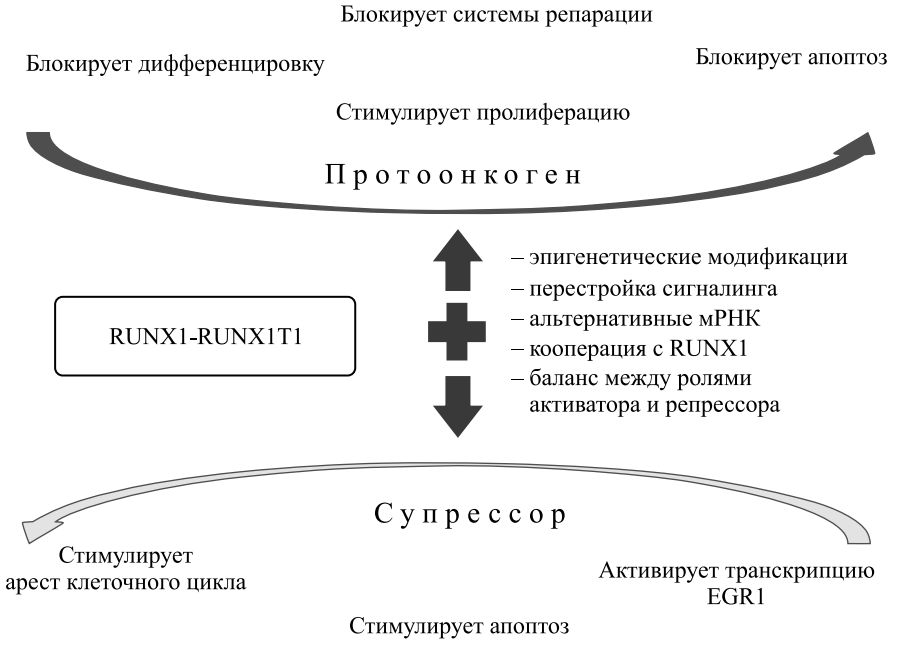


Рис. 2. Принципиальная схема *RUNX1-RUNX1T1*-опосредованного лейкозогенеза. На уровне физиологии гибридный онкоген проявляет себя одновременно как онкоген и супрессор опухолей. Кооперативное взаимодействие дополнительных молекулярных механизмов определяет, какая из этих активностей будет доминировать

Fig. 2. The general scheme of the *RUNX1-RUNX1T1*-mediated leukemogenesis. The fusion oncogene can demonstrate protooncogenic as well as oncosupressor properties and final mode of its activity is determined by cooperation with some additional molecular mechanisms

Белковый продукт гибридного онкогена, помимо репрессорной активности, обладает способностью непосредственно активировать транскрипцию генов-мишеней. Его воздействие на регуляторные сети лейкозной клетки является двойственным: он как способствует развитию лейкоза (через подавление экспрессии супрессоров опухолей, усиление пролиферации, нарушение дифференцировки и работы систем репарации), так и препятствует этому (индуцируя преждевременное старение клеток, запуская арест клеточного цикла и апоптоз). Анализируя перечень известных генов, мутации в которых ассоциированы с t(8;21)-положительной формой ОМЛ, можно обнаружить большое количество генов, кодирующих участников клеточного сигналинга и эпигенетические модификаторы. Это позволяет предположить, что компенсация противолейкозных эффектов *RUNX1-RUNX1T1* осуществляется за счет перенастройки именно этих систем поддержания клеточного гомеостаза. Данные типы мутаций невозможно четко отнести к мутациям I или II класса в рамках гипотезы «двух ударов» [87; 88].

Вероятно, один из регуляторных механизмов, компенсирующих негативные эффекты гибридного онкогена, – его кооперация с интактным геном *RUNX1*. К настоящему времени очевидно, что роль гибридного белка не сводится к конкуренции с интактным RUNX1 за сайты связывания.

Еще одной важной темой, фактически до сих пор не изученной, является разнообразие альтернативных транскриптов *RUNX1-RUNX1T1*, а также механизмы их генерации. Как было отмечено ранее, потенциальное разнообразие альтернативных мРНК гибридного онкогена крайне велико. Логичной выглядит попытка объяснить этот феномен нефункциональным биологическим шумом, однако присутствие в нем явных математических закономерностей [25] вынуждает поднять вопрос об их источнике. Известно, что нарушения альтернативного сплайсинга – один из факторов канцерогенеза [89], а «аберрантные» транскрипты (в частности, распознаваемые как мишени NMD) могут использоваться клеткой в качестве резервуара фенотипической пластичности, способствуя ее выживанию в стрессовых условиях [90]. Исследование глобальных закономерностей сплайсинга пре-мРНК гибридного гена позволит не только углубить наше понимание его роли в лейкозогенезе, но и предсказать структуру новых, неизвестных ранее, транскриптов, обладающих высоким лейкозогенным потенциалом и являющихся хорошими мишенями для разработки терапевтиков.

Суммируя все вышесказанное, можно заключить, что обновленная концепция t(8;21)-зависимого развития ОМЛ должна учитывать следующие положения: 1) мутации-драйверы процесса малигнизации в t(8;21)-положительных клетках относятся к различным классам; 2) *RUNX1-RUNX1T1* может проявлять как пролейкозную, так и противолейкозную активность, причем последняя, вероятно, компенсируется за счет дополнительных мутаций и эпигенетических эффектов; 3) функциональная кооперация между *RUNX1-RUNX1T1* и *RUNX1* является критичной для выживания малигнизированных клеток; 4) белок *RUNX1-RUNX1T1* может функционировать и как репрессор, и как активатор; 5) минорные альтернативные транскрипты гибридного гена могут играть важную роль в лейкозогенезе. Исследования по данным направлениям будут способствовать дальнейшему прогрессу в понимании механизмов генезиса ОМЛ и разработке эффективных стратегий терапии этого заболевания.

Библиографические ссылки

1. *Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D.* Acute Myeloid Leukemia // New Engl. J. Med. 2015. Vol. 373, issue 12. P. 1136–1152.

2. *Алейникова О. В., Сыцкевич О. Н., Потапнев М. П. и др.* Современные методы диагностики острых лейкозов у детей и взрослых. Минск, 2001.

3. *Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al.* Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications // Oncogene. 2008. Vol. 27. P. 5759–5773.

4. *Basecke J., Cepek L., Mannhalter C., et al.* Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia // Blood. 2002. Vol. 100, № 6. P. 2267–2268.

5. *Mori H., Colman S. M., Xiao Z., et al.* Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, № 12. P. 8242–8247.

6. *Gilliland D. G., Griffin J. D.* The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia // Blood. 2002. Vol. 100, № 5. P. 1532–1542.

7. *Peterson L. F., Boyapati A., Ahn E.-Y., et al.* Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts // Blood. 2007. Vol. 110, № 3. P. 799–805.

8. *Pozner A., Goldenberg D., Negreanu V., et al.* Transcription-coupled translation control of AML1/RUNX1 is mediated by cap- and internal ribosome entry site-dependent mechanisms // Mol. Cell. Biol. 2000. Vol. 20, issue 7. P. 2297–2307.

9. *Pozner A., Lotem J., Xiao C., et al.* Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls RUNX1 function during embryonic hematopoiesis // BMC Dev. Biol. 2007. Vol. 7, № 84.

10. *Bee T., Swiers G., Muroi S., et al.* Nonredundant roles for Runx1 alternative promoters reflect their activity at discrete stages of developmental hematopoiesis // Blood. 2010. Vol. 115, № 15. P. 3042–3050.

11. *Markova E. N., Kantidze O. L., Razin S. V.* Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line // Gene. 2012. Vol. 510, issue 2. P. 142–146.

12. *Migas A. A., Mishkova O. A., Ramanouskaya T. V., et al.* RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells // Leuk. Res. 2014. Vol. 38, issue 9. P. 1102–1110.

13. *Erickson P. F., Robinson M., Owens G., et al.* The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor // Cancer Res. 1994. Vol. 54, issue 7. P. 1782–1786.

14. *Liu Y., Cheney M. D., Gaudet J. J., et al.* The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity // Cancer Cell. 2006. Vol. 9, issue 4. P. 249–260.

15. *Kwok C., Zeisig B. B., Qiu J., et al.* Transforming activity of AML1-ETO is independent of CBFβ and ETO interaction but requires formation of homo-oligomeric complexes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. Vol. 106, № 8. P. 2853–2858.

16. *Bartel Y., Grez M., Wichmann C.* Interference with RUNX1/ETO leukemogenic function by cell-penetrating peptides targeting the NHR2 oligomerization domain // BioMed Res. Int. 2013. Vol. 2013.

17. *Lam K., Zhang D.-E.* RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis // Front. Biosci. 2012. Vol. 17, issue 3. P. 1120–1139.

18. *Erickson P. F., Dessev G., Lasher R. S., et al.* ETO and AML1 phosphoproteins are expressed in CD34+ hematopoietic progenitors: implications for t(8;21) leukemogenesis and monitoring residual disease // Blood. 1996. Vol. 88, № 5. P. 1813–1823.

19. *Kozu T., Fukuyama T., Yamami T., et al.* MYND-less splice variants of AML1-MTG8 (RUNX1-CBFA2T1) are expressed in leukemia with t(8;21) // Genes. Chromosomes Cancer. 2005. Vol. 43, issue 1. P. 45–53.

20. *Wolford J. K., Prochazka M.* Structure and expression of the human MTG8/ETO gene // Gene. 1998. Vol. 212, issue 1. P. 103–109.

21. *Yan M., Kanbe E., Peterson L. F., et al.* A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis // Nat. Med. 2006. Vol. 12, № 8. P. 945–949.

22. *Link K. A., Lin S., Shrestha M., et al.* Supraphysiologic levels of the AML1-ETO isoform AE9a are essential for transformation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. Vol. 113, № 32. P. 9075–9080.

23. *Mannari D., Gascoyne D., Dunne J., et al.* A novel exon in AML1-ETO negatively influences the clonogenic potential of the t(8;21) in acute myeloid leukemia // Leukemia. 2010. Vol. 24, issue 4. P. 891–894.

24. *LaFiura K. M., Edwards H., Taub J. W., et al.* Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology group // Oncogene. 2008. Vol. 27, № 36. P. 4933–4942.

25. *Grinev V. V., Migas A. A., Kirsanava A. D., et al.* Decoding of exon splicing patterns in the human RUNX1-RUNX1T1 fusion gene // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2015. Vol. 68. P. 48–58.

26. *Ильюшёнок И. Н., Гринев В. В.* Структурно-функциональная характеристика гибридного онкогена RUNX1-RUNX1T1 человека методами биоинформатики // Международный конгресс по информатике: информационные системы и технологии : материалы Междунар. науч. конгр. (Минск, 24–27 окт. 2016 г.). Минск, 2016. С. 155–159.

27. *Shibata H., Nawaz Z., Tsai S. Y., et al.* Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT) // Mol. Endocrinol. 1997. Vol. 11, № 6. P. 714–724.

28. *Hildebrand D., Tiefenbach J., Heinzel T., et al.* Maurer A.B. Multiple regions of ETO cooperate in transcriptional repression // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, issue 13. P. 9889–9895.

29. *Dannenberg J.-H., David G., Zhong S., et al.* mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival // Genes Dev. 2005. Vol. 19, № 13. P. 1581–1595.

30. *Amann J. M., Nip J., Strom D. K., et al.* ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds msin3a through its oligomerization domain // Mol. Cell. Biol. 2001. Vol. 21, issue 19. P. 6470–6483.

31. *DeKelver R. C., Yan M., Ahn E.-Y., et al.* Attenuation of AML1-ETO cellular dysregulation correlates with increased leukemogenic potential // Blood. 2013. Vol. 121, № 18. P. 3714–3717.

32. *Wang L., Gural A., Sun X. J., et al.* The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation // Science. 2011. Vol. 333, issue 6043. P. 765–769.

33. *Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., et al.* The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases // Cell. 1996. Vol. 87, issue 5. P. 953–959.

34. *Bedford D. C., Brindle P. K.* Is histone acetylation the most important physiological function for CBP and p300? // Aging. 2012. Vol. 4, issue 4. P. 247–255.

35. *Gao X., Lin J., Ning Q. Y., et al.* A histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in AML1-ETO-Positive AML cells // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 2. P. e55481.

36. *Mandoli A., Singh A. A., Prange K. H., et al.* The hematopoietic transcription factors RUNX1 and ERG prevent AML1-ETO oncogene overexpression and onset of the apoptosis program in t(8;21) AMLs // Cell Rep. 2016. Vol. 17, issue 8. P. 2087–2100.

37. *Shia W.-J., Okumura A. J., Yan M., et al.* PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential // Blood. 2012. Vol. 119, № 21. P. 4953–4962.

38. *Chen M., Zhu N., Liu X., et al.* JMJD1C is required for the survival of acute myeloid leukemia by functioning as a coactivator for key transcription factors // Genes Dev. 2015. Vol. 29, № 20. P. 2123–2139.

39. *Zhang J., Kalkum M., Yamamura S., et al.* E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein // Science. 2004. Vol. 305, issue 5688. P. 1286–1289.

40. *Guo C., Hu Q., Yan C., et al.* Multivalent binding of the ETO corepressor to e proteins facilitates dual repression controls targeting chromatin and the basal transcription machinery // Mol. Cell. Biol. 2009. Vol. 29, № 10. P. 2644–2657.

41. *Sun X. J., Wang Z., Wang L., et al.* A stable transcription factor complex nucleated by oligomeric AML1-ETO controls leukaemogenesis // Nature. 2013. Vol. 500, issue 7460. P. 93–97.

42. *Vangala R. K., Heiss-Neumann M. S., Rangatia J. S., et al.* The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia // Blood. 2003. Vol. 101, № 1. P. 270–277.

43. *Burda P., Laslo P., Stopka T.* The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis // Leukemia. 2010. Vol. 24, № 7. P. 1249–1257.

44. *Pabst T., Mueller B. U., Harakawa N., et al.* AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPα in t(8;21) myeloid leukemia // Nat. Med. 2001. Vol. 7, № 4. P. 444–451.

45. *Ohlsson E., Schuster M. B., Hasemann M., et al.* The multifaceted functions of C/EBPα in normal and malignant haematopoiesis // Leukemia. 2016. Vol. 30, № 4. P. 767–775.

46. *Choi Y., Elagib K. E., Delehanty L. L., et al.* Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1 // Cancer Res. 2006. Vol. 66, issue 6. P. 2990–2996.

47. *Quong M. W., Romanow W. J., Murre C.* E protein function in lymphocyte development // Annu. Rev. Immunol. 2002. Vol. 20. P. 301–322.

48. *Alcalay M., Meani N., Gelmetti V., et al.* Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair // J. Clin. Invest. 2003. Vol. 112, issue 11. P. 1751–1761.

49. *Krejci O., Wunderlich M., Geiger H., et al.* p53 signaling in response to increased DNA damage sensitizes AML1-ETO cells to stress-induced death // Blood. 2008. Vol. 111, № 4. P. 2190–2199.

50. *Esposito M. T., Zhao L., Fung T. K., et al.* Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors // Nat. Med. 2015. Vol. 21, № 12. P. 1481–1490.

51. *Forster V. J., Nahari M. H., Martinez-Soria N., et al.* The leukemia-associated RUNX1/ETO oncoprotein confers a mutator phenotype // Leukemia. 2016. Vol. 30, № 1. P. 251–254.

52. *Гринев В. В., Ильюшёнок И. Н., Накжайн С. и др.* Детекция дифференциальных сплайсинговых событий в транскриптоме клеток человека с помощью высокопроизводительного секвенирования // Международный конгресс по информатике: информационные системы и технологии : материалы Междунар. науч. конгр. (Минск, 24–27 окт. 2016 г.). Минск, 2016. С. 140–144.

53. *Ahn E.-Y., Yan M., Malakhova O. A., et al.* Disruption of the NHR4 domain structure in AML1-ETO abrogates SON binding and promotes leukemogenesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105, № 44. P. 17103–17108.

54. *Hickey C. J., Kim J.-H., Ahn E.-Y.* New discoveries of old SON: a link between RNA splicing and cancer // J. Cell. Biochem. 2014. Vol. 115, № 2. P. 224–231.

55. *Gao X. N., Yan F., Lin J., et al.* AML1/ETO cooperates with HIF1α to promote leukemogenesis through DNMT3a transactivation // Leukemia. 2015. Vol. 29, № 8. P. 1730–1740.

56. *Lin S., Mulloy J. C., Goyama S.* RUNX1-ETO Leukemia // RUNX proteins in development and cancer : advances in experimental medicine and biology / eds.: Y. Groner [et al.]. 2017. Vol. 962. P. 151–173.

57. *Linggi B., Müller-Tidow C., van de Locht L., et al.* The t(8;21) fusion protein, AML1-ETO, specifically represses the transcription of the *p14ARF* tumor suppressor in acute myeloid leukemia // Nat. Med. 2002. Vol. 8, № 7. P. 743–750.

58. *Müller-Tidow C., Steffen B., Cauvet T., et al.* Translocation products in acute myeloid leukemia activate the wnt signaling pathway in hematopoietic cells // Mol. Cell. Biol. 2004. Vol. 24, issue 7. P. 2890–2904.

59. *Chou F.-S., Griesinger A., Wunderlich M., et al.* The thrombopoietin/MPL/Bcl-xL pathway is essential for survival and self-renewal in human preleukemia induced by AML1-ETO // Blood. 2012. Vol. 120, № 4. P. 709–719.

60. *Krones-Herzig A., Mittal S., Yule K., et al.* Early growth response 1 acts as a tumor suppressor *in vivo* and *in vitro* via regulation of p53 // Cancer Res. 2005. Vol. 65, issue 12. P. 5133–5143.

61. *Fu L., Huang W., Jing Y., et al.* AML1-ETO triggers epigenetic activation of early growth response gene l, inducing apoptosis in t(8;21) acute myeloid leukemia // FEBS J. 2014. Vol. 281, issue 4. P. 1123–1131.

62. *Rhoades K. L., Hetherington C. J., Harakawa N., et al.* Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model // Blood. 2000. Vol. 96, № 6. P. 2108–2115.

63. *Yuan Y., Zhou L., Miyamoto T., et al.* AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98, № 18. P. 10398–10403.

64. *Higuchi M., O'Brien D., Kumaravelu P., et al.* Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia // Cancer Cell. 2002. Vol. 1, № 1 P. 63–74.

65. *Mulloy J. C., Cammenga J., MacKenzie K. L., et al.* The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells // Blood. 2002. Vol. 99, № 1. P. 15–23.

66. *Mulloy J. C., Cammenga J., Berguido F. J., et al.* Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human CD34+ hematopoietic cells using a single genetic element // Blood. 2003. Vol. 102, № 13. P. 4369–4376.

67. *Shima T., Miyamoto T., Kikushige Y., et al.* The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell // Exp. Hematol. 2014. Vol. 42, issue 11. P. 955–965. Article number: e5.

68. *Zhao S., Zhang Y., Sha K., et al.* KRAS (G12D) Cooperates with AML1/ETO to initiate a mouse model mimicking human acute myeloid leukemia // Cell. Physiol. Biochem. 2014. Vol. 33, № 1. P. 78–87.

69. *Hatlen M. A., Arora K., Vacic V., et al.* Integrative genetic analysis of mouse and human AML identifies cooperating disease alleles // J. Exp. Med. 2016. Vol. 213, № 1. P. 25–34.

70. *Krauth M.-T., Eder C., Alpermann T., et al.* High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome // Leukemia. 2014. Vol. 28, № 7. P. 1449–1458.

71. *Goyama S., Mulloy J. C.* Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects // Int. J. Hematol. 2011. Vol. 94, issue 2. P. 126–133.

72. *Ben-Ami O., Friedman D., Leshkowitz D., et al.* Addiction of t(8;21) and inv(16) acute myeloid leukemia to native RUNX1 // Cell Rep. 2013. Vol. 4, issue 6. P. 1131–1143.

73. *Tang J.-L., Hou H.-A., Chen C.-Y., et al.* AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations // Blood. 2009. Vol. 114, № 26. P. 5352–5361.

74. *Goyama S., Schibler J., Cunningham L., et al.* Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells // J. Clin. Invest. 2013. Vol. 123, № 9. P. 3876–3888.

75. *Ptasinska A., Assi S. A., Mannari D., et al.* Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding // Leukemia. 2012. Vol. 26, № 8. P. 1829–1841.

76. *Ptasinska A., Assi S. A., Martinez-Soria N., et al.* Identification of a dynamic core transcriptional network in t(8;21) AML that regulates differentiation block and self-renewal // Cell Rep. 2014. Vol. 8, issue 6. P. 1974–1988.

77. *Li Y., Wang H., Wang X., et al.* Genome-wide studies identify a novel interplay between AML1 and AML1/ETO in t(8;21) acute myeloid leukemia // Blood. 2016. Vol. 127, № 2. P. 233–242.

78. *Jin W., Wu K., Li Y.-Z., et al.* AML1-ETO targets and suppresses cathepsin G, a serine protease, which is able to degrade AML1-ETO in t(8;21) acute myeloid leukemia // Oncogene. 2013. Vol. 32, № 15. P. 1978–1987.

79. *Burel S. A., Harakawa N., Zhou L., et al.* Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation // Mol. Cell. Biol. 2001. Vol. 21, № 16. P. 5577–5590.

80. *Li X., Xu Y.-B., Wang Q., et al.* Leukemogenic AML1-ETO fusion protein upregulates expression of connexin 43: The role in AML1-ETO-induced growth arrest in leukemic cells // J. Cell. Physiol. 2006. Vol. 208, issue 3. P. 594–601.

81. *Zhuang W.-Y., Cen J.-N., Zhao Y., et al.* Epigenetic silencing of Bcl-2, CEBPA and p14ARF by the AML1-ETO oncoprotein contributing to growth arrest and differentiation block in the U937 cell line // Oncol. Rep. 2013. Vol. 30, issue 1. P. 185–192.

82. *Wolyniec K., Wotton S., Kilbey A., et al.* RUNX1 and its fusion oncoprotein derivative, RUNX1-ETO, induce senescence-like growth arrest independently of replicative stress // Oncogene. 2009. Vol. 28, issue 27. P. 2502–2512.

83. *Barbetti V., Tusa I., Cipolleschi M. G., et al.* AML1/ETO sensitizes via TRAIL acute myeloid leukemia cells to the pro-apoptotic effects of hypoxia // Cell Death Dis. 2013. Vol. 4, № 3. Article number: e536.

84. *Spirin P. V., Lebedev T. D., Orlova N. N., et al.* Silencing AML1-ETO gene expression leads to simultaneous activation of both pro-apoptotic and proliferation signaling // Leukemia. 2014. Vol. 28, № 11. P. 2222–2228.

85. *Jacob F.* Evolution and tinkering // Science. 1977. Vol. 196, issue 4295. P. 1161–1166.

86. *Grove C. S., Vassilou G. S.* Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? // Dis. Model. Mech. 2014. Vol. 7, № 8. P. 941–951.

87. *Зуховицкая Е. В., Фиясь А. Т.* Молекулярные механизмы лейкозогенеза и проблемы терапии острых лейкозов. Гродно, 2015.

88. *Kitamura T., Inoue D., Okochi-Watanabe N., et al.* The molecular basis of myeloid malignancies // Proc. Jpn. Acad. Ser. B: Phys. Biol. Sci. 2014. Vol. 90, № 10. P. 389–404.

89. *Biamonti G., Catillo M., Pignataro D., et al.* The alternative splicing side of cancer : RNA biogenesis & TGFβ signalling in embryonic development // Semin. Cell Dev. Biol. 2014. Vol. 32. P. 30–36.

90. *Grinev V. V., Ramanouskaya T. V., Gloushen S. V.* Multidimensional control of cell structural robustness // Cell Biol. Int. 2013. Vol. 37, issue 10. P. 1023–1037.

References

1. Döhner H., Weisdorf D. J., Bloomfield C. D. Acute Myeloid Leukemia. *New Engl. J. Med*. 2015. Vol. 373, issue 12. P. 1136–1152. DOI: 10.1056/NEJMra1406184.

2. Aleinikova O. V., Sitskevich O. N., Potapnev M. P., et al. [The modern diagnostics approaches of children and adult acute leukemia]. Minsk, 2001 (in Russ.).

3. Müller A. M. S., Duque J., Shizuru J. A., et al. Complementing mutations in core binding factor leukemias: from mouse models to clinical applications. *Oncogene*. 2008. Vol. 27. P. 5759–5773. DOI: 10.1038/onc.2008.196.

4. Basecke J., Cepek L., Mannhalter C., et al. Transcription of AML1/ETO in bone marrow and cord blood of individuals without acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2002. Vol. 100, No. 6. P. 2267–2268. DOI: 10.1182/blood-2002-06-1673.

5. Mori H., Colman S. M., Xiao Z., et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 99, No. 12. P. 8242–8247. DOI: 10.1073/pnas.112218799.

6. Gilliland D. G., Griffin J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002. Vol. 100, No. 5. P. 1532–1542. DOI: 10.1182/blood-2002-02-0492.

7. Peterson L. F., Boyapati A., Ahn E.-Y., et al. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*. 2007. Vol. 110, No. 3. P. 799–805. DOI: 10.1182/blood-2006-11-019265.

8. Pozner A., Goldenberg D., Negreanu V., et al. Transcription-coupled translation control of AML1/RUNX1 is mediated by cap- and internal ribosome entry site-dependent mechanisms. *Mol. Cell. Biol*. 2000. Vol. 20, issue 7. P. 2297–2307.

9. Pozner A., Lotem J., Xiao C., et al. Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls RUNX1 function during embryonic hematopoiesis. *BMC Dev. Biol*. 2007. Vol. 7, No. 84. DOI: 10.1186 /1471-213X-7-84.

10. Bee T., Swiers G., Muroi S., et al. Nonredundant roles for Runx1 alternative promoters reflect their activity at discrete stages of developmental hematopoiesis. *Blood*. 2010. Vol. 115, No. 15. P. 3042–3050. DOI:10.1182/blood-2009-08-238626.

11. Markova E. N., Kantidze O. L., Razin S. V. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line. *Gene*. 2012. Vol. 510, issue 2. P. 142–146. DOI: 10.1016/j.gene.2012.09.028.

12. Migas A. A., Mishkova O. A., Ramanouskaya T. V., et al. RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells. *Leuk. Res*. 2014. Vol. 38, issue 9. P. 1102–1110. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.06.002.

13. Erickson P. F., Robinson M., Owens G., et al. The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor. *Cancer Res*. 1994. Vol. 54, issue 7. P. 1782–1786.

14. Liu Y., Cheney M. D., Gaudet J. J., et al. The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity. *Cancer Cell*. 2006. Vol. 9, issue 4. P. 249–260. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.03.012.

15. Kwok C., Zeisig B. B., Qiu J., et al. Transforming activity of AML1-ETO is independent of CBFβ and ETO interaction but requires formation of homo-oligomeric complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. Vol. 106, No. 8. P. 2853–2858. DOI: 10.1073/pnas.0810558106.

16. Bartel Y., Grez M., Wichmann C. Interference with RUNX1/ETO leukemogenic function by cell-penetrating peptides targeting the NHR2 oligomerization domain. *BioMed Res. Int.* 2013. Vol. 2013. DOI: 10.1155/2013/297692.

17. Lam K., Zhang D.-E. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front. Biosci.* 2012. Vol. 17, issue 3. P. 1120–1139. DOI:10.2741/3977.

18. Erickson P. F., Dessev G., Lasher R. S., et al. ETO and AML1 phosphoproteins are expressed in CD34+ hematopoietic progenitors: implications for t(8;21) leukemogenesis and monitoring residual disease. *Blood*. 1996. Vol. 88, No. 5. P. 1813–1823.

19. Kozu T., Fukuyama T., Yamami T., et al. MYND-less splice variants of AML1-MTG8 (RUNX1-CBFA2T1) are expressed in leukemia with t(8;21). *Genes. Chromosomes Cancer*. 2005. Vol. 43, issue 1. P. 45–53. DOI: 10.1002/gcc.20165.

20. Wolford J. K., Prochazka M. Structure and expression of the human MTG8/ETO gene. *Gene*. 1998. Vol. 212, issue 1. P. 103–109.

21. Yan M., Kanbe E., Peterson L. F., et al. A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis. *Nat. Med.* 2006. Vol. 12, No. 8. P. 945–949. DOI: 10.1038/nm1443.

22. Link K. A., Lin S., Shrestha M., et al. Supraphysiologic levels of the AML1-ETO isoform AE9a are essential for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. Vol. 113, No. 32. P. 9075–9080. DOI: 10.1073/pnas.1524225113.

23. Mannari D., Gascoyne D., Dunne J., et al. A novel exon in AML1-ETO negatively influences the clonogenic potential of the t(8;21) in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010. Vol. 24, issue 4. P. 891–894. DOI: 10.1038/leu.2009.288.

24. LaFiura K. M., Edwards H., Taub J. W., et al. Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology group. *Oncogene*. 2008. Vol. 27, No. 36. P. 4933–4942. DOI: 10.1038/onc.2008.134.

25. Grinev V. V., Migas A. A., Kirsanava A. D., et al. Decoding of exon splicing patterns in the human RUNX1-RUNX1T1 fusion gene. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015. Vol. 68. P. 48–58. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.08.017.

26. Ilyushonak I. M., Grinev V. V. Structural and functional characterization of the human fusion oncogene RUNX1-RUNX1T1 with bioinformatics approaches. *International congress on computer science: information systems and technologies* : proc. of the Int. sci. congr. (Minsk, 24–27 Oct., 2016). Minsk, 2016. P. 155–159 (in Russ.).

27. Shibata H., Nawaz Z., Tsai S. Y., et al. Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT). *Mol. Endocrinol.* 1997. Vol. 11, No. 6. P. 714–724. DOI: 10.1210/mend.11.6.0002.

28. Hildebrand D., Tiefenbach J., Heinzel T., et al. Maurer A.B. Multiple regions of ETO cooperate in transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, issue 13. P. 9889–9895. DOI: 10.1074/jbc.M010582200.

29. Dannenberg J.-H., David G., Zhong S., et al. mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev.* 2005. Vol. 19, No. 13. P. 1581–1595. DOI: 10.1101/gad.1286905.

30. Amann J. M., Nip J., Strom D. K., et al. ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds msin3a through its oligomerization domain. *Mol. Cell. Biol.* 2001. Vol. 21, issue 19. P. 6470–6483.

31. DeKelver R.C., Yan M., Ahn E.-Y., et al. Attenuation of AML1-ETO cellular dysregulation correlates with increased leukemogenic potential. *Blood*. 2013. Vol. 121, No. 18. P. 3714–3717. DOI: 10.1182/blood-2012-11-465641.

32. Wang L., Gural A., Sun X. J., et al. The leukemogenicity of AML1-ETO is dependent on site-specific lysine acetylation. *Science*. 2011. Vol. 333, issue 6043. P. 765–769. DOI: 10.1126/science.1201662.

33. Ogryzko V. V., Schiltz R. L., Russanova V., et al. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996. Vol. 87, issue 5. P. 953–959. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)82001-2.

34. Bedford D. C., Brindle P. K. Is histone acetylation the most important physiological function for CBP and p300?. *Aging*. 2012. Vol. 4, issue 4. P. 247–255. DOI: 10.18632/aging.100453.

35. Gao X., Lin J., Ning Q., et al. A histone acetyltransferase p300 inhibitor C646 induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in AML1-ETO-Positive AML cells. *PLoS One.* 2013. Vol. 8, No. 2. Article number: e55481. DOI: 10.1371/journal.pone.0055481.

36. Mandoli A., Singh A. A., Prange K. H., et al. The hematopoietic transcription factors RUNX1 and ERG prevent AML1-ETO oncogene overexpression and onset of the apoptosis program in t(8;21) AMLs. *Cell Rep.* 2016. Vol. 17, issue 8. P. 2087–2100. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.08.082.

37. Shia W.-J., Okumura A. J., Yan M., et al. PRMT1 interacts with AML1-ETO to promote its transcriptional activation and progenitor cell proliferative potential. *Blood*. 2012. Vol. 119, No. 21. P. 4953–4962. DOI: 10.1182/blood-2011-04-347476.

38. Chen M., Zhu N., Liu X., et al. JMJD1C is required for the survival of acute myeloid leukemia by functioning as a coactivator for key transcription factors. *Genes Dev.* 2015. Vol. 29, No. 20. P. 2123–2139. DOI: 10.1101/gad.267278.115.

39. Zhang J., Kalkum M., Yamamura S., et al. E protein silencing by the leukemogenic AML1-ETO fusion protein. *Science*. 2004. Vol. 305, issue 5688. P. 1286–1289. DOI: 10.1126/science.1097937.

40. Guo C., Hu Q., Yan C., et al. Multivalent binding of the ETO corepressor to e proteins facilitates dual repression controls targeting chromatin and the basal transcription machinery. *Mol. Cell. Biol.* 2009. Vol. 29, No. 10. P. 2644–2657. DOI: 10.1128/MCB.00073-09.

41. Sun X. J., Wang Z., Wang L., et al. A stable transcription factor complex nucleated by oligomeric AML1-ETO controls leukaemogenesis. *Nature*. 2013. Vol. 500, issue 7460. P. 93–97. DOI: 10.1038/nature12287.

42. Vangala R. K., Heiss-Neumann M. S., Rangatia J. S., et al. The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia. *Blood*. 2003. Vol. 101, No. 1. P. 270–277. DOI: 10.1182/blood-2002-04-1288.

43. Burda P., Laslo P., Stopka T. The role of PU.1 and GATA-1 transcription factors during normal and leukemogenic hematopoiesis. *Leukemia*. 2010. Vol. 24, No. 7. P. 1249–1257. DOI: 10.1038/leu.2010.104.

44. Pabst T., Mueller B. U., Harakawa N., et al. AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPα in t(8;21) myeloid leukemia. *Nat. Med.* 2001. Vol. 7, No. 4. P. 444–451. DOI: 10.1038/86515.

45. Ohlsson E., Schuster M. B., Hasemann M., et al. The multifaceted functions of C/EBPα in normal and malignant haematopoiesis. *Leukemia*. 2016. Vol. 30, No. 4. P. 767–775. DOI: 10.1038/leu.2015.324.

46. Choi Y., Elagib K. E., Delehanty L. L., et al. Erythroid inhibition by the leukemic fusion AML1-ETO is associated with impaired acetylation of the major erythroid transcription factor GATA-1. *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, issue 6. P. 2990–2996. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2944.

47. Quong M. W., Romanow W. J., Murre C. E protein function in lymphocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* 2002. Vol. 20. P. 301–322. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.092501.162048.

48. Alcalay M., Meani N., Gelmetti V., et al. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 112, issue 11. P. 1751–1761. DOI: 10.1172/JCI17595.

49. Krejci O., Wunderlich M., Geiger H., et al. p53 signaling in response to increased DNA damage sensitizes AML1-ETO cells to stress-induced death. *Blood.* 2008. Vol. 111, No. 4. P. 2190–2199. DOI: 10.1182/blood-2007-06-093682.

50. Esposito M. T., Zhao L., Fung T. K., et al. Synthetic lethal targeting of oncogenic transcription factors in acute leukemia by PARP inhibitors. *Nat. Med.* 2015. Vol. 21, No. 12. P. 1481–1490. DOI: 10.1038/nm.3993.

51. Forster V. J., Nahari M. H., Martinez-Soria N., et al. The leukemia-associated RUNX1/ETO oncoprotein confers a mutator phenotype. *Leukemia*. 2016. Vol. 30, No. 1. P. 251–254. DOI: 10.1038/leu.2015.133.

52. Grinev V. V., Ilyushonak I. M., Nakjang S., et al. Detection of the differential splicing events in transcriptome of human cells using next-generation sequencing. *International congress on computer science: information systems and technologies* : proc. of the Int. sci. congr. (Minsk, 24–27 Oct., 2016). Minsk, 2016. P. 140–144 (in Russ.).

53. Ahn E.-Y., Yan M., Malakhova O. A., et al. Disruption of the NHR4 domain structure in AML1-ETO abrogates SON binding and promotes leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. Vol. 105, No. 44. P. 17103–17108. DOI: 10.1073/pnas.0802696105.

54. Hickey C. J., Kim J.-H., Ahn E.-Y. New discoveries of old SON: a link between RNA splicing and cancer. *J. Cell. Biochem.* 2014. Vol. 115, No. 2. P. 224–231. DOI: 10.1002/jcb.24672.

55. Gao X. N., Yan F., Lin J., et al. AML1/ETO cooperates with HIF1α to promote leukemogenesis through DNMT3a transactivation. *Leukemia*. 2015. Vol. 29, No. 8. P. 1730–1740. DOI: 10.1038/leu.2015.56.

56. Lin S., Mulloy J. C., Goyama S. RUNX1-ETO Leukemia. *RUNX proteins in development and cancer* : advances in experimental medicine and biology. 2017. Vol. 962. P. 151–173. DOI: 10.1007/978-981-10-3233-2_11.

57. Linggi B., Müller-Tidow C., van de Locht L., et al. The t(8;21) fusion protein, AML1-ETO, specifically represses the transcription of the *p14*^{ARF} tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* 2002. Vol. 8, No. 7. P. 743–750. DOI: 10.1038/nm726.

58. Müller-Tidow C., Steffen B., Cauvet T., et al. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* 2004. Vol. 24, issue 7. P. 2890–2904.

59. Chou F.-S., Griesinger A., Wunderlich M., et al. The thrombopoietin/MPL/Bcl-xL pathway is essential for survival and self-renewal in human preleukemia induced by AML1-ETO. *Blood*. 2012. Vol. 120, No. 4. P. 709–719. DOI: 10.1182/blood-2012-01-403212.

60. Krones-Herzig A., Mittal S., Yule K., et al. Early growth response 1 acts as a tumor suppressor *in vivo* and *in vitro* via regulation of p53. *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, issue 12. P. 5133–5143. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3742.

61. Fu L., Huang W., Jing Y., et al. AML1-ETO triggers epigenetic activation of early growth response gene l, inducing apoptosis in t(8;21) acute myeloid leukemia. *FEBS J.* 2014. Vol. 281, issue 4. P. 1123–1131. DOI: 10.1111/febs.12673.

62. Rhoades K. L., Hetherington C. J., Harakawa N., et al. Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood*. 2000. Vol. 96, No. 6. P. 2108–2115.

63. Yuan Y., Zhou L., Miyamoto T., et al. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. Vol. 98, No. 18. P. 10398–10403. DOI: 10.1073/pnas.171321298.

64. Higuchi M., O'Brien D., Kumaravelu P., et al. Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 2002. Vol. 1, No. 1. P. 63–74.

65. Mulloy J. C., Cammenga J., MacKenzie K. L., et al. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002. Vol. 99, No. 1. P. 15–23.

66. Mulloy J. C., Cammenga J., Berguido F. J., et al. Maintaining the self-renewal and differentiation potential of human $CD34^+$ hematopoietic cells using a single genetic element. *Blood*. 2003. Vol. 102, No. 13. P. 4369–4376. DOI: 10.1182/blood-2003-05-1762.

67. Shima T., Miyamoto T., Kikushige Y., et al. The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. *Exp. Hematol*. 2014. Vol. 42, issue 11. P. 955–965. Article number: e5. DOI: 10.1016/j.exphem.2014.07.267.

68. Zhao S., Zhang Y., Sha K., et al. KRAS (G12D) Cooperates with AML1/ETO to initiate a mouse model mimicking human acute myeloid leukemia. *Cell. Physiol. Biochem*. 2014. Vol. 33, No. 1. P. 78–87. DOI: 10.1159/000356651.

69. Hatlen M. A., Arora K., Vacic V., et al. Integrative genetic analysis of mouse and human AML identifies cooperating disease alleles. *J. Exp. Med*. 2016. Vol. 213, No. 1. P. 25–34. DOI: 10.1084/jem.20150524.

70. Krauth M.-T., Eder C., Alpermann T., et al. High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome. *Leukemia*. 2014. Vol. 28, No. 7. P. 1449–1458. DOI: 10.1038/leu.2014.4.

71. Goyama S., Mulloy J. C. Molecular pathogenesis of core binding factor leukemia: current knowledge and future prospects. *Int. J. Hematol*. 2011. Vol. 94, issue 2. P. 126–133. DOI: 10.1007/s12185-011-0858-z.

72. Ben-Ami O., Friedman D., Leshkowitz D., et al. Addiction of t(8;21) and inv(16) acute myeloid leukemia to native RUNX1. *Cell Rep*. 2013. Vol. 4, issue 6. P. 1131–1143. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.020.

73. Tang J.-L., Hou H.-A., Chen C.-Y., et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009. Vol. 114, No. 26. P. 5352–5361. DOI: 10.1182/blood-2009-05-223784.

74. Goyama S., Schibler J., Cunningham L., et al. Transcription factor RUNX1 promotes survival of acute myeloid leukemia cells. *J. Clin. Invest*. 2013. Vol. 123, No. 9. P. 3876–3888. DOI: 10.1172/JCI68557.

75. Ptasinska A., Assi S. A., Mannari D., et al. Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia*. 2012. Vol. 26, No. 8. P. 1829–1841. DOI: 10.1038/leu.2012.49.

76. Ptasinska A., Assi S. A., Martinez-Soria N., et al. Identification of a dynamic core transcriptional network in t(8;21) AML that regulates differentiation block and self-renewal. *Cell Rep*. 2014. Vol. 8, issue 6. P. 1974–1988. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.024.

77. Li Y., Wang H., Wang X., et al. Genome-wide studies identify a novel interplay between AML1 and AML1/ETO in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016. Vol. 127, No. 2. P. 233–242. DOI: 10.1182/blood-2015-03-626671.

78. Jin W., Wu K., Li Y.-Z., et al. AML1-ETO targets and suppresses cathepsin G, a serine protease, which is able to degrade AML1-ETO in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2013. Vol. 32, No. 15. P. 1978–1987. DOI: 10.1038/onc.2012.204.

79. Burel S. A., Harakawa N., Zhou L., et al. Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2001. Vol. 21, No. 16. P. 5577–5590. DOI: 10.1128/MCB.21.16.5577-5590.2001.

80. Li X., Xu Y.-B., Wang Q., et al. Leukemogenic AML1-ETO fusion protein upregulates expression of connexin 43: The role in AML1-ETO-induced growth arrest in leukemic cells. *J. Cell. Physiol.* 2006. Vol. 208, issue 3. P. 594–601. DOI: 10.1002/jcp.20695.

81. Zhuang W.-Y., Cen J.-N., Zhao Y., et al. Epigenetic silencing of Bcl-2, CEBPA and p14ARF by the AML1-ETO oncoprotein contributing to growth arrest and differentiation block in the U937 cell line. *Oncol. Rep*. 2013. Vol. 30, issue 1. P. 185–192. DOI: 10.3892/or.2013.2459.

82. Wolyniec K., Wotton S., Kilbey A., et al. RUNX1 and its fusion oncoprotein derivative, RUNX1-ETO, induce senescence-like growth arrest independently of replicative stress. *Oncogene*. 2009. Vol. 28, issue 27. P. 2502–2512. DOI: 10.1038/onc.2009.101.

83. Barbetti V., Tusa I., Cipolleschi M. G., et al. AML1/ETO sensitizes via TRAIL acute myeloid leukemia cells to the pro-apoptotic effects of hypoxia. *Cell Death Dis.* 2013. Vol. 4, No. 3. Article number: e536. DOI: 10.1038/cddis.2013.49.

84. Spirin P. V., Lebedev T. D., Orlova N. N., et al. Silencing AML1-ETO gene expression leads to simultaneous activation of both pro-apoptotic and proliferation signaling. *Leukemia*. 2014. Vol. 28, No. 11. P. 2222–2228. DOI: 10.1038/leu.2014.130.

85. Jacob F. Evolution and tinkering. *Science*. 1977. Vol. 196, issue 4295. P. 1161–1166. DOI: 10.1242/dmm.015974.

86. Grove C. S., Vassilou G. S. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer?. *Dis. Model. Mech.* 2014. Vol. 7, No. 8. P. 941–951. DOI: 10.1242/dmm.015974.

87. Zuchovickaya E. V., Fiyas' A. T. [Molecular mechanisms of leukemogenesis and challenges in acule leukemia treatment]. Grodno, 2015 (in Russ.).

88. Kitamura T., Inoue D., Okochi-Watanabe N., et al. The molecular basis of myeloid malignancies. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B: Phys. Biol. Sci*. 2014. Vol. 90, No. 10. P. 389–404. DOI: 10.2183/pjab.90.389.

89. Biamonti G., Catillo M., Pignataro D., et al. The alternative splicing side of cancer : RNA biogenesis & TGFβ signalling in embryonic development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2014. Vol. 32. P. 30–36. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.03.016.

90. Grinev V. V., Ramanouskaya T. V., Gloushen S. V. Multidimensional control of cell structural robustness. *Cell Biol. Int.* 2013. Vol. 37, issue 10. P. 1023–1037. DOI: 10.1002/cbin.10128.

Статья поступила в редколлегию 30.05.2017.
Received by editorial board 30.05.2017.

УДК 577.29+581.17

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ GRP78 И GRP94 В МИКРО- И МАКРОЦИРКУЛЯТОРНЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

Т. О. СУХАН [1)]***, А. С. НЕВМЕРЖИЦКАЯ*** [2)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Институт биологии опухоли и экспериментальной терапии Георга Спайера, ул. П. Эрлиха, 42-44, 60596, г. Франкфурт-на-Майне, Германия*

Изучена экспрессия шаперонов GRP78 и GRP94, активируемых в условиях стресса, в микро- и макроциркуляторных эндотелиальных клетках человека при гипоксии и в стандартных условиях культивирования. Эксперименты выполнены на эндотелиальных клетках из пуповинной вены человека (HUVEC), микроциркуляторных эндотелиальных клетках кожи человека (HDMEC) и микроциркуляторных эндотелиальных клетках плаценты человека (HMPEC). Экспрессия белков определена путем иммуноблоттинга, количественная оценка экспрессии произведена с помощью программы ImageJ. Установлено, что в стандартных условиях культивирования экспрессия белков GRP78 и GRP94 в HUVEC сравнима с таковой в HDMEC и отличается от профиля экспрессии в HMPEC. В условиях гипоксии выявлено изменение профиля экспрессии белков GRP78 и GRP94, которая в микроциркуляторных эндотелиальных клетках (HDMEC и HMPEC) отличается от экспрессии в макроциркуляторных эндотелиальных клетках (HUVEC).

Ключевые слова: эндотелиальные клетки; гипоксия; белки теплового шока.

EXPRESSION OF GRP78 AND GRP94 PROTEINS IN THE HUMAN MICRO- AND MACROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS UNDER HYPOXIA

T. O. SUHAN [a]***, A. S. NEVMERZHITSKAYA*** [b]

[a]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*
[b]*George Spaiher Institute of the Tumor Biotechnology and Experimental Therapy, P. Erlich Street, 42-44, 60596, Frankfurt-am-Main, Germany*

Corresponding author: T. O. Suhan (tanyasuhan@mail.ru)

It was investigated the expression of stress activated chaperons GRP78, GRP94 in human microvascular and macrovascular endothelial cells in normoxic and hypoxic conditions of cultivations. The experiments were carried out on HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) and HMPEC (human microvascular placental endothelial cells). The proteins expression was estimated with immunoblotting.

Образец цитирования:
Сухан Т. О., Невмержицкая А. С. Экспрессия белков GRP78 и GRP94 в микро- и макроциркуляторных эндотелиальных клетках человека в условиях гипоксии // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 17–24.

For citation:
Suhan T. O., Nevmerzhitskaya A. S. Expression of GRP78 and GRP94 proteins in the human micro- and macrovascular endothelial cells under hypoxia. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 17–24 (in Russ.).

Авторы:
Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Александра Сергеевна Невмержицкая – научный сотрудник.

Authors:
Tatyana Suhan, PhD (biology); senior researcher at the scientific research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
tanyasuhan@mail.ru
Aleksandra Nevmerzhitskaya, research assistant.
nevmerzhitskaja@gmail.com

Densitometry of the immunoblotting results was done with «ImageJ» software. It was find out that in normoxic conditions pattern of GRP78 and GRP94 expression in HUVEC is similar to HDMEC and differs from HMPEC. Hypoxia changes expression of stress-induced proteins GRP78 and GRP94. Expression of GRP78 and GRP94 in microvascular endothelial cells (HDMEC, HMPEC) differs from expression in macrovascular endothelial cells (HUVEC).

Key words: endothelial cells; hypoxia; heat shock proteins.

Введение

Многие патологические состояния организма сопровождаются гипоксией, влиянию которой подвержены различные органы и ткани, в том числе эндотелий сосудов. Причиной этого может быть пониженный уровень кислорода в окружающей среде. Способность адаптироваться к острой и хронической гипоксии становится критичной для выживания. Многие беспозвоночные и низшие позвоночные выработали устойчивость к гипоксии [1–3], но большинство млекопитающих имеют ограниченные возможности адаптации к ней и, следовательно, гораздо чувствительнее в этом отношении. Между тем адаптивный потенциал к гипоксии среди клеток млекопитающих существенно отличается. Так, для эндотелиальных клеток, которые могут напрямую испытывать на себе воздействие пониженного содержания кислорода в крови, способность адаптироваться к гипоксии является жизненно важной. Доказано, что эндотелиальные клетки легочной вены, которые в организме регулярно подвергаются гипоксии, в условиях экспериментального понижения кислорода сохраняют жизнеспособность [4–9]. В то же время в аналогичных условиях другие типы клеток (кардиомиоциты, гепатоциты, эпителиальные клетки почечных канальцев, нейроны) крайне чувствительны к гипоксии [1–11]. Механизмы, посредством которых эндотелиальные клетки адаптируются к ней, изучены мало. Если рассматривать гипоксию как стрессовый фактор, логично оценить экспрессию стресс-индуцируемых белков, к которым относится семейство белков теплового шока (HSP). Установлено повышение их экспрессии при ответе на стресс [12].

В случае стрессового воздействия, в результате которого нарушается структура белка, на помощь приходят белки HSP, и в первую очередь семейства Hsp70. Они взаимодействуют с открывшимися гидрофобными поверхностями частично денатурированных белков, предотвращая их агрегацию и содействуя рефолдингу. Способность шаперонов, к которым также относятся белки семейства Hsp70, неспецифически связываться с гидрофобными пептидами позволяет им взаимодействовать с широким спектром субстратов. Белки семейства Hsp70 характеризуются высокой видовой структурной гомологией и функциональной консервативностью. Выполняя функцию защиты от стресса, они участвуют в таких важных клеточных процессах, как трансляция, перенос белков через мембрану, презентация белков с их последующей деградацией, агрегация и дезагрегация белков, апоптоз [13–16].

Еще один представитель семейства HSP – белок GRP94, который экспрессируется главным образом в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). Являясь молекулярным шапероном, GRP94 участвует в процессинге и транспорте секретируемых белков. Основные субстраты GRP94 имеют дисульфидные связи [17]. Кроме того, GRP94 – один из ключевых белков, связывающих ионы кальция [17]. Как правило, стрессовые факторы, вызывающие изменение уровня кальция, гликозилирования и кислотно-основное состояние в ЭПР, активируют молекулярный каскад, направленный на восстановление гомеостаза в клетке или на запуск ее апоптоза. GRP94 и другие шапероны – главные участники этого каскада.

Цель настоящего исследования – изучить *in vitro* уровень экспрессии белков теплового шока GRP78 и GRP94 в трех типах эндотелиальных клеток в условиях гипоксии.

Методы исследования

Клеточные культуры. Эксперименты выполнены на трех типах эндотелиальных клеток:

- HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, макроваскулярные);
- HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells);
- HMPEC (human microvascular placental endothelial cells).

Клетки были выделены и фенотипированы в *Repair-Lab* Института патологии (медицинский центр Университета им. И. Гутенберга, г. Майнц, Германия). Культивирование проводили в среде, приготовленной на основе базовой среды для эндотелиальных клеток (*Promo Cell*, Германия), с добавлением 15 % телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 3 нг/мл bFGF и 0,02 % Na-Hep. Клетки контроля выращивали в 6-луночных планшетах в CO_2-инкубаторе при стандартных условиях (37 ºС, 5 % CO_2, 95 % воздуха). Для создания условий гипоксии клетки выращивали при пониженном содержании кислорода (37 ºС, 5 % CO_2, $\leq$1 % O_2).

Моделирование гипоксии *in vitro.* Клетки выращивали в 6-луночных планшетах в течение суток в CO_2-инкубаторе (37 ºС, 5 % CO_2, 95 % воздуха), затем планшеты помещали в герметичные пакеты с поглотителем кислорода AnaeroGen™ Compact (*Hardy Diagnostics*, Англия), что обеспечивало поддержание $O_2 \leq 1$ %. Снижение уровня кислорода контролировали с помощью анаэробного индикатора (*Thermo Scientific*, Англия), который в анаэробных условиях меняет цвет с красного на белый. Через 24, 48 и 72 ч планшеты извлекали из пакетов, удаляли из них среду, промывали буфером и проводили выделение белков.

Выделение белков. Лизис клеток выполняли с использованием RIPA-буфера посредством добавления ингибиторов протеаз. Белковый супернатант собирали после центрифугирования лизата (15 мин при 14 тыс. об/мин и 4 ºС).

Концентрацию белков определяли с помощью коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit (*Thermo Scientific*) согласно инструкции. Калибровочную кривую строили, применяя бычий сывороточный альбумин.

Иммуноблоттинг. Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле, в котором присутствовал додецилсульфат натрия, по Лэммли [18] и переносили их с геля на изготовленную из нитроцеллюлозы мембрану методом электроблоттинга. Неспецифические связывания блокировали добавлением раствора бычьего сывороточного альбумина. В работе использовали первичные поликлональные кроличьи антитела к белкам GRP78, GRP94, ERK1/2 (*Santa Cruize*, Германия) и вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве хемилюминесцентного субстрата применяли набор ECL (*Bio-Rad*, Германия).

Денситометрия. Чтобы получить количественные данные, результаты иммуноблоттинга обрабатывали с помощью программы ImageJ. Экспрессию целевого изучаемого белка нормировали по экспрессии контрольных белков (ERK1/2).

Статистическая обработка результатов

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программного комплекса Microsoft XP. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Чтобы выявить достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами, использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0{,}05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспрессия GRP94 и GRP78 в контрольных эндотелиальных клетках. Показано, что при стандартных условиях (37 ºС, 5 % CO_2, 95 % воздуха) через 24 ч экспрессия GRP94 в HUVEC и HDMEC была сравнима, а в HMPEC – в 2,5 раза выше, чем в HUVEC ($p \leq 0{,}01$) и HDMEC ($p \leq 0{,}01$) (рис. 1, *а*). Через 48 ч инкубации экспрессия GRP94 снизилась во всех типах эндотелиальных клеток; через 72 ч экспрессия GRP94 в HUVEC ($p \leq 0{,}01$) и HDMEC ($p \leq 0{,}01$) значительно усилилась по сравнению с уровнем 24 ч, а в клетках HMPEC вернулась к уровню 24 ч (см. рис. 1, *а*).

В стандартных условиях культивирования (37 ºС, 5 % CO_2, 95 % воздуха) через 24 ч по степени возрастания экспрессии GRP78 клетки располагались следующим образом: HUVEC, HDMEC, HMPEC (см. рис. 1, *б*). Уровень экспрессии GRP78 через 48 ч инкубации снизился, а через 72 ч возрос во всех типах клеток (см. рис. 1, *б*). При этом через 72 ч инкубации экспрессия GRP78 в клетках HUVEC и HDMEC была значительно выше, чем через 24 ч, а в клетках HMPEC оказалась выше, чем через 48 ч, но немного ниже, чем через 24 ч (см. рис. 1, *б*).

Таким образом, через 24 ч культивирования в стандартных условиях эндотелиоциты из микроциркуляторного русла плаценты (HMPEC) показали максимальный уровень экспрессии обоих шаперонов GRP78 и GRP94, что, возможно, связано с особой ролью плаценты. Появляется все больше данных о том, что плацента участвует в фетальном программировании [19]. Адекватное развитие плаценты и ее адаптивные возможности определяют нормальное развитие плода. Являясь посредником в транспорте питательных веществ и кислорода от матери к развивающемуся и растущему плоду, плацента должна обладать высоким адаптивным потенциалом, поскольку материнский организм не всегда находится в идеальном состоянии, подвергаясь гипоксии и метаболическим нарушениям. Если отклонения со стороны материнского организма превышают адаптивные возможности плаценты, то они могут запустить фетальное программирование у плода, которое приведет к аналогичным патологиям во взрослом организме.

Интересно, что во всех типах эндотелиоцитов было отмечено падение уровня экспрессии шаперонов через 48 ч культивирования, а затем резкий подъем через 72 ч.

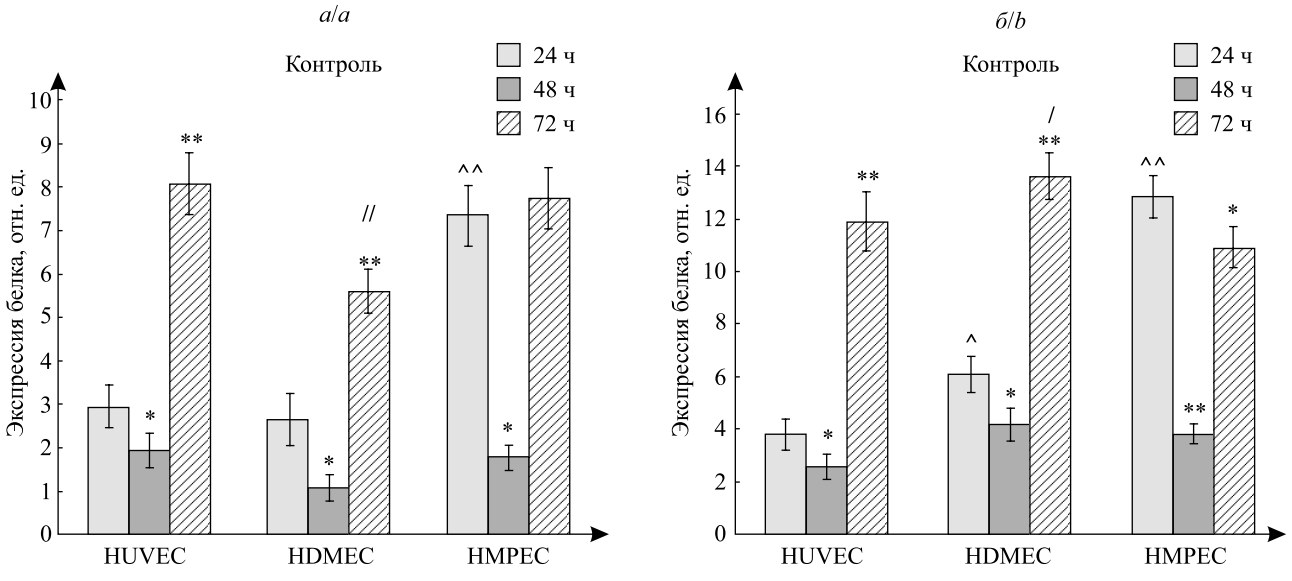


Рис. 1. Экспрессия белков GRP94 (*а*) и GRP78 (*б*) в эндотелиальных клетках HUVEC, HDMEC и HMPEC при стандартных условиях культивирования (37 ºС, 5 % CO_2, 95 % воздуха) (клетки контроля): * и ** – различия достоверны по отношению к клеткам, которые культивировали 24 ч, при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно (сравнения проводили внутри каждой группы клеток); ^ и ^^ – различия достоверны по отношению к клеткам HUVEC и HDMEC, которые культивировали 24 ч, при $p < 0,01$; / – различия достоверны по отношению к клеткам HPMEC, которые культивировали 72 ч, при $p < 0,05$; // – различия достоверны по отношению к клеткам HUVEC и HPMEC, которые культивировали 72 ч, при $p < 0,01$

Fig. 1. Expression of proteins GRP94 (*a*) and GRP78 (*b*) in the endothelial cells HUVEC, HDMEC and HMPEC under the standard conditions of cultivation (37 ºC, 5 % CO_2, 95 % air) (control cells): * and ** – the differences are significant in comparison to cells cultivated 24 h, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively (comparison was done in each group); ^ and ^^ – the differences are significant in comparison to HUVEC and HDMEC, cultivated 24 h, $p < 0.01$; / – the differences are significant in comparison to HPMEC, cultivated 72 h, $p < 0.05$; // – the differences are significant in comparison to HUVEC and HPMEC, cultivated 72 h, $p < 0.01$

Экспрессия GRP94 и GRP78 в эндотелиальных клетках в условиях гипоксии. В эндотелиальных клетках HUVEC в условиях гипоксии (37 ºС, 5 % CO_2, ≤1 % O_2) наблюдалось повышение экспрессии уровня GRP94 через 24, 48 и 72 ч по сравнению с клетками контроля ($p \leq 0,01$). Через 48 ч было зафиксировано максимальное повышение, уровень которого сохранился и через 72 ч инкубации в условиях гипоксии (рис. 2, *а*). Паттерн экспрессии GRP78 в HUVEC в условиях гипоксии сравним с GRP94 (рис. 3, *а*). Таким образом, в эндотелиальных клетках из пуповинной вены в условиях гипоксии усиливается экспрессия обоих белков, помогающих клетке адаптироваться к стрессовой ситуации.

На экспрессию GRP94 в эндотелиальных клетках HDMEC и HMPEC гипоксия влияла иначе. В условиях гипоксии через 24 ч инкубации уровень экспрессии GRP94 в этих клетках был сравним с таковым в клетках контроля (см. рис. 2, *б* и *в*), а через 48 ч экспрессия GRP94 существенно выросла по сравнению с клетками контроля ($p \leq 0,01$) (см. рис. 2, *б* и *в*). Через 72 ч инкубации в условиях гипоксии в эндотелиальных клетках HDMEC экспрессия GRP94 сохранилась на уровне 48 ч (гипоксия), превышая уровень контроля (72 ч) ($p \leq 0,01$) (см. рис. 2, *б*), а в клетках HMPEC экспрессия упала по сравнению с уровнем 48 ч (гипоксия) ($p \leq 0,01$) и была сравнима с уровнем контроля (72 ч) (см. рис. 2, *в*).

В целом в условиях экспериментальной гипоксии экспрессия GRP94 в микроциркуляторных эндотелиоцитах кожи (HDMEC) и плаценты (HMPEC) сравнима, но отличается от паттерна экспрессии в макроциркуляторных эндотелиоцитах пуповины (HUVEC), что, возможно, объясняется различиями в физиологических функциях сосудов микро- и макроциркуляторного русла [20].

В эндотелиальных клетках HDMEC в условиях гипоксии экспрессия GRP78 через 24 ч была сравнима с контролем (24 ч); через 48 ч выросла вдвое по сравнению с контролем (48 ч); через 72 ч возросла еще более чем в 2 раза по сравнению с контролем (72 ч). Паттерн экспрессии GRP78 в HDMEC в условиях гипоксии сравним с GRP94 (см. рис. 3, *б*).

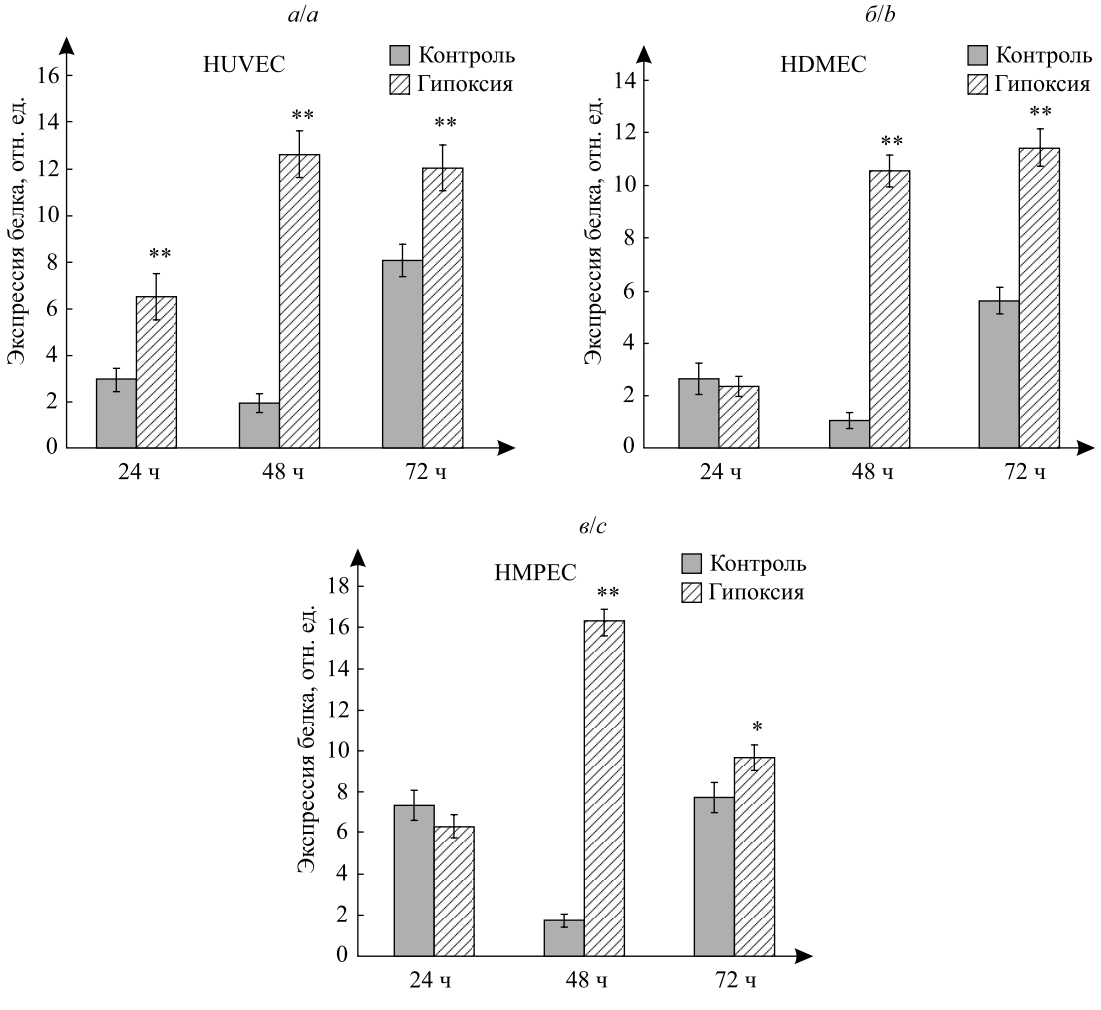


Рис. 2. Экспрессия белков GRP94 в эндотелиальных клетках HUVEC (*а*), HDMEC (*б*) и HMPEC (*в*) в условиях экспериментальной гипоксии (37 ºС, 5 % CO_2, ≤ 1 % O_2): * и ** – различия достоверны по отношению к произведенному контролю при $p < 0{,}05$ и $p < 0{,}01$ соответственно

Fig. 2. Expression of proteins GRP94 in the endothelial cells HUVEC (*a*), HDMEC (*b*), and HMPEC (*c*) under experimental hypoxia (37 ºC, 5 % CO_2, ≤ 1 % O_2): * and ** – the differences are significant in comparison to the appropriate control, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively

В клетках HMPEC в условиях гипоксии паттерн экспрессии GRP78 отличался от такового в HUVEC и HDMEC, а также имел отличия от паттерна экспрессии GRP94 в HMPEC (см. рис. 3, *в*): через 24 ч инкубации в условиях гипоксии экспрессия GRP78 была ниже, чем в контроле (24 ч); через 48 ч экспрессия повысилась по сравнению с клетками, выращиваемыми 48 ч в стандартных условиях культивирования ($p \leq 0{,}01$), и клетками, выращиваемыми 24 ч в условиях гипоксии ($p \leq 0{,}01$), но уровень их экспрессии не превышал уровня экспрессии в клетках, которые росли в стандартных условиях 24 ч (см. рис. 3, *в*). Через 72 ч инкубации в условиях гипоксии экспрессия GRP78 увеличилась более чем в 5 раз по сравнению с клетками, которые росли 24 или 72 ч в стандартных условиях ($p \leq 0{,}01$) (см. рис. 3, *в*).

Через 72 ч инкубации в условиях гипоксии в микроциркуляторных эндотелиальных клетках HDMEC и HMPEC уровень экспрессии GRP78 был существенно выше, чем GRP94. Известно, что белки семейства Hsp70 являются высококонсервативными и их основная функция у различных организмов заключается в адаптации клетки к условиям стресса за счет восстановления нарушенной структуры белков. Накопление белков с поврежденной структурой запускает реакцию несвернутых белков (англ. *unfolded protein response*), главными сенсорами которой являются IRE1 (inositol requiring protein-1), PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) и ATF6 (activating transcription factor-6) [21–25]. В результате запускаются следующие механизмы, уменьшающие стрессовую нагрузку на клетку:

- ингибирование трансляции, снижающее уровень белков в ЭПР;
- активация белков-шаперонов, способствующих восстановлению белковой структуры [21–25].

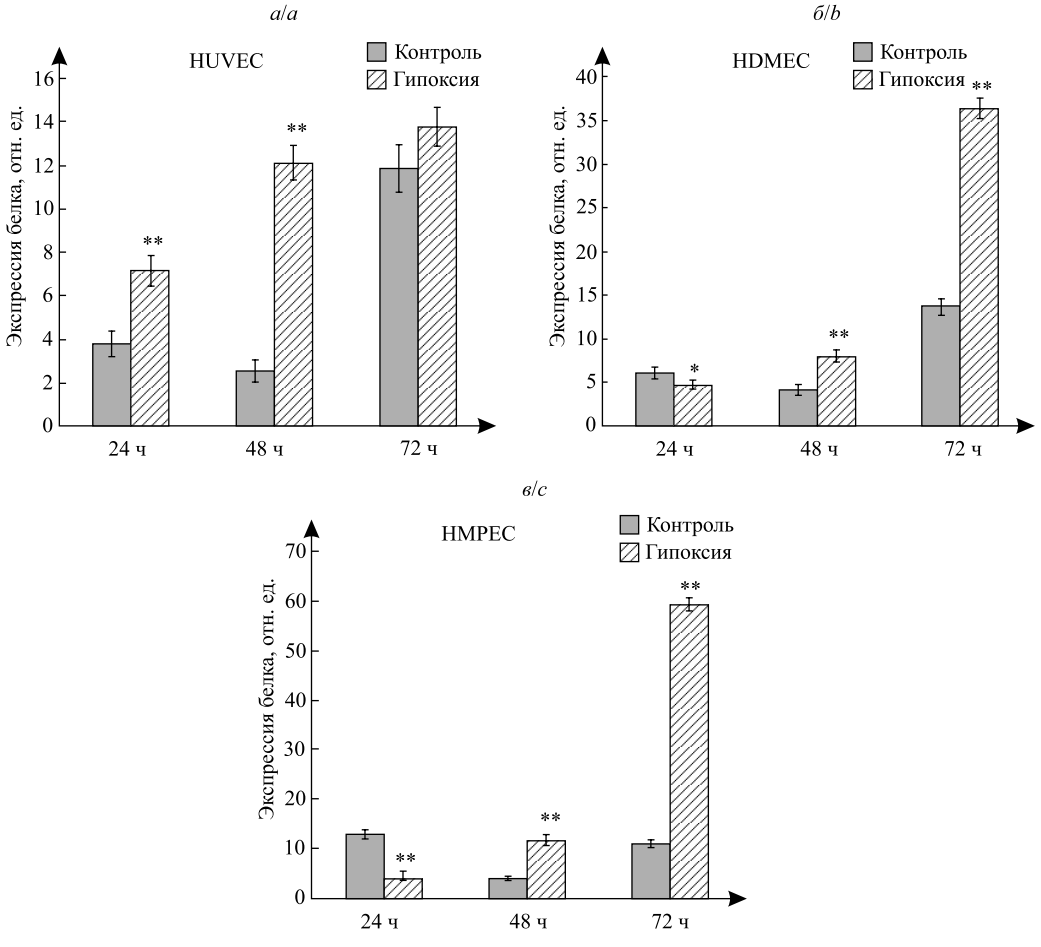


Рис. 3. Экспрессия белков GRP78 в эндотелиальных клетках HUVEC (*а*), HDMEC (*б*) и HMPEC (*в*) в условиях экспериментальной гипоксии (37 ºС, 5 % CO_2, ≤ 1 % O_2):
* и ** – различия достоверны по отношению к произведенному контролю при $p < 0{,}05$ и $p < 0{,}01$ соответственно

Fig. 3. Expression of proteins GRP78 in the endothelial cells HUVEC (*a*), HDMEC (*b*), and HMPEC (*c*) under experimental hypoxia (37 ºC, 5 % CO_2, ≤ 1 % O_2):
* and ** – the differences are significant in comparison to the appropriate control, $p < 0.05$ and $p < 0.01$ respectively

Выводы

Экспрессия стрессовых белков-шаперонов GRP78 и GRP94 при стандартных условиях культивирования (37 ºС, 5 % CO_2, 95 % воздуха) в эндотелиальных клетках HUVEC и HDMEC схожа, а в эндотелиоцитах HMPEC имеет отличия. В условиях гипоксии паттерн экспрессии меняется: появляются различия в экспрессии между эндотелиоцитами микроциркуляторного (HDMEC, HMPEC) и макроциркуляторного русла (HUVEC).

Библиографические ссылки

1. *Hochachka P. W.* Defense strategies against hypoxia and hypothermia // Science. 1986. Vol. 231. P. 234–241.

2. *Suarez R. K., Doll C. J., Buie A. E., et al.* Turtles and rats: a biochemical comparison of anoxia-tolerant and anoxia-sensitive brains // Am. J. Physiol. 1989. Vol. 257. P. 1083–1088.

3. *Nilsson G. E., Alfaro A. A., Lutz P. L.* Changes in turtle brain neurotransmitters and related substances during anoxia // Am. J. Physiol. 1990. Vol. 259. P. 376–384.

4. *Lee S. L., Fanburg B. L.* Glycolytic activity and enhancement of serotonin uptake by endothelial cells exposed to hypoxia/anoxia // Circ. Res. 1987. Vol. 60, № 5. P. 653–658.

5. *Ogawa S., Gerlach H., Esposito C., et al*. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium // J. Clin. Invest. 1990. Vol. 85. P. 1090–1098.

6. *Kourembanas S., Marsden P. A., McQuillan L. P., et al.* Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium // J. Clin. Invest. 1991. Vol. 88. P. 1054–1057.

7. *Farber H. W., Rounds S.* Effect of long-term hypoxia on cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells // Exp. Cell Res. 1990. Vol. 191. P. 27–36.

8. *Farber H. W., Barnett H. F.* Differences in prostaglandin metabolism in cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells exposed to acute and chronic hypoxia // Circ. Res. 1991. Vol. 68. P. 1446–1457.

9. *Zimmerman L. H., Levine R. A., Farber H. W.* Hypoxia induces a specific set of stress proteins in cultured endothelial cells // J. Clin. Invest. 1991. Vol. 87. P. 908–914.

10. *Kreisberg J. I., Mills J. W., Jarrell J. A., et al.* Protection of cultured renal tubular epithelial cells from anoxic cell swelling and cell death // Proc. Natl. Acad. Sci. 1981. Vol. 77. P. 5445–5447.

11. *Schwartz P., Piper H. M., Spahr R., et al.* Ultrastructure of cultured adult myocardial cells during anoxia and reoxygenation // Am. J. Pathol. 1984. Vol. 115. P. 349–361.

12. *Santoro M. G.* Heat shock factors and the control of the stress response // Biochem. Pharmacol. 2000. Vol. 59, № 1. P. 55–63.

13. *Nollen E. A., Morimoto R. I.* Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing «heat shock» proteins // J. Cell Sci. 2002. Vol. 115. P. 2809–2816.

14. *Sangster T. A., Lindquist S., Queitsch C.* Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance // Bioessays. 2004. Vol. 26. P. 348–362.

15. *De Los Rio P., Ben-Zvi A., Slutsky O., et al.* Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, № 16. P. 6166–6172.

16. *Floer M., Bryant G. O., Ptashne M.* HSP90/70 chaperones are required for rapid nucleosome removal upon induction of the GAL genes of yeast // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105, № 8. P. 2975–2980.

17. *Van P. N., Peter F., Söling H. D.* Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264, № 29. P. 17494–17501.

18. *Laemmli U. K.* Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, issue 5259. P. 680–685.

19. *Myatt L.* Placental adaptive responses and fetal programming // J. Physiol. 2006. Vol. 572, № 1. P. 25–30.

20. *Wiernsperger N. F., Bouskela E.* Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication // Diabetes Metab. 2003. Vol. 29, № 4. P. 6S77–87.

21. *Ron D., Walter P.* Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. Vol. 8. P. 519–529.

22. *Hetz C.* The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012. Vol. 13. P. 89–102.

23. *Oslowski C. M., Urano F.* Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system // Methods Enzymol. 2011. Vol. 490. P. 71–92.

24. *Chakrabarti A., Chen A. W., Varner J. D.* A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response // Biotechnol. Bioeng. 2011. Vol. 108, № 12. P. 2777–2793.

25. *Liu C. Y., Kaufman R. J.* The unfolded protein response // J. Cell Sci. 2003. Vol. 116, № 10. P. 1861–1862.

References

1. Hochachka P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. 1986. Vol. 231. P. 234–241.

2. Suarez R. K., Doll C. J., Buie A. E., et al. Turtles and rats: a biochemical comparison of anoxia-tolerant and anoxia-sensitive brains. *Am. J. Physiol.* 1989. Vol. 257. P. 1083–1088.

3. Nilsson G. E., Alfaro A. A., Lutz P. L. Changes in turtle brain neurotransmitters and related substances during anoxia. *Am. J. Physiol.* 1990. Vol. 259. P. 376–384.

4. Lee S. L., Fanburg B. L. Glycolytic activity and enhancement of serotonin uptake by endothelial cells exposed to hypoxia/anoxia. *Circ. Res.* 1987. Vol. 60, No. 5. P. 653–658. DOI: 10.1161/01.RES.60.5.653.

5. Ogawa S., Gerlach H., Esposito C., et al. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. *J. Clin. Invest.* 1990. Vol. 85. P. 1090–1098. DOI: 10.1172/JCI114540.

6. Kourembanas S., Marsden P. A., McQuillan L. P., et al. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest*. 1991. Vol. 88. P. 1054–1057. DOI: 10.1172/JCI116604.

7. Farber H. W., Rounds S. Effect of long-term hypoxia on cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells. *Exp. Cell Res*. 1990. Vol. 191. P. 27–36.

8. Farber H. W., Barnett H. F. Differences in prostaglandin metabolism in cultured aortic and pulmonary arterial endothelial cells exposed to acute and chronic hypoxia. *Circ. Res.* 1991. Vol. 68. P. 1446–1457. DOI: 10.1161/01.RES.68.5.1446.

9. Zimmerman L. H., Levine R. A., Farber H. W. Hypoxia induces a specific set of stress proteins in cultured endothelial cells. *J. Clin. Invest*. 1991. Vol. 87. P. 908–914.

10. Kreisberg J. I., Mills J. W., Jarrell J. A., et al. Protection of cultured renal tubular epithelial cells from anoxic cell swelling and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981. Vol. 77. P. 5445–5447.

11. Schwartz P., Piper H. M., Spahr R., et al. Ultrastructure of cultured adult myocardial cells during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Pathol*. 1984. Vol. 115. P. 349–361.

12. Santoro M. G. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.* 2000. Vol. 59, No. 1. P. 55–63.

13. Nollen E. A., Morimoto R. I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing «heat shock» proteins. *J. Cell Sci.* 2002. Vol. 115. P. 2809–2816.

14. Sangster T. A., Lindquist S., Queitsch C. Under cover: causes, effects and implications of Hsp90-mediated genetic capacitance. *Bioessays*. 2004. Vol. 26. P. 348–362. DOI: 10.1002/bies.20020.

15. De Los Rio P., Ben-Zvi A., Slutsky O., et al. Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103, No. 16. P. 6166–6172. DOI: 10.1073/pnas.0510496103.

16. Floer M., Bryant G. O., Ptashne M. HSP90/70 chaperones are required for rapid nucleosome removal upon induction of the GAL genes of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 2008. Vol. 105, No. 8. P. 2975–2980. DOI: 10.1073/pnas.0800053105.

17. Van P. N., Peter F., Söling H. D. Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles. *J. Biol. Chem*. 1989. Vol. 264, No. 29. P. 17494–17501.

18. Laemmli U. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970. Vol. 227, issue 5259. P. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

19. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J. Physiol*. 2006. Vol. 572, No. 1. P. 25–30. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.104968.

20. Wiernsperger N. F., Bouskela E. Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication. *Diabetes Metab*. 2003. Vol. 29, No. 4. P. 6S77–87. DOI: 10.1016/S1262-3636(03)72791-8.

21. Ron D., Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. Vol. 8. P. 519–529. DOI: 10.1038/nrm2199.

22. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. Vol. 13. P. 89–102. DOI: 10.1038/nrm3270.

23. Oslowski C. M., Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol*. 2011. Vol. 490. P. 71–92. DOI: 10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0.

24. Chakrabarti A., Chen A. W., Varner J. D. A Review of the Mammalian Unfolded Protein Response. *Biotechnol. Bioeng.* 2011. Vol. 108, No. 12. P. 2777–2793. DOI: 10.1002/bit.23282.

25. Liu C. Y., Kaufman R. J. The unfolded protein response. *J. Cell Sci.* 2003. Vol. 116, No. 10. P. 1861–1862.

Статья поступила в редколлегию 25.04.2017.
Received by editorial board 25.04.2017.

УДК 616.98:578.831.21.083.338

ИНГИБИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АНТАГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА P2X7 НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ α-ДЕФЕНЗИНОВ

Ю. В. ЧАЛЫЙ [1)]***, Н. Н. НАШКЕВИЧ*** [2)]

[1)]*Университет Айовы, 2191 ML 500, ул. Ньютон-роуд, IA 52242, Айова Сити, США*
[2)]*Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь*

Миелоидные α-дефензины – мультифункциональные катионные пептиды системы врожденного иммунитета – играют важную роль в инфекционно-воспалительной патологии человека. Ранее нами было показано участие HNP 1–3 (human neutrophil peptides 1–3) в регуляции воспаления за счет стимуляции экспрессии ряда цитокинов, в том числе хемокина интерлейкина-8 (ИЛ-8, CXCL8), в моноцитах крови и других клетках человека, однако механизмы подобных эффектов HNP изучены недостаточно. При помощи антагонистов рецептора P2X7 – ингибиторов PPADS и KN-62 – показано эффективное подавление продукции ИЛ-8 в ответ на действие HNP в культуре макрофагов человека, в то время как вызванная фактором некроза опухолей-α продукция ИЛ-8 практически не ингибировалась KN-62. Данные указывают на возможное вовлечение пуринергического рецептора P2X7 в клеточные ответы макрофагов при стимуляции миелоидными дефензинами и могут быть полезны для понимания механизмов участия HNP в воспалении в норме и при патологии, а также совершенствования методов диагностики и лечения дефензин-ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: α-дефензины; антагонисты рецептора P2X7; макрофаги; интерлейкин-8 (CXCL8).

Благодарность. Работа поддержана грантами 03-55-2196 и 03-50-4211 INTAS.

INHIBITORY EFFECT OF P2X7 RECEPTOR ANTAGONISTS ON NEUTROPHIL α-DEFENSIN-INDUCED INTERLEUKIN-8 PRODUCTION BY HUMAN MACROPHAGES

Y. V. CHALY [a]***, N. N. NASHKEVICH*** [b]

[a]*University of Iowa, 2191 ML 500, Newton Rd., IA 52242, Iowa City, USA*
[b]*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, Daŭhabrodskaja Street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus*

Corresponding author: N. N. Nashkevich (nnash2001@mail.ru)

Myeloid α-defensins are multifunctional cationic peptides of innate immune system that play an important role in infection, inflammation and human disease. We previously showed participation of HNP 1–3 (human neutrophil peptides 1–3) in regulation of inflammation by stimulation of monocytes and non-monocytic cells to express some cytokines,

Образец цитирования:
Чалый Ю. В., Нашкевич Н. Н. Ингибирующий эффект антагонистов рецептора P2X7 на продукцию интерлейкина-8 макрофагами человека в ответ на действие нейтрофильных α-дефензинов // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 25–30.

For citation:
Chaly Y. V., Nashkevich N. N. Inhibitory effect of P2X7 receptor antagonists on neutrophil α-defensin-induced interleukin-8 production by human macrophages. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 25–30 (in Russ.).

Авторы:
Юрий Владимирович Чалый – кандидат биологических наук; ассистент-профессор отдела педиатрии медицинского колледжа им. Д. В. Карвера Университета Айовы.
Наталья Николаевна Нашкевич – кандидат биологических наук; доцент кафедры радиационной гигиены и эпидемиологии.

Authors:
Yury Chaly, PhD (biology); research assistant professor of pediatrics – rheumatology, stead family department of pediatrics, Carver College of Medicine, University of Iowa.
yury-chaly@uiowa.edu
Natallia Nashkevich, PhD (biology); associate professor at the department of radiation hygiene and epidemiology.
nnash2001@mail.ru

i. e. chemokine interleukin-8 (IL-8, CXCL8), in response to HNP, but mechanisms of this induction retained unclear. Using P2X7 receptor antagonists PPADS and KN-62 an effective inhibition of HNP-dependent IL-8 induction in cultures of human macrophages was shown. In contrast to the effect of P2X7 antagonists on, TNFα-induced IL-8 induction was resistant to the action of KN-62. The data suggest the possible involvement of purinergic P2X7 receptor in cell effects of macrophages mediated by neutrophil-released HNP. Our data are useful for understanding of a role of HNP in inflammatory responses and pathological events, as well as for development of tools for neutralization of HNP-mediated detrimental cell effects and improving of diagnostic and therapy methods for HNP-dependent pathologies.

Key words: α-defensins; P2X7 receptor antagonists; macrophages; interleukin-8 (CXCL8).

Acknowledgements. The work is supported by grants 03-55-2196 and 03-50-4211 INTAS.

Введение

Полиморфно-ядерные нейтрофильные гранулоциты (далее – ПМН) преобладают среди лейкоцитов крови и являются важнейшим элементом врожденного иммунитета. В азурофильных гранулах ПМН человека присутствуют в основном α-дефензины (human neutrophil peptides, HNP-1, -2, -3, -4), эффективно нейтрализующие любые инфекционные агенты внутри фаголизосомы, а также экстраклеточно, после дегрануляции ПМН, чаще всего в ответ на наиболее значимый для ПМН хемотаксический и активирующий стимул – α-хемокин интерлейкин-8 (ИЛ-8) [1–3]. Мощные катионные микробициды HNP могут накапливаться в высоких концентрациях, которые многократно повышаются локально при инфильтрации нейтрофилами тканей в очаге инфекции [1–3]. При этом нередко реализуются не только полезные эффекторные функции дефензинов, но и патофизиологические явления, приводящие к развитию патологии с их участием [4–8].

Роль HNP как эндогенного антибиотика особенно важна в инфекционной патологии человека. Свои функции α-дефензины выполняют также в барьерных эпителиальных тканях и физиологических жидкостях, где отмечается накопление HNP при развитии патологии (например, в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями легких различного генеза). Генетические дефекты, связанные с нарушениями экспрессии и регуляции HNP, часто выступают причиной иммунодефицитных состояний. С гиперпродукцией HNP могут быть связаны заболевания кожи, аллергические состояния, онкологические изменения [2–6]. В силу катионности α-дефензины могут оказаться губительными для эукариотических клеток при отсутствии защитных белковых факторов организма, обладают исключительной способностью сорбироваться на белках и клетках и долго сохраняются в тканях даже после гибели короткоживущих ПМН в очаге инфильтрации, вызывая разнообразные физиологические эффекты [8; 9]. Внутрисосудистую активацию и дегрануляцию ПМН рассматривают как механизм, приводящий к развитию системного воспалительного ответа, септического шока и мультиорганной дисфункции при генерализированных гнойно-воспалительных заболеваниях, осложнениях после тяжелых травм, ожогов и т. д. [5–7].

В предыдущих исследованиях [9–12] нами было показано участие HNP в регуляции воспаления за счет стимуляции экспрессии фактора некроза опухолей-α (ФНО-α (*англ*. tumor necrosis factor, TNF)), интерлейкина-1β (ИЛ-1β) и ИЛ-8 в моноцитах и цельной крови, а также в эпителиальных, эндотелиальных, почечно-эмбриональных и других клетках человека [11–13].

Таким образом, высокая концентрация HNP системно либо локально инициирует (усиливает) воспалительный ответ через индукцию ИЛ-8 в клетках различного тканевого происхождения, среди которых моноциты и макрофаги являются наиболее реактивными и потенциально мощными продуцентами провоспалительных цитокинов.

Многие катионные микробициды, в том числе HNP, вызывают в клетках моноцитарного ряда человека экспрессию хемокинов *in vitro* [14; 15]. В связи с этим возникает вопрос: отвечают ли сходные структурные домены этих катионных молекул за хемокиновую экспрессию и взаимодействуют ли они с теми же гипотетическими рецепторами на моноцитах/макрофагах?

Поскольку HNP может выступать стрессовым фактором для моноцитов, вызывая синтез цитокинов [8–13], мы предположили участие механизма пуринергической передачи сигнала в реализации данных эффектов HNP. У макрофагов и дендритных клеток пуринергическая передача сигналов, сопровождающаяся мобилизацией внутриклеточного кальция, служит важным «сигналом опасности» при воспалении, но вместе с тем может играть патофизиологическую роль [16; 17]. В пользу такой гипотезы говорит факт подавления ингибиторами рецепторов P2X7 продукции интерлейкина-1β в супернатантах моноцитов крови человека в ответ на катионное производное кателицидина пептид LL-37 [15].

Рецепторы P1 и P2 (семейств P1, P2X и P2Y) являются функциональными рецепторами для экстраклеточных нуклеотидов и участвуют в пуринергической передаче сигнала, важной для функционального ответа на экстраклеточные стимулы [16; 17]. Семейство пуринорецепторов P2X (1–7) представляет

собой активируемые аденозинтрифосфатом (АТФ) катионные каналы, которые экспрессируются в том числе на макрофагах и клетках микроглии [17; 18]. Пуринорецептор P2X7, кодируемый геном P2RX, функционирует как паттерн-распознающий рецептор при апоптозе и воспалении. Присоединение лиганда в случае P2X7 влечет за собой активацию трансмембранных паннексиновых каналов, пропускающих ионы, АТФ и прочие малые молекулы из клетки, что может приводить к «кальциевым волнам» в цитоплазме и в конечном итоге к АТФ-зависимому лизису макрофагов. Активация P2X7-рецептора макрофагов ведет к быстрому созреванию и высвобождению ИЛ-1β. К антагонистам P2X7-рецептора относят пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновую кислоту (PPADS), аналог сурамина NF279, а также производное изохиномина KN-62 (антагонист Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы, или II CaM-киназы), который считают неконкурентным антагонистом рецептора P2X7, и др. [18].

В настоящем исследовании изучено влияние ингибиторов рецептора P2X7 на HNP-индуцированную продукцию ИЛ-8 в клетках дифференцированных макрофагов человека.

Материалы и методы исследования

Очистка и тестирование препарата HNP 1–3. Дефензины были очищены из нейтрофилов здоровых доноров, как описано в [19]. Пептиды HNP 1–3 экстрагировали из пулированных азурофильных гранул и фракционировали методом гель-фильтрации с Bio-Gel P6 (*Bio-Rad*, США). Содержащие HNP фракции подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хромато-масс-спектрометре с диодно-матричным детектором (*Agilent1100*, США) с помощью колонки Zorbax C18 (*Pharmacia*). Элюирование проводили в линейном градиенте с использованием следующей системы: ацетонитрил (А), вода и 0,1 % трифторуксусной кислоты (ТФУ) (Б). Полученный препарат HNP растворяли в 0,01 % уксусной кислоте и хранили при –20 °С до проведения анализа. В конечном препарате HNP с помощью хромогенного LAL-теста (*Hbt*, Уден, Нидерланды) контролировали содержание липополисахарида, которое не превышало 5 пг/мл в расчете на 100 мкг/мл пептидов. Приемлемый уровень чистоты препарата (> 98 %) подтверждали с помощью трицин-ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле, гель-электрофореза для катионных белков и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации. Очищенный препарат HNP содержал смесь HNP1, -2 и -3 в соотношении 5 : 3 : 2 соответственно.

Протоколы выделения и культивирования клеток. Мононуклеары периферической крови человека получали из гепаринизированной донорской крови по стандартной методике с помощью Ficoll/Paque (*Amersham*). Нейтрофилы изолировали из гепаринизированной крови после седиментации эритроцитов на декстране с последующим градиентным центрифугированием клеток с использованием Ficoll/Paque [20]. Моноциты выделяли по протоколу CC-элютриации, как описано в [21].

Культуру макрофагов получали путем семидневного культивирования моноцитов крови (10^6 кл./мл) в планшетах (*Nunc*, Висбаден, ФРГ) в среде культивирования DMEM (*Biochrom*, Берлин, ФРГ), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (*Roche*), 2 ммоль/л глутамина, 1 ммоль/л пирувата натрия, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, с добавлением 100 нг/мл рекомбинантного макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) человека (*R&D Systems*, Висбаден, ФРГ). Чистоту зрелых макрофагов по истечении периода культивирования подтверждали проточной цитофлюориметрией после иммуноцитохимической окраски поверхностных маркеров CD1a, CD14, CD83 и CD209, как описано в [22].

Стимулирование макрофагов. Для проведения *in vitro* стимуляции и ингибирования продукции ИЛ-8 дифференцированные макрофаги переносили в 96-луночные планшеты для культуры клеток (*Nunc*) в объеме 0,1 мл на лунку в среде RPMI-160, содержащей 5 % ФБС. Макрофаги (10^5 кл./мл) культивировали в течение 30 мин в присутствии 100 мкмоль/л PPADS, 300 нмоль/л KN-62 (*Sigma-Aldrich*, Сент-Луис, США) либо без них. Затем клетки стимулировали нейтрофильными дефензинами HNP (30 мкмоль/л) или рекомбинантным TNFα (*PeproTech*, Роки Хилл, США) в концентрации 5 нг/мл. Культивирование продолжали при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO_2. Клеточные супернатанты собирали и центрифугировали. Уровень продуцируемого ИЛ-8 тестировали методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа UptiBlue (*Interchim*, Монлюсон, Франция) согласно рекомендациям производителя либо стандартным методом исключения трипанового синего.

ИФА. Содержание ИЛ-8 в супернатантах культур стимулированных клеток выявляли с помощью собственного ИФА на основе моноклональных антител (МКА) 4C и биотинилированного МКА 3A, как описано в [23], с ИЛ-8 человека (*PeproTech*) в качестве стандартного белка. Количество HNP определяли методом «сэндвич»-ИФА, используя анти-HNP антитела, как описано в [24], с нативными очищенными HNP 1–3 (*Hbt*) в качестве стандартных пептидов.

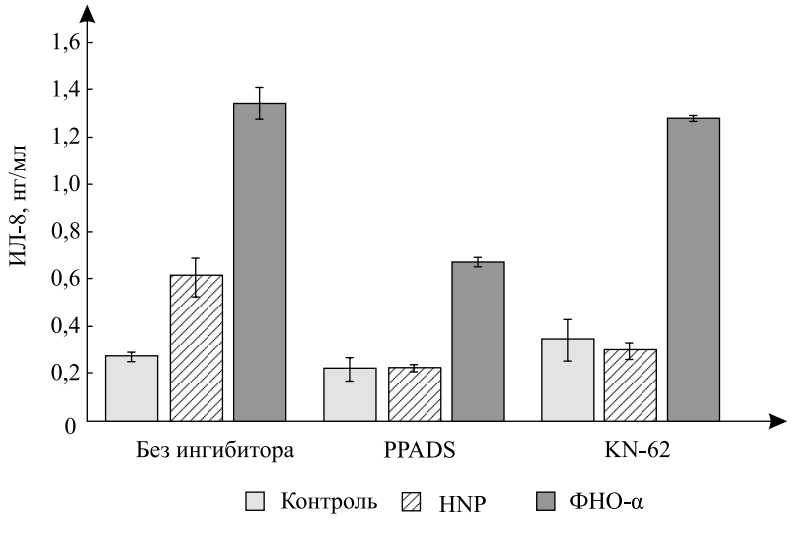
Статистический анализ. Рассчитывали средние значения и стандартные отклонения уровня ИЛ-8 (Mean ± SE), измеренные трехкратно в супернатантах стимулированных клеток в культурах *in vitro*. Определения повторяли не менее чем в трех независимых экспериментах. Статистический анализ проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента (при $p < 0,05$ различия считали значимыми).

Результаты исследования и их обсуждение

Нейтрофильные дефензины способны индуцировать синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови человека, что было показано ранее в [7–11]. Мы предположили, что в культуре макрофагов, дифференцированных *in vitro* из моноцитов в присутствии M-CSF, HNP также вызовут синтез ИЛ-8, причем закономерности и механизмы данного эффекта HNP должны быть общими как для моноцитов, так и для макрофагов. В экспериментах в клеточных культурах макрофагов HNP эффективно индуцировали продукцию ИЛ-8 с тем же профилем индукции. Обнаружена чувствительность синтеза ИЛ-8 к ингибированию фосфорилирования и активации митоген-активированных протеинкиназ (MAP-киназ), экстраклеточной сигнал-регулируемой киназы 1/2 (ERK1/2) и p38 в клетках макрофагов в ответ на HNP (данные не представлены). Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукция ИЛ-8 опосредована активацией клеточных рецепторов, прямо либо косвенно связанных с передачей сигнала через MAP-киназы.

В качестве наиболее вероятного кандидата на роль «HNP-рецептора», опосредующего продукцию ИЛ-8 в клетках моноцитарно-макрофагального ряда, в настоящем исследовании выступал пуринергический рецептор P2X7.

На рисунке показано, что антагонисты рецептора P2X7 – ингибиторы PPADS и KN-62 – эффективно подавляли индукцию ИЛ-8 в ответ на действие HNP (более чем на 50 %; $p < 0,05$) на уровне белка в культуре стимулированных макрофагов.



Влияние антагонистов рецептора P2X7 (PPADS и KN-62) на продукцию ИЛ-8, индуцированную в культуре макрофагов человека (10^5 кл./мл) в присутствии 300 нмоль/л нейтрофильных α-дефензинов HNP 1–3 либо 5 нг/мл ФНО-α (контроль – варианты без внесения стимула)

Effects of P2X7 receptor antagonists PPADS and KN-62 on IL-8 production induced in the presence of 300 nmol/l neutrophil α-defensins HNP1-3 or 5 ng/ml TNF-α in a culture of human macrophages (10^5 cells/ml) (control – variants without stimulation)

Индукция ИЛ-8 в ответ на лиганд рецептора P2X7 (2'-3'-O-(4-бензоил-бензоил)-АТФ) также эффективно подавлялась в присутствии антагонистов (результаты не представлены).

В то же время продукция ИЛ-8 в ответ на ФНО-α в контрольном варианте теста была практически неизменной в присутствии ингибитора KN-62 и снизилась наполовину под действием PPADS.

Наши предварительные данные относительно активации MAP-киназ ERK1/2 и p38 в клетках макрофагов в ответ на HNP и полученные результаты ингибирования у макрофагов индуцированного HNP синтеза ИЛ-8 антагонистами рецептора P2X7 [25; 26] поддерживают гипотезу об участии рецептора P2X7 моноцитов/макрофагов в реализации описанных эффектов HNP.

Показано, что индукторами ИЛ-8 у клеток в целом и у моноцитов и макрофагов в особенности могут быть стрессовые факторы различной природы, к числу которых можно отнести и действие катионных пептидов на мембраны эукариотических клеток. Так, HNP могут выступать деструктивным

стрессовым фактором при неадекватной (чрезмерной или аномально локализованной) продукции дефензинов в тканях либо кровотоке и таким образом запускать патогенные реакции [8–13], одним из механизмов реализации которых служит активация P2X7, с последующими патофизиологическими эффектами.

Изучение роли HNP при патологии и механизмов, лежащих в основе их действия на клетки человека, а также поиск мишеней для направленной коррекции связанных с HNP нарушений важны для совершенствования методов диагностики и лечения дефензин-ассоциированных заболеваний человека, патогенез которых связан с местным или системным воспалительным ответом. Способы направленного влияния на патологические реакции, в которые вовлечены HNP, позволят регулировать их аномальное накопление в опасных для собственных клеток концентрациях либо нейтрализовывать их патофизиологическую активность.

Библиографические ссылки

1. *Ganz T*. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // Nat. Rev. Immunol. 2003. Vol. 3. P. 710–720.

2. *Lehrer R. I*. Multispecific myeloid defensins // Curr. Opin. Hematol. 2007. Vol. 14. P. 16–21.

3. *Suarez-Carmona M., Hubert P., Delvenne P., et al*. Defensins: «Simple» antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? // Cytokine Growth Factor Rev. 2015. Vol. 26, № 3. P. 361–370.

4. *Нашкевич Н. Н.* Альфа-дефензины – мультифункциональные молекулы нейтрофилов: роль в воспалении и инфекционной патологии человека // Современные проблемы инфекционной патологии человека : сб. науч. тр. Вып. 6 / под ред. Л. П. Титова. Минск, 2013. Электрон. текст. дан. С. 221–226.

5. *Panyutich A. V., Panyutich E. A., Krapivin V. A., et al.* Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis // J. Lab. Clin. Med. 1993. Vol. 122. P. 202–207.

6. *Кудин А. П., Нашкевич Н. Н., Коледа С. Т. и др.* Содержание некоторых цитокинов в крови и ликворе детей с генерализованными формами менингококковой инфекции // Мед. новости. 2001. № 10. С. 66–68.

7. *Акалович С. Т., Нашкевич Н. Н., Астапов А. А. и др.* Содержание растворимого рецептора ФНО p55, альфа-дефензинов и ИЛ-877 и ИЛ-872 форм интерлейкина-8 в крови и ликворе детей с генерализованными формами менингококковой инфекции// Мед. иммунология. 2005. Т. 7. С. 575–578.

8. *Чалый Ю. В., Нашкевич Н. Н., Войтенок Н. Н.* Влияние радикалов кислорода, NO, повреждающих цитоскелет агентов, нейтрофильных дефензинов и фактора некроза опухолей-α на экспрессию гена интрелейкина-8 в человеческих клеточных линиях // Инфекция и иммунитет : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию БелНИИЭМ (Минск, 9–10 дек. 1999 г.) Минск, 1999. С. 557–558.

9. *Chaly Y., Nashkevich N., Voitenok N.* Cell stress conditions induce expression of IL-8 in different cell lines // J. Leuk. Biol. Suppl. 2000. P. 14.

10. *Misuno N. I., Kolesnikova T. S., Lehrer R. I., et al.* Effects of human defensin HNP-1 on the production of tumor necrosis factor-α by human blood monocytes *in vitro* // Biul. Eksp. Biol. Med. 1992. Vol. 113. P. 524–527.

11. *Chaly Y. V., Paleolog E. M., Kolesnikova T. S., et al.* Neutrophil α-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells // Eur. Cytokine Netw. 2000. Vol. 11. P. 257–266.

12. *Chaly Y. V., Kotlinski K. V., Sholukh A. M., et al.* The induction of IL-8 in various cells by human alpha-defensins: different mechanisms of IL-8 induction by neutrophil defensins in monocytic and non-monocytic cells // Abst. of Eighth John Humphrey Advanced Summer Program in Immunology (Moscow, 10–14 Sept., 2007). Moscow, 2007. P. 10.

13. *Sakamoto N., Mukae H., Fujii T., et al.* Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells // Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. 2005. Vol. 288, № 3. P. 508–513.

14. *Boniotto M., Jordan W. J., Eskdale J., et al*. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. Vol. 50, № 4. P. 1433–1441.

15. *Elssner A., Duncan M., Gavrilin M., et al*. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release // J. Immunol. 2004. Vol. 172, № 8. P. 4987–4994.

16. *Burnstock G.* Short- and long-term (trophic) purinergic signalling // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.: Biol. Sci. 2016. Vol. 371, issue 1700. DOI: 10.1098/rstb.2015.0422.

17. *Dubyak G. R.* P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells // Cell Microbiol. 2012. Vol. 14, issue 11. P. 1697–1706.

18. *North R. A., Michael F. J.* P2X Receptors as Drug Targets // Mol. Pharmacol. 2013. Vol. 83, issue 4. P. 759–769.

19. *Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., et al.* Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils // J. Clin. Invest. 1985. Vol. 76, issue 4. P. 1427–1435.

20. *Doroshenko T., Chaly Y., Savitskiy V., et al.* Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 // Blood. 2002. Vol. 100, issue 7. P. 2668–2671.

21. *Grage-Griebenow E., Lorenzen D., Fetting R., et al.* Phenotypical and functional characterization of Fey receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity // Eur. J. Immunol. 1993. Vol. 23, issue 12. P. 3126–3135.

22. *Fricke I., Mitchell D., Petersen F., et al*. Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells // FASEB J. 2004. Vol. 18, № 13. P. 1588–1590.

23. *Nashkevich N. N., Akalovich S., Louneva N., et al.* A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) // J. Immunol. Methods. 2002. Vol. 270. P. 37–51.

24. *Panyutich A. V., Voitenok N. N., Lehrer R. I., et al.* An enzyme immunoassay for human defensins // J. Immunol. Methods. 1991. Vol. 141, issue 2. P. 149–155.

25. *Donnelly-Roberts D. L., Namovic M. T., Faltynek C. R., et al*. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004. Vol. 308, issue 3. P. 1053–1061.

26. *Chen Q., Jin Y., Zhang K., et al.* Alarmin HNP-1 promotes pyroptosis and IL-1beta release through different roles of NLRP3 inflammasome via P2X7 in LPS-primed macrophages // Innate Immun. 2014.Vol. 20, issue 3. P. 290–300.

References

1. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 3. P. 710–720. DOI: 10.1038/nri1180.

2. Lehrer R. I. Multispecific myeloid defensins. *Curr. Opin. Hematol*. 2007. Vol. 14. P. 16–21.

3. Suarez-Carmona M., Hubert P., Delvenne P., et al. Defensins: «Simple» antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015. Vol. 26, No. 3. P. 361–370.

4. Nashkevich N. N. [Alfa-defensins as multifunctional molecules of neutrophils: the role in inflammation and in infectious human pathology]. *Actual problems of human infectious pathology* : sb. nauchn. tr. Issue 6 / ed. by L. P. Titov. Minsk, 2013. P 221–226. DVD-ROM (in Russ.).

5. Panyutich A. V., Panyutich E. A., Krapivin V. A., et al. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* 1993. Vol. 122. P. 202–207.

6. Kudin A. P., Nashkevich N. N., Koleda S. T., et al. [Blood and liquor levels of some cytokines by children with generalized forms of meningococcal infection]. M*ed. novosti*. 2001. No. 10. P. 66–68 (in Russ.).

7. Akalovich S. T., Nashkevich N. N., Kudin A. P., et al. The levels of soluble receptor of tumor necrosis factor p55, alpha-defensins and IL-877 и IL-872 forms of interleukin-8 in blood and cerebrospinal liquid of children with generalized forms of meningococcal infection. *Med. Immunol.* 2005. Vol. 7. P. 575–578 (in Russ.).

8. Chaly Y. V., Nashkevich N. N., Voitenok N. N. The effect of oxygen radicals, NO, cytoskeletal active compounds, neutrophil defensins and tumor necrosis factor-α on expression of IL-8 gene in human cell lines. *Infection and immunity* : materialy nauchn.-prakt. konf., posvyashchennoi 75-letiyu BelNIIEM (Minsk, 9–10 Dec., 1999). Minsk, 1999. P. 557–558 (in Russ.).

9. Chaly Y., Nashkevich N., Voitenok N. Cell stress conditions induce expression of IL-8 in different cell lines. *J. Leuk. Biol*. Suppl. 2000. P. 14.

10. Misuno N. I., Kolesnikova T. S., Lehrer R. I., et al. Effects of human defensin HNP-1 on the production of tumor necrosis factor-α by human blood monocytes *in vitro*. *Biul. Eksp. Biol. Med*. 1992. Vol. 113. P. 524–527.

11. Chaly Y. V., Paleolog E. M., Kolesnikova T. S., *et al.* Neutrophil α-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur. Cytokine Netw.* 2000. Vol. 11. P. 257–266.

12. Chaly Y. V., Kotlinski K. V., Sholukh A. M., et al. The induction of IL-8 in various cells by human alpha-defensins: different mechanisms of IL-8 induction by neutrophil defensins in monocytic and non-monocytic cells. Abst. of Eighth John Humphrey Advanced Summer Program in Immunology (Moscow, 10–14 Sept., 2007). Moscow, 2007. P. 10.

13. Sakamoto N., Mukae H., Fujii T., et al. Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol*. 2005. Vol. 288, No. 3. P. 508–513. DOI: 10.1152/ajplung.00076.2004.

14. Boniotto M., Jordan W. J., Eskdale J., et al. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50, No. 4. P. 1433–1441. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1433-1441.2006.

15. Elssner A., Duncan M., Gavrilin M., et al. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J. Immunol*. 2004. Vol. 172, No. 8. P. 4987–4994.

16. Burnstock G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 2016. Vol. 371, issue 1700. DOI: 10.1098/rstb.2015.0422.

17. Dubyak G. R. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol*. 2012. Vol. 14, issue 11. P. 1697–1706. DOI: 10.1111/cmi.12001.

18. North R. A., Michael F. J. P2X Receptors as Drug Targets. *Mol. Pharmacol*. 2013. Vol. 83, issue 4. P. 759–769. DOI: 10.1124/mol.112.083758.

19. Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest*. 1985. Vol. 76, issue 4. P. 1427–1435. DOI: 10.1172/JCI112120.

20. Doroshenko T., Chaly Y., Savitskiy V., et al. Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood*. 2002. Vol. 100, issue 7. P. 2668–2671. DOI: 10.1182/blood.100.7.2668.

21. Grage-Griebenow E., Lorenzen D., Fetting R., et al. Phenotypical and functional characterization of Fey receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur. J. Immunol.* 1993. Vol. 23, issue 12. P. 3126–3135. DOI: 10.1002/eji.1830231213.

22. Fricke I., Mitchell D., Petersen F., et al. Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells. *FASEB J.* 2004. Vol. 18, No. 13. P. 1588–1590. DOI: 10.1096/fj.03-1435fje.

23. Nashkevich N. N., Akalovich S., Louneva N., et al. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77). *J. Immunol. Methods.* 2002. Vol. 270. P. 37–51.

24. Panyutich A. V., Voitenok N. N., Lehrer R. I., et al. An enzyme immunoassay for human defensins. *J. Immunol. Methods*. 1991. Vol. 141, issue 2. P. 149–155.

25. Donnelly-Roberts D. L., Namovic M. T., Faltynek C. R., et al. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. Vol. 308, issue 3. P. 1053–1061. DOI: 10.1124/jpet.103.059600.

26. Chen Q., Jin Y., Zhang K., et al. Alarmin HNP-1 promotes pyroptosis and IL-1beta release through different roles of NLRP3 inflammasome via P2X7 in LPS-primed macrophages. *Innate Immun*. 2014. Vol. 20, issue 3. P. 290–300. DOI: 10.1177/1753425913490575.

Статья поступила в редколлегию 19.05.2017.
Received by editorial board 19.05.2017.

УДК 613.844:66.124-026.86

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МНОГОКОМПОНЕНТНОГО СРЕДСТВА

А. В. АДАМОВИЧ [1)]***, Е. А. РИМЖА*** [2)]***, Г. В. ШЕРСТЮК*** [2)]***, Н. В. ДУДЧИК*** [1)]

[1)]*Научно-практический центр гигиены, ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Белорусская медицинская академия последипломного образования, ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Беларусь*

Представлены результаты изучения потенциальной токсичности оригинального многокомпонентного средства, предназначенного для профилактики и коррекции последствий потребления табака. На одном из этапов токсикологических исследований оценено влияние многократного приема данной композиции на состояние периферической крови лабораторных животных (крыс). По результатам 30- и 60-суточных экспериментов выявлены немногочисленные изменения отдельных гематологических параметров в зависимости от срока затравки и дозы препарата. Характер этих изменений позволяет предположить, что они являются адаптивной реакцией организма на продолжительное воздействие комплекса ксенобиотиков с разнонаправленным действием. Оценка гематологического статуса животных на обоих контрольных сроках эксперимента, глубина и транзиторность выявленных изменений свидетельствуют об отсутствии выраженного токсического действия исследуемой композиции при ее длительном применении.

Ключевые слова: антиникотиновые средства; гематологические показатели.

ANALYSIS OF CHANGES OF THE RATS' PERIPHERAL BLOOD WITH PROLONGED EXPOSURE TO VARIOUS DOSE MULTICOMPONENT MEANS

A. V. ADAMOVICH [a]***, E. A. RIMZHA*** [b]***, G. V. SHERSTYUK*** [b]***, N. V. DUDCHIK*** [a]

[a]*Scientific practical centre of hygiene, Akademichnaja Street, 8, 220012, Minsk, Belarus*
[b]*Belarusian Medical Academy of Post-graduate Education, P. Broŭki Street, 3/3, 220013, Minsk, Belarus*

Corresponding author: A. V. Adamovich (sona_seg@mail.ru)

The article presents results of studying potential toxicity of the original multicomponent composition for prevention and correction of tobacco use effects. At one of the toxicological studies stages, the effect of multiple intake of this composition on the state of peripheral blood of laboratory animals (rats) was evaluated. The results of 30- and 60-day experiments revealed a few changes in individual hematological parameters, which depended on the admission

Образец цитирования:
Адамович А. В., Римжа Е. А., Шерстюк Г. В., Дудчик Н. В. Анализ изменения состава периферической крови крыс при длительном воздействии различных доз многокомпонентного средства // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 31–35.

For citation:
Adamovich A. V., Rimzha E. A., Sherstyuk G. V., Dudchik N. V. Analysis of changes of the rats' peripheral blood with prolonged exposure to various dose multicomponent means. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 31–35 (in Russ.).

Авторы:
Анна Валерьевна Адамович – младший научный сотрудник.
Елена Андреевна Римжа – доктор медицинских наук; главный научный сотрудник.
Галина Валентиновна Шерстюк – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник.
Наталья Владимировна Дудчик – доктор биологических наук; заведующий лабораторией микробиологии.

Authors:
Anna Adamovich, junior researcher.
sona_seg@mail.ru
Elena Rimzha, doctor of science (medicine); chief researcher.
Galina Sherstyuk, PhD (biology); leading researcher.
cnil@belmapo.by
Natallia Dudchyk, doctor of science (biology); head of the laboratory of microbiology.
rspch@rspch.by

duration and the dose of the drug. The character of the changes suggests that they are an adaptive response of the body to the long-term influence of a complex of xenobiotics with a multiple effects. In general, assessment of the animals' hematologic status on the both experimental dates, the depth and temporality of the revealed changes indicate the absence of a pronounced toxic effect of the composition at its long-term use.

Key words: antinicotine composition; hematologic parameters.

Борьба с употреблением и, в частности, курением табака многие годы является предметом широкого обсуждения и при этом не теряет своей актуальности. Среди наиболее острых проблем, характерных в настоящее время и для Беларуси, следует отметить увеличение доли курящих среди подростков и молодежи, снижение возраста начала курения, расширение ассортимента табачных изделий, а также способов их употребления [1; 2].

По данным выборочного обследования домашних хозяйств по уровню жизни, в Беларуси на начало 2015 г. доля курящего населения в возрасте 16 лет и старше достигла 24,4 %, при этом среди мужчин она составила 45,8 %, среди женщин – 9,3 % [3]. Среди подростков в возрасте 13–15 лет, по данным обследования Global Youth Tobacco Survey (GYTS) 2015 г., курильщиками табака являлись 9,4 % опрошенных, причем среди девушек их больше, чем среди юношей (9,9 и 8,9 % соответственно) [4]. Однако, если учесть респондентов, куривших ранее, но на момент опроса не ассоциирующих себя с таковыми, либо имевших опыт курения, эта цифра заметно возрастет.

Кроме того, в молодежной среде все большую популярность приобретают такие продукты, как спайс и иные курительные смеси, а также некурительные табачные изделия (насвай, снюс и др.), употребление которых, особенно в молодом возрасте, может привести к еще более выраженным негативным последствиям для здоровья, чем использование традиционных табачных изделий [4; 5].

Подобная ситуация требует создания адекватных медико-социальных программ и своевременного проведения мероприятий, призванных снизить потребление табака. Согласно стратегии Всемирной организации здравоохранения [1] подобные программы предполагают разработку комплекса мер, направленных, с одной стороны, на предупреждение начала табакопотребления, а с другой – на его прекращение.

В то же время существующий арсенал методов и средств лечения зависимости от никотина ориентирован преимущественно на взрослый контингент курильщиков, имеющих многолетний стаж курения и физическую никотиновую зависимость, и зачастую является неприемлемым для подростков и молодежи. Поэтому по-прежнему весьма актуальной остается проблема, связанная с разработкой новых лечебно-профилактических средств, способствующих снижению и/или прекращению табакопотребления и предназначенных для лиц молодого возраста, у которых еще не были обнаружены значительные сдвиги метаболизма под действием никотина и прочих компонентов табачных изделий.

Материалы и методы исследований

В рамках выполнения задания Государственной комплексной научно-технической программы (ГКНТП) «Современные технологии в медицине» разработана рецептура жевательной композиции, предназначенной для минимизации последствий потребления табака. Она включает в себя глицин, 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат, витамины В1, В2, В9, С и Е, а также комплекс фитокомпонентов адаптогенного действия [6].

На одном из этапов исследования безопасности лабораторных образцов антиникотиновой композиции для лиц молодого возраста было оценено влияние длительного приема средства на гематологический статус подопытных животных.

В целях исследования использовались половозрелые белые крысы, на протяжении опыта находившиеся в условиях стационарного вивария научно-исследовательской лаборатории Белорусской медицинской академии последипломного образования в соответствии с требованиями, рекомендациями и правилами биоэтики. Для формирования подопытных групп (по 7–8 особей) были отобраны животные без видимых признаков заболевания, охотно поедавшие корм, с гладким и блестящим шерстным покровом.

В течение 30 или 60 суток животным ежедневно вместе с пищей скармливали разработанную композицию в предполагаемой терапевтической дозировке 160 мг/кг (группы 1 и 4), а также в дозировках, превышающих ее в два и три раза, – 320 мг/кг (группы 2 и 5) и 480 мг/кг (группы 3 и 6) соответственно. Контрольная группа, состоявшая из интактных животных, на протяжении эксперимента находилась в аналогичных условиях содержания и на идентичном пищевом рационе.

По окончании эксперимента животных выводили из опыта путем одномоментной декапитации на фоне тиопенталового наркоза с последующим взятием биоматериала (цельная кровь) для дальнейшего гематологического анализа.

Количество эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и их гистограммы определяли кондуктометрическим методом на автоматическом анализаторе крови Medonic CA 620 (*Boule Medical AB*, Швеция). Гематологический статус оценивали с помощью следующих показателей:

- гематокрит (HCT, %);
- количество эритроцитов (RBC, $n \cdot 1012$/л);
- ширина распределения эритроцитов (RDW, % и RDWa, фл);
- среднеклеточный объем эритроцита (MCV, фл);
- количество лейкоцитов (WBC, $n \cdot 109$/л);
- количество тромбоцитов (PLT, $n \cdot 109$/л);
- тромбоцитокрит (PCT, %);
- средний объем тромбоцита (MPV, фл);
- ширина распределения тромбоцитов (PDW, %);
- концентрация гемоглобина (HGB, г/л);
- среднеклеточный гемоглобин (MCH, пг);
- среднеклеточная концентрация гемоглобина (MCHC, г/л);
- скорость оседания эритроцитов (СОЭ, мм/ч).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программного пакета Statistica 8.0. Для сопоставления данных (с учетом размера и характера выборок) был использован тест Краскела – Уоллиса с последующим множественным сравнением ранговых средних (*multiple comparisons of mean ranks for all groups*). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$.

Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха – Me (LQ – UQ).

Результаты исследования и их обсуждение

Визуальный и морфометрический мониторинг состояния подопытных крыс показал, что многократное пероральное поступление исследуемой композиции не приводило к заметным изменениям во внешнем виде и поведении животных.

Результаты исследования образцов крови подопытных животных представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Основные показатели крови подопытных крыс после 30-суточного эксперимента (Me (LQ – UQ))

Table 1

The main blood indices of experimental rats' after a 30-day experiment (Me (LQ – UQ))

Показатели	Контрольная группа	Группа 1	Группа 2	Группа 3
		Дозировка средства, мг/кг		
		160	320	480
RBC	8,1 (7,7; 8,3)	8,3 (7,8; 8,6)	7,0 (6,8; 7,5)	8,2 (7,9; 8,3)
MCV	46,4 (45,5; 47,5)	47,5 (45,8; 48,6)	49,3 (48,6; 50,3)*	45,5 (44,5; 47,0)
RDW%	15,2 (14,4; 15,7)	14,9 (13,6; 15,6)	14,6 (14,0; 17,4)	15,4 (15,0; 15,9)
RDWa	41,9 (40,9; 43,5)	42,4 (41,3; 43,1)	44,7 (43,9; 46,1)	41,2 (39,5; 42,5)
HCT	37,5 (35,6; 38,1)	39,4 (37,7; 41,3)	34,7 (33,0; 36,6)	37,0 (36,2; 37,8)
PLT	530,5 (402,5; 650,5)	511,0 (237,0; 583,0)	475,0 (306,0; 619,0)	443,5 (424,0; 514,5)
MPV	6,5 (6,4; 6,65)	6,6 (6,5; 6,7)	6,9 (6,5; 7,0)	6,8 (6,4; 6,9)
PDW%	8,5 (8,4; 8,7)	8,8 (8,5; 9,2)	9,0 (8,4; 9,2)	8,9 (8,4; 9,1)
PCT	0,34 (0,26; 0,41)	0,34 (0,15; 0,37)	0,30 (0,21; 0,40)	0,30 (0,27; 0,35)
WBC	4,4 (3,4; 5,35)	5,1 (5,0; 5,8)	5,6 (4,9; 7,1)	5,8 (4,9; 6,8)
HGB	140,5 (133,0; 143,0)	141,0 (136,0; 146,0)	129,0 (121,0; 133,0)	137,0 (134,5; 139,5)
MCH	17,3 (17,0; 17,6)	17,0 (16,5; 17,6)	18,0 (17,9; 18,7)	16,9 (16,5; 17,3)
MCHC	374,0 (371,5; 376,0)	362,0 (358,0; 366,0)**	365,0 (358,0; 371,0)	369,0 (368,0; 372,5)
СОЭ	2,0 (1,0; 3,0)	2,0 (1,0; 3,0)	1,0 (1,0; 2,0)	2,5 (2,0; 3,0)

*Изменения статистически значимы по сравнению с интактным контролем при $p \leq 0{,}05$; ** при $p \leq 0{,}01$.

Как видно из табл. 1, по итогам 30-суточной затравки у подопытных животных были выявлены немногочисленные отклонения отдельных гематологических показателей по сравнению с интактным контролем.

В группе, получавшей средство в дозировке 160 мг/кг в течение месяца, среднеклеточная концентрация гемоглобина снизилась.

Анализ композиции в дозировке 320 мг/кг выявил статистически значимое увеличение среднеклеточного объема эритроцита. При этом можно отметить тенденцию к изменению и других показателей, характеризующих эритроцитарный компонент крови. В частности, несколько уменьшилось количество эритроцитов и значение связанного с ним показателя гематокрита.

В то же время при расчете параметров описательной статистики для этой группы животных обнаружены достаточно высокие по сравнению с другими группами значения стандартного отклонения по описанным и ряду других показателей, что свидетельствует о некотором разбросе данных внутри выборки. При ближайшем рассмотрении была выявлена особь с несколько отличающимся гематологическим статусом (разница по некоторым показателям относительно медианы по группе достигала 100 % и более). При расчете статистических параметров группы 2 (без учета данных по «выпадающей» особи) по приведенным показателям были получены следующие данные, статистически значимо не отличавшиеся от контроля: RBC – 7,1 (6,9; 7,8); MCV – 49,1 (48,6; 50,3); HCT – 35,3 (34,0; 36,6). Пересчет по оставшимся показателям гемограммы также не выявил каких-либо статистически значимых отклонений.

Анализ полученных данных позволил сделать вывод о том, что длительное воздействие исследуемой композиции в дозировке 320 мг/кг не приводило к заметным изменениям гематологического статуса подопытных животных. Однако, принимая во внимание «выпадающие» результаты, необходимо учитывать возможность развития индивидуальной реакции на разработанное средство (например, аллергической или обусловленной характером метаболизма конкретного организма), особенно в связи с многокомпонентностью его состава.

Результаты двухмесячной затравки (табл. 2) также свидетельствуют об отсутствии серьезных изменений в гемограммах подопытных животных. Гематологические показатели, по которым были отмечены статистически значимые изменения после месячной затравки, по истечении двух месяцев эксперимента были сопоставимы с контрольными значениями.

Таблица 2

Основные показатели крови подопытных крыс после 60-суточного эксперимента (Me (LQ – UQ))

Table 2

The main blood indices of experimental rats' after a 60-day experiment (Me (LQ – UQ))

Показатели	Контрольная группа	Группа 4	Группа 5	Группа 6
		Дозировка средства, мг/кг		
		160	320	480
RBC	8,1 (7,7; 8,3)	8,3 (8,1; 8,4)	7,5 (6,9; 7,6)	7,8 (7,6; 7,9)
MCV	46,4 (45,5; 47,5)	46,4 (43,9; 48,3)	48,6 (48,0; 49,5)	45,9 (45,2; 46,7)
RDW%	15,2 (14,4; 15,7)	15,6 (15,2; 16,1)	13,1 (12,9; 13,5)*	15,3 (14,6; 15,6)
RDWa	41,9 (40,9; 43,5)	41,8 (39,7; 43,2)	42,5 (41,9; 44,0)	41,2 (40,9; 41,5)
HCT	37,5 (35,6; 38,1)	37,3 (36,2; 38,9)	35,7 (34,1; 36,6)	35,7 (34,9; 36,3)
PLT	530,5 (402,5; 650,5)	578,5 (208,0; 657,0)	591,5 (508,5; 660,5)	544,0 (451,0; 656,0)
MPV	6,5 (6,4; 6,65)	6,9 (6,8; 7,0)	6,5 (6,5; 6,7)	6,7 (6,5; 6,9)
PDW%	8,5 (8,4; 8,7)	9,1 (8,9; 9,5)*	8,5 (8,4; 8,6)	8,5 (8,5; 8,9)
PCT	0,34 (0,26; 0,41)	0,39 (0,14; 0,45)	0,39 (0,33; 0,44)	0,40 (0,33; 0,42)
WBC	4,4 (3,4; 5,35)	7,5 (5,3; 9,5)	5,0 (4,4; 6,5)	5,7 (5,4; 7,1)
HGB	140,5 (133,0; 143,0)	138,0 (130,0; 144,0)	133,0 (128,0; 136,5)	133,0 (130,0; 137,0)
MCH	17,3 (17,0; 17,6)	17,1 (16,1; 17,6)	18,1 (17,8; 18,6)	17,3 (16,9; 17,5)
MCHC	374,0 (371,5; 376,0)	365,0 (361,0; 370,0)	373,0 (372,0; 374,5)	375,0 (372,0; 377,0)
СОЭ	2,0 (1,0; 3,0)	4,0 (3,0; 6,0)	1,0 (1,0; 2,0)	2,0 (2,0; 3,0)

*Изменения статистически значимы по сравнению с интактным контролем при $p \leq 0{,}05$.

Среди всех исследованных групп статистически значимые отличия были отмечены только у животных группы 4 (160 мг/кг) и выражались в увеличении ширины распределения тромбоцитов (PDW), что свидетельствует о гетерогенности популяции тромбоцитов. В то же время остальные показатели, характеризующие данную популяцию клеток, статистически значимо не отличались от контрольных.

У животных группы 5 статистически значимо снизился коэффициент анизотропии (RDW%). Значимых отличий у животных, получавших препарат в дозировке 480 мг/кг, как и в случае 30-суточной затравки, выявлено не было.

Таким образом, длительное (на протяжении двух месяцев) воздействие композиции во всех исследованных дозировках не приводило к заметному изменению гематологического статуса подопытных животных.

Заключение

Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод о том, что изменения, выявленные в ходе обоих этапов эксперимента, не являются показателем выраженного токсического влияния исследуемой композиции. Вероятнее всего, они обусловлены адаптивной реакцией организма на длительное воздействие комплекса ксенобиотиков (фармпрепараты, активные вещества фитокомпонентов, входящих в состав композиции) с разнонаправленным действием. В пользу этого предположения свидетельствуют транзиторность описанных явлений и их самостоятельная нормализация ко второму контрольному сроку эксперимента. Более стабильные гематологические показатели, характерные для групп животных, получавших высокие дозы композиции, также подтверждают данное предположение, поскольку с учетом интенсивной ксенобиотической нагрузки адаптация к длительному воздействию композиции, а следовательно, и основные реактивные изменения могли произойти раньше, т. е. до истечения 30 суток.

Библиографические ссылки

1. Рамочная конвенция ВОЗ по борьбе против табака [Электронный ресурс]. URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9789244591017_rus.pdf?ua=1 (дата обращения: 11.02.2016).

2. *Паксютова В. В*. Успешная мотивация отказа от курения и поддерживающие ее факторы // Контроль над табаком и общественное здоровье в Восточной Европе. 2011. Т. 1, № 1. С. 45–46.

3. В Беларуси курит 24,4 % населения // БЕЛТА [Электронный ресурс]. URL: http://www.belta.by/society/view/v-belarusi-kurit-244-naselenija-3700-2015 (дата обращения: 11.02.2016).

4. *Пронина Т. Н., Сычик С. И., Грекова Н. А. и др.* К вопросу о табакокурении современных подростков в Республике Беларусь // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / гл. ред. С. И. Сычик. Минск, 2016. Вып. 26. С. 97–102.

5. *Андрианова Е. В., Тарасова А. Н.* Наркотизм как индикатор аномии современного общества // Вестн. ЧелГУ. 2012. № 35, вып. 28. С. 56–65.

6. Жевательная композиция с антиникотиновым эффектом : пат. 10681 С1 Респ. Беларусь, МПК (2006) А 61 К 9/68 А 61 Р 25/00 / Е. А. Римжа, А. В. Бокач, И. В. Тарасюк ; заявитель ГУО «БелМАПО». № а 20061110 ; заявл. 09.11.06 // Афіц. бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. 2008. № 3. С. 59.

References

1. [WHO’s Framework Convention on Tobacco Control]. URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9789244591017_rus.pdf?ua=1 (date of access: 11.02.2016) (in Russ.).

2. Paksyutova V. V. Successful motivation of giving up smoking and factors supporting it. *Tobacco control and public health in Eastern Europe.* 2011. Vol. 1, No. 1. P. 45–46 (in Russ.).

3. [In Belarus, 24.4 % of the population smokes]. *BELTA*. URL: http://www.belta.by/society/view/v-belarusi-kurit-244-naselenija-3700-2015 (date of access: 11.02.2016) (in Russ.).

4. Pronina T. N., Sychyk S. I., Grekova N. A., et al. The issue of tobacco use among adolescents in the Republic of Belarus. *Zdorov’e i okruzhayushchaya sreda* : sb. nauchn. tr. Minsk, 2016. Issue 26. P. 97–102 (in Russ.).

5. Andrianova E. V., Tarasova A. N. [Narcotism as an indicator of anomie modern society]. *Vestnik Chelyabinskogo gos. univ*. 2012. No. 35, issue 28. P. 56–65 (in Russ.).

6. Rimzha E. A., Bokach A. V., Tarasyuk I. V. Gum composition with anti-nicotine effect. Patent 10681 C1 Resp. Belarus, A 61 K 9/68 A 61 P 25/00/. *Aficyjny bjul. Nac. centr intelectual. ulasnasci.* 2008. No. 3. P. 59 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 30.03.2016.
Received by editorial board 30.03.2016.

УДК 581.1:537.53

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ГРЕЧИХЕ ПОСЕВНОЙ

***Ж. Э. МАЗЕЦ*[1)], *О. А. СУША*[1)], *Н. А. ЕЛОВСКАЯ*[2)], *Ж. Н. КАЛАЦКАЯ*[3)], *Т. А. БОНИНА*[1)]**

[1)]*Белорусский государственный педагогический университет им. Максима Танка, ул. Советская, 18, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Средняя школа № 141, ул. Герасименко, 21, 220047, г. Минск, Беларусь*
[3)]*Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь*

Установлена сортоспецифичная реакция ди- и тетраплоидных сортов гречихи посевной (*Fagopyrum sagittatum gilib*) на следующие режимы низкоинтенсивного электромагнитного излучения сверхвысокочастотного диапазона: 1 и 1.1 (частота – от 54 до 74 ГГц, время воздействия – 20 и 12 мин соответственно); 2, 2.1 и 2.2 (частота – от 62 до 64 ГГц, время воздействия – 20, 12 и 8 мин соответственно). Выявлено, что у диплоидного сорта Купава режимы с максимальным (20 мин) и минимальным (8 мин) временем воздействия повышали выход электролитов через покровы семян относительно контроля. Отмечено, что применение режимов 1, 2 и 2.2 сопровождалось увеличением активности пероксидазы, снижением энергии прорастания и всхожести, а также замедлением ростовых процессов. Электропроводность экссудатов из семян тетраплоидного сорта Александрина после 24 ч инкубации линейно снижалась относительно контроля в указанных вариантах обработки от режима 1 до режима 2.2. Обработка семян режимами электромагнитного излучения в течение 12 или 8 мин приводила к снижению активности пероксидазы, сопровождалась активизацией прорастания и стимуляцией ростовых процессов. Полученные результаты раскрывают отдельные стороны механизма взаимодействия электромагнитного излучения с растительными объектами, что позволит более обоснованно использовать определенные режимы при выращивании гречихи посевной.

Ключевые слова: низкоинтенсивное электромагнитное излучение; гречиха посевная; электропроводность; пероксидаза; энергия прорастания; всхожесть; ростовые процессы.

Благодарность. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории радиофизических исследований НИУ «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного университета В. Н. Родионовой и Н. В. Пушкиной за обработку семян.

Образец цитирования:
Мазец Ж. Э., Суша О. А., Еловская Н. А., Калацкая Ж. Н., Бонина Т. А. Исследование физиологических эффектов низкоинтенсивного электромагнитного излучения на гречихе посевной // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 36–42.

For citation:
Mazets Z. E., Susha O. A., Yalouskaya N. A., Kalatskaja J. N., Bonina T. A. Investigation of physiological effects of low intensity electromagnetic radiation on buckwheat. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 36–42 (in Russ.).

Авторы:
Жанна Эмануиловна Мазец – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры общей биологии и ботаники факультета естествознания.
Ольга Александровна Суша – аспирантка кафедры общей биологии и ботаники факультета естествознания. Научный руководитель – Ж. Э. Мазец.
Нинель Анатольевна Еловская – магистр биологических наук; учитель биологии и химии.
Жанна Николаевна Калацкая – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории роста и развития растений.
Татьяна Александровна Бонина – кандидат химических наук, доцент; доцент кафедры общей биологии и ботаники факультета естествознания.

Authors:
Zhanna Mazets, PhD (biology), docent; associate professor at the department of general biology and botany, faculty of natural sciences.
zhannamazets@mail.ru
Olga Susha, postgraduate student at the department of general biology and botany, faculty of natural sciences.
olgasusha2013@mail.ru
Ninel Yalouskaya, master of science (biology); teacher of biology and chemistry.
tytsi_92@mail.ru
Joanna Kalatskaja, PhD (biology); leading reseacher at the laboratory of growth and development of plants.
kalatskayaj@mail.ru
Tatsiana Bonina, PhD (chemistry), docent; associate professor at the department of general biology and botany, faculty of natural sciences.
tatbonina@gmail.com

INVESTIGATION OF PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF LOW INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION ON BUCKWHEAT

***Z. E. MAZETS*[a], *O. A. SUSHA*[a], *N. A. YALOUSKAYA*[b], *J. N. KALATSKAJA*[c], *T. A. BONINA*[a]**

[a]*Belarusian State Pedagogical University named after Maxim Tank, Savieckaja Street, 18, 220030, Minsk, Belarus*
[b]*Secondary school No. 141, Hierasimienki Street, 21, 220047, Minsk, Belarus*
[c]*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Akademičnaja Street, 27, 220072, Minsk, Belarus*

Corresponding author: Z. E. Mazets (zhannamazets@mail.ru)

A variety-specific reaction of di- and tetraploid varieties of buckwheat (*Fagopyrum sagittatum gilib*) on the modes of low-intensity electromagnetic radiation of the microwave range: modes 1 and 1.1 frequency 54–74 GHz, time 20 and 12 min respectively; modes 2, 2.1 and 2.2 – frequency 62–64 GHz and time 20, 12 and 8 min respectively was noted. It was revealed that modes with maximum (20 min) and minimum (8 min) exposure time increased the yield of electrolytes through seed's covers relative to control in the diploid variety Kupava. The use of modes 1, 2 and 2.2 was accompanied by an increase in peroxidase activity, a decrease in germination energy, germination and a slowing down of growth processes. The electrical conductivity of the seed's exudates of the tetraploid variety Alexandrina after 24 h of incubation decreased linearly with respect to the control in the indicated treatment variants from mode 1 to mode 2.2. Seed treatment with electromagnetic radiation modes for 12 or 8 min led to a decrease in peroxidase activity, accompanied by activation of germination and stimulation of growth processes. The received results reveal some aspects of the mechanism of electromagnetic radiation interaction with plant objects. It allows more justified use of certain modes in the cultivation of buckwheat.

Key words: low-intensity electromagnetic radiation; buckwheat; conductivity; peroxidase; germination energy; germination; growth processes.

Acknowledgements. The authors are grateful to employees of the radiophysical research laboratory of the Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University V. N. Rodionova and N. V. Pushkina for seed treatment.

Увеличение производства и урожайности сельскохозяйственной продукции в условиях Республики Беларусь является приоритетным направлением экономического развития нашей страны. Повысить продуктивность может применение эффективных технологий подготовки семян к посеву (химические, термохимические, термические методы и технические средства), а также энергоэкономных приемов при обработке семян и растений. Много позитивных отзывов получила предпосевная электромагнитная обработка [1–4].

Все виды электромагнитных излучений (ЭМИ) при воздействии на семена растений имеют зоны стимуляции и угнетения в зависимости от дозы облучения. Наиболее глубоко изучено влияние электромагнитного поля (ЭМП) сверхвысокой частоты (СВЧ) [4]. Однако механизм процессов взаимодействия ЭМИ СВЧ-диапазона с растительными объектами до конца неясен. Несмотря на существование различных точек зрения, многие ученые едины в главном: ЭМП возмущения воздействуют прежде всего на физико-химические процессы, а через них – на направленность биохимических реакций [5]. В связи с этим актуальным представляется исследование физиологических эффектов, которые низкоинтенсивное ЭМИ вызывает у растений на ранних этапах онтогенеза. Цель настоящей работы – изучить физиологические реакции растений ди- и тетраплоидных сортов гречихи посевной (*Fagopyrum sagittatum gilib*) на различные режимы низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ-диапазона на ранних этапах онтогенеза.

Объектами исследования являлись ди- и тетраплоидный сорта гречихи посевной – Купава и Александрина соответственно – из коллекции Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по земледелию. Гречиха – ценная крупяная культура, широко используемая в пищевой и медицинской промышленности, сельском хозяйстве (в качестве корма для скота и зеленого удобрения) [6]. Однако Беларусь не обеспечивает свои потребности в гречневых крупах [7]. Так, из-за низкой урожайности, обусловленной биологическими особенностями этой культуры, которые связаны с разновременным созреванием семян в различных ярусах и неспособностью переносить климатические колебания, посевы гречихи в Республике Беларусь в 2016 г. сократились по сравнению с 2015 г. почти вдвое – с 30,14 до 15,6 тыс. га [7; 8].

В качестве стимулирующего фактора воздействия на растения было выбрано ЭМИ. Семена гречихи посевной (*Fagopyrum sagittatum gilib*) были обработаны следующими режимами ЭМИ:

- 1 и 1.1 (частота – от 54 до 74 ГГц, время воздействия – 20 и 12 мин соответственно);
- 2, 2.1 и 2.2 (частота – от 62 до 64 ГГц, время воздействия – 20, 12 и 8 мин соответственно).

Семена обрабатывались в Институте ядерных проблем Белорусского государственного университета. В качестве контроля служили необработанные семена. Выбор режимов обусловлен выполненными ранее теоретическими и экспериментальными исследованиями взаимодействия низкоинтенсивного ЭМИ с биологической мембраной, которые подтвердили правильность взятой в качестве объекта для электродинамического анализа модели структуры биологической мембраны [9].

Энергия прорастания и всхожесть в лабораторном эксперименте оценивались на 3-й и 7-й день соответственно. Оба показателя отражены в процентах проросших семян к их общему количеству в пробе. Проросшими считали семена, у которых длина корешков или одного главного корешка составляла не менее длины семени, а длина ростка достигала не менее половины длины семени [10]. Повторность опыта являлась трехкратной.

Исследования по определению целостности семенных оболочек и функциональной активности клеточных мембран проводились на базе Института экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси с использованием кондуктометрического метода. Электропроводность на грамм семени для каждого образца рассчитывали следующим образом: (электропроводность (мкS) для каждого сосуда) / (вес (г) образца в сосуде) = мкS × см$^{-1}$/г [10–13]. Электропроводность семян гречихи определяли по выходу электролитов в раствор в течение 20–24 ч гидратации семян при температуре 20 ºС с помощью кондуктометра Hanna HI 9932. Лабораторные опыты проведены в трех биологических и пяти аналитических повторностях.

Активность растворимой пероксидазы в образцах определяли по Бояркину, используя в качестве хромогенного субстрата бензидин. Значение оптической плотности фиксировали через 2 мин при длине волны 590 нм на спектрофотометре Specord-50 (Германия). Активность пероксидаз в экстракте (А) рассчитывали по формуле

$$\text{А} = \frac{E \cdot a \cdot \sigma \cdot b}{c \cdot t},$$

где E – оптическая плотность (ед.); a – отношение количества буферной смеси, взятой для экстрагирования фермента (мл), к навеске растительной ткани (г); σ – степень дополнительного разведения; b – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси; c – толщина слоя в кювете (см); t – время (мин), и выражали в единицах активности в минуту [14].

Данные обрабатывались общепринятыми статистическими методами анализа [15; 16] при помощи пакета Microsoft Office Excel.

Пусковым фактором прорастания семени является процесс набухания, связанный с поступлением воды через полупроницаемые пограничные барьеры (семенные покровы, клеточные стенки и мембраны). Однако скорость поступления воды и интенсивность выхода веществ через семенные покровы определяются свойствами этих барьеров, физиологическим качеством семян [13] и влиянием на них эндо- и экзогенных факторов. В связи с этим на семенах ди- и тетраплоидной форм гречихи изучены целостность их семенных оболочек и функциональная активность клеточных мембран при набухании под действием ЭМП СВЧ-диапазона в нескольких режимах, различающихся частотой и временем воздействия. Кондуктометрический метод позволяет оценить целостность клеточных мембран по выходу клеточных метаболитов, в том числе электролитов (таких как сахарофосфаты, аминокислоты, K^+ и др.), в раствор [13]. По мере того как семена гидратируются, способность их клеточных мембран к восстановлению повреждений, полученных в период созревания и хранения, будет влиять на степень выхода электролитов. Следовательно, чем выше скорость, с которой семена могут восстанавливать целостность мембран, тем ниже выход электролитов и тем лучше качество семян [10; 13].

В ходе эксперимента установлено, что у гречихи сорта Купава электропроводность экссудатов из семян увеличилась при обработке режимами 1 и 2, т. е. в двух частотных диапазонах и при максимальном времени воздействия (20 мин), и сохранялась повышенной в данных вариантах на протяжении всего опыта (рис. 1, *а*). Через 20 ч гидратации семян проницаемость семенных оболочек была выше контроля на 30 % после обработки семян режимом 1 и на 18 % – после применения режима 2. Отмечено, что через 3 ч после применения гидратации в режимах 2.1 и 2.2 проницаемость увеличивалась на 19 и 23 % соответственно, тогда как к концу эксперимента электропроводность снизилась относительно контроля на 21,4 и 6,8 % соответственно. В случае режима 1.1 отмечено незначительное повышение проницаемости семенных оболочек относительно контрольных значений.

У тетраплоидной гречихи сорта Александрина через 3 ч после инкубации семян в воде (см. рис. 1, *б*) выявлена четкая зависимость «доза – эффект» электропроводности экссудатов от времени и частоты воздействия. С увеличением времени до 20 мин мембраны все больше дестабилизируются и выход электролитов становится выше, чем в контрольном варианте: в случае режима 1 – на 20 %; в случае режима 2 – на 11,5 % (см. рис. 1, *б*). К концу опыта отмечены снижение проницаемости покровов и стабилизация мембранного комплекса.

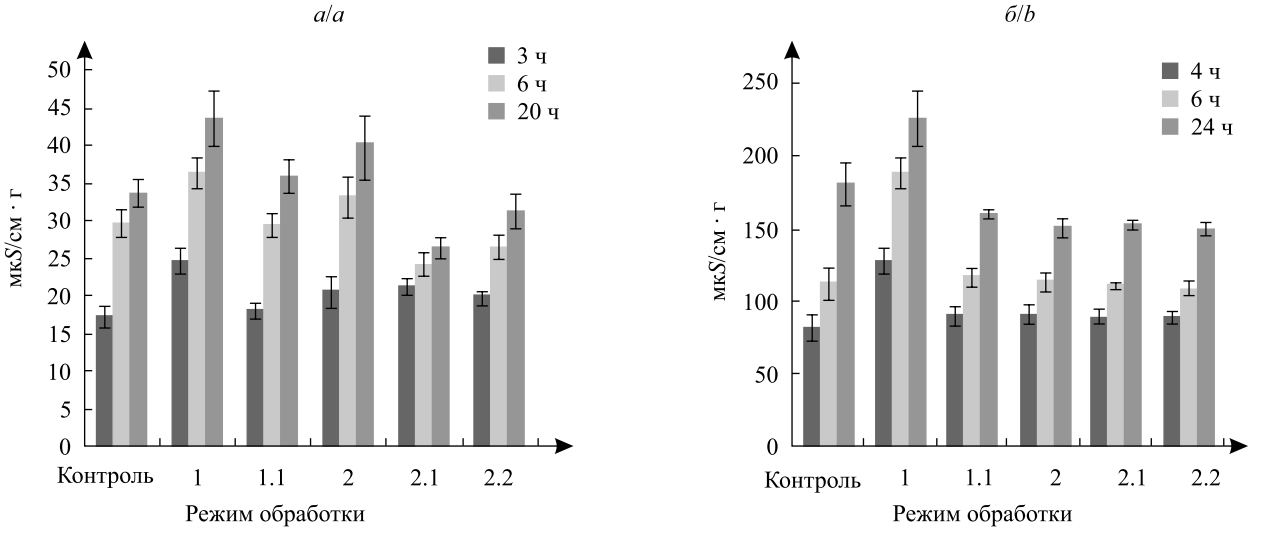


Рис. 1. Влияние обработки режимами ЭМИ на электропроводность экссудатов из семян тетраплоидной гречихи сортов Купава (*а*) и Александрина (*б*) после гидратации

Fig. 1. The effect of treatment by EMR regimes on the conductivity of exudates of tetraploid buckwheat seeds varieties Kupava (*a*) and Alexandrina (*b*) after hydration

Исследованы ростовые процессы двух сортов гречихи, семена которых были обработаны различными режимами ЭМИ. Выявлено, что режимы 1 и 2 снижали энергию прорастания у сорта Купава на 15 и 10 % соответственно, а также уменьшали всхожесть на 10 и 5 % соответственно относительно контроля (рис. 2, *а*). Максимальное снижение посевных качеств отмечено в случае режима 2.2 с минимальным временем воздействия в узком частотном диапазоне. После применения режима 2.1 обсуждаемые параметры возросли на 10 %. Анализ посевных свойств семян сорта Александрина после воздействия ЭМИ показал, что, за исключением режимов 1.1 и 2.2, повышающих обсуждаемые показатели на 5 и 10,2 % соответственно, другие варианты не оказывали достоверно значимого влияния на энергию прорастания и всхожесть (см. рис. 2, *б*).

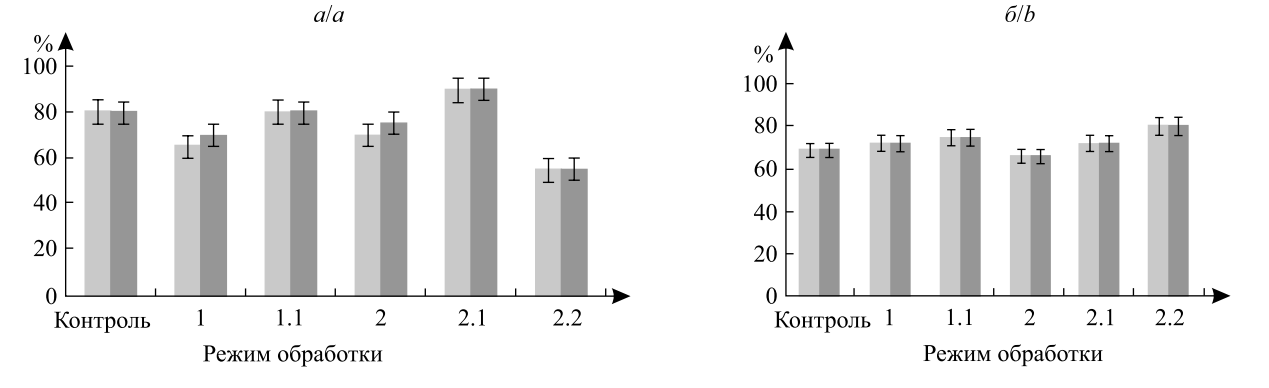


Рис. 2. Влияние ЭМИ на посевные качества семян гречихи посевной сортов Купава (*а*) и Александрина (*б*): – энергия прорастания; – всхожесть

Fig. 2. Influence of EMR on the sowing quality of the buckwheat seeds varieties Kupava (*a*) and Alexandrina (*b*): – germination energy; – germination

Анализ влияния режимов ЭМИ на ростовые процессы ювенильных 7-дневных растений гречихи посевной сорта Купава выявил снижение ростовых процессов как корней, так и проростков во всех случаях (см. таблицу), при этом наиболее ингибирующий эффект оказал режим 2.2. Так, зафиксировано снижение длины проростков – от 4,3 % (режим 2.1) до 11 % (режим 2.2) – относительно контроля, но более существенной была убыль их массы – от 16,2 % (режим 2) до 34 % (режим 2.2). Отмечено незначительное отрицательное отклонение от контрольных значений длины корневой системы – от 5,6 % (режим 2) до 5,8 % (режим 1) – на фоне сильного торможения прироста их массы: от 23,2 % (режим 2.1) до 43,4 % (режим 2.2).

Влияние режимов ЭМИ на морфометрические параметры ювенильных растений гречихи посевной

Influence of EMR regimes on the morphometric parameters of the juvenile buckwheat plants

№ п/п	Режим обработки	Длина, см		Масса, г	
		Корни	Проростки	Корни	Проростки
Сорт Купава (7-дневные растения)					
1	Контроль	6,0 ± 0,3	7,3 ± 0,4	0,033 ± 0,002	0,062 ± 0,003
2	1	4,5 ± 0,2*	6,6 ± 0,3	0,022 ± 0,003*	0,046 ± 0,003*
3	1.1	5,5 ± 0,3	6,9 ± 0,3	0,023 ± 0,002*	0,061 ± 0,003
4	2	5,1 ± 0,3*	6,7 ± 0,3	0,025 ± 0,002*	0,051 ± 0,004*
5	2.1	5,7 ± 0,3	6,9 ± 0,4	0,026 ± 0,003*	0,051 ± 0,003*
6	2.2	5,0 ± 0,3*	6,5 ± 0,3	0,019 ± 0,002*	0,041 ± 0,002*
Сорт Александрина (6-дневные растения)					
1	Контроль	9,10 ± 3,31	9,20 ± 2,15	0,020 ± 0,011	0,140 ± 0,055
2	1	9,70 ± 2,48	10,10 ± 1,25	0,040 ± 0,012	0,230 ± 0,033
3	1.1	8,80 ± 2,59	9,90 ± 1,76	0,030 ± 0,014	0,210 ± 0,050
4	2	9,70 ± 2,86	10,10 ± 1,85	0,040 ± 0,015	0,210 ± 0,045
5	2.1	11,00 ± 3,31	9,40 ± 1,58	0,030 ± 0,012	0,190 ± 0,032
6	2.2	8,40 ± 3,23	9,50 ± 1,82	0,030 ± 0,014	0,210 ± 0,051

*Достоверно при $p \leq 0,05$.

В ходе исследования установлена несколько иная реакция ростовых процессов гречихи сорта Александрина в ответ на разные режимы ЭМИ. Выявлено, что все режимы стимулировали рост побегов (см. таблицу). Причем длина побегов увеличивалась незначительно и отличалась от контроля – от 7,6 % (режим 1.1) до 9,7 % (режим 1), тогда как прирост массы был более существенным – от 35,7 % (режим 2.1) до 64,3 % (режим 1). Реакция ростовых процессов корней зависела от режима. Так, применение режима 1.1 снижало данный показатель на 3,3 %, а режима 2.2 – на 8,7 %. Режимы 1 и 2 стимулировали рост корней на 6,6 %, а режим 2.1 – на 20,9 % относительно контроля. Отмечено увеличение массы корней после воздействия ЭМИ: в случае режимов 1.1 и 2.1 – на 50 %, в случае режимов 1, 2 и 2.2 – в два раза (см. таблицу).

Анализ влияния разных режимов ЭМИ на накопление сырой и сухой биомассы у растений гречихи сорта Александрина показал позитивные результаты во всех опытных вариантах (рис. 3). Наиболее существенно накопление сырой биомассы относительно контроля повышало применение режима 1 (68,8 %), наименее значительным оказалось применение режима 2.1 (37,5 %) (см. рис. 3, *а*). Прирост сухой биомассы отмечался на 60 % относительно контроля под влиянием режимов 1.1 и 2 и на 50 % после использования режимов 1, 2.1 и 2.2 (см. рис. 3, *б*). Таким образом, прирост сырой биомассы происходил или за счет повышения оводненности в результате осмотического стресса, или за счет сдвигов в активности и интенсивности метаболических процессов. Это нашло отражение и в функционировании компонентов антиоксидантной защиты – ферментов пероксидаз.

В ходе исследований активности пероксидазы в 4-дневных проростках гречихи диплоидной сорта Купава отмечено, что при частоте 54–78 ГГц и увеличении времени воздействия с 12 до 20 мин возрастает активность пероксидазы – с 1,9 до 24 % соответственно относительно контрольных значений. В противоположность этому при частоте 64–66 ГГц наблюдается иная тенденция: максимальная активность (на 17,5 % выше контроля) выявлена при минимальном времени воздействия (8 мин), а минимальный сдвиг (9,9 %) – при максимальной экспозиции (20 мин). После 12-минутного воздействия активность снизилась на 11,5 % относительно контроля (рис. 4).

У сорта Александрина под действием режимов 1.1, 2, 2.1 и 2.2 отмечено резкое снижение активности пероксидазы по сравнению с контрольными образцами – на 45,3; 11,4; 33,7 и 61,2 % соответственно (см. рис. 4). При этом с увеличением времени воздействия падение активности пероксидазы по отношению к контролю уменьшалось.

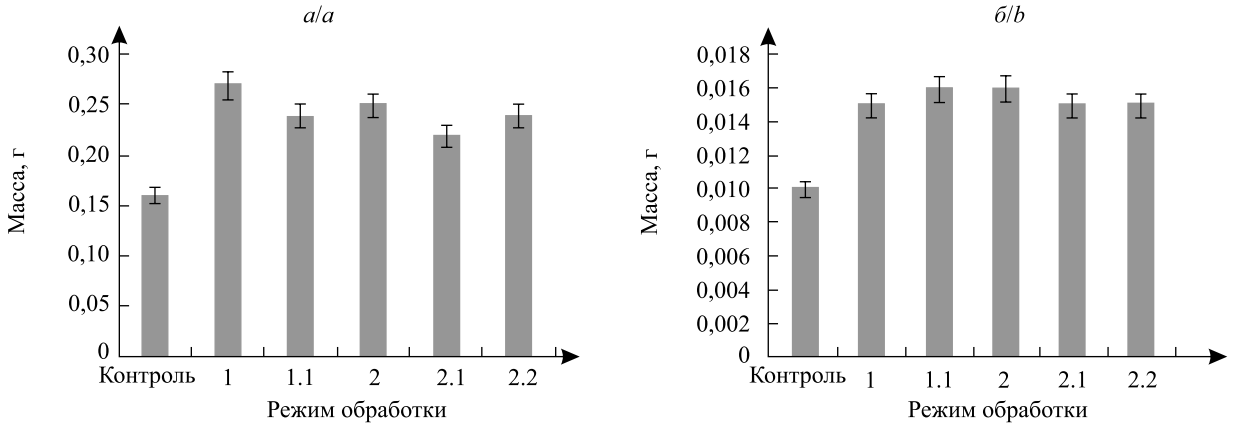


Рис. 3. Влияние ЭМИ на общую сырую (*а*) и сухую (*б*) массу 6-дневных растений тетраплоидной гречихи сорта Александрина

Fig. 3. Influence of EMR on the total crude (*a*) and dry (*b*) weight of the 6th-day tetraploid buckwheat plants of the variety Alexandrina

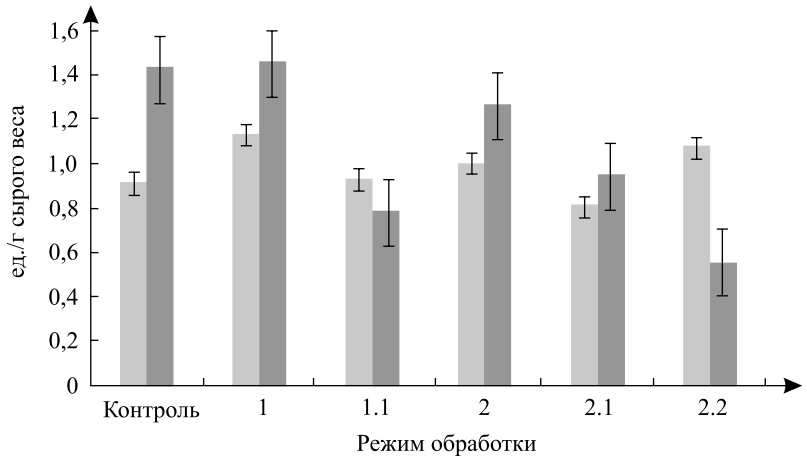


Рис. 4. Влияние режимов ЭМИ на активность пероксидазы в 5-дневных проростках гречихи посевной сортов Купава (■) и Александрина (■)

Fig. 4. Influence of EMR regimes on peroxidase activity of the 5th-day seedlings of the buckwheat varieties Kupava (■) and Alexandrina (■)

Таким образом, установлена сортоспецифичная реакция ди- и тетраплоидных сортов гречихи посевной на режимы ЭМИ. Отмечено, что в случае сорта Купава электропроводность экссудатов значительно увеличивается при максимальном времени воздействия ЭМИ на семена – 20 мин (режимы 1 и 2). Также обнаружено, что применение режимов 1, 2 и 2.2 приводит к повышению активности пероксидазы и торможению прорастания и ростовых процессов относительно контроля. Касательно сорта Александрина выявлена иная тенденция: зафиксирована первичная активация выхода электролитов из семян с постепенным замедлением к 24 ч инкубации и линейным снижением электропроводности в вариантах обработки от режима 1 до режима 2.2. Обработка семян в течение 12 или 8 мин приводит к снижению активности пероксидазы у данного сорта, сопровождается усилением прорастания и стимуляцией ростовых процессов. Полученные результаты раскрывают отдельные стороны механизма взаимодействия ЭМИ с растительными объектами и позволят обоснованнее использовать определенные режимы при выращивании гречихи посевной.

Библиографические ссылки

1. *Сазонова С. Н., Мазец Ж. Э., Спиридович Е. В. и др.* Влияние электромагнитного и плазменного воздействия на рост и развитие *Calendula officinales* L. // Весці БДПУ. Сер. 3, Фізіка. Матэматыка. Інфарматыка. Біялогія. Геаграфія. 2012. № 1. С. 3–10.

2. *Пушкина Н. В., Мазец Ж. Э., Спиридович Е. В. и др.* Особенности предпосевного электромагнитного воздействия на отдельные физиолого-биохимические процессы *Leonurus Cardiaca* (L.) // Весці БДПУ. Сер. 3, Фізіка. Матэматыка. Інфарматыка. Біялогія. Геаграфія. 2012. № 3. С. 7–12.

3. *Федорищенко М. Г., Жолобова М. В.* Предпосевная электромагнитная обработка семян как один из наиболее безопасных и перспективных приемов рационального природопользования // Проблемы геологии, планетологии, геоэкологии и рационального природопользования : сб. тез. и ст. Всеросс. конф. (Новочеркасск, 26–28 окт. 2011 г.). Новочеркасск, 2011. С. 135–136.

4. *Шиш С. Н., Шутова А. Г., Мазец Ж. Э. и др.* Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения и сверхмалых концентраций экзогенной аминолевулиновой кислоты на отдельные физиолого-биохимические процессы лекарственных растений // Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине : науч. тр. Междунар. конгр. [Электронный ресурс]. URL: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=111 (дата обращения: 15.12.2016). С. 111.

5. *Чёрная М. А., Косулина Н. Г.* Биофизический анализ воздействия информационного электромагнитного поля на биологические объекты [Электронный ресурс]. URL: http://khntusg.com.ua/files/sbornik/vestnik_142/32.pdf (дата обращения: 25.10.2016).

6. *Вавилов Г. П., Балышев Л. Н.* Полевые сельскохозяйственные культуры СССР. Москва, 1975.

7. Особенности развития и размещения сельского хозяйства Республики Беларусь [Электронный ресурс]. URL: http://lektsii.org/8-23030.html (дата обращения: 09.02.2017).

8. Беларусь вдвое сократит посевные под гречихой [Электронный ресурс]. URL: http://agro2b.ru/ru/analytics/31948-Belarus-vdvoe-sokratit-posevnye-pod-grechihoj.html (дата обращения: 09.02.2017).

9. Патент Респ. Беларусь № 5580. Способ предпосевной обработки семян овощных или зерновых культур / В. А. Карпович, В. Н. Родионова. Выд. 23.06.2003.

10. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести : ГОСТ 12038–84. Введ. 01.07.1986. М.: Изд-во стандартов, 1985.

11. *TeKrony D. M.* Seed Vigor Testing // J. Seed Technol. 1995. Vol. 8. P. 55–60.

12. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution № 32 to the Handbook of Seed Nesting // Association of Official Seed Analysts. New York, 2002.

13. *Пушкина Н. В., Курченко В. П., Калацкая Ж. Н.* Возможность использования электрофизических методов для оценки физиологического качества семян кукурузы // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2016. № 1. С. 26–30.

14. *Гавриленко В. Ф., Ладыгина М. Е., Хандобина Л. М.* Большой практикум по физиологии растений. М., 1975.

15. *Зайцев Г. Н.* Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М., 1984.

16. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск, 1973.

References

1. Sazonova S. N., Mazets Z. E., Spiridovich E. V., et al. [The influence of electromagnetic and plasma effects on growth and development of *Calendula officinales* L.]. *Vesci BDPU. Ser. 3, Fizika. Matematyka. Infarmatyka. Bijalogija. Geagrafija.* 2012. No. 1. P. 3–10 (in Russ.).

2. Pushkina N. V., Mazets Z. E., Spiridovich E. V., et al. Peculiarities of presowing electromagnetic influence on individual physiological and biochemical processes of *Leonurus Cardiaca* (L.). *Vesci BDPU. Ser. 3, Fizika. Matematyka. Infarmatyka. Bijalogija. Geagrafija.* 2012. No. 3. P. 7–12 (in Russ.).

3. Fedorischenko M. G., Zholobova M. V. Presowing electromagnetic seed treatment as one of the safest and the most advanced environmental management techniques. *Problems of geology, planetology, geoecology and rational nature management* : sb. tezisov i statei Vseross. konf. (Novocherkassk, 26–28 Oct., 2011). Novocherkassk, 2011. P. 135–136 (in Russ.).

4. Shysh S. N., Shutava H. G., Mazets Z. E., et al. Effects of low intensity electromagnetic radiation and ultrasmall concentrations of exogenous aminolevulinic acid on selected physiological and biochemical processes in medicinal plants. *Slabye i sverkhslabye polya i izluchenia v biologii i medicine* : nauchn. tr. Mezhdunar. kongr. URL: www.biophys.ru/archive/congress2015.pdf#page=111 (date of access: 15.12.2016) (in Russ.).

5. Chernaya M. A., Kosulina N. G. [Biophysical analysis of the information electromagnetic field effect on biological objects]. URL: http://khntusg.com.ua/files/sbornik/vestnik_142/32.pdf (date of access: 25.10.2016) (in Russ.).

6. Vavilov G. P., Balyshev L. N. [Field agricultural crops of the USSR]. Moscow, 1975 (in Russ.).

7. [Peculiarities of development and location of agriculture in the Republic of Belarus]. URL: http://lektsii.org/8-23030.html (date of access: 09.02.2017) (in Russ.).

8. [Belarus to cut crops under buckwheat on a half]. URL: http://agro2b.ru/ru/analytics/31948-Belarus-vdvoe-sokratit-posevnye-pod-grechihoj.html (date of access: 09.02.2016) (in Russ.).

9. Karpovich V. A., Rodionova V. H. [Method of presowing processing of seeds of vegetable or grain crops] . Patent No. 5580. 23.06.2003 (in Russ.).

10. Semena sel'skokhozyaistvennykh kul'tur. Metody opredeleniya vskhozhesti : GOST 12038–84. Vved. 01.07.1986. M.: Izdatel'stvo standartov, 1985.

11. TeKrony D. M. Seed Vigor Testing. *J. Seed Technol.* 1995. Vol. 8. P. 55–60.

12. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution No. 32 to the Handbook of Seed Nesting. *Association of Official Seed Analysts.* New York, 2002.

13. Pushkina N. V., Kurchanka U. P., Kalatskaja J. N. The use of electrophysical methods for evaluating the physiological quality of corn seeds. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2016. No. 1. P. 26–30 (in Russ.).

14. Gavrilenko V. F., Ladygina M. E., Handobina L. M. [A large workshop on plant physiology]. Moscow, 1975 (in Russ.).

15. Zaitsev G. N. [Mathematical statistics in experimental botany]. Moscow, 1984 (in Russ.).

16. Rokitskii P. F. [Biological statistics]. Minsk, 1973 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 30.03.2017.
Received by editorial board 30.03.2017.

Генетика, микробиология и молекулярная биология

Genetics, microbiology and molecular biology

УДК 577.27

БИОСИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ОВЕЧЬЕГО ИНТЕФЕРОНА-α В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

***К. В. ОСТРИКОВА*[1)], *М. И. ПОТАПОВИЧ*[1)], *В. А. ПРОКУЛЕВИЧ*[1)]**

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

Обозначена актуальная для животноводства и, в частности, овцеводства проблема инфекционных заболеваний, приводящих к значительным экономическим потерям. Отмечается отсутствие антивирусных лечебных ветеринарных препаратов, несмотря на выпуск огромного количества антибиотиков для лечения заболеваний бактериальной этиологии. Обращается внимание на перспективность производства препаратов интерферонов. В ходе настоящего эксперимента последовательность гена овечьего интерферона-α оптимизирована для экспрессии в грамотрицательных бактериях и клонирована в клетках *Escherichia coli* в составе вектора pET24b. Получен штамм-продуцент рекомбинантного овечьего интерферона-α с максимальной продуктивностью, составляющей около 40 % общего клеточного белка.

Ключевые слова: клонирование; экспрессия; овечий интерферон-α; индукция; рекомбинантный белок; масс-спектрометрический анализ.

Образец цитирования:
Острикова К. В., Потапович М. И., Прокулевич В. А. Биосинтез рекомбинантного овечьего интеферона-α в клетках *Escherichia coli* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 43–50.

For citation:
Vostrykava K. U., Patapovich M. I., Prakulevich U. A. Biosynthesis of ovine recombinant interferon-α in *Escherichia coli* cells. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 43–50 (in Russ.).

Авторы:
Кристина Владимировна Острикова – аспирантка кафедры микробиологии биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Прокулевич.
Максим Иосифович Потапович – заведующий научно-исследовательской лабораторией биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.
Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:
Krystsina Vostrykava, postgraduate student at the department of microbiology, faculty of biology.
kristiost@mail.ru
Maksim Patapovich, head of the research laboratory of biotechnology at the department of microbiology, faculty of biology.
mipatapovich@gmail.com
Uladzimir Prakulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.
prokulevich@mail.ru

BIOSYNTHESIS OF OVINE RECOMBINANT INTERFERON-α IN *ESCHERICHIA COLI* CELLS

***K. U. VOSTRYKAVA*[a], *M. I. PATAPOVICH*[a], *U. A. PRAKULEVICH*[a]**

[a]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*
Corresponding author: K. U. Vostrykava (kristiost@mail.ru)

Viral infection diseases cause huge losses to livestock. Although bacterial infections can be controlled by antibiotics, there is a lack of effective treatment for viral diseases. Recombinant interferons have broad spectrum of antiviral activity and can be used to solve this problem. As a result of the study the ovine interferon-α gene sequence was optimized for expression in gram-negative bacteria and cloned in *Escherichia coli* cells as a part of the pET24b vector. A strain producing recombinant ovine interferon-α with a target protein yield of about 40 % of the total cellular protein was obtained.

Key words: cloning; expression; ovine interferon-α; induction; recombinant protein; mass-spectrometric analysis.

Овцеводство – отрасль мирового продуктивного скотоводства, обеспечивающая сырьем легкую промышленность (шерсть, овчина, смушка, кожсырье), а также производящая пищевые продукты (ягнятина, баранина, молоко, сыры). Несмотря на регулярное проведение противоэпизоотических мероприятий, количество инфекционных заболеваний животных в хозяйствах постоянно растет. Экономический ущерб от инфицирования овец складывается из падежа, вынужденного убоя животных, снижения продуктивности вследствие их болезни, недополучения приплода по причине постинфекционного бесплодия, потери племенной ценности, а также затрат на профилактику [1].

К числу наиболее опасных заболеваний овец относят чуму мелкого рогатого скота, анаплазмоз, ящур, блютанг и др. [2]. Причинами их возникновения являются разнообразные стрессы и всегда сопутствующие им иммунодефицитные состояния, на фоне которых развиваются бактериальные, вирусные и смешанные инфекции. И если проблемы, связанные с заболеваниями бактериальной этиологии, современная наука решает достаточно успешно, то бороться с болезнями, вызванными вирусами, оказалось гораздо сложнее. Создание терапевтических препаратов, обладающих противострессовой, иммуномодулирующей и противовирусной активностью, – важное направление прикладных научно-исследовательских работ. Поиски подходящего агента привели к открытию многообещающих по своим свойствам белков – интерферонов (ИФН). Именно они характеризуются комплексным воздействием на организм животного.

Интерфероны – семейство цитокинов, многофункциональных секретируемых сигнальных белков животных [3]. По молекулярно-структурным и функциональным особенностям ИФН подразделяют на три типа. Группа ИФН овцы I типа включает в себя четыре подтипа ИФН-α и по одному подтипу -β, -ξ, -κ, -ε, -ω, -σ. К выработке ИФН-α способны все ядерные клетки организма (лейкоциты, фибробласты и др.). Эти цитокины индуцируют внутриклеточные механизмы, ингибирующие вирусную репродукцию. Кроме того, они принимают участие в процессах каскадной регуляции систем иммунной защиты организма – естественных киллеров, макрофагов, Т-лимфоцитов и др. Гены, кодирующие ИФН I типа, сконцентрированы у овцы на 2-й хромосоме [4; 5]. Ко II типу ИФН относится один представитель – ИФН-γ, под действием которого Т-лимфоциты синтезируют необходимые для иммунного ответа интерлейкины (ИЛ) [6]. Наконец, III тип ИФН включает в себя ИФН-λ1, -λ2 и -λ3 (известные как ИЛ-29, ИЛ-28А и ИЛ-28В соответственно) [7] и недавно идентифицированный ИФН-λ4 [8]. Интерфероны III типа, как и ИФН I типа, участвуют в противовирусной и антибактериальной защите, однако обособлены в отдельный тип, поскольку различаются аминокислотными последовательностями и третичной структурой. Интерфероны III типа синтезируются только клетками эпителиальных тканей [7; 8].

Благодаря высокому терапевтическому потенциалу и очевидному разнообразию специфических функций ИФН представляют большой интерес для ветеринарии в качестве средств профилактики и лечения вирусных, бактериальных и вирусно-бактериальных заболеваний, стрессовых состояний, а также как иммуномодуляторы. Главный способ применения препаратов на основе ИФН заключается во введении экзогенного белка в терапевтической или профилактической концентрации в организм животного. Получить экзогенный ИФН необходимой степени чистоты и в достаточных количествах можно биотехнологическим путем с помощью генно-инженерных методов. В настоящее время ведутся поиски наиболее высокопродуктивных систем синтеза рекомбинантных белков.

Особенностью биопрепаратов на основе ИФН является их строгая видоспецифичность, вследствие чего для каждого вида животных требуется разработка индивидуальных технологий производства субстанций и лекарственных форм. В Республике Беларусь выпускаются препараты на основе видоспецифических рекомбинантных свиных, бычьих, лошадиных и собачьих ИФН-α. Между тем препараты на основе овечьего ИФН-α отсутствуют. Цель настоящей работы – клонировать и получить высокоэффективный штамм-продуцент овечьего ИФН-α.

Материалы и методы исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. В целях клонирования рекомбинантных плазмид использовали клетки штамма *Escherichia coli* XL-1Blue (*F'':: Tn 10 proA$^+$B$^+$ lacI^{q}Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi hsdR17(r_k^- m_k^+) glnV44 relA1 lac*) [9] из коллекции научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета БГУ.

Для экспрессии целевого белка были взяты клетки *E. coli* следующих штаммов [10]:

• BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL с генотипом *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm]* Δ*hsdS* λ *DE3*=λ *sBamHIo* Δ*EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21* Δ*nin5*. Клетки данного штамма содержат дополнительные копии генов, редко встречающихся у прокариот тРНК;

• BL21(DE3) с генотипом *F$^-$ dcm ompT hsdS*(r_B^- m_B^-) *gal* λ (DE3). Клетки данного штамма лизогенны по бактериофагу λ DE3, который содержит в себе ген Т7 РНК-полимеразы под контролем *lacUV5*-промотора;

• BL21(DE3)pLysS с генотипом *F$^-$ ompT hsdS*(r_B^- m_B^-) *gal dcm* λ (*DE3*) [*pLysS Cam^R*]. Клетки данного штамма содержат плазмиду pLysS, которая несет в своем составе конститутивно экспрессируемый ген эндолизина бактериофага Т7, являющийся естественным ингибитором Т7 РНК-полимеразы. Штамм позволяет более строго следить за экспрессией белков под контролем Т7-промотора;

• BL21-Gold с генотипом *F$^-$ ompT hsdS(rB$^-$mB$^-$) dcm$^+$ Tetr gal endA Hte.* В данном штамме отсутствуют протеазы *lon* и *ompT*, которые могут разрушить белки во время очистки. Кроме того, ген *endA*, который кодирует эндонуклеазу I, инактивирован (не происходит деградации плазмидной ДНК).

Плазмиду pET24b(+) (*Novagen*, Великобритания) применяли в качестве вектора для экспрессии.

Генно-инженерные методики и ферменты. В работе использовали ферменты и соответствующие им буферные системы производства компании *Thermo Fisher Scientific* (США).

Синтез гена овечьего ИФН-α (*ovineIFN-α*) проводили таким образом, чтобы на концах последовательности находились сайты рестрикции *Nde*I и *Eco*RI, что позволит встроить полученную нуклеотидную последовательность в полилинкер pET24b.

Гидролиз ДНК рестриктазами *Nde*I и *Eco*RI осуществляли в буферных растворах при условиях, рекомендуемых фирмой-производителем. Результаты рестрикции контролировали при помощи электрофореза в агарозном геле. Реакционную смесь очищали от продуктов реакции с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*, США) согласно инструкции.

Лигирование гена *ovineIFN-α* с векторной ДНК проводили при помощи ДНК-лигазы фага Т4. Реакционную смесь инкубировали при температуре 22 °С в течение 2 ч.

Индукция экспрессии рекомбинантного гена. Индукцию экспрессии гена овечьего ИФН-α в клетках штамма-продуцента осуществляли с использованием изопропил-β-D-тиогалактопиранозида (ИПТГ). Для этого единичную колонию штамма-продуцента инокулировали в 10 мл среды LB, содержащей канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (15 мкг/мл), и культивировали при температуре 37 °С в термостатированном шейкере на протяжении ночи при постоянном перемешивании (180 об/мин). Ночную культуру разводили в 20 раз и выращивали в течение 1–2 ч при температуре 37 °С до $ОП_{600}$ = 1. Далее в среду добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 0,5 ммоль/л и продолжали культивировать в течение 4–8 ч при температуре 37 °С. Накопление целевого белка определяли с помощью электрофореза в денатурирующем (0,1 % ДСН – додецил сульфат натрия) 16 % полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [11]. Пробы для ДСН-ПААГ-электрофореза получали путем осаждения одинакового количества клеток на основе данных по оптической плотности (ОП) бактериальных культур. Клетки осаждали центрифугированием (13 000 об/мин, 1 мин), ресуспендировали в загрузочном буфере (50 ммоль/л трис-HCl; pH 6,8; 5 % ДСН; 1,4 моль/л 2-меркаптоэтанола; 10 % глицерина; 0,05 % бромфенолового синего) и кипятили на водяной бане в течение 5 мин. Гель окрашивали в растворе кумасси синего R-250.

Масс-спектрометрический анализ. Образцы бактериальных клеток, находящиеся в 1 мл 70 % этанола, тщательно встряхивали и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 2 мин. Надосадок сливали, образцы оставляли на воздухе до полного испарения следов этанола. Затем к осадку добавляли 30 мкл 70 % муравьиной кислоты и тщательно встряхивали. После этого добавляли 30 мкл 100 % ацетонитрила и снова встряхивали. Смесь центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 2 мин. Надосадок наносили на мишень для матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометра в смеси (50 : 50) с синаповой кислотой.

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 (*Thermo Fisher Scientific*) согласно инструкции производителя с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer той же компании.

Методы обработки последовательностей. Кодирующая последовательность гена овечьего (*Ovis aries*) ИФН-α взята из базы данных GenBank, код доступа AY802984.1.

Эффективность использования кодонов определяли путем расчета индекса адаптации кодонов (Codon adaptation index – CAI) согласно Codon Usage Database при помощи алгоритма, реализованного в программе DAMBE [12].

Денситометрический анализ изображений гелей производили при помощи пакета программ ImageJ 1.47v (*Image Processing and Data Analysis in Java*, Национальный институт здоровья, США) [13].

Результаты исследования и их обсуждение

Зрелый овечий ИФН-α представляет собой белковую молекулу, состоящую из 167 аминокислотных остатков, с молекулярной массой около 19 кДа. Белок имеет две дисульфидные связи: Cys 2 – Cys 30 и Cys 100 – Cys 140, последняя из которых важна для проявления антивирусной активности ИФН [14].

Как известно, частота встречаемости синонимичных кодонов в эукариотических и бактериальных кодирующих последовательностях может значительно отличаться, что отражает различия в относительном количестве молекул тРНК, соответствующих таким кодонам. Недостаток определенных тРНК в клетках прокариот приводит к низкой эффективности гетерологичной экспрессии эукариотических последовательностей. Из-за присутствия тандемов Arg-кодонов AGA или AGG может произойти сдвиг рамки считывания. Эти проблемы способна решить замена в последовательности гена редко встречающихся в *E. coli* кодонов на синонимичные прокариотические, благодаря чему увеличится продукция белка от его суммарного количества (до 20–50 % и более).

Кодирующая последовательность природного гена овечьего ИФН-α из базы данных GenBank содержит редко встречающиеся в *E. coli* кодоны Arg (6 кодонов AGA; 7 – AGG; 1 – CGA), а также относительно редко встречающиеся Leu (9 кодонов CTC; 3 – TTG), Pro (2 кодона – CCC; 3 – CCT), Gly (1 кодон – GGA; 2 – GGG; 2 – GGC) и Lys (6 кодонов – AAG). Кроме того, последовательность содержит в себе три тандема AGG AGG: 34–39 пар оснований (п. о.), 64–69 и 489–492 п. о. (рис. 1, выделены полужирным шрифтом).

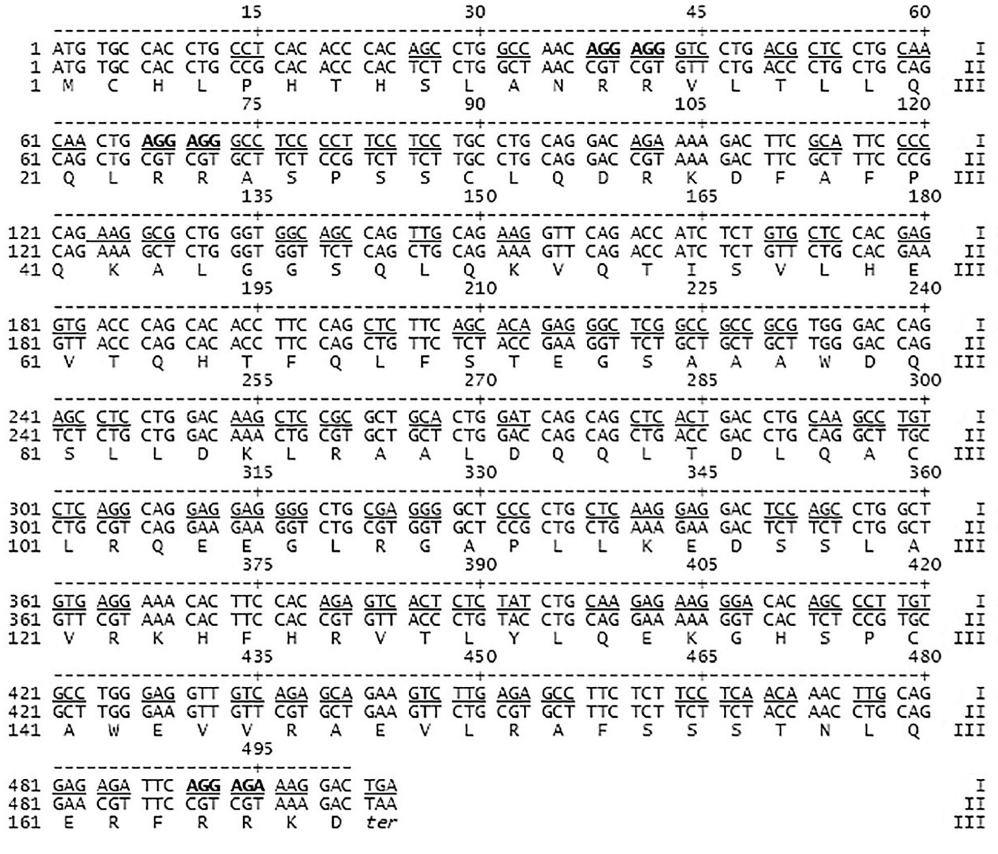


Рис. 1. Последовательности ДНК структурной части гена и белка овечьего ИФН-α:
I – природная нуклеотидная последовательность структурной части гена из базы данных GenBank (AY802984.1). Редко встречающиеся в *E. coli* кодоны подчеркнуты; II – секвенированная последовательность гена, оптимизированного для экспрессии в *E. coli*; III – аминокислотная последовательность белка до и после оптимизации гена

Fig. 1. DNA and protein sequences of ovine IFN-α:
I – native nucleotide sequence from GenBank (AY802984.1). Rare codons for *E. coli* are underlined;
II – gene optimised for expression in *E. coli* after sequencing; III – amino acid sequence before and after optimisation

Рассчитанный индекс адаптации кодонов (CAI) для исходной последовательности овечьего ИФН-α из базы данных равен 0,54, что не позволяет надеяться на эффективную экспрессию интактного гена в клетках *E. coli* даже при достаточно сильном промоторе. Замена соответствующих кодонов при оптимизации последовательности повышает CAI до значения 0,98 (см. рис. 1).

На основании разработанного дизайна (см. рис. 1, II) синтезирована последовательность гена овечьего ИФН-α, адаптированного для экспрессии в клетках бактерий *E. coli*. В результате получен продукт – фрагмент ДНК размером 498 пар нуклеотидов (п. н.), – который содержит в себе следующие структурные элементы: инициаторный (ATG) и терминирующий (TGA) кодоны, сайты рестрикции (*Nde*I и *Eco*RI) и последовательность кодонов структурной части гена овечьего ИФН-α.

Оптимизированная последовательность целевого гена переклонирована в вектор экспрессии pET24b(+) по сайтам рестриктаз *Nde*I и *Eco*RI. Полученная конструкция была названа pMK13113. Рекомбинантная плазмида pMK13113 имеет размер 5810 п. н. и содержит в себе ген овечьего ИФН-α под контролем промотора бактериофага T7. Полученная конструкция кодирует устойчивость к канамицину (30 мкг/мл) [15]. Кроме того, плазмида имеет в своем составе терминатор фага T7 и последовательность, кодирующую ген *lacI*.

Правильность полученной синтетической последовательности овечьего ИФН-α в составе рекомбинантной молекулы подтверждена секвенированием (см. рис. 1, II). Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали рекомбинантной плазмидной ДНК. В результате получен штамм *E. coli* BL21(DE3)-pMK13113, наследующий рекомбинантную плазмиду с геном овечьего ИФН-α, адаптированным к экспрессии в бактериях *E. coli*.

Для установления факта экспрессии целевого белка проводили индукцию гена путем добавления в культуру растущих бактерий индуктора ИПТГ в конечной концентрации 0,5 ммоль/л. В качестве отрицательного контроля выступали клетки того же штамма, выращиваемые без добавления индуктора.

В результате проведенного электрофореза суммарных клеточных белков *E. coli* зафиксировали белковый продукт с молекулярной массой около 19 кДа, что соответствует размеру белка овечьего ИФН-α (рис. 2). В контроле данный белок обнаруживается в следовых количествах.

Белок овечьего ИФН-α идентифицировали с помощью времяпролетного масс-спектрометра с источником ионизации МАЛДИ, позволяющим определять молекулярные массы белков, природных соединений и физиологически активных веществ (рис. 3).

Путем масс-спектрометрического анализа (см. рис. 3) удалось определить молекулярную массу накапливающегося в ходе индукции белка, которая оказалась равна 19 085 Да, при этом теоретическая расчетная масса овечьего ИФН-α составляла примерно 19 067 Да. Из этого можно сделать вывод о том, что белок, который накапливается в клетках *E. coli*, является овечьим ИФН-α.

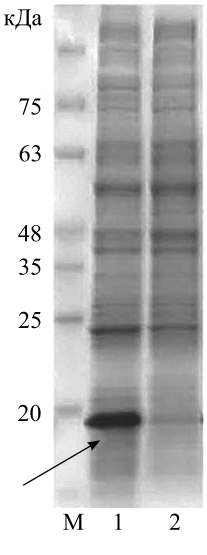


Рис. 2. ДСН-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков *E. coli* BL21-(DE3)-pMK13113:
M – маркер молекулярной массы Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (*Cleaver Scientific Ltd*, Великобритания) (кат. № CSL-BBL); 1 – образец спустя 4 ч после индукции ИПТГ (0,5 ммоль/л); 2 – образец без индукции ИПТГ. Стрелкой обозначен белок, соответствующий по размеру овечьему ИФН-α (около 19 кДа)

Fig. 2. SDS-PAGE of *E. coli* BL21-(DE3)-pMK13113 cellular proteins:
M – molecular weight marker Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (*Cleaver Scientific Ltd,* United Kingdom) (Cat. No. CSL-BBL); 1 – sample after 4 h induction with IPTG (0.5 mmol/l); 2 – sample without IPTG. Molecular weight of ovine IFN-α is indicated by arrow (about 19 kDa)

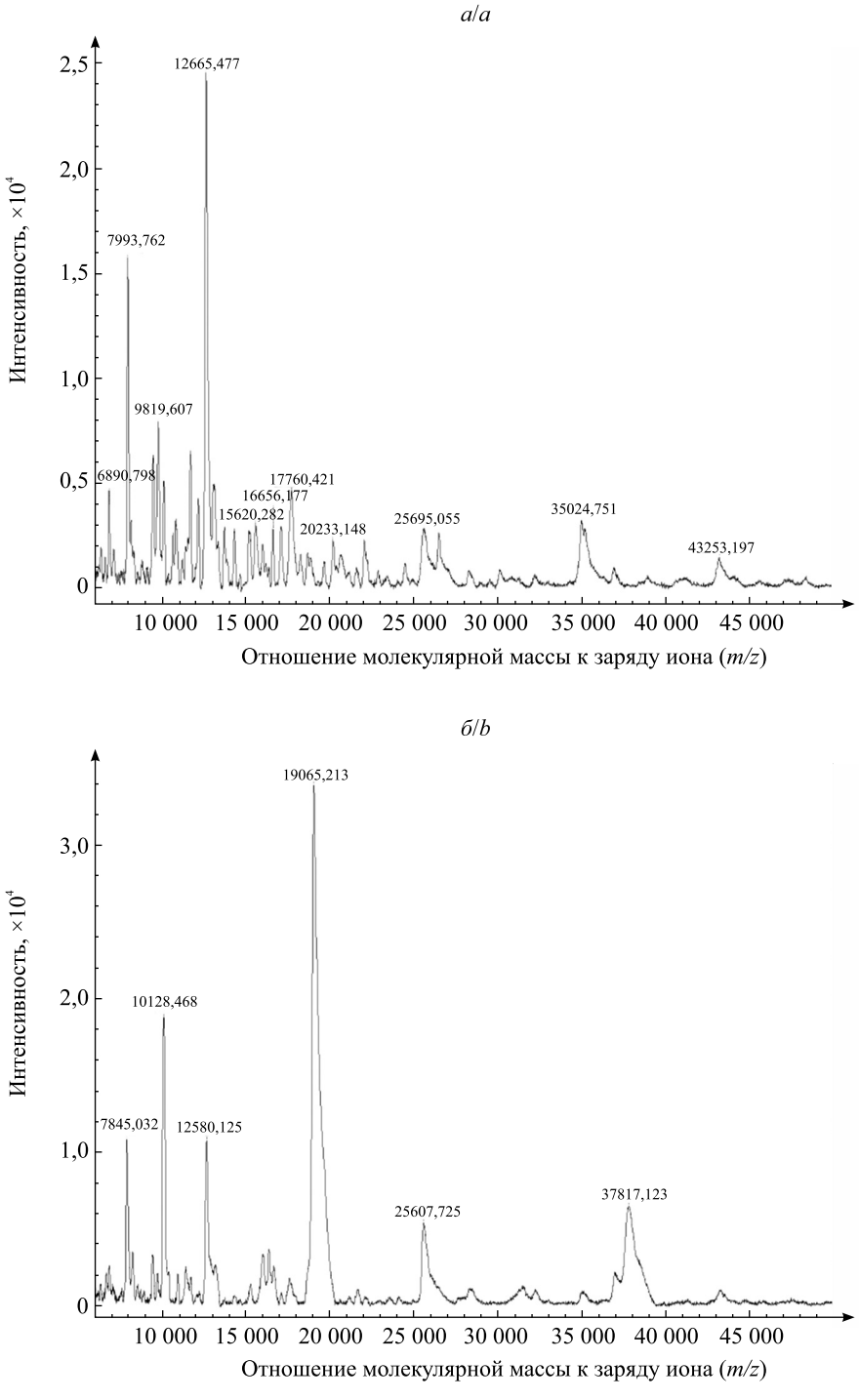


Рис. 3. МАЛДИ масс-спектры клеточных белков *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pMK1311:
а – образец без индукции ИПТГ; *б* – образец спустя 4 ч после индукции ИПТГ (0,5 ммоль/л). Значение *m/z*, равное 19 085,213, для однозарядного иона соответствует молекулярной массе 19 085,213 Да

Fig. 3. MALDI mass-spectra of *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL-pMK1311 cellular proteins:
a – sample without IPTG; *b* – sample after 4 h induction with IPTG (0.5 mmol/l). 19 085.213 m/z value for monovalent ion corresponds to 19 085.213 Da molecular mass

В целях выбора наиболее эффективного бактериального продуцента овечьего ИФН-α исследовали уровни накопления целевого белка в клетках различных, генетически отличающихся штаммов *E. coli*, а именно: BL21(DE3); BL21(DE3)pLysS; BL21-Gold и BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL. Для этого бактерии *E. coli* указанных штаммов трансформировали рекомбинантной плазмидой pMK13113. В трансформированных клетках изучали уровни экспрессии целевого белка после индукции гена овечьего ИФН-α. В качестве отрицательного контроля использовали клетки тех же штаммов, не подвергавшиеся воздействию индуктора (рис. 4).

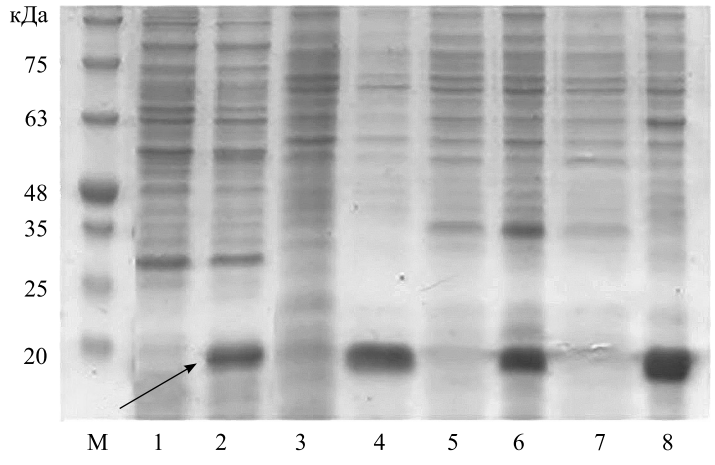


Рис. 4. ДСН-ПААГ-электрофореграмма клеточных белков в клетках различных штаммов *E. coli*, наследующих плазмиду pMK13113:
M – маркер молекулярной массы Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (*Cleaver Scientific Ltd*, Великобритания) (кат. № CSL-BBL);
1 – штамм BL21(DE3)pLysS без добавления индуктора; 2 – тот же штамм после индукции;
3 – штамм BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без добавления индуктора; 4 – тот же штамм после индукции;
5 – BL21-Gold без добавления индуктора; 6 – тот же штамм после индукции;
7 – BL21(DE3) без добавления индуктора; 8 – тот же штамм после индукции.
Стрелкой обозначен белок, соответствующий по размеру овечьему ИФН-α (около 19 кДа)

Fig. 4. SDS-PAGE of cellular proteins from different *E. coli* strains with plasmid pMK13113:
M – molecular weight marker Blue Wide Range Prestained Protein Ladder (*Cleaver Scientific Ltd*, United Kingdom) (cat. No. CSL-BBL); 1 – strain BL21(DE3)pLysS without IPTG; 2 – the same strain after induction;
3 – strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL without IPTG; 4 – the same strain after induction;
5 – strain BL21-Gold without IPTG; 6 – the same strain after induction;
7 – strain BL21(DE3) without IPTG; 8 – the same strain after induction.
Molecular weight of ovine IFN-α is indicated by arrow (about 19 kDa)

В результате проведенного электрофореза суммарных клеточных белков *E. coli* в индуцированных клетках различных штаммов зафиксирован белковый продукт с молекулярной массой около 19 кДа, что соответствует размеру белка овечьего ИФН-α. В контрольных образцах исследуемый белок отсутствовал (см. рис. 4). Пробы для ДСН-ПААГ-электрофореза получали путем осаждения одинакового количества клеток на основе данных по оптической плотности бактериальных культур спустя 4 ч после индукции экспрессии при температуре 37 °C. Эксперимент проводили три раза. С помощью денситометрического анализа цифровых фотографий окрашенных гелей выявляли средний выход целевого белка по отношению к общему белку клетки, выраженный в процентах (см. таблицу).

Накопление овечьего ИФН-α в клетках различных штаммов *E. coli*

Accumulation of ovine IFN-α in different *E. coli* strains

Штамм	Относительный выход целевого белка, %
BL21(DE3)pLysS	19,8 ± 0,81
BL21-Gold	20,2 ± 0,6
BL21(DE3)	38,0 ± 0,74
BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	42,0 ± 0,62

Как следует из данных денситометрического анализа, в качестве штамма-хозяина для получения овечьего ИФН-α предпочтительно использовать бактерии *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, поскольку выход целевого белка по отношению к общему белку клетки составляет в среднем 42 %, что является наибольшим показателем для всех исследованных нами штаммов.

Таким образом, сконструирована рекомбинантная плазмида с адаптированным к экспрессии в бактериях *E. coli* геном овечьего ИФН-α. Создан высокоэффективный штамм-продуцент, обозначенный как *E. coli* PPV MK13, накапливающий более 40 % целевого белка внутриклеточно.

Библиографические ссылки

1. *Данкверт С. А., Холманов А. М., Осадчая О. Ю.* Овцеводство стран мира. М., 2011.
2. *Дорош М.* Болезни овец и коз [Электронный ресурс]. URL: http://www.e-reading.club/book.php?book=84004 (дата обращения: 21.03.2016).
3. The Interferons: Characterization and application / ed. by A. Meager. Weinheim, 2006.
4. *Kalliolias G. D., Ivashkiv L. B.* Overview of the biology of type I interferons // Arthr. Res. Ther. 2010. Vol. 12, suppl. 1. P. 1–9.
5. *Woelk C. H., Frost S. D., Richman D. D., et al.* Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals // Gene. 2007. Vol. 397. P. 38–50.
6. *Sen G. C.* Viruses and interferons // Annu. Rev. Microbiol. 2001. Vol. 55. P. 255–281.
7. *Donnelly R. P., Kotenko S. V.* Interferon-lambda: a new addition to an old family // J. Interferon Cytokine Res. 2010. Vol. 30, issue 8. P. 555–564.
8. *Hong M., Schwerk J., Lim C., et al.* Interferon lambda 4 expression is suppressed by the host during viral infection // J. Exp. Med. 2016. Vol. 213, issue 12. P. 2539–2552.
9. XL-1 Blue Competent Cells. Manual [Electronic resource]. URL: http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf (date of access: 18.12.2016).
10. BL21-CodonPlus Competent Cells. Instruction Manual [Electronic resource]. URL: http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/230240.pdf (date of access: 20.01.2017).
11. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
12. Codon Usage Database [Electronic resource]. URL: http://www.kazusa.or.jp/codon/ (date of access: 01.04.2015).
13. *Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W.* Image to ImageJ: 25 years of image analysis // Nat. Methods. 2012. Vol. 9, № 7. P. 671–675.
14. *Fish E. N.* Definition of receptor binding domains in interferon-α // J. Interferon Res. 1992. Vol. 12, issue 4. P. 257–266.
15. pET Manual system [Electronic resource]. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf (date of access: 02.06.2016).

References

1. Dankvert S. A., Kholmanov A. M., Osadchaya O. Y. [Sheep breeding of the countries of the world]. Moscow, 2010 (in Russ.).
2. Dorosh M. [Diseases of sheep and goats]. URL: http://www.e-reading.club/book.php?book=84004 (date of access: 11.03.2016) (in Russ.).
3. A. Meager (ed.). The Interferons: Characterization and application. Weinheim, 2006.
4. Kalliolias G. D., Ivashkiv L. B. Overview of the biology of type I interferons. *Arthr. Res. Ther*. 2010. Vol. 12, suppl. 1. P. 1–9. DOI: 10.1186/ar2881.
5. Woelk C. H., Frost S. D., Richman D. D., et al. Evolution of the interferon alpha gene family in eutherian mammals. *Gene*. 2007. Vol. 397. P. 38–50. DOI: 10.1016/j.gene.2007.03.018.
6. Sen G. C. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol*. 2001. Vol. 55. P. 255–281. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.255.
7. Donnelly R. P., Kotenko S. V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res*. 2010. Vol. 30, issue 8. P. 555–564. DOI: 10.1089/jir.2010.0078.
8. Hong M., Schwerk J., Lim C. Interferon lambda 4 expression is suppressed by the host during viral infection. *J. Exp. Med*. 2016. Vol. 213, issue 12. P. 2539–2552. DOI: 10.1084/jem.20160437.
9. XL-1 Blue Competent Cells. Manual. URL: http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf (date of access: 18.12.2016).
10. BL21-CodonPlus Competent Cells. Instruction Manual. URL: http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/230240.pdf (date of access: 20.01.2017).
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680–685.
12. Codon Usage Database. URL: http://www.kazusa.or.jp/codon/ (date of access: 01.04.2015).
13. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 2012. Vol. 9, No. 7. P. 671–675.
14. Fish E. N. Definition of Receptor Binding Domains in Interferon-α. *J. Interferon Res.* 1992. Vol. 12, issue 4. P. 257–266.
15. pET Manual system. URL: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/Novagen_petsystem.pdf/ (date of access: 02.06.2016).

Статья поступила в редколлегию 30.03.2017.
Received by editorial board 30.03.2017.

УДК 577.21:575.113

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ *acdS*-ГЕНА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* В-37

***А. А. МЕЛЬНИКОВА*[1)], *С. И. ЛЕОНОВИЧ*[1)], *Е. А. ХРАМЦОВА*[1)]**

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

С помощью полимеразной цепной реакции осуществлен скрининг коллекции бактерий рода *Pseudomonas* на наличие гена *acdS*, кодирующего фермент АЦК-дезаминазу. Отмечается, что данный фермент является ингибитором синтеза стрессового этилена, пагубно влияющего на рост и развитие растений. У трех (*P. putida* В-37, *P. putida* В-28 и *P. putida* КТ 2442) из пяти исследованных штаммов ризосферных бактерий обнаружен ПЦР-продукт необходимого размера (около 1000 пар нуклеотидов). Определена первичная нуклеотидная последовательность изучаемого фрагмента бактерий *P. putida* В-37, проведен ее анализ *in silico*. Сделан вывод о том, что данная последовательность соответствует *acdS*-гену, который кодирует полноценный функциональный белок, являющийся АЦК-дезаминазой. Использование АЦК-дезаминазы позволит снизить уровень стрессового этилена и уменьшить негативное влияние, оказываемое на растения различными факторами окружающей среды.

Ключевые слова: АЦК-дезаминаза; этилен; *acdS*-ген; *Pseudomonas*.

MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF *acdS* GENE OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* B-37

***A. A. MELNIKAVA*[a], *S. I. LEANOVICH*[a], *A. A. KHRAMTSOVA*[a]**

[a]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*
Corresponding author: A. A. Melnikava (alesiamelnikava@gmail.com)

In current work PCR-screening of bacterial collection of genus *Pseudomonas* was made with the purpose to check the presence of *acdS* gene which is coding enzyme ACC deaminase. ACC deaminase can inhibit synthesis of stress ethylene that is harmful for the growth and development of plants. This gene was observed among three of five bacterial strains (*P. putida* B-37, *P. putida* B-28, *P. putida* KT 2442). Nucleotide sequence of the fragment corresponding to *acdS* gene of *P. putida* B-37 was taken and analyzed *in silico*. As a result, it was proven that there is *acdS* gene and it codes the protein ACC deaminase. Using of ACC deaminase will lead to increasing of stress ethylene level and negative influence on the plants of different environmental factors.

Key words: ACC deaminase; ethylene; acdS gene; *Pseudomonas.*

Образец цитирования:
Мельникова А. А., Леонович С. И., Храмцова Е. А. Молекулярно-генетический анализ *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 51–57.

For citation:
Melnikava A. A., Leanovich S. I., Khramtsova A. A. Molecular-genetic analysis of *acdS* gene of *Pseudomonas putida* B-37. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 51–57 (in Russ.).

Авторы:
Алеся Андреевна Мельникова – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.
Светлана Игоревна Леонович – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.
Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:
Alesia Melnikava, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.
alesiamelnikava@gmail.com
Sviatlana Leanovich, student at the faculty of biology.
mnemozina176@gmail.com
Alena Khramtsova, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
elena_khramtsova@inbox.ru

Введение

Являясь важным фитогормоном, необходимым для нормального метаболизма растений, этилен может отрицательно влиять на их рост и репродукцию в случае повышения его концентрации в растительных тканях, вызванного действием комплекса абиотических и биотических факторов. Это стало одной из ключевых проблем в растениеводстве [1; 2]. Снизив уровень этилена посредством включения в биохимический путь его синтеза фермента АЦК-дезаминазы, можно повысить устойчивость растений к стрессовым условиям.

Данный фермент превращает предшественника этилена (АЦК) в аммиак и α-кетобутират [3]. Поскольку у фермента АЦК-оксидазы сродство к субстрату выше, чем у АЦК-дезаминазы, для ингибирования синтеза этилена необходима сверхэкспрессия АЦК-дезаминазы [4]. За синтез этого фермента отвечает кластер генов, в котором главную роль играет ген *acdS*. Кодирующий АЦК-дезаминазу ген присутствует в основном у почвенных бактерий, к которым относится род *Pseudomonas*. Перспективным подходом к решению задачи, связанной со снижением уровня стрессового этилена, является создание трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-дезаминазы (*acdS*). В свою очередь, это должно повысить урожайность рекомбинантных посевных культур.

Цель настоящей работы – выделение *acdS*-гена бактерий рода *Pseudomonas* и анализ *in silico* его первичной нуклеотидной последовательности. Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

- провести ПЦР-скрининг коллекции бактерий рода *Pseudomonas* на наличие *acdS*-гена;
- установить первичную нуклеотидную последовательность *acdS*-гена;
- осуществить его анализ *in silico*.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Основным объектом изучения являлся бактериальный штамм *P. putida* B-37. Кроме того, использовались бактериальные штаммы *P. fluorescens* ВКМВ 8305, *P. putida* КТ 2442, *P. mendocina* ВКМВ 1299, *P. putida* B-27, *P. putida* B-28, *P. putida* M и *Escherichia coli* Xl-1 Blue, полученные из коллекции научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики биологического факультета БГУ.

Выделение хромосомной ДНК. Выделение и очистка препарата хромосомной ДНК бактерий *P. putida* B-37 осуществлялись в соответствии с протоколом щелочного лизиса, предложенным Дж. Мармуром [5].

Амплификация *acdS*-гена. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась посредством аппарата C1000 Touch™ Thermal Cycler фирмы *Bio-Rad Laboratories* (США) с использованием вырожденных к *acdS*-гену праймеров: прямого Fatg 5’-tccggatccatgaacctgaatcgttttraacgttatc-3’ и обратного Rtga 5’-tccg gatcctcagccgttgcgraacargaag-3’. Применялись реагенты для ПЦР компании *Fermentas* (Литва), содержащие Taq-полимеразу, 10x Taq-буфер для ПЦР, смесь дНТФ (нуклеозидтрифосфат) и деионизированную воду в концентрациях, предложенных производителем. Реакцию проводили в объеме 10 мкл. Параметры амплификации включали в себя следующие условия: 1 цикл – 5 мин при 94 ºС; 35 циклов – 30 с при 94 ºС, 30 с при 54 ºС и 30 с при 72 ºС; 1 цикл – 30 с при 72 ºС.

Анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей. Анализ гомологии изучаемого гена с последовательностями *acdS*-генов других представителей рода *Pseudomonas* осуществлялся программой BLAST, доступной на портале Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), с использованием алгоритма Nucleotide blast (*https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*).

Аминокислотная последовательность белка, кодируемая изучаемым геном, определялась в программе Translate на платформе ExPASy (*http://web.expasy.org/translate/*).

Функциональный анализ проводился с помощью программ Conserved Domains (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi*), InterProScan sequence search (*http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search*) и Motif scan *(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN*).

Характеристика белков (молекулярная масса, аминокислотный состав, индекс нестабильности белка, алифатический индекс, GRAVY-индекс), кодируемых исследуемым геном и *acdS*-генами других представителей рода *Pseudomonas*, была получена с помощью программы ProtParam на портале ExPASy (*http://web.expasy.org/protparam/*).

Вторичные структуры на аминокислотной последовательности изучаемого гена вычислены в программе SOPMA (*https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html*).

Выравнивание и построение филограммы осуществлялись с помощью пакета функций программы MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (*http://www.megasoftware.net/*).

Трехмерное изображение белка создавалось с помощью программы ProMod3 Version 1.0.2. на сервере SWISS-MODEL (*https://swissmodel.expasy.org/*).

Теоретическая локализация белка была определена с помощью программы TMHMM (*http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/*).

Результаты исследования и их обсуждение

Скрининг коллекции на наличие гена *acdS*. На первом этапе был проведен скрининг коллекции ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* на наличие гена, кодирущего АЦК-дезаминазу, с использованием ПЦР. Согласно литературным данным, такой ген был выделен у многих почвенных ризобактерий. Он содержит открытую рамку считывания (ОРС) размером 1017 пар оснований (п. о.), кодирующую около 338 аминокислотных остатков (а. о.) [6]. Таким образом, ПЦР-продукт ожидаемого размера (около 1000 п. о.) был получен у бактерий *P. putida* В-37, *P. putida* В-28 и *P. putida* КТ 2442. Для дальнейшей работы, связанной с молекулярно-генетической характеристикой *acdS*-гена, был взят штамм *P. putida* В-37, который является перспективным объектом биотехнологии, поскольку обладает высокими темпами роста, способен расти в широком диапазоне температур и на различных субстратах, а кроме того, представляет собой широко распространенный ризосферный микроорганизм и имеет наибольшую ростостимулирующую активность из всех указанных штаммов.

Анализ нуклеотидной последовательности. Было проведено секвенирование фрагмента, соответствующего по размеру *acdS*-гену, в целях определения и дальнейшего анализа первичной нуклеотидной последовательности. Установлено, что нуклеотидная последовательность гена, выделенного из бактерий *P. putida* В-37, имеет высокую степень гомологии с последовательностями *acdS*-генов других представителей бактерий рода *Pseudomonas* sp. (табл. 1). По результатам выравнивания ее идентичность с *acdS*-геном бактерий *P. fluorescens* достигла 91 %.

Таблица 1

Результат поиска гомологии гена *P. putida* В-37 с *acdS*-генами изученных бактерий рода *Pseudomonas* sp. в базе данных NCBI с использованием программы BLAST

Table 1

Result of searching of homology between *P. putida* B-37 gene and *acdS* genes of investigated bacteria *Pseudomonas* sp. in data bank NCBI using BLAST program

Гомолог	Идентификационный номер в базе данных GeneBank	Выравнивание, %	E-value	Идентичность, %
Ген АЦК-дезаминазы (*acdS*) и регулятора транскрипции (*acdR*) *P. fluorescens* штамм 2P24	EF635249.1	100	0,0	91
Ген АЦК-дезаминазы *P. fluorescens*	U37103.1	100	0,0	91
Ген АЦК-дезаминазы *P. putida* штамм AS1.1003	EU700088.1	100	0,0	90
Ген АЦК-дезаминазы *P. fluorescens* штамм KACC 10070	JQ646055.1	100	0,0	89
Ген АЦК-дезаминазы *Pseudomonas* sp. штамм PNSL	DQ830987.1	100	0,0	89
Ген АЦК-дезаминазы *Pseudomonas* sp. штамм CH-GRS8	EF581137.1	100	0,0	89
Ген АЦК-дезаминазы *P. fluorescens* штамм FY32	FJ465155.1	100	0,0	87
Ген АЦК-дезаминазы *P. entomophila* штамм PS-PJH	FJ882923.1	100	0,0	86
Ген АЦК-дезаминазы *P. putida* штамм UW4	AY823987.1	100	0,0	86

Выделенный из *P. putida* В-37 *acdS*-ген включает в себя 1017 пар нуклеотидов (п. н.), содержание ГЦ-пар (гуанин и цитозин) составляет 59 %. Уникальные сайты рестрикции, обнаруженные на последовательности анализируемого гена, представлены на рис. 1.

Анализируемая нуклеотидная последовательность содержит в себе ОРС, которая начинается с AUG-кодона на позиции 1–3-го нуклеотидов и заканчивается терминирующим кодоном на позиции 1015–1017-го нуклеотидов. Данная ОРС кодирует полипептид длиной 338 а. о. с молекулярной массой, равной 36,18 кДа.

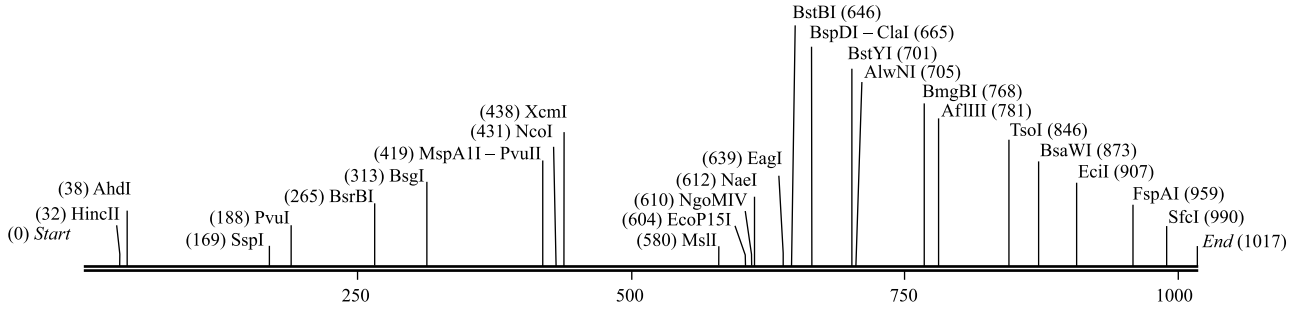


Рис. 1. Рестрикционная карта *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37, построенная с помощью программы SnapGene (*http://www.snapgene.com/*)

Fig. 1. Restriction map of *acdS* gene *P. putida* B-37, constructed with SnapGene program (*http://www.snapgene.com/*)

Функциональный анализ. В белке, кодируемом геном *acdS* бактерий *P. putida* B-37, выявлено присутствие консервативного домена, который соответствует ACCD-домену (структурная и функциональная единица АЦК-дезаминазы), относящемуся к суперсемейству β-триптофан синтаз II типа фолдинга (идентификационный номер в базе данных NCBI – cl00342).

При анализе аминокислотной последовательности с помощью программы InterProScan sequence search также были выявлены пиридоксаль-связывающие сайты, относящиеся к консервативным сайтам связывания, необходимым для функционирования фермента АЦК-дезаминазы, а именно: Lys^{51}, Tyr^{294}, Ser^{78}, Cys^{162} и Glu^{295} [7].

Физико-химический анализ. Фермент АЦК-дезаминаза штамма *P. putida* B-37 и десять других штаммов представителей рода *Pseudomonas*, аминокислотные последовательности которых были взяты из баз данных NCBI (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/*) и UniProt (*http://www.uniprot.org/*), характеризовались по таким физико-химическим параметрам, как молекулярный вес, теоретическая изоэлектрическая точка, общее число отрицательно и положительно заряженных аминокислотных остатков, индекс нестабильности, алифатический и GRAVY-индексы (табл. 2). Согласно полученным результатам физико-химические характеристики сходны для фермента бактерий *P. putida* B-37 и АЦК-дезаминазы представителей рода *Pseudomonas.* Основываясь на численном значении GRAVY-индекса и индекса нестабильности, можно предположить, что изучаемый белок обладает гидрофильными свойствами [8] и будет стабилен при выделении его в чистом виде [9].

Таблица 2

Характеристики АЦК-дезаминазы бактерий рода *Pseudomonas* sp., рассчитанные с использованием программы ProtParam на портале ExPASy

Table 2

Characteristics of ACC deaminases of genus *Pseudomonas* sp. based on results of ProtParam program on the portal ExPASy

Бактериальная природа белка	Длина, а.	Молекулярный вес, Да	Общее число отрицательно заряженных остатков (Asp + Glu), %	Общее число положительно заряженных остатков (Arg + Lys), %	Индекс нестабильности белка	Алифатический индекс	GRAVY-индекс
P. putida B-37	338	36718,91	12,13	10,36	38,79	85,98	–0,112
P. putida UW4 AY823987.1	338	36873,98	13,02	10,65	40,22	84,23	–0,187
P. fluorescens KACC 10070 JQ646055.1	338	36955,14	12,72	10,95	41,40	85,38	–0,176
P. fluorescens FY32 FJ465155.1	338	36902,03	13,02	10,65	40,69	84,53	–0,188
Pseudomonas sp. *ACP* AAA25689.1	338	36671,79	11,83	10,95	31,73	84,56	–0,149

Окончание табл. 2
Ending table 2

Бактериальная природа белка	Длина, а.	Молекулярный вес, Да	Общее число отрицательно заряженных остатков (Asp + Glu), %	Общее число положительно заряженных остатков (Arg + Lys), %	Индекс нестабильности белка	Алифатический индекс	GRAVY-индекс
Pseudomonas sp. *CH-GRS 8* EF581137.1	338	36900,15	12,42	11,54	36,19	84,23	–0,203
Pseudomonas sp. *PNSL* ABH03031.1	338	36916,19	12,42	11,54	35,64	85,38	–0,187

Определение наличия вторичных структур. В аминокислотной последовательности *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 идентифицировано четыре класса вторичных структур, а именно: α-спирали, β-пласты, протяженные нити и рандомные витки в процентном соотношении 31,95; 11,54; 21,60 и 34,91 соответственно (рис. 2).

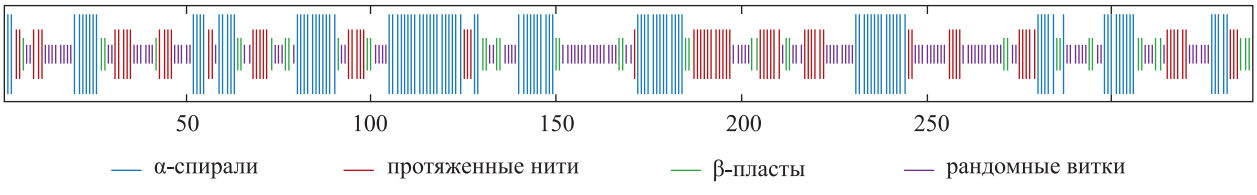


Рис. 2. Предполагаемая вторичная структура белка

Fig. 2. Proposed secondary structure of protein

Филогенетический анализ. При помощи алгоритма Neighbor-Joining Bootstrap, включающего в себя 500 *bootstrap*-повторов, проанализированы филогенетические отношения бактерий *P. putida* B-37 и других представителей рода *Pseudomonas* на основании аминокислотных последовательностей АЦК-дезаминазы (рис. 3).

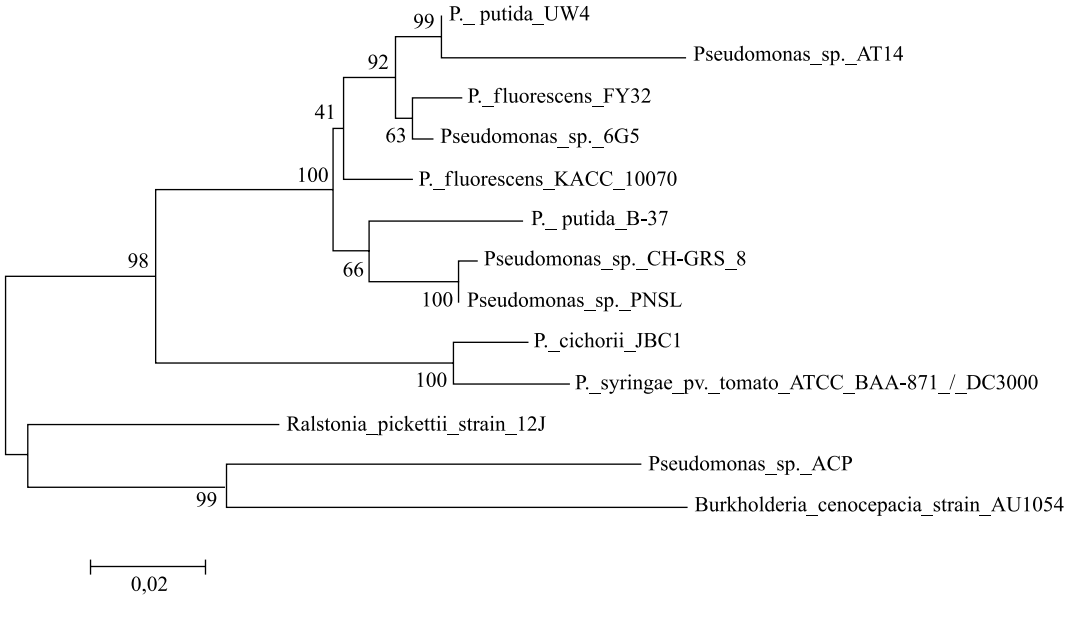


Рис. 3. Филогенетический анализ представителей рода *Pseudomonas* на основе аминокислотной последовательности АЦК-дезаминазы

Fig. 3. Phylogenetic analyses of genus *Pseudomonas* based on amino acid sequence of ACC deaminase

3D-моделирование белка. По результатам анализа, проведенного с помощью программы ProMod3 Version 1.0.2, белок, кодируемый изучаемым геном бактерий *P. putida* B-37, является гомотетрамером (рис. 4). Для построения 3D-модели была взята 1tzm.1.A-модель АЦК-дезаминазы, имеющая сходство с анализируемой аминокислотной последовательностью на 81,66 %.

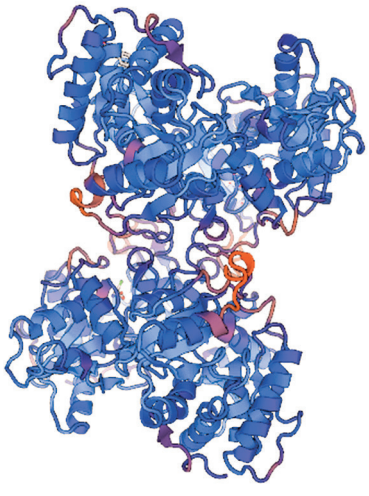


Рис. 4. Предполагаемая пространственная структура белка АЦК-дезаминазы бактерий *P. putida* B-37

Fig. 4. Proposed 3D structure of ACC deaminase protein of *P. putida* B-37

На основании данных о теоретической локализации изучаемый белок предположительно является секретируемым (рис. 5).

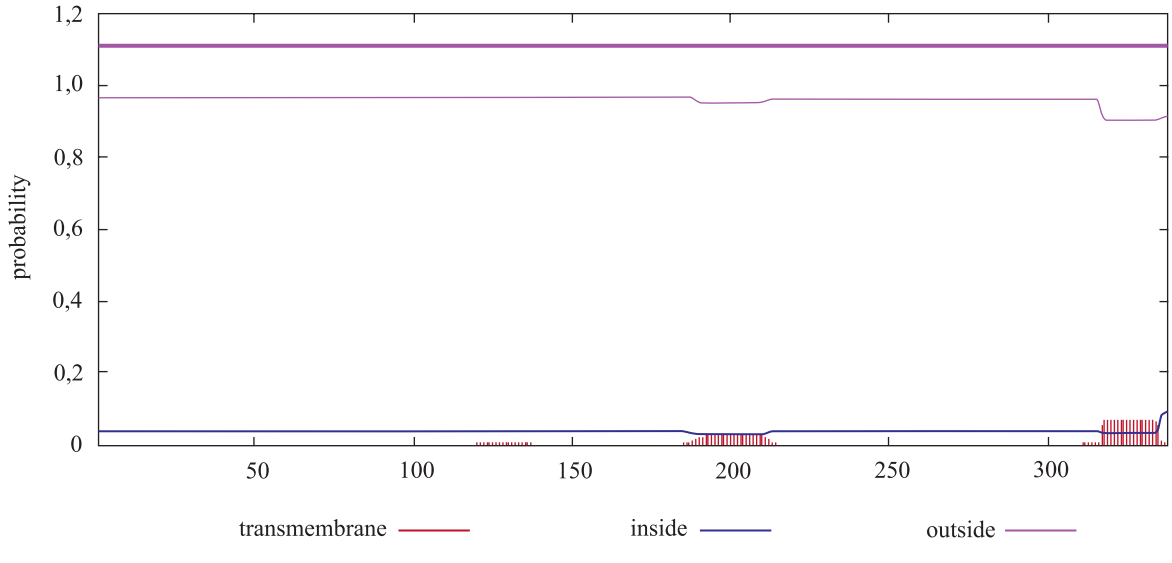


Рис. 5. Результат анализа локализации изучаемого белка

Fig. 5. Result of localization analysis of studied protein

Таким образом, полученные результаты амплификации и анализа *in silico* первичной нуклеотидной последовательности *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 позволили судить о высокой степени гомологии и родства изучаемого белка с АЦК-дезаминазой других представителей рода *Pseudomonas*.

Заключение

В настоящей работе методом ПЦР осуществлен скрининг коллекции бактерий рода *Pseudomonas* на наличие гена *acdS*. У трех (*P. putida* B-37, *P. putida* B-28 и *P. putida* KT 2442) из пяти исследованных штаммов ризосферных бактерий обнаружен ПЦР-продукт необходимого размера. Произведено

секвенирование изучаемого фрагмента бактерий *P. putida* B-37 в целях дальнейшего анализа *in silico* его первичной нуклеотидной последовательности. По итогам анализа сделан вывод о том, что данная последовательность соответствует *acdS*-гену. Этот ген кодирует полноценный функциональный белок, который является АЦК-дезаминазой, и содержит необходимые сайты связывания с кофактором. Использование АЦК-дезаминазы позволит снизить уровень стрессового этилена и уменьшить негативное влияние, оказываемое на растения различными факторами среды. Практическая значимость данного исследования связана с возможностью получения трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-дезаминазы (*acdS*) и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. *Glick B., Todorovic B., Czarny J., et al*. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // Critical Rev. Plant Sci. 2007. Vol. 26, issue 5–6. P. 227–242.

2. *Gontia-Mishra I., Sasidharan S., Tiwari S.* Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress // Biotechnol. Lett. 2014. Vol. 36, issue 5. P. 889–898.

3. *Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биология: принципы и применение; пер. с англ. М., 2002.

4. *Glick B. R.* Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase // FEMS Microbiol. Lett. 2005. Vol. 251, issue 1. P. 1–7.

5. *Marmur J.* A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms // J. Mol. Biol. 1961. Vol. 3. P. 208–218.

6. *Saravanakumar D*. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration // Bacteria in Agrobiology : stress management / ed. by D. K. Maheshwari. Heidelberg, 2012. P. 187–204.

7. *Kamala-Kannan S., Lee K. J., Park S. M., et al.* Characterization of ACC deaminase gene in Pseudomonas entomophila strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil // J. Basic Microbiol. 2010. Vol. 50. P. 200–205.

8. *Kyte I., Doolittle R. F.* A simple method for displaying the hydropathic character of a protein // J. Mol. Biol. 1982. Vol. 157. P. 105–132.

9. *Guruprasad K., Bhasker Reddy B. V., Pandit M*. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence // Protein Eng., Design Selection. 1990. Vol. 4, № 2. P. 155–161.

References

1. Glick B. R., Todorovic B., Czarny J., et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Rev. Plant Sci.* 2007. Vol. 26, issue 5–6. P. 227–242. DOI: 10.1080/07352680701572966.

2. Gontia-Mishra I., Sasidharan S., Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnol. Lett.* 2014. Vol. 36, issue 5. P. 889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.

3. Glick B., Pasternak J. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. Moscow, 2002 (in Russ.).

4. Glick B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiol. Lett*. 2005. Vol. 251, issue 1. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.030.

5. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 1961. Vol. 3. P. 208–218.

6. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. *Bacteria in Agrobiology*: *stress management*. Heidelberg, 2012. P. 187–204. DOI: 10.1007/978-3-642-23465-1_9.

7. Kamala-Kannan S., Lee K. J., Park S. M., et al. Characterization of ACC deaminase gene in Pseudomonas entomophila strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J. Basic Microbiol.* 2010. Vol. 50. P. 200–205.

8. Kyte I., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol*. 1982. Vol. 157. P. 105–132.

9. Guruprasad K., Bhasker Reddy B. V., Pandit M. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng., Design Selection*. 1990. Vol. 4, No. 2. P. 155–161.

Статья поступила в редколлегию 19.05.2017.
Received by editorial board 19.05.2017.

Биохимия

Biochemistry

УДК 577.17;577.12.05.;57.08

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОЧИСТКИ И РЕФОЛДИНГА РЕКОМБИНАНТНОГО ЭФРИНА-А5 ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ *ESCHERICHIA COLI*

А. В. ЖИДЕЦКИЙ [1)]***, М. В. ШОЛУХ*** [1)]***, Ю. Р. ХАННЕМАН*** [2)]***, Р. ХАНДРИК*** [2)]***,***
Ж. В. МОТЫЛЕВИЧ [3)]***, Ю.-П. ХИМАНЕН*** [4)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Биберахский университет прикладных наук, ул. Карлштрассе, 11, 888400, г. Биберах, Германия*
[3)]*Гродненский государственный медицинский университет, ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Беларусь*
[4)]*Институт исследования рака Sloan Kettering, 1275 Йорк авеню, 10065, г. Нью-Йорк, США*

В результате настоящего исследования разработана методика выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 из телец включения *Escherichia coli*. В основу легли спектрофотометрические, электрофоретические, хроматографические методы, а также рефолдинг методом разведения и на матрице аффинного сорбента.

Образец цитирования:
Жидецкий А. В., Шолух М. В., Ханнеман Ю. Р., Хандрик Р., Мотылевич Ж. В., Химанен Ю.-П. Оптимизация условий очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 из телец включения *Escherichia coli* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 58–65.

For citation:
Zhydzetski A. V., Sholukh M. V., Hannemann J. R., Handrick R., Motylevich Z. V., Himanen J.-P. Optimizing purification and refolding conditions of the recombinant ephrin-A5 from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 58–65 (in Russ.).

Авторы:
Александр Вячеславович Жидецкий – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биохимии обмена веществ кафедры биохимии биологического факультета.
Михаил Васильевич Шолух – кандидат биологических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией биохимии обмена веществ кафедры биохимии биологического факультета.
Юрген Райнер Ханнеман – доктор философии, профессор; декан факультета биотехнологии.
Рене Хандрик – доктор философии; заведующий лабораторией факультета фармацевтической биотехнологии.
Жанна Витальевна Мотылевич – кандидат биологических наук; начальник отдела международных связей.
Юха-Пекка Химанен – доктор философии; ведущий научный сотрудник.

Authors:
Alexander Zhydzetski, junior researcher at the research laboratory of the biochemistry department, faculty of biology.
zhydzetski@gmail.com
Mikhail Sholukh, PhD (biology), docent; head of the research laboratory of the biochemistry of metabolism of the biochemistry department, faculty of biology.
msholukh@mail.ru
Jürgen Rainer Hannemann, PhD (philosophy), full professor; dean of the faculty of biotechnology.
hannemann@hochschule-bc.de
Rene Handrick, PhD (philosophy); head of the research laboratory, faculty of pharmaceutical biotechnology.
rene.handrick@gmx.de
Zhanna Motylevich, PhD (biology); head of the international relations department.
zhanna2012@gmail.com
Juha-Pekka Himanen, doctor of science (philosophy); leading researcher.
himanenj@mskcc.org

Благодаря оптимизации условий отмывки и солюбилизации телец включения установлены составы отмывочных и солюбилизирующего растворов, позволяющие наиболее полно избавиться от примесных соединений с наименьшими потерями целевого белка, а также провести полную экстракцию целевого белка из растворенных телец включения. В процессе концентрирования и очистки рекомбинантного эфрина-А5 из солюбилизата телец включения с применением металл-хелатной хроматографии на Ni-сефарозе удалось получить целевой продукт чистотой 70,3 ± 7,4 % перед проведением рефолдинга. В результате скрининга основных характеристик рефолдинг-буфера для ренатурации рекомбинантного эфрина-А5 была выбрана следующая система: 20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 50 ммоль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT; 50 ммоль/л NaCl с конечной концентрацией эфрина-А5 в ренатурирующей системе до 20 мкг/мл и разведением в 10 раз.

Ключевые слова: эфрин-А5; скрининг условий рефолдинга; металл-хелатная хроматография; рекомбинантные белки; тельца включения.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ в рамках программы «Наука-М» № Б16М-082, ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (задание 1.11) и международного проекта BMBF (IB-037) «Развитие новых методов для анализа образцов гликозилирования моноклональных антител».

OPTIMIZING PURIFICATION AND REFOLDING CONDITIONS OF THE RECOMBINANT EPHRIN-A5 FROM INCLUSION BODIES OF *ESCHERICHIA COLI*

A. V. ZHYDZETSKI [a], ***M. V. SHOLUKH*** [a], ***J. R. HANNEMANN*** [b], ***R. HANDRICK*** [b], ***Z. V. MOTYLEVICH*** [c], ***J.-P. HIMANEN*** [d]

[a] *Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*
[b] *Biberach University of Applied Sciences, Karlstrasse Street, 11, 88400, Biberach, Germany*
[c] *Grodno State Medical University, Horkaha Street, 80, 230009, Grodno, Belarus*
[d] *Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 1275 York Avenue, 10065, New York, USA*

Corresponding author: A. V. Zhydzetski (zhydzetski@gmail.com)

The paper is devoted to isolation, purification and development of refolding approach of the recombinant ephrin-A5 out of *Escherichia coli* inclusion bodies which corresponds to the aim of the research. The main methods applied are UV/visible spectroscopy, protein electrophoresis, column chromatography, refolding by dilution and matrix-assisted renaturation. Composition of the washing and solubilizing solutions was established as a result of washing and solubilizing conditions optimization allowing to get rid of impurities and minimize loss of the target protein as well as carry out the protein extraction out of inclusion bodies. The protein of interest with 70.3 ± 7.4 % purity was managed to obtain in conducting concentration and purification of the solubilized recombinant ephrin-A5 with the help of immobilized metal affinity chromatography on Ni-sepharose. Following refolding system containing 20 mmol/l Tris-HCl; pH 8; 50 mmol/l sucrose; 2.5 mmol/l DTT; 50 mmol/l NaCl with the final protein concentration up to 200 mkg/ml and 10-fold dilution was chosen as the best during the main refolding buffer characteristics screening.

Key words: ephrin-A5; refolding conditions screening; imobilized metal affinity chromatography; recombinant proteins; inclusion bodies.

Acknowledgments. The research was funded by BRFFI within the framework of the treaty No. Б16М-082, program SPSI «Fundamental and applied science – medicine» (assignment 1.11) and international project BMBF (IB-037) «Development of new methods for analyzing specimens of monoclonal antibody glycosilation».

Эфриновые рецепторы (Eph) и их мембраносвязанные лиганды – эфрины (ephrin) активно синтезируются во время эмбрионального развития организма во многих тканях, участвуя в регуляции направления роста аксонов, образовании нейрональных связей, морфогенезе тканей, ангиогенезе и межклеточных взаимодействиях [1; 2]. Помимо функционирования в здоровых клетках и тканях эти белки играют важную роль в процессе канцерогенеза, участвуя в неоангиогенезе, метастазировании и инвазии опухолевых клеток [3; 4]. В связи с этим данная группа рецепторов и их лигандов представляет несомненный интерес в качестве объектов целевой терапии рака, а также при изучении патогенеза тканей [5]. Метод экспрессии рекомбинантных белков штаммами-продуцентами позволяет получить нужный белок в необходимых количествах, однако накопление химерного продукта в большинстве случаев происходит в виде телец включения (ТВ). Последние являются в основном неструктурированными агрегатами неактивного целевого продукта с включением белков и других балластных соединений клетки-продуцента [6]. Для растворения ТВ применяют высокие концентрации хаотропных агентов (мочевина, гуанидин гидрохлорид), солюбилизат которых используют для последующей очистки и рефолдинга целевого белка.

Цель настоящего исследования – разработка метода выделения, очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 из ТВ на основе скрининга главных параметров каждого этапа.

Методы исследования

Экспрессия рекомбинантного эфрина-А5. Для получения препаративного количества рекомбинантного эфрина-А5 использовали систему экспрессии на основе штамма *E. coli* BL21 (DE3) Codon RIPL. Клетки после индукции экспрессии 1 ммоль/л изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) и дальнейшей ферментации (до достижения оптической плотности ≈1 при длине волны 600 нм) собирали путем центрифугирования 30 мин при 7000 g и 10 ºС и замораживали при –20 ºС на хранение. Перед использованием клетки размораживали при температуре 4 ºС в течение ночи, после чего порционно переносили в лизис-буфер (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,1 моль/л KCl; 5 ммоль/л $CaCl_2$; 10 ммоль/л $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 1 ммоль/л PMSF; 10 % глицерола; 2 мкг/мл DNAase I; 10 000 ед./мл лизоцима) при механическом раздавливании и последующем ресуспендировании на магнитной мешалке до полного исчезновения видимых частиц в соотношении 1 г клеток на 3 мл среды. Полученную суспензию подвергали трехкратной обработке с помощью френч-пресса при 20 000 psi, после чего центрифугировали 30 мин при 13 300 g и 10 ºС. После удаления супернатанта осадок, содержащий ТВ, взвешивали, аликвотировали и хранили при –20 ºС. Наличие целевого белка определяли методом ДСН-электрофореза.

Отмывка телец включения. Отмывку ТВ от примесей проводили в два этапа. Сначала использовали растворы на основе 50 и 500 ммоль/л трис, 50 и 500 ммоль/л NaCl, 1 % изопропанола и 1 % Tween-20, затем – на основе 50 ммоль/л трис в 1–6 моль/л мочевины для определения наиболее эффективной системы. Тельца включения суспендировали в растворе для отмывки в соотношении 1 : 20 (вес/объем), перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч и центрифугировали 20 мин при 15 000 g и 20 ºС. Для сравнения эффективности систем отмывки белковый состав в осадке и супернатанте контролировали методом ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Солюбилизация телец включения. Отмытые ТВ растворяли в буфере (50 ммоль/л трис-HCl, pH 8 или 9) с или без β-меркаптоэтанола (BME) и мочевине в концентрации 6 и 8 моль/л в течение ночи. После растворения ТВ полученный раствор центрифугировали 20 мин при 15 000 g и 20 ºС. Наилучшую систему определяли по присутствию в солюбилизате мономерной формы белка.

Металл-хелатная хроматография (IMAC) на Ni-сефарозе. Условия очистки подбирали на колонке с Ni-сефарозой FF объемом 1,5 мл. Колонку предварительно уравновешивали буфером А (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 0,5 моль/л NaCl; 5 ммоль/л имидазола, 5 ммоль/л BME), после чего наносили солюбилизат ТВ (7,5 мл) и промывали тем же буфером со ступенчатым градиентом концентрации имидазола (15 ммоль/л, 30, 60, 120, 240 ммоль/л, 1 моль/л) для определения содержания имидазола, позволяющего наиболее полно избавиться от примесных белков с наименьшей потерей целевого продукта.

Гель-фильтрационная хроматография. Избавление от имидазола в образцах белка после IMAC и их перевод в буфер А осуществляли методом гель-фильтрации на сефадексе G-25. Полученный образец использовали для скрининга условий рефолдинга методом разведения.

Рефолдинг рекомбинантного эфрина-А5 методом разведения. Для определения условий рефолдинга эфрина-А5 использовали образец, полученный, как описано в предыдущем абзаце. На первом этапе применяли ренатурирующие системы с различными значениями pH на основе 0,4 моль/л сахарозы, 4 ммоль/л Цис (L-цистеин), 0,4 ммоль/л цистина, содержащие либо 20 ммоль/л MES (pH 5 и 6), либо 20 ммоль/л трис-HCl (pH 7–9) при температуре 10 или 20 ºС. Затем подбирали окислительно-восстановительный потенциал ренатурирующего буфера. Для этого использовали различные концентрации дитиотреитола (DTT) (0,1; 1,0 и 5,0 ммоль/л) и пару цистеин – цистин с разным соотношением компонентов (0,1/0,1 ммоль/л; 1,0/0,1; 5,0/0,1; 0,1/1,0; 1,0/1,0; 5,0/1,0; 0,1/5,0; 1,0/5,0; 5,0/5,0 ммоль/л) на основе 20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,4 моль/л сахарозы. Далее устанавливали оптимальную конечную концентрацию белка и мочевины в растворе. Рефолдинг проводили в буфере (20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,4 моль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT) с разведением образца в 32, 16, 8 и 4 раза. На заключительном этапе определяли наилучшее антиагрегационное соединение и его концентрацию. В этом случае образец вносили в рефолдинг-буфер (20 ммоль/л трис; pH 8; 2,5 ммоль/л DTT), содержащий один из следующих компонентов: 0,1, 0,5, 1,0 % кремафора; 0,1, 0,5, 1,0 % полиэтиленгликоля 3000; 0,1, 0,5, 1,0 % поливинилпирролидона; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л глицерола; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л сахарозы; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л L-глицина; 0,1, 0,2, 0,4 моль/л глюкозы.

Лучшей системой на каждом этапе рефолдинга считалась та, в которой после 12–14 ч инициации ренатурации детектировалась мономерная форма целевого белка и наблюдалась наименьшая степень мутности раствора, свидетельствующая об агрегации.

УФ-видимая спектроскопия. Концентрацию общего белка измеряли по методу Лоури в модификации Петерсона [7]. Агрегатное состояние белка оценивали по светорассеиванию при длине волны 340 нм через 30 мин и через 12 ч после инициации ренатурации. Степень экстракции эфрина-А5 и других примесных соединений при определении условий отмывки и солюбилизации ТВ выявляли спектрофотометрически в диапазоне длины волн от 200 до 600 нм.

ДСН-электрофорез в ПААГ. Эффективность экстракции рекомбинантного эфрина-А5 из ТВ, чистоту белковых фракций и содержание мономерной формы целевого белка оценивали методом ДСН-электрофореза в 12,5 % ПААГ [8]. Окраску гелей проводили красителем кумасси ярко-синим R-250 (CBB R-250) [9] либо серебром по [10]. Степень чистоты устанавливали с помощью программы TotalLab 2.01.

Результаты исследования и их обсуждение

Помимо целевого продукта ТВ содержат ряд примесных соединений (белки, нуклеиновые кислоты, компоненты клеточной стенки и мембраны), которые, как показано в ряде исследований, заметно снижают выход целевого продукта на этапе рефолдинга белка, оказывая при этом влияние и на чистоту конечного белка [11]. В большинстве случаев для этих целей применяют солевые растворы, детергенты и хаотропные агенты при щелочных значениях pH [12]. Концентрация данных соединений зависит в первую очередь от степени чистоты и связывания примесных соединений с ТВ, а также от штамма-продуцента, образующего эти включения.

Таким образом, на первом этапе был проведен скрининг условий отмывки ТВ, содержащих рекомбинантный эфрин-А5, растворами на основе NaCl, трис, Tween-20, изопропанола в различных концентрациях. По данным электрофореза в ПААГ (рис. 1) и УФ-видимой спектроскопии, установлено, что к наибольшей утрате примесных соединений приводит раствор, содержащий 0,5 моль/л NaCl, однако со значительными потерями целевого белка (см. рис. 1, *3*). Отмывка ТВ раствором на основе 50–500 ммоль/л трис приводит к избавлению от примесных соединений небелковой природы, причем без потери целевого белка. Балластные соединения переходят в раствор непосредственно после добавления отмывочных систем, и их выход не зависит от продолжительности инкубации ТВ в данных растворах.

На втором этапе отмывки применяли растворы на основе мочевины, которая позволяет наиболее полно избавиться от прочно связанных с ТВ примесных белков. Чтобы установить содержание мочевины, удаляющей максимальное количество примесей и при этом не приводящей к потере целевого продукта, было изучено ее действие в концентрации от 1 до 6 моль/л. Определено, что выход эфрина-А5 из ТВ начинается при концентрации мочевины 1 моль/л (см. рис. 1). При повышении концентрации до 3 моль/л и более происходит практически полная экстракция целевого продукта, достигающая максимума при 6 моль/л. По этой причине для отмывки ТВ была выбрана система только на основе 50 ммоль/л NaCl и 50 ммоль/л трис. Балластные соединения включали в себя, как правило, нуклеиновые кислоты, имеющие характерный максимум поглощения при длине волны 260 нм, и хромофорные

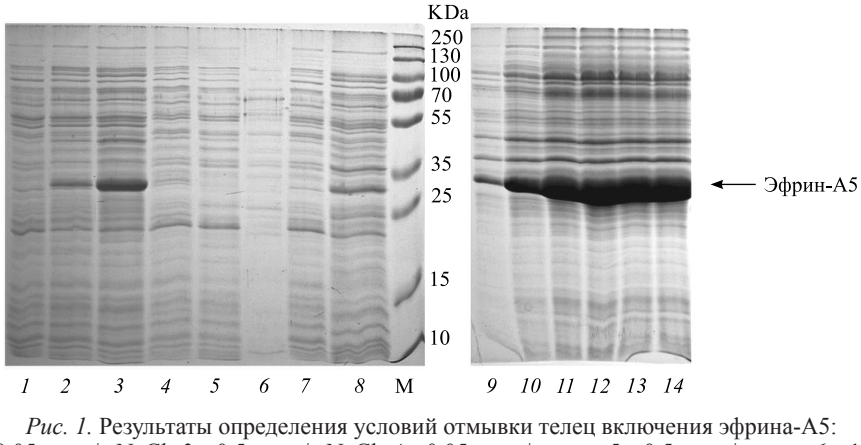


Рис. 1. Результаты определения условий отмывки телец включения эфрина-А5:
1 – H_2O; *2* – 0,05 моль/л NaCl; *3* – 0,5 моль/л NaCl; *4* – 0,05 моль/л трис; *5* – 0,5 моль/л трис; *6* – 1 % Tween-20;
7 – 1 % изопропанола; *8* – 0,5 моль/л NaCl + 0,5 моль/л трис + 1 % Tween-20 + 1 % изопропанола;
M – маркеры молекулярных масс; *9* – 1 моль/л мочевины; *10* – 2 моль/л мочевины; *11* – 3 моль/л мочевины;
12 – 4 моль/л мочевины; *13* – 5 моль/л мочевины; *14* – 6 моль/л мочевины

Fig. 1. Washing conditions of ephrin-A5 inclusion bodies:
1 – H_2O; *2* – 0.05 mol/l NaCl; *3* – 0.5 mol/l NaCl; *4* – 0.05 mol/l Tris; *5* – 0.5 mol/l Tris; *6* – 1 % Tween-20;
7 – 1 % isopropanol; *8* – 0.5 mol/l NaCl + 0.5 mol/l Tris + 1 % Tween-20 + 1 % isopropanol; M – molecular weight markers;
9 – 1 mol/l urea; *10* – 2 mol/l urea; *11* – 3 mol/l urea; *12* – 4 mol/l urea; *13* – 5 mol/l urea; *14* – 6 mol/l urea

вещества, окрашивающие полученные растворы в желто-оранжевый цвет. При отмывке ТВ выбранной системой выход составляет до 80 % массы исходных телец.

На следующем этапе оптимизировали условия солюбилизации ТВ. С этой целью применяли системы на основе 6 и 8 моль/л мочевины при pH 8 и 9 с и без добавления BME. Установлено, что все подобные системы приводят к полному растворению ТВ, однако наибольшее количество мономерной формы целевого белка, по данным ДСН-электрофореза, наблюдалось в случае использования 6 и 8 моль/л мочевины при pH 8 и 9 с добавлением 10 ммоль/л BME. Данный агент необходим для восстановления меж- и внутримолекулярных дисульфидных связей, которые образуются в восстанавливающей среде клетки-хозяина [13]. В результате выбор был сделан в пользу следующей системы: 50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л BME и 0,5 моль/л NaCl.

Дальнейший этап заключался в определении оптимальных условий очистки целевого продукта из солюбилизата ТВ на колонке с Ni-сефарозой. Сорбент уравновешивали буфером А (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л BME; 0,5 моль/л NaCl) с добавлением имидазола до конечной концентрации 5 ммоль/л для минимизации связывания примесных белков, содержащих остатки гистидина. Затем наносили солюбилизат, промывали колонку тем же буфером А, после чего проводили ступенчатую элюцию.

На основании электрофоретических данных установлено, что для элюции примесных белков достаточно до 30 ммоль/л имидазола, а для полной элюции целевого белка требуется 1 моль/л этого агента (рис. 2).

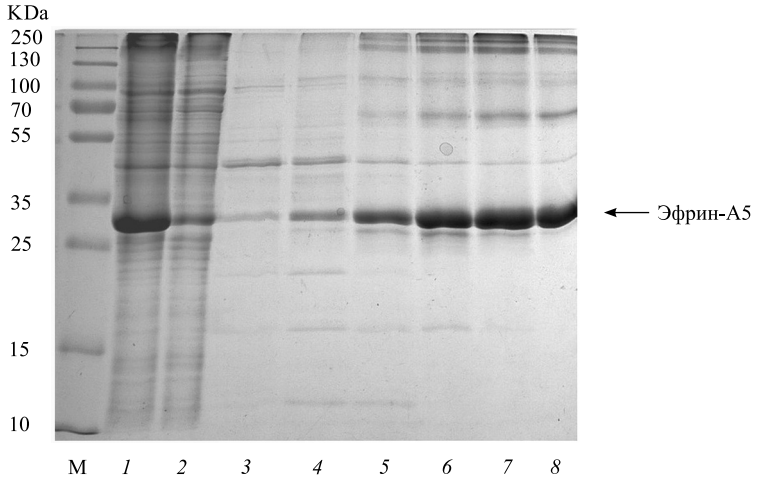


Рис. 2. Определение условий очистки рекомбинантного эфрина-А5 методом изократической элюции имидазолом:
М – маркеры молекулярных масс; *1* – солюбилизат ТВ; *2* – не связавшаяся с сорбентом фракция;
3 – элюция 15 ммоль/л имидазолом; *4* – элюция 30 ммоль/л имидазолом; *5* – элюция 60 ммоль/л имидазолом;
6 – элюция 120 ммоль/л имидазолом; *7* – элюция 240 ммоль/л имидазолом; *8* – элюция 1 моль/л имидазолом

Fig. 2. Determination of recombinant ephrin-A5 purification conditions by imidazole isocratic elution:
M – molecular weight marker; *1* – inclusion bodies solubilizate; *2* – Ni-sepharose FF flowthrough;
3 – 15 mmol/l imidazole elution; *4* – 30 mmol/l imidazole elution; *5* – 60 mmol/l imidazole elution;
6 – 120 mmol/l imidazole elution; *7* – 240 mmol/l imidazole elution; *8* – 1 mol/l imidazole elution

В свою очередь, это приводит к необходимости удаления из образца имидазола и введения дополнительного этапа – гель-фильтрации, поскольку оказалось, что остатки имидазола после рефолдинга препятствуют связыванию рекомбинантного эфрина-А5 с Ni-сефарозой. Таким образом, после посадки целевого белка на Ni-сефарозу оптимальным условием его сбора и очистки является применение ступенчатой элюции: сначала буфером В1 (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л BME; 0,5 моль/л NaCl; 25 ммоль/л имидазола), затем буфером В2 (50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л BME; 0,5 моль/л NaCl; 1 моль/л имидазола). После этого фракции элюции с целевым белком объединяли и наносили на колонку с сефадексом G-25 для избавления от имидазола. В результате удалось получить образец, свободный от имидазола, содержащий 70,3 ± 7,4 % целевого белка и готовый к дальнейшему проведению рефолдинга.

На следующем этапе были определены основные характеристики ренатурирующего буфера рефолдинга. Эффективность каждого параметра оценивали по электрофоретической чистоте мономерной формы и степени агрегации рекомбинантного эфрина-А5.

Исследование влияния температурного фактора и значения pH буфера для рефолдинга на выход мономерной формы целевого белка позволило установить, что при повышенных температурах (20 ºС)

и значениях pH (5 и 6), близких к изоэлектрической точке белка (6,4), выход мономерной формы целевого продукта снижается. Это обусловлено в первую очередь элиминацией заряда молекулы и, как следствие, взаимодействием переходных белковых молекулярных форм посредством неспецифических гидрофобных связей, приводящих к инициации агрегации (рис. 3). Для проведения рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 было выбрано значение pH, равное 8, которое удалено от изоэлектрической точки молекулы, равной 6,4, и способствует формированию дисульфидных связей при температуре 10 ºС [14].

На этапе выбора редокс-системы установлена зависимость выхода конечного продукта от природы и концентрации восстановительного агента. Так, при повышенных концентрациях (5 ммоль/л) DTT или

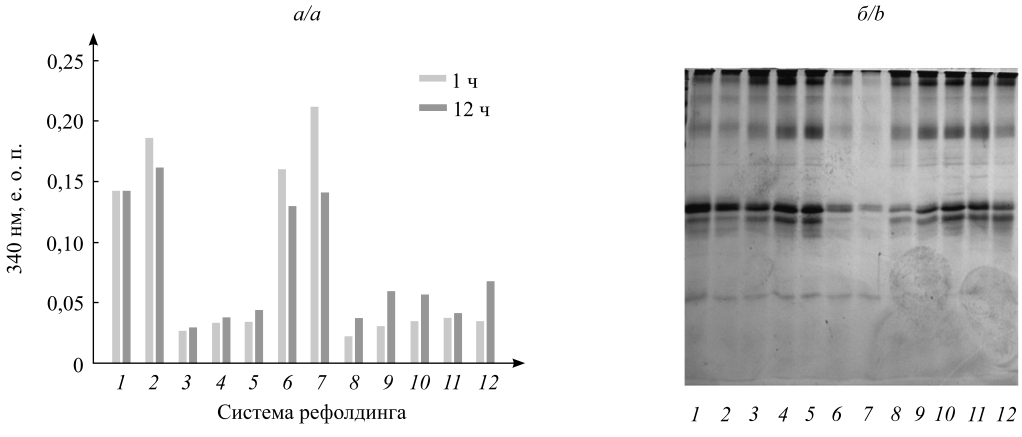


Рис. 3. Влияние pH и температуры рефолдинг-буфера на агрегацию эфрина-А5:
а – турбидиметрический анализ эффективности систем рефолдинга; *б* – ДСН-электрофорез в 12,5 % ПААГ в нередуцирующих условиях систем рефолдинга первого этапа, окраска серебром.
Все системы включали в себя 0,4 моль/л сахарозы; 4 ммоль/л Цис; 0,4 ммоль/л цистина.
Разведение в 8 раз. *1* – pH 5, 5 ºС; *2* – pH 6, 5 ºС; *3* – pH 7, 5 ºС; *4* – pH 8, 5 ºС; *5* – pH 9, 5 ºС; *6* – pH 5, 20 ºС; *7* – pH 6, 20 ºС; *8* – pH 7, 20 ºС; *9* – pH 8, 20 ºС; *10* – pH 9, 20 ºС; *11* – pH 7,4, 5 ºС; *12* – pH 7,4, 20 ºС

Fig. 3. Influence of refolding buffer pH and temperature value on ephrin-A5 aggregation:
a – turbidimetric assay; *b* – 12.5 % non-reducing SDS-PAGE, Ag staining.
All systems contained 0.4 mol/l sucrose, 4 mmol/l Cys, 0.4 mmol/l cystine. 8-fold dilution.
1 – pH 5, 5 ºC; *2* – pH 6, 5 ºC; *3* – pH 7, 5 ºC; *4* – pH 8, 5 ºC; *5* – pH 9, 5 ºC; *6* – pH 5, 20 ºC; *7* – pH 6, 20 ºC; *8* – pH 7, 20 ºC; *9* – pH 8, 20 ºC; *10* – pH 9, 20 ºC; *11* – pH 7.4, 5 ºC; *12* – pH 7.4, 20 ºC

L-Цис наблюдались увеличение содержания мономерной формы эфрина-А5 и низкая степень агрегации, в то время как при возрастании концентрации L-цистина проявлялась обратная картина (результаты не представлены). В первом случае это связано с интенсивным окислением молекул DTT и, соответственно, восстановлением дисульфидных связей в молекуле белка, а также принятием ею нативной конформации, во втором – с восстановлением уже образовавшихся связей.

На степень и скорость агрегации при рефолдинге заметно влияет конечная концентрация белка в системе. В мировой практике рефолдинг проводят методом разведения, снижая концентрацию целевого продукта с 1–2 мг/мл до 1–10 мкг/мл в зависимости от типа белка и его склонности к агрегации [15]. Очевидно, что чем ниже концентрация белка, тем ниже степень агрегации, однако это приводит к значительным конечным объемам рефолдинг-буфера и существенному разведению образца, что, в свою очередь, увеличивает материальные и временные затраты. Поэтому необходимо подобрать такую концентрацию, при которой невысокими будут и степень агрегации, и требуемые объемы. Таким образом, следующий этап был посвящен определению оптимальной конечной концентрации эфрина-А5 в ренатурирующей системе. При достаточно большой конечной концентрации эфрина-А5 в растворе (300 мкг/мл) происходит значительное помутнение и образование агрегатов, хотя и в данном случае часть целевого белка присутствует в мономерной форме. На основании турбидиметрических и электрофоретических данных (результаты не представлены) при масштабировании процесса рефолдинга методом разведения было установлено, что оптимальными являются конечные концентрации мочевины 0,8 моль/л, белка – до 200 мкг/мл.

Немаловажную роль в обеспечении правильного протекания рефолдинга и подавления конкурирующего процесса – агрегации – играют стабилизаторы различной химической природы [16]. Нами изучено влияние кремафора, сахарозы, глицерола, полиэтиленгликоля 3000, поливинилпирролидона, L-глицина и глюкозы на процесс подавления агрегации. На основании результатов турбидиметрического исследования и ДСН-электрофореза установлено, что все исследуемые соединения препятствуют

агрегации в одинаковой степени и соответствуют применявшейся на первых этапах концентрации сахарозы 0,4 моль/л, как рекомендовано. Аналогичный эффект достигнут при концентрации сахарозы 50 ммоль/л. На ней, как самом дешевом и часто используемом в подобных процессах соединении, и был остановлен выбор.

На рис. 4 представлены данные, касающиеся оценки чистоты и гомогенности эфрина-А5 на стадиях от солюбилизации ТВ до сбора ренатурированного белка на конечном этапе.

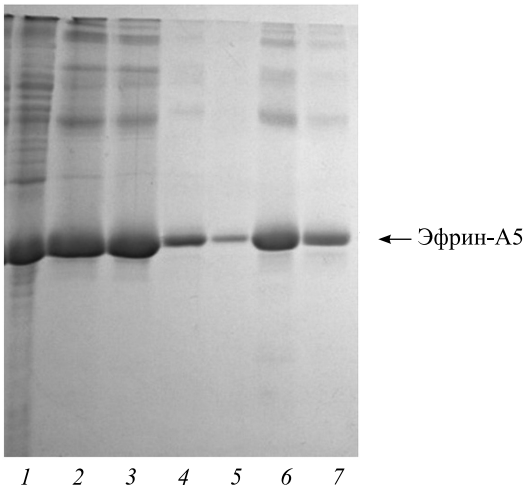


Рис. 4. Масштабирование процесса очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5.
Эфрин-А5 на стадиях: *1* – солюбилизации ТВ; *2* – элюции с Ni-сефарозы; *3* – гель-фильтрации;
4 – в рефолдинг-буфере; *5* – проскока с IMAC; *6* – рефолдинга и элюции с Ni-сефарозы (фракция 1);
7 – рефолдинга и элюции с Ni-сефарозы (фракция 2).
ДСН-электрофорез в 12,5 % ПААГ, окраска CBB R-250

Fig. 4. Scaling up recombinant ephrin-A5 purification and refolding process.
Ephrin-A5: *1* – inclusion bodies solubilazate; *2* – Ni-sepharose FF elution; *3* – gel-filtratio;
4 – in refolding buffer; *5* – Ni-sepharose FF flowthrough;
6 – Ni-sepharose FF elution after refolding (fraction 1); *7* – Ni-sepharose FF elution after refolding (fraction 2).
12.5 % SDS-PAGE, CBB R-250 staining

Таким образом, в результате проверки эффективности действия различных композиций буфера для рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 выбрана следующая система: 20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,05 моль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT; 50 ммоль/л NaCl с конечной концентрацией эфрина-А5 до 200 мкг/мл.

В результате оптимизации условий отмывки и солюбилизации ТВ были установлены составы растворов, содержащие 50 ммоль/л NaCl; 50 ммоль/л трис и 50 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 8 моль/л мочевины; 5 ммоль/л BME; 0,5 моль/л NaCl соответственно и позволяющие наиболее полно избавиться от примесных соединений небелковой природы (нуклеиновых кислот) с наименьшими потерями целевого белка, а также провести полную экстракцию целевого белка из растворенных ТВ. При концентрировании и очистке рекомбинантного эфрина-А5 из солюбилизата ТВ с применением металл-хелатной хроматографии на Ni-сефарозе удалось получить целевой продукт с чистотой 70,3 ± 7,4 % перед проведением рефолдинга. На основе скрининга главных характеристик рефолдинг-буфера для ренатурации рекомбинантного эфрина-А5 была выбрана следующая система: 20 ммоль/л трис-HCl; pH 8; 0,05 моль/л сахарозы; 2,5 ммоль/л DTT; 50 ммоль/л NaCl с конечной концентрацией эфрина-А5 в ренатурирующей системе до 200 мкг/мл и разведением в 10 раз.

Таким образом, на завершающем этапе данной методики удалось получить ренатурированный рекомбинантный эфрин-А5 в мономерной форме и гомогенном состоянии.

Библиографические ссылки

1. *Charmsaz S., Boyd A. W.* Expression and function of the Eph receptor family in leukemia and hematopoietic malignancies: prospects for targeted therapies // J. Leuk. 2013. Vol. 1, issue 1. P. 1–9.

2. *Himanen J.-P., Nikolov D.* Eph receptors and ephrins // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2003. Vol. 35, № 5. P. 130–134.

3. *Pasquale E. B.* Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond // Nat. Rev. Cancer. 2010. Vol. 10, № 3. P. 165–180.

4. *Janes P. W., Adikari S., Lackmann M.* Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development // Curr. Cancer Drug Targets. 2008. Vol. 8, issue 6. P. 473–479.

5. *Zozulya S. A., Udovichenko I. P.* Eph family receptors as therapeutic targets // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. Vol. 38, issue 3. P. 231–242.

6. *Guise A. D., West S. M., Chaudhuri J. B.* Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies // Mol. Biotechnol. 1996. Vol. 6, issue 1. P. 53–64.

7. *Peterson G. L.* Determination of total protein // Methods Enzymol. 1983. № 91. P. 95–119.

8. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. № 227. P. 680–685.

9. *Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H.* Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane // Biochemistry. 1971. Vol. 10, № 13. P. 2606–2617.

10. *Damerval C., Le Guilloux M., Blaisonneau J., et al.* A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins // Electrophoresis. 1987. Vol. 8, issue 3. P. 158–159.

11. *Georgiou G., Valax P.* Isolating inclusion bodies from bacteria // Methods Enzymol. 1999. № 309. P. 48–58.

12. *Lilie H., Schwarz E., Rudolph R.* Advances in refolding of proteins produced in *E. coli* // Curr. Opin. Biotechnol. 1998. Vol. 9, issue 5. P. 497–501.

13. *Misawa S., Kumagai I.* Refolding of therapeutic proteins produced in Escherichia coli as inclusion bodies // Biopolymers-Peptide Sci. 1999. Vol. 51, issue 4. P. 297–307.

14. *Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., et al.* Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies // Protein Exp. Purif. 2003. Vol. 28, issue 1. P. 1–8.

15. *Vallejo L. F., Rinas U.* Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins // Microb. Cell Fact. 2004. Vol. 3. P. 11–22.

16. *Middelberg A. P.* Preparative protein refolding // Trends Biotechnol. 2002. Vol. 20, issue 10. P. 437–443.

References

1. Charmsaz S., Boyd A. W. Expression and function of the Eph receptor family in leukemia and hematopoietic malignancies: prospects for targeted therapies. *J. Leuk*. 2013. Vol. 1, issue 1. P. 1–9. DOI: 10.4172/2329-6917.1000107.

2. Himanen J.-P., Nikolov D. Eph receptors and ephrins. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2003. Vol. 35, No. 5. P. 130–134. DOI: 10.1038/nrc2806.

3. Pasquale E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. *Nat. Rev. Cancer*. 2010. Vol. 10, No. 3. P. 165–180.

4. Janes P. W., Adikari S., Lackmann M. Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development. *Curr. Cancer Drug Targets*. 2008. Vol. 8, issue 6. P. 473–479. DOI: 10.2174/156800908785699315.

5. Zozulya S. A., Udovichenko I. P. Eph family receptors as therapeutic targets. *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2012. Vol. 38, issue 3. P. 231–242. DOI: 10.1134/S106816201203017X.

6. Guise A. D., West S. M., Chaudhuri J. B. Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Mol. Biotechnol*. 1996. Vol. 6, issue 1. P. 53–64. DOI: 10.1007/BF02762323.

7. Peterson G. L. Determination of total protein. *Methods Enzymol*. 1983. No. 91. P. 95–119.

8. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. No. 227. P. 680–685.

9. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 1971. Vol. 10, No. 13. P. 2606–2617. DOI: 10.1021/bi00789a030.

10. Damerval C., Le Guilloux M., Blaisonneau J., et al. A simplification of Heukeshoven and Dernick's silver staining of proteins. *Electrophoresis*. 1987. Vol. 8, issue 3. P. 158–159. DOI: 10.1002/elps.1150080308.

11. Georgiou G., Valax P. Isolating inclusion bodies from bacteria. *Methods Enzymol*. 1999. No. 309. P. 48–58.

12. Lilie H., Schwarz E., Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol*. 1998. Vol. 9, issue 5. P. 497–501.

13. Misawa S., Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in Escherichia coli as inclusion bodies. *Biopolymers-Peptide Sci.* 1999. Vol. 51, issue 4. P. 297–307. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0282(1999)51:4<297::AID-BIP5>3.0.CO;2-I.

14. Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Exp. Purif*. 2003. Vol. 28, issue 1. P. 1–8.

15. Vallejo L. F., Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact*. 2004. Vol. 3. P. 11–22. DOI: 10.1186/1475-2859-3-11.

16. Middelberg A. P. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol*. 2002. Vol. 20, issue 10. P. 437–443.

Статья поступила в редколлегию 15.05.2017.
Received by editorial board 15.05.2017.

УДК 577.15

КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛАКТОПЕРОКСИДАЗЫ СЫВОРОТКИ МОЛОКА КОРОВЫ

Е. Ю. КОХАНОВСКАЯ [1)]***, И. В. СЕМАК*** [2)]

[1)]*Белорусский государственный медицинский университет, пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

Выявлены кинетические параметры окисления естественных субстратов лактопероксидазы сыворотки молока коровы. Установлена зависимость начальных скоростей окисления естественных субстратов лактопероксидазы молока коровы от значения pH и концентрации фермента. Определены оптимум pH для окисления естественных субстратов лактопероксидазы (тиоцианат-, бромид- и иодид-ионы) и кинетические характеристики фермента. Обнаружено, что лактопероксидаза молока коровы при окислении естественных субстратов характеризуется сходными с другими пероксидазами оптимумом pH и кинетическими параметрами. На основе сравнения константы Михаэлиса, а также с учетом содержания анионов в биологических жидкостях сделан вывод о том, что наиболее предпочтительным субстратом лактопероксидазы молока коровы является тиоцианат-ион. Полученные результаты могут быть использованы для сравнительного анализа кинетических свойств лактопероксидаз разных видов животных, а также для контроля качества при производстве продуктов питания и косметических препаратов, содержащих лактопероксидазу в качестве одного из активных компонентов.

Ключевые слова: лактопероксидаза; сыворотка молока; субстратная специфичность; константа Михаэлиса; каталитическая константа.

KINETIC STUDIES OF COW MILK LACTOPEROXIDASE

K. Y. KAKHANOUSKAYA [a]***, I. V. SEMAK*** [b]

[a]*Belarusian State Medical University, Dziaržynskaha Avenue, 83, 220116, Minsk, Belarus*
[b]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*
Corresponding author: K. Y. Kakhanouskaya (e.kohanovskaya@gmail.com)

The kinetic parameters of oxidation of natural substrates of lactoperoxidase of cow's milk whey were obtained. The correlation between the initial substrate oxidation velocity and pH and enzyme concentration were characterized and kinetic parameters of cow milk lactoperoxidase were determined. Cow's milk lactoperoxidase is characterized by similar optimum pH and kinetic parameters with regard to the oxidation of natural substrates by other peroxidases. The substrate specificity data analysis indicated that the most prefered substrate of cow's milk lactoperoxidase is SCN^-. The results can be used for comparative analysis of lactoperoxidase kinetic properties of different animal species, as well as for quality control in the manufacture of lactoperoxidase-containing foods and cosmetics.

Key words: lactoperoxidase; milk whey; substrate specificity; the Michaelis constant; the catalytic constant.

Образец цитирования:
Кохановская Е. Ю., Семак И. В. Кинетический анализ лактопероксидазы сыворотки молока коровы // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 66–71.

For citation:
Kakhanouskaya K. Y., Semak I. V. Kinetic studies of cow milk lactoperoxidase. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 66–71 (in Russ.).

Авторы:
Екатерина Юрьевна Кохановская – преподаватель кафедры общей химии факультета профориентации и довузовской подготовки.
Игорь Викторович Семак – кандидат биологических наук, доцент; заведующий кафедрой биохимии биологического факультета.

Authors:
Katsiaryna Kakhanouskaya, lecturer at the department of general chemistry, faculty of career quidance and pre-university training.
e.kohanovskaya@gmail.com
Igor Semak, PhD (biology), docent; head of the department of biochemistry, faculty of biology.
semak@bsu.by

Введение

Лактопероксидаза (ЛПО) – фермент молока, слюны и других биологических жидкостей, имеющий изоэлектрическую точку, равную 9,6, и молекулярную массу около 74 кДа. В естественных условиях ЛПО защищает дыхательные пути, предохраняет молочные железы во время лактации, а также пищеварительный тракт новорожденных от патогенных микроорганизмов [1].

Свои функции лактопероксидаза осуществляет как ЛПО-система (непосредственно фермент, тиоцианат, пероксид водорода). Тиоцианат-ион широко представлен в тканях и секретах животных. Его концентрация в секретах зависит от вида животного [2]. Пероксид водорода, необходимый для работы ЛПО-системы, образуется эндогенно полиморфно-ядерными лейкоцитами в процессе фагоцитоза или продуцируется некоторыми микроорганизмами (*Lactobacillus, Streptococcus* и *Lactococcus*) в аэробных условиях [3; 4]. Помимо этого, пероксид водорода может продуцироваться H_2O_2-генерирующими системами при окислении аскорбиновой кислоты, при окислении глюкозы – глюкозоксидазой, гипоксантина – ксантиноксидазой, а также при магний-зависимом окислении восстановленных пиридиновых нуклеотидов [4].

Первичный продукт реакции – гипотиоцианат – реагирует с тиоловыми группами белков, инактивируя ключевые ферменты микроорганизмов [1].

Благодаря антимикробным свойствам ЛПО имеет широкий спектр применения. Активированную ЛПО-систему можно использовать как бактериостатический агент в молочных продуктах питания, препаратах для лечения инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных, в медицине (офтальмология, стоматология, проктология, гинекология, хирургия), а также в пищевой и косметологической промышленности для увеличения сроков хранения продукции [1].

На данном этапе интерес к использованию лактопероксидазы значительно возрос, однако ее кинетические особенности ранее систематически не исследовались. Цель настоящей работы – изучить кинетические параметры ЛПО молока коровы при окислении естественных субстратов и определить субстратную специфичность этого фермента.

Методы исследования

Начальную скорость окисления естественных субстратов определяли в области линейной зависимости изменения оптической плотности (ОП) во времени, варьируя величину pH раствора (3,8–8,0), тип буферной системы (цитратно-фосфатный буферный раствор – ЦФР, цитратный буферный раствор – ЦБР, ацетатный буферный раствор – АЦБ, фосфатный буферный раствор – ФБР), концентрацию ЛПО сыворотки молока коровы и естественных субстратов, а также пероксида водорода.

Кинетические параметры определяли в оптимуме pH. Окисление TNB (5,5’-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), меркаптоэтанол) фиксировали в течение 20 с после добавления H_2O_2 по уменьшению ОП раствора при длине волны 412 нм (при окислении тиоцианат- и бромид-ионов) и по увеличению ОП при длине волны 353 нм (при окислении иодид-ионов). Полученные значения были скорректированы с учетом контроля при окислении TNB в DTNB в отсутствие галогенид- или псевдогалогенид-ионов [5; 6].

Зависимость начальной скорости реакции от концентрации фермента и субстратов выявляли при оптимуме pH и оптимальной концентрации пероксида водорода, установленной опытным путем. Кинетические параметры определяли методами Лайнуивера – Берка и Эдди – Хофсти. Пероксидазную активность оценивали спектрофотометрически на спектрофотометре Solar PV 1251. Активность фермента выражали в международных единицах (МЕ).

Для всех прямых были приняты пороги значимости 95 % и выше. Каждая точка на графиках является усредненным значением, зафиксированным по итогам трех-шести экспериментов. Результаты на графиках представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ первичных данных проводился при помощи программы Statistica 7.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Лактопероксидаза молока коровы способна окислять различные соединения. К естественным субстратам ЛПО относят тиоцианат-, бромид- и иодид-ионы (SCN^-, Br^- и I^- соответственно). Некоторые авторы установили также окисление хлорид-ионов. В естественных условиях наиболее предпочтительным субстратом является SCN^-, поскольку в биологических жидкостях (слюна, молоко, слеза и пр.) концентрация этого иона, по сравнению с другими субстратами, наибольшая, что обеспечивает достаточную скорость пероксидазной реакции для формирования противомикробных соединений широкого спектра действия [1].

В целях определения кинетических параметров окисления каждого субстрата была установлена зависимость скорости окисления субстратов от концентрации фермента, второго субстрата (пероксид водорода) и значения pH.

При окислении субстрата лактопероксидазой наблюдается прямопропорциональная зависимость скорости окисления субстрата от содержания ЛПО при концентрации фермента 0,1–0,6 нмоль/л (рис. 1). В случае более высокой концентрации скорость реакции возрастает непропорционально концентрации ЛПО.

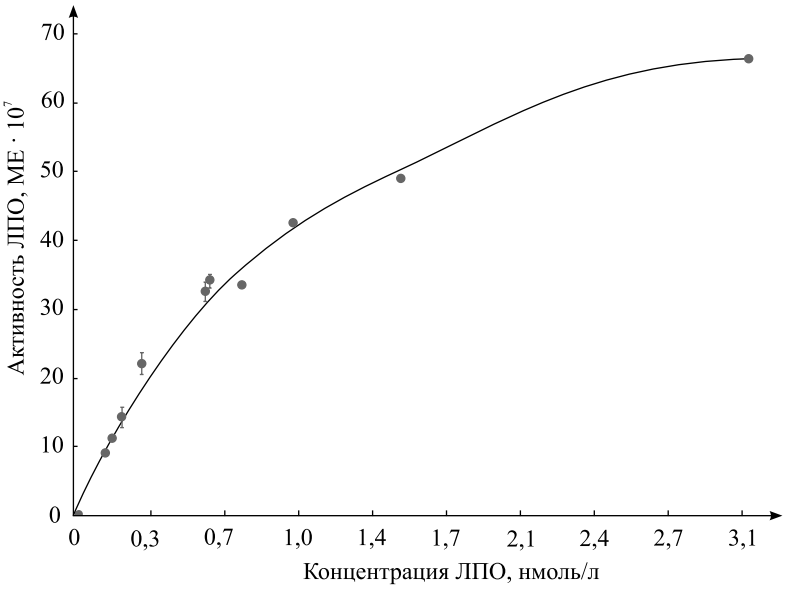


Рис. 1. Зависимость скорости окисления субстрата (концентрация I^- составляет 4,3 ммоль/л) от концентрации ЛПО молока коровы

Fig. 1. Dependence of the oxidation rate of the substrate (I^- concentration is 4.3 mmol/l) on the concentration of cow's milk lactoperoxidase

Для ЛПО молока козы характерна сходная зависимость. Например, при окислении лактопероксидазой молока козы I^- пропорциональное увеличение скорости окисления этого иона также наблюдается при малой концентрации фермента [7].

На скорость окисления естественных субстратов влияет и концентрация второго субстрата пероксидазы – пероксида водорода. При его недостаточной концентрации не будут соблюдены условия, необходимые для определения кинетических параметров, однако в случае превышения оптимальной концентрации пероксида водорода уже в два раза начнется ингибирование фермента. Установлено, что наибольшая скорость окисления субстрата наблюдается при концентрации пероксида водорода 0,04–0,05 ммоль/л (рис. 2), причем начиная с концентрации 0,07 ммоль/л и более скорость реакции резко снижается. Это объясняется ингибированием фермента избытком второго субстрата.

Активность ЛПО зависит также от типа буферной системы. Нами была исследована скорость окисления субстрата в различных буферных системах при разных значениях pH: АЦБ и ЦФР – 5,0; ЦФР, ЦБР и ФБР – 5,8 (рис. 3).

Установлено, что ЛПО молока коровы проявляет наибольшую активность в ацетатном и цитратном буферах при одинаковых значениях pH.

Кроме того, определен оптимальный диапазон pH для каждого из естественных субстратов при их окислении ЛПО (см. таблицу). При окислении Br^- и SCN^- оптимум pH находится в диапазоне от 4,8 до 5,0; при окислении I^- – между 4,4 и 6,4. Результаты экспериментов согласуются с полученными ранее данными относительно ЛПО молока козы [7] и с данными других авторов относительно пероксидаз иных видов животных [5; 6]. Оптимальный диапазон pH для ЛПО молока козы в реакции окисления I^- также является более широким, чем при окислении других субстратов (от 4,0 до 6,2), в то время как для SCN^- и Br^- оптимум pH находится в диапазоне от 4,6 до 5,6. Сходный оптимум pH при окислении естественных субстратов наблюдается для пероксидазы слюнных желез овцы: Br^- – 5,0; SCN^- – 5,25; I^- – 5,5.

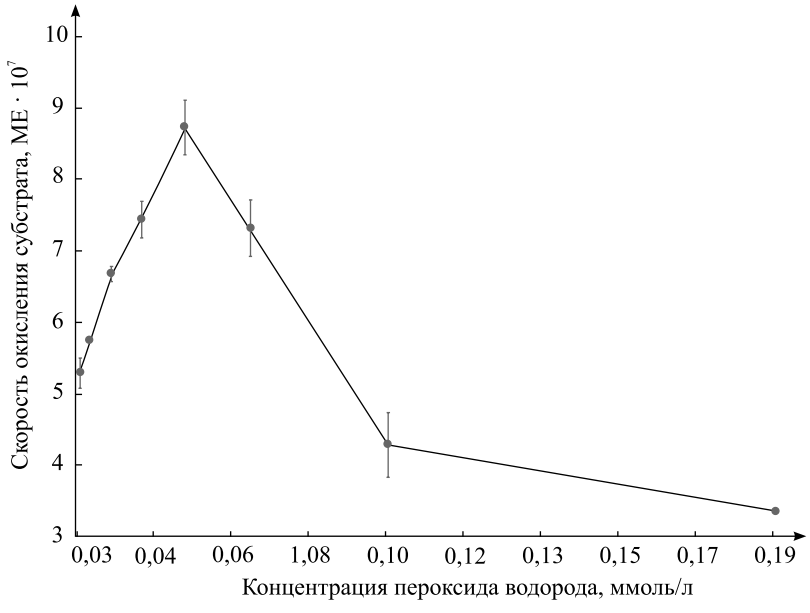


Рис. 2. Зависимость скорости окисления субстрата (концентрация I^- составляет 4 ммоль/л) ЛПО молока коровы от концентрации пероксида водорода (концентрация ЛПО достигает 8,8 нмоль/л)

Fig. 2. Dependence of the oxidation rate of the substrate (I^- concentration is 4 mmol/l) of the cow's LPO on the concentration of hydrogen peroxide (concentration of LPO is 8.8 nmol/l)

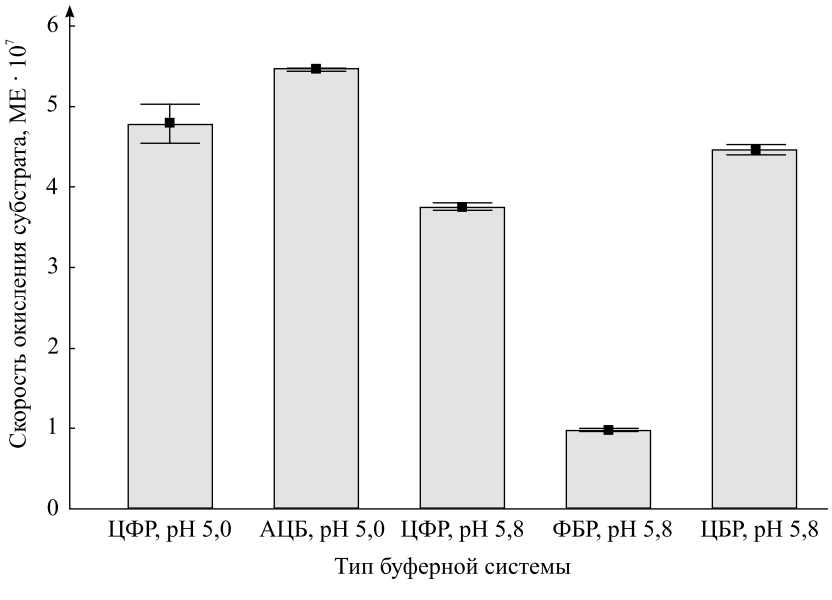


Рис. 3. Активность ЛПО молока коровы в различных буферных системах:
концентрация I^- составляет 12 ммоль/л, ЛПО – 0,3 нмоль/л, пероксида водорода – 0,05 ммоль/л

Fig. 3. Activity of cow's milk LPO in various buffer systems:
concentration of I^- is 12 mmol/l, concentration of LPO is 0.3 nmol/l, hydrogen peroxide concentration is 0.05 mmol/l

Для определения константы Михаэлиса ($К_М$), каталитической константы ($К_{кат}$) и их соотношения использовали установленные в ходе предыдущих экспериментов оптимальные значения pH, концентраций фермента и пероксида водорода.

Константа Михаэлиса для ЛПО коровы при окислении SCN^- составляет 0,36 ммоль/л, что соответствует значению $К_М$ для пероксидазы слюнных желез овцы (0,43 ммоль/л) [6]. Наиболее эффективно окисление данного иона происходит при участии ЛПО молока козы [7] и рекомбинантной эозинофильной пероксидазы человека [6]. Константа Михаэлиса ЛПО молока коровы при окислении Br^- составляет 2,66 ммоль/л, что сравнимо с $К_М$ ЛПО козы при окислении Br^- (2,1 ммоль/л) и незначительно

превышает значение K_M при окислении Br^- пероксидазой слюнных желез овцы (1,8 ммоль/л) [6]. Значения K_M при окислении I^- ЛПО молока коровы в целом соответствуют показателям K_M для ЛПО молока козы [7] и пероксидазы слюнных желез овцы [6].

Кинетические параметры ЛПО молока коровы при окислении естественных субстратов

Kinetic parameters of cow's milk LPO during the oxidation of natural substrates

Параметры	Субстрат		
	Br^-	I^-	SCN^-
Оптимум pH	4,6–5,6	4,4–6,4	4,8–5,0
K_M, ммоль/л	2,66	1,28	0,36
$K_{кат}$, $с^{-1}$	0,66	4,57	0,57
$K_{кат}/K_M$, л/(моль · с)	$2{,}48 \cdot 10^2$	$3{,}57 \cdot 10^3$	$1{,}58 \cdot 10^3$

Таким образом, окисление SCN^- характеризуется наименьшим значением K_M (см. таблицу), в то время как значения K_M для других естественных субстратов (Br^-, I^-) выше. Следовательно, SCN^- является наиболее предпочтительным естественным субстратом для ЛПО молока коровы.

Каталитическая константа при окислении Br^- для ЛПО молока коровы (0,66 $с^{-1}$) соответствует значениям $K_{кат}$ для ЛПО молока козы и рекомбинантной эозинофильной пероксидазы человека (0,72 $с^{-1}$ и 0,46 $с^{-1}$ соответственно) [5; 7]. Таким образом, ЛПО молока козы и коровы, а также эозинофильная пероксидаза человека со сходной эффективностью катализируют окисление Br^-.

Сопоставив значения $K_{кат}$ для ЛПО молока коровы (4,57 $с^{-1}$) и козы (1,78 $с^{-1}$) при окислении I^-, можно сделать вывод о том, что эти ферменты со сравнимой скоростью катализируют окисление данного субстрата. Более высокое значение $K_{кат}$ при окислении I^- по сравнению с другими естественными субстратами объясняется тем, что для установления кинетических параметров использовались разные методики определения активности фермента.

Соотношение $K_{кат}/K_M$ для Br^- и I^- при их окислении ЛПО молока коровы соответствует аналогичному соотношению для ЛПО молока козы, однако для SCN^- наблюдается различие как по значению $K_{кат}/K_M$ ($1{,}5 \cdot 10^5$ л/(моль · с) для ЛПО молока козы [7] и $1{,}58 \cdot 10^3$ л/(моль · с) для ЛПО молока коровы), так и по значению $K_{кат}$ (12,5 $с^{-1}$ для ЛПО молока козы и 0,57 $с^{-1}$ для ЛПО молока коровы). Подобные отличия в кинетических характеристиках ферментов могут быть связаны с различиями в первичной структуре ЛПО разных видов животных, а также с особенностями посттрансляционных модификаций молекул фермента в клетках разных организмов.

Заключение

Лактопероксидаза молока коровы при окислении естественных субстратов характеризуется сходными с другими пероксидазами оптимумом pH и кинетическими параметрами. При анализе субстратной специфичности было установлено, что наиболее вероятным субстратом ЛПО молока коровы является SCN^-.

Результаты кинетических исследований ЛПО молока коровы можно использовать для сравнительного анализа свойств лактопероксидаз разных видов животных, что будет способствовать разработке и внедрению новых способов применения этих ферментов в пищевой и фармацевтической промышленности, а также для контроля качества при производстве продуктов питания и косметических препаратов, содержащих ЛПО.

Библиографические ссылки

1. *Kussendrager K. D., Van Hooijdonk A. C.* Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications // B. J. Nutr. 2000. Vol. 84, suppl. 1. P. 19–25.

2. *De Wit J. N., Van Hooydonk A. C. M.* Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems // Neth. Milk Dairy J. 1996. Vol. 50. P. 227–244.

3. *Thomas E. L., Milligan T. W., Joyner R. E., et al*. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci // Infect. Immun. 1994. Vol. 62, issue 2. P. 529–535.

4. *Wolfson L. M., Sumner S. S.* Antibacterial activity of the lactoperoxidase system : a review // J. Food Prot. 1993. Vol. 56, № 10. P. 887–892.

5. *Ciaccio C., Cambacurta A., De Sanctis G., et al.* rhEPO (recombinant human eosinophil peroxidase): expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization // Biochem. J. 2006. Vol. 395, part 2. P. 295–301.

6. *Mazumdai A., Chatterjee R., Adak S., et al.* Characterization of sheep lacrimal-gland peroxidase and its major physiological electron donor // Biochem. J. 1996. Vol. 314. P. 413–419.

7. *Кохановская Е. Ю., Семак И. В.* Кинетический анализ лактопероксидазы сыворотки молока козы // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2015. № 2. С. 83–87.

References

1. Kussendrager K. D., Van Hooijdonk A. C. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *B. J. Nutr.* 2000. Vol. 84, suppl. 1. P. 19–25.

2. De Wit J. N., Van Hooydonk A. C. M. Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.* 1996. Vol. 50. P. 227–244.

3. Thomas E. L., Milligan T. W., Joyner R. E., et al. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infect. Immun.* 1994. Vol. 62, issue 2. P. 529–535.

4. Wolfson L. M., Sumner S. S. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system : a review. *J. Food Prot.* 1993. Vol. 56, No. 10. P. 887–892. DOI: 10.4315/0362-028X-56.10.887.

5. Ciaccio C., Cambacurta A., De Sanctis G., et al. rhEPO (recombinant human eosinophil peroxidase): expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization. *Biochem. J.* 2006. Vol. 395, part 2. P. 295–301. DOI: 10.1042/BJ20051385.

6. Mazumdai A., Chatterjee R., Adak S., et al. Characterization of sheep lacrimal-gland peroxidase and its major physiological electron donor. *Biochem. J.* 1996. Vol. 314. P. 413–419.

7. Kakhanouskaya K. Y., Semak I. V. Kinetic studies of goat milk lactoperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Biol. ser*. 2015. No. 2. P. 83–87 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 17.04.2017.
Received by editorial board 17.04.2017.

УДК 577.11:577.15:577.18

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ БИОХИМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС В МОДЕЛЯХ ДОКСИЦИКЛИНОВОГО ХОЛЕСТАЗА И АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА

Н. М. ОРЁЛ[1)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

Экспериментально установлено, что рекомбинантный лактоферрин при введении в течение пяти дней в дозе 40 мг/кг в сутки не изменяет показателей активности аминотрансфераз, ферментов антиоксидантной защиты и интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Полученные данные предполагают, что его поступление в интактный организм является практически безвредным. На модели экспериментального инсулинзависимого сахарного диабета обнаружено, что лактоферрин в исследованных дозах нормализует активность каталазы, ослабляет сдвиги активности аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови, супероксиддисмутазы и процессов перекисного окисления липидов в печени и почках крыс, развивающиеся при введении аллоксана однократно в дозе 150 мг/кг. В серии опытов определено, что лактоферрин способен достоверно уменьшать негативные изменения активности аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы, ферментов антиоксидантной защиты, процессов перекисного окисления липидов и липидного обмена у крыс с экспериментальным холестазом, индуцированным введением доксициклина в дозе 540 мг/кг массы животного в сутки в течение пяти дней.

Ключевые слова: лактоферрин; экспериментальный холестаз; экспериментальный сахарный диабет; ферменты; перекисное окисление липидов.

THE EFFECTIVENESS OF THE USE OF RECOMBINANT LACTOFERRIN FOR CORRECTING BIOCHEMICAL IRREGULARITIES IN RATS WITH EXPERIMENTAL DOXYCYCLINE-INDUCED CHOLESTASIS AND ALLOXAN MODEL OF DIABETES

N. M. ORYOL[a]

[a]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*

It is experimentally shown that recombinant lactoferrin, when administered for 5 days in a dose of 40 mg/kg, does not change the activity index of aminotransferases, the enzymes of antioxidant defense, and the intensity of lipid peroxidation processes. The data suggest that its entry into an intact organism is practically harmless. Using the model of an experimental insulin dependent diabetes mellitus, it is established that lactoferrin in the studied doses normalizes the catalase activity, weakens the shifts in activity of aspartate aminotransferase in the blood serum, superoxide dismutase and lipid peroxidation processes in the liver and kidneys of rats, which develop with the administration of alloxan in a single dose of 150 mg/kg. In the next series of experiments, it was determined that lactoferrin is able to reliably decrease

Образец цитирования:
Орёл Н. М. Эффективность использования рекомбинантного лактоферрина для коррекции биохимических нарушений у крыс в моделях доксициклинового холестаза и аллоксанового диабета // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 72–79.

For citation:
Oryol N. M. The effectiveness of the use of recombinant lactoferrin for correcting biochemical irregularities in rats with experimental doxycycline-induced cholestasis and alloxan model of diabetes. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 72–79 (in Russ.).

Автор:
Наталия Михайловна Орёл – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Author:
Nataliya Oryol, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.
oryoln47@tut.by

the negative changes in the activity of aminotransferases, lactate dehydrogenase, the enzymes of antioxidant defense, the processes of lipid peroxidation and lipid metabolism in rats with experimental cholestasis induced by administration of doxycycline for 5 days in a dose of 540 mg/kg of animal weight.

Key words: lactoferrin; experimental cholestasis; an experimental diabetes mellitus; enzymes; lipid peroxidation.

Поиск веществ, защищающих органы и ткани от повреждающего воздействия экзо- или эндогенных факторов и ускоряющих их нормализацию, относится к приоритетным направлениям исследований. Лактоферрин (ЛФ, или лактотрансферрин) – негемовый железосвязывающий глобулярный гликопротеин, содержащийся преимущественно в молоке, сыворотке крови и многих экзокринных секретах, – уникален благодаря своей исключительной полифункциональности и регуляторным свойствам. Помимо транспорта железа в клетки и контроля над его уровнем ЛФ характеризуется антибактериальной, противовирусной, противогрибковой, противовоспалительной и антиоксидантной активностью, участвует в регуляции роста и дифференцировке клеток, стимулирует синтез ДНК, способен взаимодействовать с ДНК, РНК, белками и полисахаридами, обладает свойствами пиримидин-специфических секреторных рибонуклеаз и является фактором транскрипции. Проведенные исследования показали большой терапевтический потенциал ЛФ, заключающийся в поддержании гомеостаза железа, лечении малокровия и инфекционных заболеваний, препятствии развитию и метастазированию опухолей и др. [1–10].

Несмотря на растущее количество публикаций, посвященных функциональным и терапевтическим свойствам ЛФ, объективная оценка возможности его применения для нормализации нарушений метаболизма аминокислот, углеводов, липидов, состояния антиоксидантной защиты и процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), лежащих в основе развития многих патологий, практически отсутствует.

Целью настоящего исследования является изучение эффективности использования ЛФ для коррекции изменений ключевых биохимических показателей метаболизма у крыс с доксициклин-индуцированным холестазом и аллоксановым сахарным диабетом.

Материалы и методы исследования

Эксперименты выполнены на самцах беспородных половозрелых белых крыс массой 160–200 г, находившихся на стандартном рационе вивария. Все опыты проводили в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами выполнения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях, обоснованными рекомендациями и требованиями Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

В качестве биологически активного природного соединения был взят рекомбинантный человеческий ЛФ, выделенный из молока трансгенных коз. Для исследования его действия на биохимические показатели крыс с доксициклин-индуцированным холестазом и аллоксановым сахарным диабетом были проведены следующие серии опытов:

1) на животных с внутрипеченочным холестазом. Для создания модели крысам вводили доксициклин (антибиотик тетрациклинового ряда) зондом внутрь желудка в течение пяти дней в дозе 540 мг/кг массы в сутки (суммарно – 2,7 г) [11; 12];

2) на животных с инсулинзависимым сахарным диабетом. Для создания модели крысам однократно вводили аллоксан тетрагидрат внутримышечно в дозе 150 мг/кг массы [13]. Развитие диабета контролировали путем определения содержания глюкозы в сыворотке крови. На шестые сутки ее концентрация повышалась в среднем на 230 %;

3) на животных, которым вводили ЛФ в дозе 40 мг/кг массы в сутки в течение пяти дней (суммарно – 0,2 г);

4) на животных, которым внутрижелудочно вводили доксициклин в дозе 540 мг/кг в сутки в сочетании с ЛФ в дозе 40 мг/кг в сутки в течение пяти дней;

5) на животных, которым однократно вводили аллоксан в дозе 150 мг/кг, а затем в течение последующих пяти дней – ЛФ в дозе 40 мг/кг массы в сутки.

Опыт с крысами проводили на шестые сутки после воздействий. Контролем служили интактные животные.

Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), концентрации ацилглицеролов (Аг) в сыворотке крови и холестерола (Хл) в сыворотке крови, печени и почках определяли с помощью наборов реактивов НТПК «Анализ-Х». Уровень липопротеинов высокой плотности (ЛПВП, α-Хл) исследовали в сыворотке крови после осаждения липопротеинов низкой и очень низкой плотности (ЛПНП и ЛПОНП соответственно) гепарином в присутствии ионов марганца [14]. Активность супероксиддисмутазы (СОД) [15], каталазы (Кат) [16],

малонового диальдегида (МДА) [17] оценивали в печени и почках крыс. Концентрацию белка измеряли методами, описанными в [18; 19]. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента [20].

Результаты исследования и их обсуждение

Внутрипеченочный холестаз характеризуется нарушением образования и выделения желчи на уровне печеночной клетки и может возникать при воздействии различных факторов, в частности введении больших доз или длительном применении некоторых антибиотиков, нестероидных противовоспалительных средств, гормонов и др. [21; 22]. Биохимическим механизмом развития холестаза служит накопление в сыворотке крови веществ, в норме выводимых в желчь, что инициирует некроз гепатоцитов и канальцев и развитие печеночно-клеточной недостаточности. Важнейшая роль в этом процессе отводится как токсическим, так и нормальным желчным кислотам. Как показано в [27; 28], в результате повреждаются плазматические мембраны гепатоцитов и митохондрий, блокируется синтез АТФ, накапливается цитозольный кальций, повышается концентрация холестерола, ацилглицеролов, уровня аминотрансфераз, усиливаются свободнорадикальные процессы [22–26]. Для настоящего исследования выбрана модель доксициклин-индуцированного холестаза, апробированная в ранее проведенных экспериментах.

Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что внутрижелудочное введение крысам доксициклина в течение пяти дней в дозе 540 мг/кг сопровождается достоверным увеличением в сыворотке крови (см. рис. 1, *а*) активности АсАТ и АлАТ (более чем в 2,5 раза), ЛДГ (на 31,5 %), концентрации Аг (на 21,2 %), общего Хл и α-Хл (на 50,5 и 78,3 % соответственно) и содержания общего Хл в печени и почках. Вместе с тем в этих органах (см. рис. 1, *б* и *в*) в среднем в 2 раза повышается скорость реакций, катализируемых СОД и Кат. Однако их активности, вероятно, недостаточно для контроля над уровнем супероксидного радикала и пероксида водорода, поскольку при этом усиливаются процессы ПОЛ, о чем свидетельствует нарастание уровня МДА в печени и почках на 115,7 и 84,2 % соответственно.

Полученные в ходе эксперимента показатели активности ферментов переаминирования, содержания липидов в сыворотке крови (см. рис. 1, *а*), концентрации общего Хл, активности ферментов антиоксидантной защиты и интенсивности ПОЛ в печени и почках крыс (см. рис. 1, *б* и *в*) позволили установить, что введение рекомбинантного ЛФ в течение пяти дней в дозе 40 мг/кг массы достоверно не изменяет их значений по отношению к контролю. Зафиксировано лишь снижение активности ЛДГ в сыворотке крови. Эти результаты свидетельствуют о том, что ЛФ в указанных дозах не влияет на большинство исследованных параметров и его поступление в интактный организм практически безвредно.

По результатам опытов, полученным после введения доксициклина одновременно с ЛФ (см. рис. 1), выявлено, что лактоферрин существенно уменьшает сдвиги активности АсАТ (на 32,4 %), АлАТ (на 33 %) и ЛДГ (на 47 %), концентрацию общего Хл в сыворотке крови (на 19,8 %), общего Хл (на 12 и 17 %) и МДА (на 33,8 и 30,8 %), активность СОД (на 43,4 и 26,1 %) и Кат (на 21,1 и 19,4 %) в печени и почках по сравнению с аналогичными показателями, установленными у крыс с доксициклин-индуцированным холестазом. При этом содержание Аг, α-Хл в сыворотке крови, активность СОД в печени и Кат в почках нормализуются до контрольных значений. Таким образом, ЛФ существенно уменьшает уровень сдвигов исследуемых показателей в сыворотке крови, печени и почках крыс в модели внутрипеченочного доксициклинового холестаза.

Сахарный диабет 1-го типа, модель которого в настоящем эксперименте создавалась путем однократного внутримышечного введения аллоксана в дозе 150 мг/кг, связывают с аутоиммунным поражением инсулинобразующих клеток островков Лангерганса поджелудочной железы, приводящим к дистрофии этих клеток, сморщиванию самих островков и почти полному прекращению выработки инсулина [13; 29].

Как видно из результатов, представленных на рис. 2, *а*, введение крысам аллоксана в дозе 150 мг/кг повышает скорость реакций переаминирования АсАТ и АлАТ более чем в 2 раза, терминального этапа гликолиза, катализируемого ЛДГ, на 46,5 % и концентрацию Аг в сыворотке крови на 41,2 %. При развитии аллоксанового диабета концентрация ТБК-активных продуктов нарастает на 108,6 % в печени и на 47,1 % – в почках (см. рис. 2, *б* и *в*), активность СОД повышается более чем на 50 % в обеих исследованных тканях.

Анализ изменения показателей при развитии аллоксанового сахарного диабета и доксициклин-индуцированного холестаза выявил ряд особенностей. Это в первую очередь касается сдвигов активности аминотрансфераз, ЛДГ, ферментов антиоксидантной защиты, содержания Аг и МДА, которые соответственно исследованным органам совпадают по направленности, но отличаются количественно. Введение аллоксана не повышает уровень общего Хл и α-Хл в сыворотке крови и общего Хл в печени

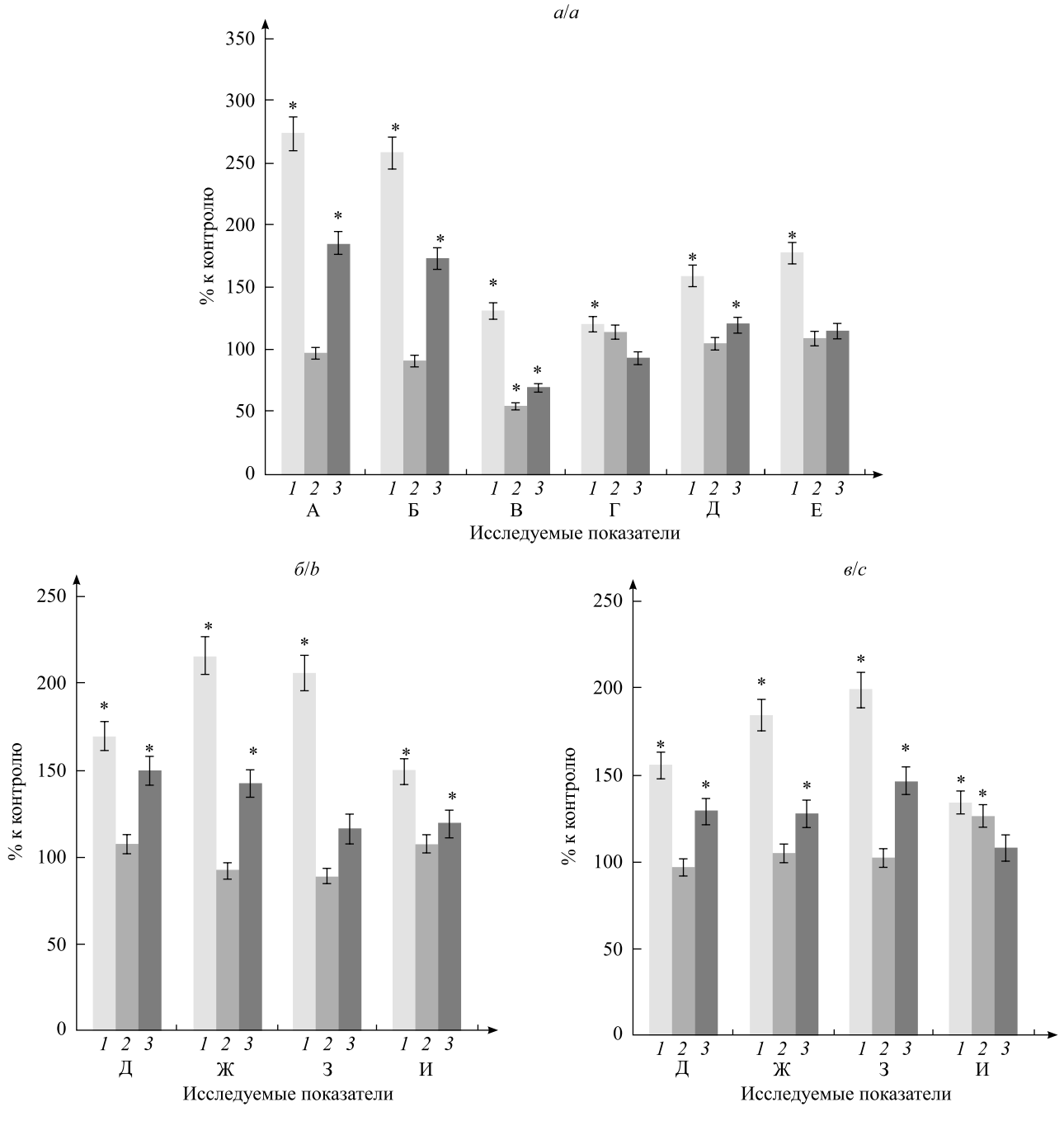


Рис. 1. Влияние лактоферрина на биохимические показатели в сыворотке крови (*а*), печени (*б*) и почках (*в*) крыс с доксициклиновым холестазом:
А – АсАТ; Б – АлАТ; В – ЛДГ; Г – Аг; Д – общий Хл; Е – α-Хл; Ж – МДА; З – СОД; И – Кат.
Введение препарата: *1* – доксициклина; *2* – лактоферрина; *3* – доксициклина и лактоферрина.
*Достоверные изменения при $P \leq 0{,}05$

Fig. 1. The effect of lactoferrin on biochemical parameters in blood serum (*a*), liver (*b*) and kidney (*c*) of rats with doxycycline cholestasis: А – AST; Б – ALT; В – LDH; Г – acylglycerol; Д – cholesterol; Е – HDL cholesterol; Ж – MDA; З – SOD; И – catalase.
Injection: *1* – doxycycline; *2* – lactoferrin; *3* – doxycycline and lactoferrin. *Significant changes when $P \leq 0.05$

и почках, что наблюдается при введении доксициклина, а активность Кат достоверно снижается на 61,1 и 32,4 % соответственно. В степени выраженности изменений прослеживаются тканевые различия.

Круг веществ, улучшающих функционирование инсулярного аппарата, достаточно большой. Прежде всего это биологически активные вещества различной природы с разнонаправленным воздействием на метаболические процессы (тиолы, витамины, аминокислоты, иммуномодуляторы, микроэлементы, растительные антиоксиданты полифенольной структуры и др.) [30–33]. Однако воздействие, которое ЛФ оказывает на процессы метаболизма в органах и тканях при сахарном диабете, практически не исследовалось.

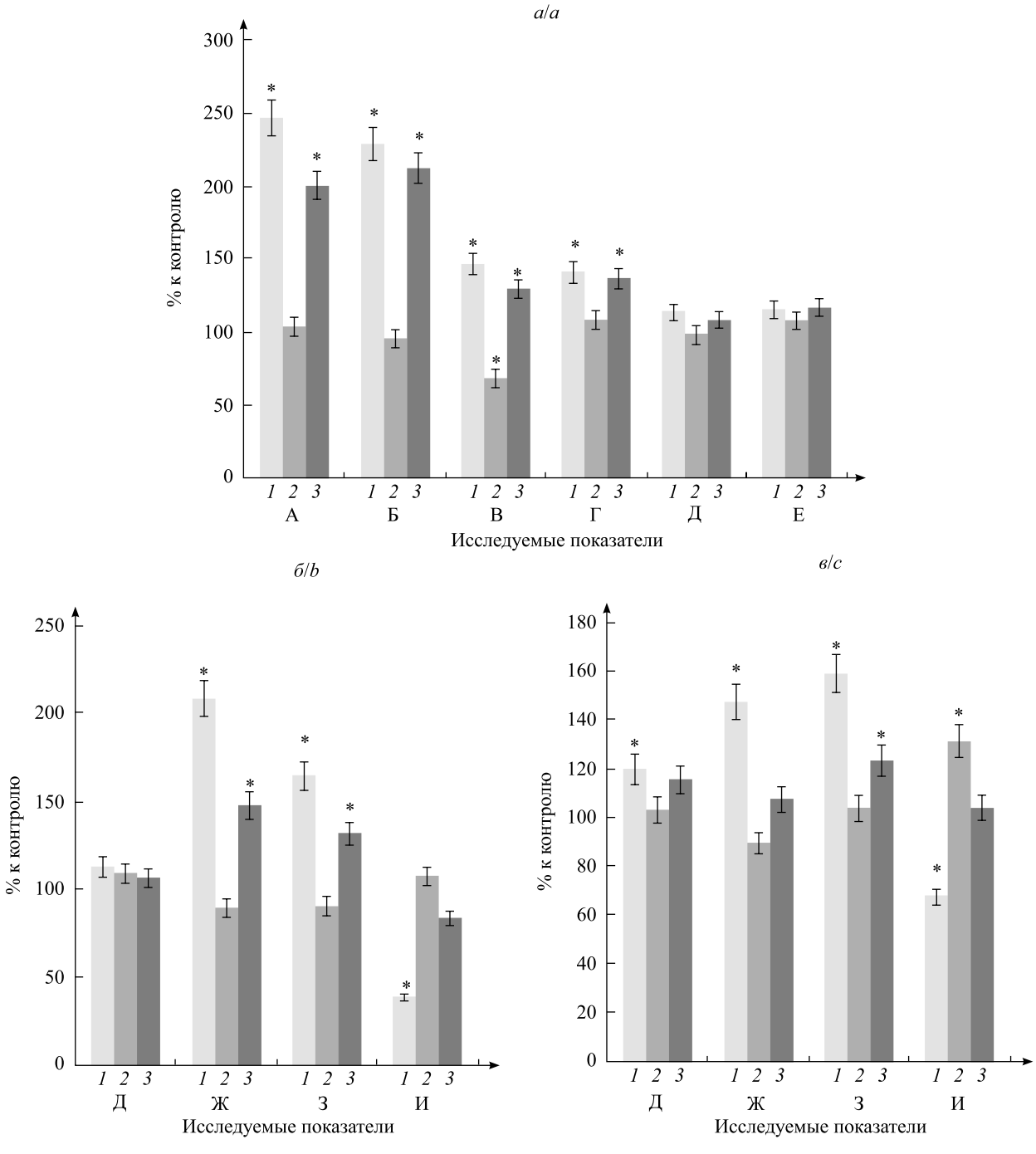


Рис. 2. Влияние лактоферрина на биохимические показатели в сыворотке крови (*а*), печени (*б*) и почках (*в*) крыс с аллоксановым сахарным диабетом:
А – АсАТ; Б – АлАТ; В – ЛДГ; Г – Аг; Д – общий Хл; Е – α-Хл; Ж – МДА; З – СОД; И – Кат.
Введение препарата: *1* – аллоксана; *2* – лактоферрина; *3* – аллоксана и лактоферрина.
*Достоверные изменения при $P \leq 0{,}05$

Fig. 2. The effect of lactoferrin on biochemical parameters in blood serum (*a*), liver (*b*) and kidney (*c*) of rats with alloxan induced diabetes: А – AST; Б – ALT; В – LDH; Г – acylglycerol; Д – cholesterol; Е – HDL cholesterol; Ж – MDA; З – SOD; И – catalase. Injection: *1* – alloxan; *2* – lactoferrin; *3* – alloxan and lactoferrin. *Significant changes when $P \leq 0.05$

Показатели, полученные при введении рекомбинантного ЛФ в серии экспериментов, результаты которых представлены на рис. 2, полностью согласуются с данными серии опытов, отраженными на рис. 1.

Введение крысам лактоферрина в течение пяти дней после инъекции аллоксана достоверно уменьшает сдвиги активности АсАТ в сыворотке крови (на 19 %) (см. рис. 2, *а*), концентрацию в печени и почках МДА (на 29 и 27 % соответственно) и активность СОД (на 20,0 и 22,2 % соответственно) (рис. 2, *б* и *в*) по сравнению с аналогичными показателями, установленными при введении аллоксана, и нормализует

скорость разложения пероксида водорода Кат в обоих органах. Лактоферрин не снижает эффекта воздействия аллоксана на активность АлАТ, ЛДГ и концентрацию Аг. Эти данные свидетельствуют о том, что ЛФ способен корректировать не все нарушения метаболических процессов, развивающиеся при аллоксановом сахарном диабете, однако значимо ослабляет сдвиги активности АсАТ в сыворотке крови, СОД и процессов ПОЛ в печени и почках крыс, а также восстанавливает активность Кат в этих органах до контрольного уровня.

Установленные нами эффекты ЛФ в моделях доксициклинового холестаза и аллоксанового сахарного диабета хорошо согласуются с данными литературы, показавшими нормализацию общей антиоксидантной системы защиты организма в модели острого аллергического контактного дерматита при применении мазевых основ, содержащих ЛФ [34], а также выявившими противовоспалительный эффект ЛФ, который обусловлен связыванием ионов железа (II), участвующего в окислительно-восстановительных процессах, сопровождаемых образованием свободнорадикальных продуктов, разрушающих клеточные структуры [35], и др.

Таким образом, проведенное биохимическое исследование показало эффективность использования рекомбинантного ЛФ молока трансгенных коз для достоверного уменьшения негативных изменений активности аминотрансфераз, ЛДГ, ферментов антиоксидантной защиты, процессов ПОЛ, липидного обмена у крыс с экспериментальным доксициклин-индуцированным холестазом и коррекции нарушений работы антиоксидантной системы в модели аллоксанового сахарного диабета.

Результаты исследования могут быть использованы в клинической практике для разработки технологии регуляции процессов обмена веществ в органах и тканях и совершенствования способов биохимического контроля при развитии медикаментозного внутрипеченочного холестаза и нарушении выработки инсулина поджелудочной железой путем введения рекомбинантного лактоферрина.

Библиографические ссылки

1. *Борзенкова Н. В., Балабушевич Н. Г., Ларионова Н. И.* Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки // Биофарм. журн. 2010. Т. 2, № 3. С. 3–19.

2. *Крот И. Ф.* Структура и функции лактоферрина и его возможное применение в акушерстве // Пробл. здоровья и экологии. 2005. № 1. С. 65–68.

3. *Николаев А. А., Аншакова Н. И.* Иммунохимическая и физико-химическая характеристика лактоферрина биологических жидкостей человека // Вопр. мед. химии. 1985. № 3. С. 128–131.

4. *Gonzalez-Chavez S. A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q.* Lactoferrin: structure, function and applications // Int. J. Antimicrob. Agents. 2009. Vol. 33, issue 4. P. 301.e1–303.e8.

5. *Jessen H., Hancock R. E.* Antimicrobial properties of lactoferrin // Biochimie. 2009. Vol. 91, issue 1. P. 19–29.

6. *Lupetti A., Paulusma-Annema A., Welling M. M., et al.* Synergistic activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazol against *Candida* species // Antimicrob. Agents Chemother. 2003. Vol. 47, issue 1. P. 262–267.

7. *Naot D., Grey A., Reid I. R., et al.* Lactoferrin – a novel bone growth factor // Clin. Med. Res. 2005. Vol. 3, issue 2. P. 93–101.

8. *Nozaki A., Ikeda M., Naganuma A., et al.* Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, № 12. P. 10162–10173.

9. *Orsi N.* The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives // Biometals. 2004. Vol. 17, issue 3. P. 189–196.

10. *Welsh K. J., Hwang S. A., Boyd S., et al*. Influence of oral lactoferrin on *Mycobacterium tuberculosis* induced immunopathology // Tuberculosis. 2011. Vol. 91, suppl. 1. P. 105–113.

11. *Губский К. И.* Коррекция химического поражения печени. Киев, 1989.

12. *Голиков С. Н., Саноцки И. В., Тиунов Л. А.* Общие механизмы токсического действия. Ленинград, 1986.

13. Экспериментальный сахарный диабет / под ред. В. Г. Баранова. Ленинград, 1983.

14. *Камышников В. С.* Клинико-биохимическая лабораторная диагностика : в 2 т. Минск, 2003.

15. *Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В.* Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. 1990. Т. 36, вып. 2. С. 88–91.

16. *Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.

17. *Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г.* Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Совр. методы в биохимии. М., 1977. С. 66–68.

18. *Peterson G. L.* A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // Anal. Biochem. 1977. Vol. 83, issue 2. P. 346–356.

19. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, issue 1. P. 265–275.

20. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. Минск, 1967.

21. *Шерлок Ш., Дули Дж.* Заболевания печени и жёлчных путей. М., 1999.

22. *Яковенко Э. П., Григорьев П. Я.* Хронические заболевания печени: диагностика и лечение // РМЖ. 2003. Т. 11, № 5. С. 291–296.

23. *Климов А. Н., Никульчева Н. Г.* Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб., 1999.

24. *Григорьев П. Я., Яковенко Э. П.* Внутрипеченочный холестаз при болезнях печени: от диагноза до лечения // Леч. врач. 1999. № 6. С. 14–17.

25. *Батвинков Н. И., Гарелик П. В.* Механическая желтуха: диагностика и лечение. Гродно, 2001.

26. *Навашин П. С.* Доксициклин: показания к применению и их фармакокинетические основы // Антибиотики и химиотерапия, 1991. Т. 36, № 1. С. 48–51.

27. *Орёл Н. М., Пышко Е. С., Соколовский Д. Ю. и др.* Регуляция метаболизма в печени крыс с экспериментальным холестазом путем воздействия лазерным излучением на биологически активные точки // Лазерная физика и оптические технологии : материалы IX Междунар. науч. конф. (Гродно, 30 мая – 2 июня 2012 г.) : в 2 ч. Гродно, 2012. Ч. 1. С. 118–120.

28. *Орёл Н. М., Пышко Е. С., Лисенкова А. М. и др.* Воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением на область биологически активных точек для коррекции биохимических нарушений в печени крыс с экспериментальным внутрипеченочным холестазом // Лазеры. Измерения. Информация : материалы Междунар. науч. конф. (Санкт-Петербург, 5–7 июня 2011 г.). СПб., 2012. С. 65–66.

29. *Балаболкин М. И.* Сахарный диабет: 100 вопросов и ответов. М., 1992.

30. *Головкин Б. Н., Руденская И. А., Трофимова И. А. и др.* Биологически активные вещества растительного происхождения : в 3 т. М., 2001.

31. *Шульпекова Ю. О.* Флавоноиды расторопши пятнистой в лечении заболеваний печени // РМЖ. 2004. № 5. С. 248.

32. *Венгеровский А. И., Саратиков А. С.* Механизм действия гепатопротекторов при токсических поражениях печени // Фармакология и токсикология. 1988. № 1. С. 89–93.

33. *Actor J. K., Hwang S. A., Kuzel M. L.* Lactoferrin as a natural immune modulator // Curr. Pharm. Des. 2009. Vol. 15, issue 17. P. 1956–1973.

34. *Жарская А. В., Чумаченко М. С., Корик Е. О.* Изучение потенциальных дерматотропных эффектов экстрактов клеток ириса и лактоферрина в модели индуцированного контактного дерматита // Современные проблемы биохимии : сб. науч. ст. (Гродно, 5–6 июля 2016 г.) : в 2 ч. Гродно, 2016. Ч. 1. С. 82–88.

35. *Hardwick R. N., Fisher C. D., Canet M. J., et al.* Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease // Drug Metab. Dispos. 2010. Vol. 38, issue 12. P. 2293–2301.

References

1. Borzenkova N. V., Balabushevich N. G., Larionova N. I. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations. *Russ. J. Biofarm.* 2010. Vol. 2, No. 3. P. 3–19 (in Russ.).

2. Krot I. F. Lactoferrin's structure and functions and its possible application in obstetrics. *Problems health ecol.* 2005. No. 1. P. 65–68 (in Russ.).

3. Nikolaev A. A., Anshakova N. I. [Immunochemical and physico-chemical characterization of lactoferrin in human biological fluids]. *Vopr. med. khim.* 1985. No. 3. P. 128–131 (in Russ.).

4. Gonzalez-Chavez S. A., Arevalo-Gallegos S., Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009. Vol. 33, issue 4. P. 301e1–301e.8. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020.

5. Jenssen H., Hancock R. E. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*. 2009. Vol. 91, issue 1. P. 19–29. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.05.015.

6. Lupetti A., Paulusma-Annema A., Welling M. M., et al. Synergistic activity of the N-terminal peptide of human lactoferrin and fluconazol against *Candida* species. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003. Vol. 47, issue 1. P. 262–267. DOI: 10.1128/AAC.47.1.262-267.2003.

7. Naot D., Grey A., Reid I. R., et al. Lactoferrin – a novel bone growth factor. C*lin. Med. Res.* 2005. Vol. 3, issue 2. P. 93–101.

8. Nozaki A., Ikeda M., Naganuma A., et al. Identification of a lactoferrin-derived peptide possessing binding activity to hepatitis C virus E2 envelope protein. *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, No. 12. P. 10162–10173. DOI: 10.1074/jbc.M207879200.

9. Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals.* 2004. Vol. 17, issue 3. P. 189–196. DOI: 10.1023/B:BIOM.0000027691.86757.e2.

10. Welsh K. J., Hwang S. A., Boyd S., et al. Influence of oral lactoferrin on *Mycobacterium tuberculosis* induced immunopathology. *Tuberculosis*. 2011. Vol. 91, suppl. 1. P. 105–113. DOI: 10.1016/j.tube.2011.10.019.

11. Gubskii K. I. Korrektsiya khimicheskogo porazheniya pecheni. Kyiv, 1989 (in Russ.).

12. Golikov S. N., Sanotski I. V., Tiunov L. A. Obshchie mekhanizmy toksicheskogo deistviya. Leningrad, 1986 (in Russ.).

13. Baranov V. G. (ed.) Eksperimentalnyi sakharnyi diabet. Leningrad, 1983 (in Russ.).

14. Kamyshnikov V. S. Kliniko-biokhimicheskaya laboratornaya diagnostika : in 2 vol. Minsk, 2003 (in Russ.).

15. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zn. V. A simple, sensitive assay for determinination of superoxide dismutase activity, based on reaction of quercetin oxidation. *Vopr. med. khim.* 1990. Vol. 36, issue 2. P. 88–91 (in Russ.).

16. Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G., et al. [The method for determining the activity of catalase]. *Lab. delo.* 1988. No. 1. P. 16–19 (in Russ.).

17. Stal'naya I. D., Garishvili T. G. [Method for determination of malondialdehyde via thiobarbituric acid]. *Sovremennye metody v biokhimii.* Moscow, 1977. P. 66–68 (in Russ.).

18. Peterson G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 1977. Vol. 83, issue 2. P. 346–356. DOI:10.1016/0003-2697(77)90043-4.

19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 193, issue 1. P. 265–275.

20. Rokitskii P. F. Biologicheskaya statistika. Minsk, 1967 (in Russ.).

21. Sherlok S., Duli J. Zabolevaniya pecheni i zhelchnykh putei. Moscow, 1999 (in Russ.).

22. Yakovenko E. P., Grigor'ev P. Y. Chronic liver disease: diagnosis and treatment. *Russ. med. zh.* 2003. Vol. 11, No. 5. P. 291–296 (in Russ.).

23. Klimov A. N., Nikul'cheva N. G. Obmen lipidov i lipoproteidov i ego narusheniya. Saint-Petersburg, 1999 (in Russ.).

24. Grigor'ev P. Y., Yakovenko E. P. Vnutripechenochnyi kholestaz pri boleznyakh pecheni: ot diagnoza do lecheniya. *Lechashchii vrach.* 1999. No. 6. P. 14–17 (in Russ.).

25. Batvinkov N. I., Garelik P. V. Mekhanicheskaya zheltukha: diagnostika i lechenie. Grodno, 2001 (in Russ.).

26. Navashin P. S. Doksitsiklin: pokazaniya k primeneniyu i ikh farmakokineticheskie osnovy. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 1991. Vol. 36, No. 1. P. 48–51 (in Russ.).

27. Oryol N. M., Pyshko Y. S., Sokolovskii D. Y., et al. [The regulation of metabolism in the liver of rats with experimental cholestasis by laser radiation on biologically active points]. *Lazernaya fizika i opticheskie tekhnologii* : materialy IX Mezhdunar. nauchn. konf. (Grodno, 30 May – 2 June, 2012) : in 2 parts. Grodno, 2012. Part 1. P. 118–120 (in Russ.).

28. Oryol N. M., Pyshko Y. S., Lisenkova A. M., et al. Vozdeistvie nizkointensivnym lazernym izlucheniem na oblast' biologicheski aktivnykh tochek dlya korrektsii biokhimicheskikh narushenii v pecheni krys s eksperimental'nym vnutripechenochnym kholestazom. *Lazery. Izmereniya. Informatsiya* : materialy Mezhdunar. nauchn. konf. (Saint-Petersburg, 5–7 June, 2011) Saint-Petersburg, 2012. P. 65–66 (in Russ.).

29. Balabolkin M. I. Sakharnyi diabet: 100 voprosov i otvetov. Moscow, 1992 (in Russ.).

30. Golovkin B. N., Rudenskaya I. A., Trofimova I. A., et al. *Biologicheski aktivnye veshchestva rastitel'nogo proiskhozhdeniya :* in 3 vol. Moscow, 2001. Vol. 1 (in Russ.).

31. Shul'pekova Y. O. [Milk thistle flavonoids in the treatment of liver diseases]. *Russ. med. zh*. 2004. No. 5. P. 248 (in Russ.).

32. Vengerovskii A. I., Saratikov A. S. [Action mechanisms of hepatoptrotectors under toxic liver damage]. *Farmakologiya i toksikologiya.* 1988. No. 1. P. 89–93 (in Russ.).

33. Actor J. K., Hwang S. A., Kuzel M. L. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr. Pharm. Des*. 2009. Vol. 15, issue 17. P. 1956–1973.

34. Zharskaya A. V., Chumachenko M. S., Korik Ey. O. Studies of potential dermatotropic effects of flag cell extract and lactoferrin in model of induced contact dermatitis. *Currernt problems in biochemistry* : sb. nauchn. statei (Grodno, 5–6 July, 2016). Grodno, 2016. Part 1. P. 82–88 (in Russ.).

35. Hardwick R. N., Fisher C. D., Canet M. J., et al. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab. Dispos.* 2010. Vol. 38, issue 12. P. 2293–2301. DOI: 10.1124/dmd.110.035006.

Статья поступила в редколлегию 27.12.2016.
Received by editorial board 27.12.2016.

Экология и природопользование

Ecology and conservancy

УДК 595.762.12

СТРУКТУРА СООБЩЕСТВА ЖУЖЕЛИЦ (*COLEOPTERA: CARABIDAE*) НА РАННЕМ ЭТАПЕ ЛЕСОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕ САНИТАРНОЙ РУБКИ ЕЛЬНИКА КИСЛИЧНОГО В БЕЛОВЕЖСКОЙ ПУЩЕ

Н. Г. КОЗУЛЬКО [1)]***, Г. А. КОЗУЛЬКО*** [2)]

[1)]*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Общественный проект «Беловежская пуща – XXI век» (http://bp21.org.by), ул. Пущанская, 6, 225063, агрогородок Каменюки, Брестская обл., Беларусь*

Приводятся данные по влиянию сплошной санитарной рубки ельника кисличного на организацию сообщества жужелиц в Беловежской пуще. С апреля по ноябрь 1992 г. с использованием 20 ловушек Барбера учтено 3028 экз. жужелиц, относящихся к 45 видам. Почвенно-зоологические раскопки позволили обнаружить 42 экз., относящихся к 12 видам. Рассмотрена структура сообществ жужелиц в лесном массиве и на прилегающей вырубке. Выявлено преобладание следующих видов: *Calathus micropterus*, *Carabus arcensis*, *Carabus hortensis*, *Carabus nemoralis*, *Pterostichus niger*, *Pterostichus oblongopunctatus* и *Trechus secalis*. Установлено увеличение видового богатства при снижении численности жесткокрылых после сведения леса. На вырубленной площади зарегистрировано

Образец цитирования:
Козулько Н. Г., Козулько Г. А. Структура сообщества жужелиц (*Coleoptera: Carabidae*) на раннем этапе лесовосстановления после санитарной рубки ельника кисличного в Беловежской пуще // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 80–89.

For citation:
Kazulka M. H., Kazulka H. A. Ground beetle (*Coleoptera: Carabidae*) community structure at the early stage of forest regeneration after sanitary logging of oxalidosum spruce forest in Belovezhskaya Pushcha. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 80–89 (in Russ.).

Авторы:
Николай Георгиевич Козулько – аспирант Научно-практического центра Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам. Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент В. А. Цинкевич.
Георгий Алексеевич Козулько – кандидат биологических наук; координатор проекта.

Authors:
Mikalai Kazulka, postgraduate student at the National Scientific Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources.
kazulka.mikalai@gmail.com
Heorhi Kazulka, PhD (biology); coordinator of the project.
kazulka@tut.by

снижение численности большинства лесных видов и увеличение численности видов, населяющих открытые биотопы, а также лесного вида *Trechus secalis*. Данные, полученные с помощью ловушек Барбера, во многом подтверждены материалами раскопок.

Ключевые слова: жужелицы; видовой состав; ельник кисличный; рубка леса; Беловежская пуща.

Благодарность. Авторы выражают благодарность доктору биологических наук, профессору О. Р. Александровичу (г. Слупск, Польша) и кандидату биологических наук, доценту В. А. Цинкевичу (г. Минск) за критические замечания и комментарии, сделанные при написании работы.

GROUND BEETLE (*COLEOPTERA: CARABIDAE*) COMMUNITY STRUCTURE AT THE EARLY STAGE OF FOREST REGENERATION AFTER SANITARY LOGGING OF OXALIDOSUM SPRUCE FOREST IN BELOVEZHSKAYA PUSHCHA

***M. H. KAZULKA*[a], *H. A. KAZULKA*[b]**

[a]*National Scientific Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Akademičnaja Street, 27, 220072, Minsk, Belarus*
[b]*Public project «Belovezhskaya Pushcha – 21st Century» (http://bp21.org.by), Puščanskaja Street, 6, 225063, Kamenyuki, Brest region, Belarus*
Corresponding author: M. H. Kazulka (kazulka.mikalai@gmail.com)

Data on the effect from sanitation harvest upon community structure of ground beetles in the Oxalidosum spruce forest in Belovezhskaya Pushcha are given. 3028 specimens of ground beetles belonging to 45 species were collected by using pitfall traps and 42 specimens of 12 species were collected by quadrate method from April to November 1992. The structure of ground beetle communities in the forest area and the adjacent logging plot were examined. *Calathus micropterus*, *Carabus arcensis*, *Carabus hortensis*, *Carabus nemoralis*, *Pterostichus niger*, *Pterostichus oblongopunctatus* and *Trechus secalis* prevailed. Increasing in species diversity and reducing in the number of ground beetles after deforestation was established. Decreasing in the number of most forest species and increasing in the number of species of open habitats and the forest species *Trechus secalis* was recorded on the logging plot. Data obtained by pitfall traps were largely confirmed by quadrate method.

Key words: carabid beetles; species composition; spruce forest; logging; Belovezhskaya Pushcha.

Acknowledgements. Authors are grateful to doctor of science (biology), full professor O. R. Aleksandrowicz (Slupsk, Poland) and PhD (biology), docent V. A. Tsinkevich (Minsk) for providing critical comments on the manuscript.

Беловежская пуща представляет собой наиболее крупный равнинный лесной массив в Европе, сохранившийся в относительно ненарушенном состоянии. Расположение на стыке европейской неморальной и евразиатской таежной геоботанических областей обусловливает высокое флористическое и фаунистическое богатство этой территории. Длительная история лесопользования, особенности условий произрастания, а также результаты действий природных катаклизмов (ветровалы, вспышки численности насекомых-вредителей и др.) способствовали формированию большого разнообразия типов леса в регионе.

Леса Беловежской пущи представлены широким спектром коренных и производных типов с преобладанием сосновых фитоценозов. Еловые леса занимают здесь более 10 % лесопокрытой площади [1] и, находясь на южной границе сплошного распространения [2], образуют менее устойчивые фитоценозы. В результате воздействия причин природного (засушливость некоторых сезонов, буреломы и др.) и антропогенного характера иногда создаются благоприятные условия для массового развития насекомых-ксилофагов. С учетом физиологического ослабления древостоев вредители приводят к их преждевременной гибели [3]. При отсутствии должных лесотехнических мероприятий возникает опасность распространения вредителей леса за пределы очагов заражения.

В борьбе с ксилофагами основной и наиболее эффективной практикой лесопользования считаются санитарные рубки леса [4]. При небольшом поражении древостоев проводятся рубки промежуточного пользования. В случае значительного усыхания применяются сплошные санитарные рубки

(в том числе с удалением сопутствующих пород), а также различные лесотехнические мероприятия, направленные на борьбу с вредителями (сжигание порубочных остатков, окорка деревьев). При этом характер экологических изменений на лесосеке сильно варьирует в зависимости от вида и способа рубки.

В системе управления лесами Беловежской пущи рубки леса занимают одно из ведущих мест среди различных видов антропогенного влияния. Помимо коммерческой выгоды от продажи древесины большое значение придается формированию и поддержанию структуры ценных в породном отношении древостоев путем проведения рубок ухода, а также санитарным мероприятиям, направленным на борьбу со стволовыми вредителями леса. И хотя сплошнолесосечные рубки не получили здесь широкого распространения (ввиду их ограничения в условиях заповедного режима), они применяются в случае значительного усыхания древостоев.

Поскольку жужелицы характеризуются высокой численностью и разнообразием в различных типах экосистем, они являются удобным объектом для мониторинговых исследований. В настоящее время хорошо разработаны методы их отлова и учета, изучены экологические особенности и систематика [5]. Это позволяет широко использовать жужелиц для оценки изменения среды их обитания, в том числе при рубках леса и на последующих этапах лесовозобновления [6–10].

Место, материалы и методы исследований

Исследования проводились в 1992 г. в ельнике кисличном (квартал 742А) и на расположенном рядом участке, образовавшемся в 1989 г. после сплошной вырубки поврежденных короедом елей (порубочные остатки сжигались). Территориальный эффект, потенциально способный оказывать влияние на организацию сообществ, видовой состав и численность жужелиц [11; 12], нивелировался благодаря соседству изучаемых площадок.

В ельнике в составе древостоя доминировала ель обыкновенная (*Picea abies* (L.) H. Karst.) с незначительным участием сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). Живой напочвенный покров представлен кислицей обыкновенной (*Oxalis acetosella* L.), майником двулистным (*Maianthemum bifolium* (L.) F. W. Schmidt), черникой обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), вейником тростниковым (*Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth) и зелеными мхами (*Dicranum scoparium* Hedw., *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt.).

Сформировавшийся в результате лесохозяйственных мероприятий участок площадью около 0,5 га представлял собой сплошную вырубку трехлетнего возраста вейникового типа с доминированием в напочвенном покрове вейника тростникового.

Жужелицы собирались модифицированными ловушками Барбера [13] (полистироловые стаканы объемом 250 мл с диаметром отверстия 72 мм). В качестве фиксирующей жидкости использовался 4 % раствор формалина. В каждом биотопе устанавливалось по 10 ловушек на расстоянии не менее 25 м от края биоценоза для ослабления краевого эффекта между ельником и вырубкой. Ловушки функционировали с начала апреля по середину ноября. Выбор материала проводился один раз в 9–11 дней.

Плотность жужелиц определялась методом почвенно-зоологических раскопок по стандартной процедуре (пробы размером 25 × 25 см (1/16 м^2) отбирались на глубину 10 см) [14]. Насекомых учитывали в апреле, июне, августе и октябре. За один раз в месяц бралось 16 проб, что составило 1 м^2. Таким образом, за период исследований в каждом биотопе взято по 64 пробы. Разбор подстилки и почвы производился ручным способом частично в полевых и лабораторных условиях.

Биотопическая приуроченность жужелиц устанавливалась на основании литературных данных [15; 16] с некоторыми изменениями. В настоящей работе выделены следующие группы видов жесткокрылых с преимущественным обитанием в определенных типах биоценозов:

- лесные (Лс);
- луговые (Л);
- полевые (П);
- болотные (Б);
- прибрежные (Пр);
- эврибионтные (Э).

Для выявления различий в численности массовых видов жужелиц, учтенных с помощью ловушек Барбера, и их экологических групп использовался *U*-критерий Манна – Уитни [17]. Достоверными считались результаты при уровне значимости (P) меньше 0,05. Степень сходства сообществ жесткокрылых оценивалась на основании индекса Брея – Кёртиса для количественных данных. Все расчеты выполнены в программном продукте PAST [18].

Номенклатура жужелиц приводится согласно Catalogue of Palaearctic Coleoptera [19].

Результаты исследований

Всего на двух участках с помощью почвенных ловушек Барбера учтено 3028 экз. жужелиц, относящихся к 45 видам (табл. 1). Более высокая численность жужелиц характерна для ельника кисличного (U = 135,5; P = 0,005), где было отловлено 2244 экз. В ельнике учтено 26 видов, на вырубке – 42 вида. Численность семи видов превышала 100 экз. Наиболее многочисленными видами являлись *Pterostichus oblongopunctatus* и *Carabus hortensis*, обилие которых составляло 26,1 и 21,8 % всего улова соответственно. Лесная группа включала в себя 22 вида, их обилие составляло 94,9 %. Обитатели открытых пространств (луговые и полевые виды) представлены 14 видами, их обилие было незначительным (3,3 %). На долю остальных видов (болотные, прибрежные и эврибионты) приходилось 1,7 % численности жужелиц.

Таблица 1

Видовой состав и численность жужелиц в ельнике кисличном и на вырубке (по результатам почвенных ловушек)

Table 1

Species composition and abundance of carabid beetles in the Oxalidosum spruce forest and on the logging plot (data obtained by pitfall traps)

Вид	Биотопическая приуроченность	Численность особей, экз.		
		Ельник	Вырубка	Всего
Agonum fuliginosum (Panzer, 1809)	Б	1	1	2
Amara aenea (De Geer, 1774)	Л	–	1	1
Amara brunnea (Gyllenhal, 1810)	Лс	5	–	5
Amara communis (Panzer, 1797)	Л	–	2	2
Amara familiaris (Duftschmid, 1812)	Л	2	4	6
Amara lunicollis Schiødte, 1837	Л	–	39	39
Amara plebeja (Gyllenhal, 1810)	П	–	12	12
Anisodactylus binotatus (Fabricius, 1787)	Л	–	1	1
Badister bullatus (Schrank, 1798)	Л	–	1	1
Bradycellus csikii Laczó, 1912	П	–	1	1
Calathus melanocephalus (Linnaeus, 1758)	Л	–	2	2
Calathus micropterus (Duftschmid, 1812)	Лс	121	3	124
Carabus arcensis Herbst, 1758	Лс	116	94	210
Carabus coriaceus Linnaeus, 1758	Лс	38	28	66
Carabus glabratus Paykull, 1790	Лс	33	6	39
Carabus granulatus Linnaeus, 1758	Б	–	9	9
Carabus hortensis Linnaeus, 1758	Лс	631	28	659
Carabus nemoralis Müller, 1764	Лс	177	4	181
Carabus violaceus Linnaeus, 1758	Лс	7	18	25
Clivina fossor (Linnaeus, 1758)	Л	–	3	3
Cychrus caraboides (Linnaeus, 1758)	Лс	64	15	79
Dyschirius aeneus (Dejean, 1825)	Пр	–	1	1
Dyschirius globosus (Herbst, 1784)	Б	–	2	2
Harpalus laevipes Zetterstedt, 1828	Лс	63	6	69
Harpalus latus (Linnaeus, 1758)	Лс	16	6	22
Harpalus rufipes (De Geer, 1774)	П	–	4	4
Leistus terminatus (Panzer, 1793)	Лс	1	1	2
Loricera pilicornis (Fabricius, 1775)	Лс	–	1	1

Окончание табл. 1
Ending table 1

Вид	Биотопическая приуроченность	Численность особей, экз.		
		Ельник	Вырубка	Всего
Nebria brevicollis (Fabricius, 1792)	Лс	5	1	6
Notiophilus biguttatus (Fabricius, 1779)	Лс	18	–	18
Notiophilus palustris (Duftschmid, 1812)	Б	3	13	16
Patrobus atrorufus (Ström, 1768)	Лс	1	–	1
Poecilus cupreus (Linnaeus, 1758)	П	–	1	1
Poecilus versicolor (Sturm, 1824)	Л	2	21	23
Pterostichus aethiops (Panzer, 1797)	Лс	1	1	2
Pterostichus diligens (Sturm, 1824)	Б	–	2	2
Pterostichus melanarius (Illiger, 1798)	Э	6	7	13
Pterostichus niger (Schaller, 1783)	Лс	174	93	267
Pterostichus nigrita (Paykull, 1790)	Б	2	3	5
Pterostichus oblongopunctatus (Fabricius, 1787)	Лс	716	75	791
Pterostichus rhaeticus Heer, 1838	Б	–	2	2
Pterostichus strenuus (Panzer, 1797)	Лс	17	27	44
Stomis pumicatus (Panzer, 1796)	Лс	–	1	1
Synuchus vivalis (Illiger, 1798)	Л	–	5	5
Trechus secalis (Paykull, 1790)	Лс	24	239	263
Всего		2244	784	
Кол-во видов		26	42	

В ельнике кисличном преобладал *Pterostichus oblongopunctatus* (учтено 716 экз., что составило 31,9 %). Вторым по обилию был *Carabus hortensis* (631 экз., или 28,1 %). В число массовых видов с обилием более 5 % также входили *Carabus nemoralis* (177 экз.), *Pterostichus niger* (174 экз.), *Calathus micropterus* (121 экз.) и *Carabus arcensis* (116 экз.). Виды открытых пространств в ельнике представлены очень бедно (по 2 экз. *Amara familiaris* и *Poecilus versicolor*). Немногочисленны болотные и эврибионтные виды (всего 12 экз.).

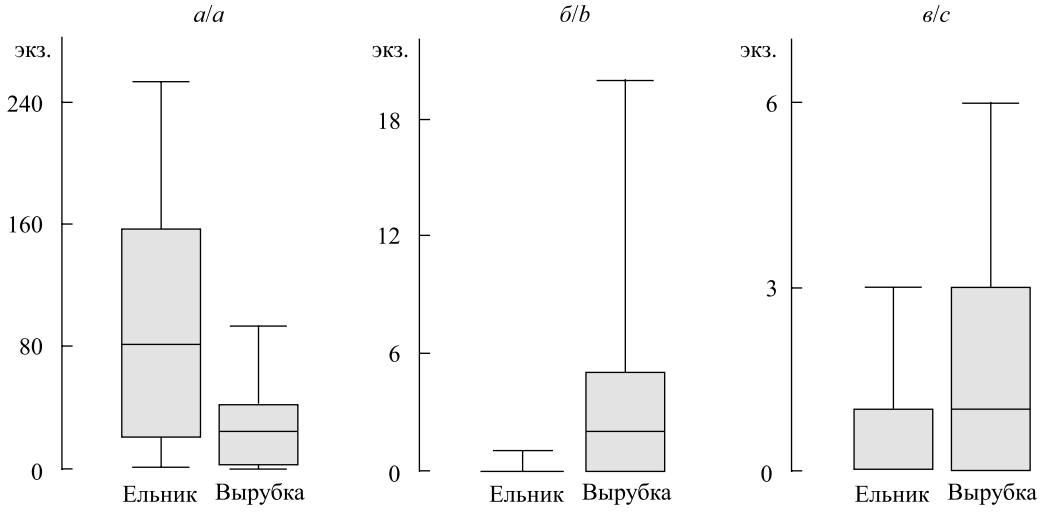
На вырубке доминировал *Trechus secalis* (239 экз., или 30,5 %), численность которого в лесном массиве была незначительной. В число доминирующих видов с обилием более 5 % входили *Carabus arcensis* (94 экз.), *Pterostichus niger* (93 экз.) и *Pterostichus oblongopunctatus* (75 экз.). Здесь разнообразна группа видов, приуроченных к открытому местообитанию (14 видов), среди которых высокой численностью отличался *Amara lunicollis* (39 экз., или 5 %). На долю болотных, прибрежных и эврибионтных видов на вырубке приходилось 5,1 % численности жужелиц.

Вырубка леса оказала существенное влияние на структуру сообщества жужелиц. Комплексы жесткокрылых в ельнике и на вырубке значительно различались между собой (коэффициент сходства Брея – Кёртиса составил 28,6 %). На вырубке существенно возрастает видовое разнообразие жужелиц (см. табл. 1). Многие виды, предпочитающие открытые пространства, встречались исключительно здесь (либо демонстрировали наиболее высокую численность). Из лесных видов более высокая численность на вырубке установлена только для *Trechus secalis*, *Carabus violaceus* и *Pterostichus strenuus*.

Численность многих видов на вырубке существенно снижалась. К ним относились *Pterostichus oblongopunctatus* (U = 100,5; P < 0,001), *Carabus hortensis* (U = 174,5; P = 0,030), *Carabus nemoralis* (U = 124,5; P < 0,001), *Calathus micropterus* (U = 97,5; P < 0,001) и некоторые другие. Сходная тенденция выявлена для *Pterostichus niger* и *Carabus arcensis*, однако разница в численности статистически недостоверна. Единственным доминантным видом, демонстрировавшим увеличение численности на вырубке, был *Trechus secalis* (U = 13,5; P = 0,026).

Характерным изменением в структуре сообщества жужелиц при сведении леса является резкое снижение численности лесных видов (U = 120; P = 0,002) и увеличение численности видов, обитающих в открытых биотопах (луговые и полевые) (U = 102,5; P < 0,001). Возрастают разнообразие

и численность болотных и прибрежных видов, а также эврибионтов (по совокупным данным $U = 156{,}5$; $P = 0{,}010$). Если виды открытых пространств в ельнике представлены незначительно, то на вырубке их численность возрастает до 97 экз., или 12,4 % в структуре сообщества жужелиц (см. рисунок).



Численность экологических групп жужелиц:
а – лесные виды; *б* – виды открытых пространств (луговые и полевые);
в – прочие виды (болотные, прибрежные и эврибионты)

Abundance of ecological groups of carabid beetles:
a – forest species; *b* – open-habitat species (praticolous and campicolous species);
c – other species (paludicolous, riparian and eurytopic species)

Методом почвенно-зоологических раскопок учтено 42 экз. жужелиц, относящихся к 12 видам (табл. 2). Количество учтенных видов оказалось почти одинаковым (7 – в ельнике, 8 – на вырубке), общая плотность жужелиц достоверно не различалась между биоценозами (различия оценивались с использованием *t*-критерия Стьюдента). Преобладающие виды – *Pterostichus oblongopunctatus* и *Notiophilus biguttatus* – были найдены только в ельнике ($1{,}8 \pm 0{,}6$ и $1{,}5 \pm 0{,}7$ экз./м^2 соответственно), а *Trechus secalis* – только на вырубке ($1{,}8 \pm 0{,}6$ экз./м^2). Виды, предпочитающие открытые пространства (*Bradycellus csikii*, *Amara familiaris*, *Bembidion guttula*), доминировали на вырубке, а в лесном массиве были представлены лишь одним видом – *Amara plebeja*. В то же время лесные виды *Trechus secalis* и *Pterostichus strenuus* обильны на вырубке.

Обсуждение результатов исследований

Рубка леса оказала сильное влияние на структуру сообщества жужелиц. Отсутствие сомкнутости крон деревьев, повреждение подстилки и верхнего горизонта почвы при сведении леса и трелевке древесины приводят к изменению экологических параметров среды на вырубленной территории [20; 21]. Увеличение мозаичности биотопа после рубки способствует формированию комплексов жужелиц с более высоким видовым богатством, что свойственно молодым вырубкам [6; 8; 22]. Учет с помощью ловушек Барбера позволил выявить значительное снижение численности жужелиц на вырубке по сравнению с еловым массивом. Сильное снижение численности сообществ жужелиц в первые три года после рубки леса было отмечено также в сосновых лесах Польши [23].

Видовое богатство жужелиц на вырубке сформировалось благодаря появлению видов открытых пространств (луговых и полевых). Виды, предпочитающие открытые биотопы, разнообразны и характеризуются высокой численностью на недавно сформировавшихся вырубках [6; 23; 24]. В результате лесозаготовительной деятельности создается большое количество подходящих для них местообитаний [25], а лесные дороги являются коридорами для распространения [26–28]. Многие виды открытых пространств (*Amara* spp., *Calathus melanocephalus*, *Harpalus rufipes*, *Poecilus* spp.) имеют хорошо развитые крылья, что способствует их активному расселению [29].

В ельнике обнаружено лишь незначительное число видов, обитающих в открытых биотопах. В то же время сообщество жужелиц на вырубке включает в себя 18 лесных видов (42,9 %), при этом численность *Trechus secalis*, *Carabus arcensis*, *Pterostichus niger* и *Pterostichus oblongopunctatus* оказалась

значительной (см. табл. 1). Известно, что многие лесные стенобионтные виды сохраняют достаточно высокую численность в первые годы после рубки [23; 30]. Это может достигаться как за счет их миграции с соседних лесных участков, так и за счет выживания особей некоторых видов в наименее нарушенных рубками микростациях [31].

Таблица 2

Видовой состав и плотность жужелиц в ельнике кисличном и на вырубке (по результатам раскопок)

Table 2

Species composition and density of carabid beetles in the Oxalidosum spruce forest and on the logging plot (data obtained by quadrate method)

Вид	Плотность, экз./м^2		Всего, экз.
	Ельник	Вырубка	
Amara familiaris (Duftschmid, 1812)	–	+	1
Amara plebeja (Gyllenhal, 1810)	+	–	1
Bembidion guttula (Fabricius, 1792)	–	+	1
Bradycellus csikii Laczó, 1912	–	1,0 ± 0,6	4
Carabus violaceus Linnaeus, 1758	+	–	1
Notiophilus biguttatus (Fabricius, 1779)	1,5 ± 0,7	–	6
Notiophilus palustris (Duftschmid, 1812)	0,5 ± 0,3	0,8 ± 0,4	5
Pterostichus diligens (Sturm, 1824)	–	+	1
Pterostichus nigrita (Paykull, 1790)	+	+	2
Pterostichus oblongopunctatus (Fabricius, 1787)	1,8 ± 0,6	–	7
Pterostichus strenuus (Panzer, 1797)	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,4	6
Trechus secalis (Paykull, 1790)	–	1,8 ± 0,6	7
Кол-во видов	7	8	
Общая плотность, экз./м^2	5,3 ± 1,1	5,3 ± 1,2	

Примечание. Знак + означает единично встреченных особей.

Такие виды, как *Pterostichus oblongopunctatus*, *Carabus hortensis*, *Carabus nemoralis*, *Calathus micropterus*, *Harpalus laevipes*, *Notiophilus biguttatus* и некоторые другие, демонстрируют приуроченность к ельнику (см. табл. 1 и 2). В условиях зоны смешанных лесов все они предпочитают леса разных типов [15]. Сплошная рубка ельника негативно отразилась на их численности, что также частично подтверждают исследования, проведенные в других регионах [24; 32].

На вырубке доминировал *Trechus secalis*. В зоне смешанных лесов этот вид приурочен к лиственным лесам разных типов [15]. Кроме того, он обнаружен на лугах с различной степенью увлажнения [15; 33]. В зоне тайги *T. secalis* не демонстрирует четкой приуроченности к высокополнотным древостоям, достигая относительно большой численности после рубок леса и в молодых лесах на начальных этапах лесовосстановления [30; 32].

Хотя учет методом почвенно-зоологических раскопок не выявил существенного увеличения видового разнообразия и снижения численности жужелиц на вырубке, основные тенденции в изменении плотности отдельных видов соответствуют данным, полученным с помощью ловушек Барбера. Оба метода позволяют выявить различные аспекты биологии жужелиц (активность в случае ловушек Барбера и абсолютную плотность в случае раскопок), а их совместное использование дает возможность в значительной степени охарактеризовать видовой состав и обилие беспозвоночных.

Заключение

Сплошная санитарная рубка в ельнике кисличном оказала сильное воздействие на структуру сообщества жужелиц. Полученные данные по реакции жужелиц на рубку леса сходны с таковыми, выявленными в различных регионах Европы (средняя и южная тайга, зоны смешанных и широколиственных лесов). Общими являются увеличение видового разнообразия за счет проникновения на вырубку

и развития там видов открытых пространств, а также уменьшение разнообразия и численности лесных видов. Между тем отдельные виды проявляют неодинаковую реакцию на вырубку леса в различных регионах. Это может быть связано с условиями ведения лесного хозяйства (например, площадь вырубок, объем изъятой древесины, сохранение сопутствующих пород и биогрупп деревьев, сжигание или оставление порубочных остатков и т. д.) и региональными причинами (разная микроклиматическая обстановка на вырубках в зависимости от региона) и др.

В настоящее время важное значение приобретают экологически щадящие технологии проведения рубок, в том числе с сохранением биогрупп живых деревьев [34]. Минимальное повреждение живого напочвенного покрова, подстилки и почвы, сохранение порубочных остатков на лесосеке будут способствовать выживанию многих лесных видов насекомых на вырубках [35]. В условиях сильного антропогенного воздействия на естественные экосистемы это снизит проявление отрицательных экологических эффектов при сведении леса на коренные комплексы живых организмов, включая сообщества жужелиц, и будет способствовать максимальному сохранению биоразнообразия.

Библиографические ссылки

1. *Бамбиза Н. Н., Толкач В. Н., Бернацкий Д. И.* Формационно-типологическая структура лесов Национального парка «Беловежская пуща» // Эколого-экономический механизм сохранения биоразнообразия особо охраняемых природных территорий : материалы II Междунар. науч.-практ. конф. (Беловежская пуща, 23–25 мая 2007 г.). Брест, 2007. С. 122–137.

2. *Юркевич И. Д., Голод Д. С., Парфенов В. И.* Типы и ассоциации еловых лесов: по исследованиям в БССР. Минск, 1971.

3. *Сарнацкий В. В*. Ельники: формирование, повышение продуктивности и устойчивости в условиях Беларуси. Минск, 2009.

4. *Grodzki W., Jakuš R., Lajzová E., et al.* Effects of intensive versus no management strategies during an outbreak of the bark beetle *Ips typographus* (L.) (Col.: Curculionidae, Scolytinae) in the Tatra Mts. in Poland and Slovakia // Ann. For. Sci. 2006. Vol. 63. P. 55–61.

5. *Rainio J., Niemelä J.* Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as bioindicators // Biodivers. Conserv. 2003. Vol. 12, issue 3. P. 487–506.

6. *Niemelä J., Langor D., Spence J. R.* Effects of clear-cut harvesting on boreal ground-beetle assemblages (Coleoptera: Carabidae) in Western Canada // Conserv. Biol. 1993. Vol. 7, № 3. P. 551–561.

7. *Koivula M.* Alternative harvesting methods and boreal carabid beetles (Coleoptera, Carabidae) // For. Ecol. Manag. 2002. Vol. 167, issue 1–3. P. 103–121.

8. *Saint-Germain M., Larrivée M., Drapeau P., et al.* Short-term response of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) to fire and logging in a spruce-dominated boreal landscape // For. Ecol. Manag. 2005. Vol. 212. P. 118–126.

9. *Magura T., Tóthmérész B., Elek Z.* Diversity and composition of carabids during a forestry cycle // Biodivers. Conserv. 2003. Vol. 12, issue 1. P. 73–85.

10. *Johansson T., Hjälten J., Olsson J., et al.* Long-term effects of clear-cutting on epigaeic beetle assemblages in boreal forests // For. Ecol. Manag. 2016. Vol. 359. P. 65–73.

11. *Niemelä J., Tukia H., Halme E.* Patterns of carabid diversity in Finnish mature taiga // Ann. Zool. Fennici. 1994. Vol. 31. P. 123–129.

12. *Judas M., Dornieden K., Strothmann U.* Distribution patterns of carabid beetle species at the landscape-level // J. Biogeogr. 2002. Vol. 29, issue 4. P. 491–508.

13. *Barber H. S.* Traps for cave-inhabiting insects // J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 1931. Vol. 46. P. 259–266.

14. *Гиляров М. С.* Учет крупных почвенных беспозвоночных // Методы почвенно-зоологических исследований : сб. тр. М., 1975. Р. 12–29.

15. *Александрович О. Р*. Жужелицы (Coleoptera, Carabidae) запада лесной зоны Русской равнины. Фауна, зоогеография, экология, фауногенез. Lambert Academic Publishing, 2014.

16. *Lindroth C. H*. Ground beetles (Carabidae) of Fennoscandia: a Zoogeographic Study : in 3 parts. Washington, 1988–1992. Part 1 : Specific Knowledge Regarding the Species.

17. *Zar J. H.* Biostatistical Analysis. 5th ed. New Jersey, 2010.

18. *Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D.* PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // Palaeontol. Electron. 2001. Vol. 4, issue 1. URL: http://paleo-electronica.org/2001-1/past/past.pdf.

19. Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Eds.: I. Löbl, A. Smetana. Vol. 1. Stenstrup, 2003.

20. *Зябченко С. С., Загуральская Л. М., Лазарева И. П.* Динамика экологических процессов на сплошных концентрированных вырубках Северной Карелии // Лесоведение. 1988. № 3. С. 3–10.

21. *Исаев В. И.* Изменение экологической среды в результате сплошных рубок леса // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем : сб. ст. / редкол.: Ю. А. Израэль [и др.]. Л., 1979. Т. 2. С. 249–257.

22. *Beaudry S., Duchesne L. C., Côté B.* Short-term effects of three forestry practices on carabid assemblages in a jack pine forest // Can. J. For. Res. 1997. Vol. 27, № 12. P. 2065–2071.

23. *Szyszko J.* Planning of prophylaxis in threatened pine forest biocenoses based on an analysis of the fauna of epigeic Carabidae. Warsaw, 1990.

24. *Арнольди К. В., Матвеев В. А.* Население жужелиц (Carabidae) еловых лесов у южного предела тайги (Марийская АССР) и изменение его на вырубках // Экология почвенных беспозвоночных : сб. ст. / редкол.: М. С. Гиляров (отв. ред.). М., 1973. С. 131–143.

25. *Spence J. R., Langor D. W., Niemelä J., et al*. Northern forestry and carabids: the case for concern about old-growth species // Ann. Zool. Fennici. 1996. Vol. 33, issue 1. P. 173–184.

26. *Koivula M. J.* Effects of forest roads on spatial distribution of boreal carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) // Coleopt. Bull. 2005. Vol. 59, issue 4. P. 465–487.

27. *Vermeulen H. J. W*. The composition of the carabid fauna on poor sandy road-side verges in relation to comparable open areas // Biodivers. Conserv. 1993. Vol. 2, issue 4. P. 331–350.

28. *Eversham B. C., Telfer M. G.* Conservation value of roadside verges for stenotopic heathland Carabidae: corridors or refugia? // Biodivers. Conserv. 1994. Vol. 3, issue 6. P. 538–545.

29. *Den Boer P. J.* On the significance of dispersal power for populations of carabid-beetles (Coleoptera, Carabidae) // Oecologia. 1970. Vol. 4, issue 1. P. 1–28.

30. *Koivula M.* Boreal carabid-beetle (Coleoptera, Carabidae) assemblages in thinned uneven-aged and clear-cut spruce stands // Ann. Zool. Fennici. 2002. Vol. 39. P. 131–149.

31. *Koivula M., Niemelä J.* Boreal carabid beetles (Coleoptera, Carabidae) in managed spruce forests – a summary of Finnish case studies // Silva Fennica. 2002. Vol. 36, № 1. P. 423–436.

32. *Анциферов А. Л.* Особенности трансформации фауны жужелиц (Coleoptera, Carabidae) лесных вырубок на разных стадиях вторичной сукцессии // Изв. Пенз. гос. пед. ун-та. Ест. науки. 2011. № 25. С. 301–306.

33. *Шляхтенок А. С.* Жужелицы (Coleoptera, Carabidae) луговых сообществ как объект экологического мониторинга // Фауна и экология насекомых Березинского заповедника : сб. науч. ст. / редкол.: Л. М. Сущеня (отв. ред.) [и др.]. Минск, 1991. С. 146–169.

34. *Thompson J.* Green-tree retention in harvest units: boon or bust for biodiversity? // Sci. Findings. 2007. № 96.

35. *Козулько Г. А., Козулько Т. Н.* Роль порубочных остатков в сохранении полезных беспозвоночных животных // Лесная наука на рубеже XXI века : сб. науч. тр. Гомель, 1997. Вып. 46. С. 119–121.

References

1. Bambiza N. N., Tolkach V. N., Bernatskii D. N. [Formational and typological structure of forests of the National Park «Belovezhskaya pushcha»]. *Ekologo-ekonomicheskii mekhanizm sokhraneniya bioraznoobraziya osobo okhranyaemykh prirodnykh territorii* : materialy II Mezhdunar. nauchn.-prakt. konf. (Belovezhskaya pushcha, 23–25 May, 2007). Brest, 2007, P. 122–137 (in Russ.).

2. Yurkevich I. D., Golod D. S., Parfenov V. I. [Types and associations of spruce forests: according to research in the BSSR]. Minsk, 1971 (in Russ.).

3. Sarnackii V. V. [Spruce forests: formation, increase of productivity and stability in the conditions of Belarus]. Minsk, 2009 (in Russ.).

4. Grodzki W., Jakuš R., Lajzová E., et al. Effects of intensive versus no management strategies during an outbreak of the bark beetle *Ips typographus* (L.) (Col.: Curculionidae, Scolytinae) in the Tatra Mts. in Poland and Slovakia. *Ann. For. Sci.* 2006. Vol. 63. P. 55–61. DOI: 10.1051/forest:2005097.

5. Rainio J., Niemelä J. Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as bioindicators. *Biodivers. Conserv*. 2003. Vol. 12, issue 3. P. 487–506. DOI: 10.1023/A:1022412617568.

6. Niemelä J., Langor D., Spence J. R. Effects of clear-cut harvesting on boreal ground-beetle assemblages (Coleoptera: Carabidae) in Western Canada. *Conserv. Biol*. 1993. Vol. 7, No. 3. P. 551–561. DOI: 10.1046/j.1523-1739.1993.07030551.x.

7. Koivula M. Alternative harvesting methods and boreal carabid beetles (Coleoptera, Carabidae). *For. Ecol. Manag.* 2002. Vol. 167, issue 1–3. P. 103–121. DOI: 10.1016/S0378-1127(01)00717-4.

8. Saint-Germain M., Larrivée M., Drapeau P., et al. Short-term response of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) to fire and logging in a spruce-dominated boreal landscape. *For. Ecol. Manag.* 2005. Vol. 212. P. 118–126. DOI: 10.1016/j.foreco.2005.03.001.

9. Magura T., Tóthmérész B., Elek Z. Diversity and composition of carabids during a forestry cycle. *Biodivers. Conserv*. 2003. Vol. 12, issue 1. P. 73–85. DOI: 10.1023/A:1021289509500.

10. Johansson T., Hjältén J., Olsson J., et al. Long-term effects of clear-cutting on epigaeic beetle assemblages in boreal forests. *For. Ecol. Manag*. 2016. Vol. 359. P. 65–73. DOI: /10.1016/j.foreco.2015.09.041.

11. Niemelä J., Tukia H., Halme E. Patterns of carabid diversity in Finnish mature taiga. *Ann. Zool. Fennici*. 1994. Vol. 31. P. 123–129.

12. Judas M., Dornieden K., Strothmann U. Distribution patterns of carabid beetle species at the landscape-level. *J. Biogeogr*. 2002. Vol. 29, issue 4. P. 491–508. DOI: 10.1046/j.1365-2699.2002.00697.x.

13. Barber H. S. Traps for cave-inhabiting insects. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc*. 1931. Vol. 46. P. 259–266.

14. Gilyarov M. S. [Inventory of large soil invertebrates]. *Metody pochvenno-zoologicheskikh issledovanii*. Moscow, 1975. P. 12–29 (in Russ.).

15. Aleksandrowicz O. R. [Ground beetles (Coleoptera, Carabidae) of the west forest zone of the Russian Plain]. Fauna, zoogeography, ecology, faunogenesis. Lambert Academic Publishin, 2014 (in Russ.).

16. Lindroth C. H. Ground beetles (Carabidae) of Fennoscandia. A Zoogeographic Study : in 3 parts. Washington, 1988–1992. Part 1 : Specific Knowledge Regarding the Species.

17. Zar J. H. Biostatistical Analysis. 5th ed. New Jersey, 2010.

18. Hammer Ø., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron*. 2001. Vol. 4, issue 1. URL: http://paleo-electronica.org/2001-1/past/past.pdf.

19. Löbl I., Smetana A. (eds.). Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Vol. 1. Stenstrup, 2003.

20. Zyabchenko S. S., Zagural'skaya L. M., Lazareva I. P. [Dynamics of ecological processes at extensive clear felling in Northern Karelia]. *Lesovedenie*. 1988. No. 3. P. 3–10 (in Russ.).

21. Isaev V. I. [Change in the ecological environment as a result of clear cuttings]. *Problemy ekologicheskogo monitoringa i modelirovaniya ekosistem* : sb. statei. Leningrad, 1979. Vol. 2. P. 249–257 (in Russ.).

22. Beaudry S., Duchesne L. C., Côté B. Short-term effects of three forestry practices on carabid assemblages in a jack pine forest. *Can. J. For. Res*. 1997. Vol. 27, No. 12. P. 2065–2071. DOI: 10.1139/x97-171.

23. Szyszko J. Planning of prophylaxis in threatened pine forest biocenoses based on an analysis of the fauna of epigeic Carabidae. Warsaw, 1990.

24. Arnol'di K. V., Matveev V. A. [Ground beetles (Carabidae) of spruce forests near the southern boundary of the taiga (Mari ASSR) and its change on felling areas]. *Ekologiya pochvennykh bespozvonochnykh* : sb. statei. Moscow, 1973. P. 131–143 (in Russ.).

25. Spence J. R., Langor D. W., Niemelä J., et al. Northern forestry and carabids: the case for concern about old-growth species. *Ann. Zool. Fennici*. 1996. Vol. 33, issue 1. P. 173–184.

26. Koivula M. J. Effects of forest roads on spatial distribution of boreal carabid beetles (Coleoptera: Carabidae). *Coleopt. Bull*. 2005. Vol. 59, issue 4. P. 465–487. DOI: /10.1649/815.1.

27. Vermeulen H. J. W. The composition of the carabid fauna on poor sandy road-side verges in relation to comparable open areas. *Biodivers. Conserv*. 1993. Vol. 2, issue 4. P. 331–350. DOI: 10.1007/BF00114038.

28. Eversham B. C., Telfer M. G. Conservation value of roadside verges for stenotopic heathland Carabidae: corridors or refugia? *Biodivers. Conserv*. 1994. Vol. 3, issue 6. P. 538–545. DOI: 10.1007/BF00115159.

29. Den Boer P. J. On the significance of dispersal power for populations of carabid-beetles (Coleoptera, Carabidae). *Oecologia*. 1970. Vol. 4, issue 1. P. 1–28. DOI: 10.1007/BF00390612.

30. Koivula M. Boreal carabid-beetle (Coleoptera, Carabidae) assemblages in thinned uneven-aged and clear-cut spruce stands. *Ann. Zool. Fennici*. 2002. Vol. 39. P. 131–149.

31. Koivula M., Niemelä J. Boreal carabid beetles (Coleoptera, Carabidae) in managed spruce forests – a summary of Finnish case studies. *Silva Fennica*. 2002. Vol. 36, No. 1. P. 423–436. DOI: 10.14214/sf.573.

32. Antsiferov A. L. Features of carabid beetle fauna (Coleoptera, Carabidae) transformation in the places of deforestation at various stages of secondary succession. *Izv. Penz. gos. un-ta. Est. nauki.* 2011. No. 25. P. 301–306 (in Russ.).

33. Shlyakhtenok A. S. [Ground beetles (Coleoptera, Carabidae) of meadows as an object of environmental monitoring]. *Fauna i ekologiya nasekomykh Berezinskogo zapovednika* : sb. nauchn. statei. Minsk, 1991. P. 146–169 (in Russ.).

34. Thompson J. Green-tree retention in harvest units: boon or bust for biodiversity? *Science Findings*. 2007. No. 96.

35. Kazulka H. A., Kazulka T. N. Role of logging residues in conservation of beneficial invertebrates. *Lesnaya nauka na rubezhe XXI veka* : sb. nauchn. tr. Gomel, 1997. Issue 46. P. 119–121 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 21.04.2017.
Received by editorial board 21.04.2017.

УДК 591.9:595.796

ОСОБЕННОСТИ ЭКОЛОГИИ И ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЧЕТЫРЕХТОЧЕЧНОГО МУРАВЬЯ (*DOLICHODERUS QUADRIPUNCTATUS* (LINNAEUS, 1771)) НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

О. В. СИНЧУК[1)]**,** ***В. В. БЛИНОВ***[2)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Военное информационное агентство Вооруженных сил Республики Беларусь «Ваяр», ул. М. Богдановича, 29, 220029, г. Минск, Беларусь*

Рассмотрены особенности экологии и географическое распространение четырехточечного муравья – *Dolichoderus quadripunctatus* (Linnaeus, 1771) – в условиях Беларуси. Отмечается, что вид впервые обнаружен на территории страны в 1980 г. на юге Национального парка «Припятский». Установлено, что для четырехточечного муравья северная граница ареала проходит по югу и востоку Беларуси. Самая северная точка регистрации *D. quadripunctatus* (зафиксирована 12.08.2015 г.) находится в городском парке г. Шклова. Уточняется, что данный дендробионт образует гнезда в различных лиственных древесных растениях: *Salix* sp., *Quercus robur*, *Carpinus* sp., *Alnus glutinosa*, *Acer platanoides*, *Populus* sp., *Cornus* sp., *Juglans regia*, *Tilia cordata*. Сделан вывод о том, что наиболее предпочтительными для заселения являются дубравы. Охрана вида осуществляется путем поддержания естественной среды обитания.

Ключевые слова: *Dolichoderus quadripunctatus*; муравьи; географическое распространение; Беларусь.

FEATURES OF ECOLOGY AND DISTRIBUTION *DOLICHODERUS QUADRIPUNCTATUS* (LINNAEUS, 1771) IN BELARUS

A. V. SINCHUK[a]**,** ***V. V. BLINOV***[b]

[a]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*
[b]*Vayar Military Information Agency, Belarusian Armed Forces, M. Bahdanoviča Street, 29, 220029, Minsk, Belarus*
Corresponding author: A. V. Sinchuk (aleh.sinchuk@gmail.com)

The article deals with the geographical distribution and ecological features of *Dolichoderus quadripunctatus* (Linnaeus, 1771) in Belarus. This species first was discovered in 1980 in the south of the Pripyat National Park. It was found that the northern boundary of the range of *D. quadripunctatus* passes over the south and east of Belarus. The northernmost point of registration of *D. quadripunctatus* (12.08.2015) is in Shklov city park. This dendrobionts forms colonies in

Образец цитирования:
Синчук О. В., Блинов В. В. Особенности экологии и географическое распространение четырехточечного муравья (*Dolichoderus quadripunctatus* (Linnaeus, 1771)) на территории Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 90–96.

For citation:
Sinchuk A. V., Blinov V. V. Features of ecology and distribution *Dolichoderus quadripunctatus* (Linnaeus, 1771) in Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 90–96 (in Russ.).

Авторы:
Олег Викторович Синчук – ассистент кафедры зоологии биологического факультета.
Владимир Викторович Блинов – кандидат биологических наук; фотокорреспондент.

Authors:
Aleh Sinchuk, assistant at the department of zoology, faculty of biology.
aleh.sinchuk@gmail.com
Vladimir Blinov, PhD (biology); photocorrespondent.
vb@tut.by

a various foliar woody plants: *Salix* sp., *Quercus robur*, *Carpinus* sp., *Alnus glutinosa*, *Acer platanoides*, *Populus* sp., *Cornus* sp., *Juglans regia*, *Tilia cordata*. The oaks are the most preferred for the settlement. The protection of species realizes through the conservation of natural habitats.

***Key words*:** *Dolichoderus quadripunctatus*; ants; distribution; Belarus.

На территории Беларуси в настоящее время известно более 60 видов муравьев [1; 2]. В литературе имеются только краткие указания, касающиеся их географического распространения в пределах границ республики [2–5], а для некоторых видов они вообще отсутствуют [1]. При этом сведения весьма спорадичны и не дают четкой картины о местах обитания многих видов муравьев.

Географические исследования населения муравьев на территории страны, проведенные в 1984 г., показывают, что границы распределения значительного числа видов (не менее 18) часто совпадают с очертаниями геоботанических подзон Беларуси [3]. Это заключение основано на специфике биотопического распределения и экологии представителей семейства Formicidae. Одним из видов, экологические особенности которого напрямую коррелируют с геоботаническими характеристиками территории, является четырехточечный муравей – *Dolichoderus quadripunctatus* (Linnaeus, 1771).

Четырехточечный муравей впервые обнаружен на территории Беларуси в Национальном парке (НП) «Припятский» и упоминается в публикации за 1984 г. [4]. Сообщения о регистрации этого вида присутствуют и в некоторых других источниках [5–8].

Муравьи вида *D. quadripunctatus* относятся к подсемейству Dolichoderinae (Formicidae) [9; 10]. У рабочих муравьев голова и брюшко черные. Мандибулы, усики, мезосома и стебелек с чешуйкой красные или коричневато-красные. Голова яйцевидной формы с выпуклыми боками и сильно закругленными углами. Проподеум угловатый, выступающий назад, в профиль сильно вогнут. Брюшко блестящее, на дорсальной стороне первых двух тергитов, после стебелька, располагаются четыре бледно-желтых расплывчатых пятна (иногда встречаются особи с двумя точками). Длина рабочего муравья составляет 3–4 мм (рис. 1).

Рис. 1. Рабочий муравей *D. quadripunctatus*
(фото О. В. Синчука)

Fig. 1. The worker ant of *D. quadripunctatus*
(photo of A. V. Sinchuk)

D. quadripunctatus питается выделениями тлей и червецов [11], а также листогрызущими вредителями.

Четырехточечный муравей относится к европейско-кавказскому виду [11]. Распространен в Центральной, Восточной и Южной Европе (отсутствует в Англии и Исландии) [12; 13] – от Франции и Испании [1] далее на восток до Волги (Ульяновская область [14], Чувашия [15; 16], Закавказье (Армения, Грузия) [17; 18]) (рис. 2).

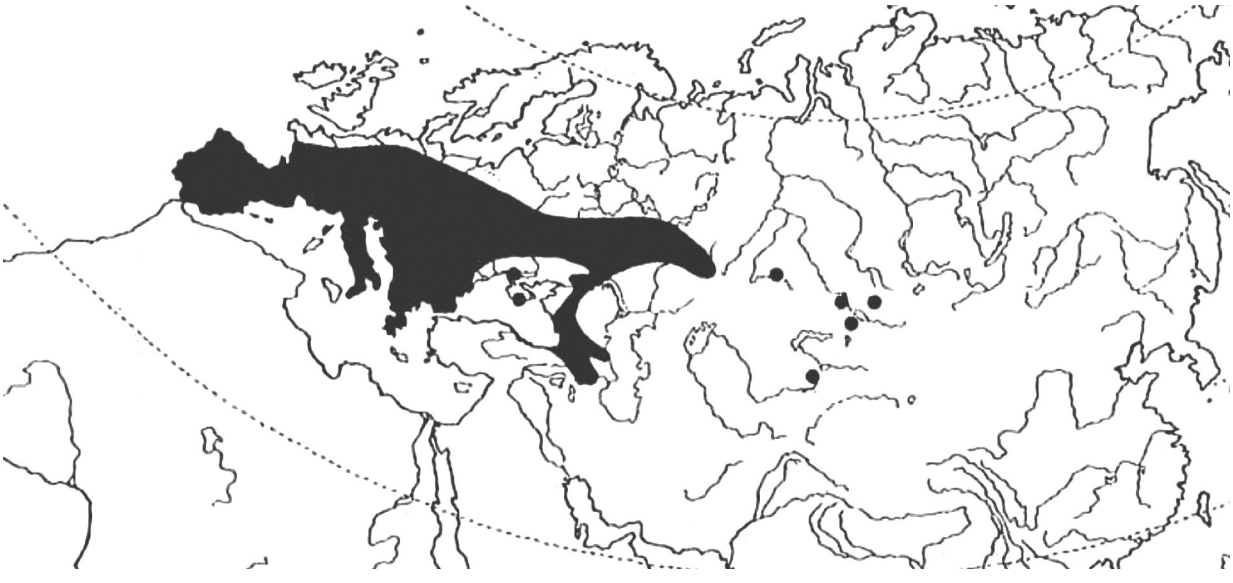


Рис. 2. Распространение *D. quadripunctatus* в Палеарктике [12]

Fig. 2. Distribution *D. quadripunctatus* in Palaearctic region [12]

Поскольку четкое описание экологии и границ ареала *D. quadripunctatus* на территории страны отсутствует, целью настоящего исследования является установление особенностей экологии и географического распространения данного вида в Беларуси.

Материалы и методы исследования

Материалами для исследования послужили сборы, сделанные нами в 1979–2000 (В. В. Блинов) и 2014–2016 гг. (О. В. Синчук). Для этого использовались различные энтомологические методы [19], однако наиболее эффективным способом поиска *D. quadripunctatus* являлось визуальное обследование лиственных древесных растений в местах трещин, расколов, усыханий, а также доступных для изучения дупел. Обнаружение данного вида осложнялось тем, что гнезда четырехточечного муравья могут находиться на высоте нескольких метров над землей. Идентификация полученного фаунистического материала проводилась по соответствующим определительным таблицам [2; 12; 20]. Структурирование информации и построение карты осуществлялись с помощью программ LibreOffice Calc и RStudio [21].

Результаты исследования и их обсуждение

Первая находка четырехточечного муравья на территории Беларуси была зарегистрирована 18.07.1980 г. на пойменном лугу у р. Припяти в ивняке, на юге НП «Припятский» (см. таблицу).

Самая северная точка регистрации *D. quadripunctatus* отмечена в городском парке г. Шклова (col. Синчук, 2015). Точка регистрации вида в Несвижском районе указывается с устного сообщения доцента кафедры зоологии БГУ В. И. Хвира: муравей обнаружен в 1990-х гг. в деревянной постройке, наблюдался в течение нескольких лет (см. таблицу).

Наибольшее число семей *D. quadripunctatus*, зарегистрированных на данный момент, обнаружено в НП «Припятский»: в период с 1980 по 1994 г. там было найдено 38 гнезд [8].

На территории Беларуси наиболее предпочтительными для проживания данного вида муравьев являются лиственные породы. Гнезда обнаружены в иве (*Salix* sp.), дубе черешчатом (*Quercus robur*), грабе (*Carpinus* sp.), ольхе черной (*Alnus glutinosa*), клене остролистном (*Acer platanoides*), тополе (*Populus* sp.), грецком орехе (*Juglans regia*), свидине (*Cornus* sp.), липе мелколистной (*Tilia cordata*) (см. таблицу). Однако оптимальным для обитания *D. quadripunctatus* является *Q. robur*. В 2011 г. на территории

Франции [22] была найдена молодая семья муравьев, которая в качестве местообитания использовала желудь дуба черешчатого, что вполне можно встретить и на территории Беларуси.

Из полученных данных видно, что *D. quadripunctatus* чаще регистрировался на юге страны, где плотность дубрав значительно выше [23] (рис. 3).

Точки сбора *D. quadripunctatus* на территории Беларуси с указанием растения, в котором основано гнездо

Points collection *D. quadripunctatus* on the territory of Belarus with an indication of the plant which was created anthill

Дата сбора	Точка сбора фактического материала	Географические координаты	Растение, в котором основано гнездо	Сборщик материала
18.07.1980	д. Хлупин, Житковичский р-н, Гомельская обл.	–	*Salix* sp.	В. В. Блинов
20.07.1980	д. Хлупин, Житковичский р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
07.06.1981	д. Хвоенск, Житковичский р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
08.06.1981	д. Хвоенск, Житковичский р-н, Гомельская обл.	–	*Carpinus* sp.	В. В. Блинов
11.06.1981	д. Хвоенск, Житковичский р-н, Гомельская обл.	–	*Alnus glutinosa*	В. В. Блинов
18.07.1981	д. Засинцы, Ельский р-н, Гомельская обл.	–	–	В. В. Блинов
25.06.1983	г. Лунинец, Лунинецкий р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
13.08.1983	д. Марковское, Лельчицкий р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
15.05.1984	д. Струки, Буда-Кошелевский р-н, Гомельская обл.	–	*Carpinus* sp.	В. В. Блинов
20.05.1984	д. Чистая Лужа, Калинковичский р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
21.05.1984	д. Залядье, Гомельский р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
23.05.1984	д. Красное, Брагинский р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
29.05.1984	д. Дубровица, Хойникский р-н, Гомельская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
27.06.1986	д. Петровичи, Жабинковский р-н, Брестская обл.	–	*Quercus robur*	В. В. Блинов
1990-е гг.	д. Панютичи, Несвижский р-н, Минская обл.	53° 13′ 31,9″ с. ш. 26° 27′ 12,8″ в. д.	в старом деревянном доме	В. И. Хвир
06.06.2015	г. Жабинка, Жабинковский р-н, Брестская обл.	52° 11′ 35,1″ с. ш. 24° 01′ 28,8″ в. д.	*Acer platanoides*	О. В. Синчук
08.08.2015	г. Жабинка, Жабинковский р-н, Брестская обл.	52° 12′ 10,6″ с. ш. 24° 01′ 12,2″ в. д.	*Quercus robur*	О. В. Синчук
06.06.2015	д. Верхолесье, Кобринский р-н, Брестская обл.	52° 04′ 39,6″ с. ш. 24° 17′ 39,2″ в. д.	*Quercus robur*	О. В. Синчук
12.08.2015	г. Шклов (городской парк), Шкловский р-н, Могилёвская обл.	54° 12′ 54,1″ с. ш. 30° 17′ 22,4″ в. д.	*Quercus robur*	О. В. Синчук
10.06.2016	около ж/д ст. Белынковичи, Костюковичский р-н, Могилёвская обл.	53° 13′ 48,4″ с. ш. 32° 09′ 45,0″ в. д.	*Populus* sp.	О. В. Синчук
10.06.2016	около ж/д ст. Белынковичи, Костюковичский р-н, Могилёвская обл.	53° 13′ 56,1″ с. ш. 32° 09′ 46,0″ в. д.	*Quercus robur*	О. В. Синчук

Окончание табл. 1
Ending table 1

Дата сбора	Точка сбора фактического материала	Географические координаты	Растение, в котором основано гнездо	Сборщик материала
25.06.2016	агрогородок Люсино, Ганцевичский р-н, Брестская обл.	52° 37′ 44,4″ с. ш. 26° 30′ 50,7″ в. д.	*Tilia cordata*	О. В. Синчук
09.07.2016	г. Марьина Горка (парк им. Л. Гайдученок), Пуховичский р-н, Минская обл.	53° 31′ 10,1″ с. ш. 28° 08′ 32,2″ в. д.	*Tilia cordata*	О. В. Синчук
16.07.2016	г. Гродно, ул. Калиновского, Гродненский р-н, Гродненская обл.	53° 41′ 26,5″ с. ш. 23° 48′ 33,1″ в. д.	*Juglans regia*	О. В. Синчук
20.08.2016	г. Старые Дороги (парк), Стародорожский р-н, Минская обл.	53° 02′ 21,5″ с. ш. 28° 16′ 03,0″ в. д.	*Tilia cordata*	О. В. Синчук
22.10.2016	г. Гомель, ул. Привокзальная, Гомельский р-н, Гомельская обл.	52° 25′ 41,7″ с. ш. 30° 59′ 41,9″ в. д.	*Cornus* sp.	О. В. Синчук

Данный дендробионт предпочитает умеренно влажные условия (мезофил) [6; 7] и наиболее часто встречается в луговиковых (*Quercetum airosum*), приуслово-пойменных (*Quercetum subalveto-fluvialis*) и папоротниковых (*Quercetum filicosum*) дубравах. Реже его можно обнаружить в более сухих кисличной (*Quercetum oxalidosum*) и орляковой (*Quercetum pteridiosum*) дубравах, очень редко – в мелколиственных лесах. Четырехточечный муравей является макротермом (предпочитает относительно высокотемпературные условия обитания). Гнезда устраивает в сухих или усыхающих деревьях – в трещинах, под корой, в небольших полостях и дуплах. Муравьи избегают прямого солнечного освещения, выбирая затенение (умброфилы).

Учитывая особенности экологии четырехточечного муравья, можно говорить о том, что данный вид характеризуется биотопическим распределением. Для зоогеографического распределения может быть использовано геоботаническое деление территории Беларуси.

Наибольшая плотность дубрав отмечается на юге страны, а именно в Гомельской [24] и Брестской областях [24; 25]. Климат данных регионов характеризуется значительной влажностью и высокими среднесуточными температурами, что и позволяет четырехточечному муравью максимально плотно образовывать здесь семьи. Одним из самых заселенных участков являются дубравы НП «Припятский» [8].

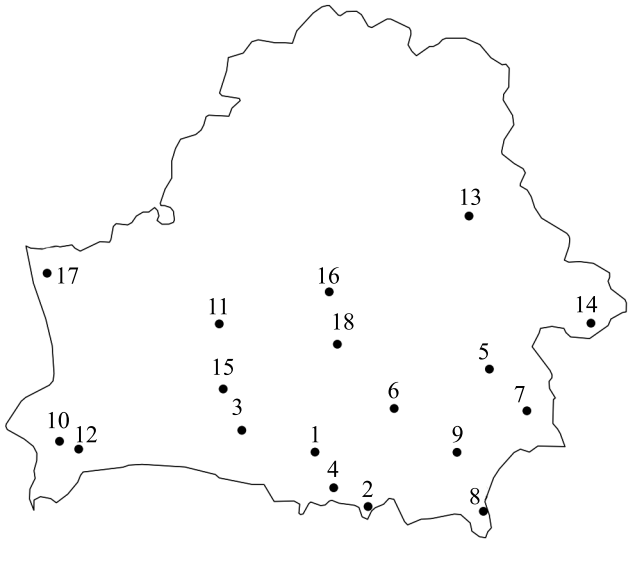


Рис. 3. Географическое распространение *D. quadripunctatus* на территории Беларуси (1980–2016):
1 – д. Хлупин, д. Хвоенск; 2 – д. Засинцы; 3 – г. Лунинец; 4 – д. Марковское; 5 – д. Струки;
6 – д. Чистая Лужа; 7 – г. Гомель, д. Залядье; 8 – д. Красное; 9 – д. Дубровица; 10 – г. Жабинка, д. Петровичи;
11 – д. Панютичи; 12 – д. Верхолесье; 13 – г. Шклов; 14 – окрестности ж/д станции Белынковичи;
15 – агрогородок Люсино; 16 – г. Марьина Горка; 17 – г. Гродно; 18 – г. Старые Дороги

Fig. 3. Geographical distribution *D. quadripunctatus* in Belarus (1980–2016):
1 – Hlupin, Hvajensk; 2 – Zasintsy; 3– Luninets; 4 – Markouskae; 5 – Struki; 6 – Chystaja Luzha; 7 – Gomel, Zaljaddzie;
8 – Krasnae; 9 – Dubrovica; 10 – Zhabinka, Pjatrovichy; 11– Panjutichy; 12 – Verhalesse; 13 – Shkloŭ;
14 – neighborhood of the railway station Bjalynkavichy; 15 – Ljusina; 16 – Maryina Horka; 17 – Grodno; 18 – Staryya Darohi

Заключение

Таким образом, наиболее плотные популяции *D. quadripunctatus* встречаются на юге Беларуси. Вид обитает на территории Брестской, Гомельской, Минской и Могилёвской областей. Четырехточечный муравей характеризуется биотическим распределением. Предполагается, что для описания географического распространения можно использовать геоботаническое деление Беларуси на подзоны. *D. quadripunctatus* тесно связан с широколиственными лесами и древесными породами. Данный вид относится к редким, что обусловлено особенностями его экологии. Охрана вида осуществляется путем поддержания естественной среды обитания.

Библиографические ссылки

1. *Borowiec L*. Catalogue of ants of Europe, the Mediterranean Basin and adjacent regions (Hymenoptera: Formicidae) // Genus. 2014. Vol. 25, issue 1–2. P. 1–340.

2. *Синчук О. В.* Определитель муравьев (Hymenoptera: Formicidae) Беларуси. Минск, 2015.

3. *Блинов В. В*. Географическая характеристика населения муравьев Белоруссии // Проблемы почвенной зоологии : тез. докл. VIII Всесоюз. совещ. (Ашхабад, сент. 1984 г.). Ашхабад, 1984. Кн. 1. С. 39–40.

4. *Блинов В. В*. Новые для фауны Белоруссии виды муравьев // Вестн. АН БССР. Сер. биол. наук. 1984. № 5. С. 113–115.

5. *Блинов В. В*. Муравьи юга Белоруссии. Минск, 1985. Деп. в ВИНИТИ 24.04.1985, № 2757-85.

6. *Блинов В. В.* Муравьи Белорусского Полесья, фауна и биотопическое распределение // Животный мир Белорусского Полесья: охрана и рациональное использование : тез. докл. IV обл. итог. науч. конф. (Гомель, 1985 г.). Гомель, 1985. С. 19–20.

7. *Бліноў У. В.* Мурашкі ахоўных тэрыторый Беларусі // Вестн. АН БССР. Сер. биол. наук. 1985. № 6. С. 91–96.

8. *Блинов В. В.* Семейство муравьи – Formicidae // Беспозвоночные национального парка «Припятский» : справ. 1997. С. 145–148.

9. *Bolton B*. Identification guide to the ant genera of the world. Cambridge, Massachusetts, 1994.

10. *Bolton B.* An online catalog of the ants of the world // Antcat [Electronic resource]. 2016. URL: http://www.antcat.org (date of access: 13.02.2016).

11. *Захаров А. А*. Муравьи лесных сообществ, их жизнь и роль в лесу. М., 2015.

12. *Czechowski W., Radchenko A., Czechowska W.* The ants (Hymenoptera, Formicidae) of Poland. Warszawa, 2002.

13. *Dolichoderus quadripunctatus* // AntWiki [Electronic resource]. 2016. URL: http://www.antwiki.org/wiki/Dolichoderus_quadripunctatus (date of access: 13.09.2016).

14. *Буганин С. И*. К фауне муравьев Ульяновской области // Насекомые Ульяновской области. Вып. 5. Ульяновск, 1994. С. 125–129.

15. *Красильников В. А.* Необычная находка нового вида муравьев для Чувашской Республики (*Dolichoderus quadripunctatus*) // Экол. вестн. Чуваш. Респ. 2000. Вып. 21. С. 16–17.

16. *Красильников В. А.* Обнаружение живых муравьев в плодах граната в Чувашской Республике: новый для местной фауны вид // Муравьи и защита леса : материалы XI Всеросс. мирмеколог. симп. (Пермь, 20–26 авг. 2001 г.). Пермь, 2001. С. 147–148.

17. *Atanassov N., Dlussky G. M*. Fauna of Bulgaria. Hymenoptera, Formicidae // Fauna Bûlg. 1992. Vol. 22. P. 1–310.

18. *Arakelian G. R.* Fauna of the Republic of Armenia. Hymenopterous insects. Ants (Formicidae). Erevan, 1994.

19. Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity / ed. by D. Agosti, J. D. Majer, L. E. Alonso, et al. Washington, 2000.

20. *Арнольди К. В., Длусский Г. М.* Сем. Formicidae – муравьи // Определитель насекомых европейской части СССР / под ред. Г. С. Медведева. Ленинград, 1978. Т. 3, ч. 1. С. 519–556.

21. *Синчук О. В., Буга С. В.* Картирование распространения инвазивных видов животных фауны Беларуси средствами RSTUDIO // Международный конгресс по информатике: информационные системы и технологии : материалы Междунар. науч. конгр. (Минск, 24–27 окт. 2016 г.). Минск, 2016. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). С. 185–188.

22. *Sinchuk A*. La faune entomologique d'un site contaminé par le cuivre et les HAPs. Talence, 2012.

23. *Юркевич И. Д., Ловчий Н. Ф., Гельтман В. С.* Леса Белорусского Полесья (геоботанические исследования). Минск, 1977.

24. *Юркевич И. Д.* Дубравы Белорусской ССР и их восстановление. Минск, 1960.

25. *Окоронка И. В.* Дубравы брестского Полесья // VI межвузовская научно-методическая конференция молодых ученых : сб. материалов (Брест, 14 мая 2004 г.). Брест, 2004. С. 51–53.

References

1. Borowiec L. Catalogue of ants of Europe, the Mediterranean Basin and adjacent regions (Hymenoptera: Formicidae). *Genus*. 2014. Vol. 25, issue 1–2. P. 1–340.

2. Sinchuk A. V. [Identification guide to the ant (Hymenoptera: Formicidae) of Belarus]. Minsk, 2015 (in Russ.).

3. Blinov V. V. [The geographic characteristics of the population ants of Belarus]. *Problemy pochvennoi zoologii* : tezisy dokladov Vsesoyuznogo soveschaniya (Ashgabat, Sept., 1984). Ashgabat, 1984. Book 1. P. 39–40 (in Russ.).

4. Blinov V. V. [New for the fauna of Belarus species of ants]. *Vestnik AN BSSR. Ser. biol. nauk*. 1984. No. 5. P. 113–115 (in Russ.).

5. Blinov V. V. [Ants south of Belarus]. Minsk, 1985. Dep. v VINITI 24.04.1985, No. 2757-85 (in Russ.).

6. Blinov V. V. [Ants Belorussian Polessye, fauna and habitat distribution]. *Zhivotnyi mir Belorusskogo Poles'ya: okhrana i ratsional'noe ispol'zovanie* : tezisy dokladov IV obl. itogovoi nauchn. konf. (Gomel, 1985). Gomel, 1985. P. 19–20 (in Russ.).

7. Blinov V. V. [Ants protected areas of Belarus]. *Vestnik AN BSSR. Ser. biol. nauk*. 1985. No. 6. P. 91–96 (in Belarus.).

8. Blinov V. V. [The family of ants – Formicidae]. *Bespozvonochnye natsional'nogo parka «Pripyatskii*» : dir. 1997. P. 145–148 (in Russ.).

9. Bolton B. Identification guide to the ant genera of the world. Cambridge, Massachusetts, 1994.

10. Bolton B. An online catalog of the ants of the world. *Antcat*. 2016. URL: http://www.antcat.org (date of access: 13.02.2016).

11. Zakharov A. A. [Ants of forest communities, their lives and their role in the forest]. Moscow, 2015 (in Russ.).

12. Czechowski W., Radchenko A., Czechowska W. The ants (Hymenoptera, Formicidae) of Poland. Warsaw, 2002.

13. *Dolichoderus quadripunctatus. AntWiki*. 2016. URL: http://www.antwiki.org/wiki/Dolichoderus_quadripunctatus (date of access: 13.09.2016).

14. Buganin S. I. [On the fauna of ants Ulyanovsk region]. *Nasekomye Ul'yanovskoi oblasti.* Issue 5. Ulyanovsk, 1994. P. 125–129 (in Russ.).

15. Krasil'nikov V. A. [Unusual discovery of a new species of ants for the Chuvash Republic (*Dolichoderus quadripunctatus*). *Ekol. vestnik Chuvashskoi Resp.* 2000. Issue 21. P. 16–17 (in Russ.).

16. Krasil'nikov V. A. [Detection of live ants in the fruit of the pomegranate in the Chuvash Republic: a new kind of local fauna]. *Murav'i i zaschita lesa* : materialy XI Vseross. mirmekologicheskogo simp. (Perm, 20–26 Aug., 2001). Perm, 2001. P. 147–148 (in Russ.).

17. Atanassov N., Dlussky G. M. Fauna of Bulgaria. Hymenoptera, Formicidae. *Fauna Bûlg*. 1992. Vol. 22. P. 1–310.

18. Arakelian G. R. Fauna of the Republic of Armenia. Hymenopterous insects. Ants (Formicidae). Erevan, 1994.

19. Agosti D., Majer J. D., Alonso L. E., et al. (eds.) Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity. Washington, 2000.

20. Arnol'di K. V., Dlusskii G. M. Sem. Formicidae – murav'i. *Opredelitel' nasekomykh evropeyskoi chasti SSSR*. 1978. Vol. 3, part 1. P. 519–556 (in Russ.).

21. Sinchuk A. V., Buga S. V. Mapping the spread of invasive species of fauna of Belarus animals means RSTUDIO. *International congress on computer science: information systems and technologies* : proc. of the Int. sci. congr. (Minsk, 24–27 Oct., 2016). Minsk, 2016. 1 electron. opt. disk (CD-ROM). P. 185–188 (in Russ.).

22. Sinchuk A. La faune entomologique d'un site contaminé par le cuivre et les HAPs. Talence, 2012 (in Fr.).

23. Yurkevich I. D., Lovchii N. F., Gel'tman V. S. [The forests of Belorussian Polessie (Geobotanical Investigations)]. Minsk, 1977 (in Russ.).

24. Yurkevich I. D. [Oakwood Belorussian SSR and the restoration]. Minsk, 1960 (in Russ.).

25. Okoronka I. V. [Oakwood Brest Polessye]. *VI mezhvuzovskaya nauchn.-metodicheskaya konferentsiya molodykh uchenykh* : sb. materialov (Brest, 14 May, 2004). Brest, 2004. P. 51–53 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 21.12.2016.
Received by editorial board 21.12.2016.

Систематика

Taxonomy

УДК 594 (282.247.28)(476)

ФАУНА ВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ (MOLLUSCA: GASTROPODA, BIVALVIA) РЕКИ НЕМАН И ЕЕ ПРИТОКОВ

М. Д. МОРОЗ[1)]***, Т. П. ЛИПИНСКАЯ***[1)]***, Т. М. ЛАЕНКО***[1)]

[1)]*Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь*

Приведены результаты исследований водных моллюсков р. Неман и ее притоков. Обнаружено 42 вида водных моллюсков, которые относятся к двум классам (Gastropoda, Bivalvia) и входят в состав семи отрядов: Neritopsina (1 вид), Architaenioglossa (2), Neotaenioglossa (3), Ectobranchia (3), Pulmonata (19), Unionoida (4), Veneroidea (10 видов). Отмечается, что важной особенностью изученных рек является обитание там ряда редких и охраняемых видов водных моллюсков, внесенных в Красную книгу Республики Беларусь и Красные списки ряда европейских стран. Обнаружены охраняемый в Беларуси вид *Unio crassus* Philipsson, 1788, и два инвазивных вида моллюсков – *Lithoglyphus naticoides* (C. Pfeiffer, 1828) и *Physella acuta* (Draparnaud, 1805). Сделан вывод о том, что изученные реки имеют большое региональное значение в поддержании высокого биологического разнообразия фауны водных моллюсков, в том числе редких и охраняемых в Беларуси и Европе видов. Река Неман служит естественным коридором, по которому возможен обмен видами водных моллюсков (включая инвазивные) между Средней и Восточной Европой.

Ключевые слова: водотоки; таксономическая структура; редкие виды; охраняемые и инвазивные виды; Беларусь.

Благодарность. Авторы выражают глубокую признательность В. П. Семенченко за поддержку и советы в проведении исследований и Т. М. Рыбкиной за помощь в осуществлении полевых работ. Исследования выполнены при поддержке отдельного гранта Национальной академии наук Беларуси, утвержденного постановлением Бюро Президиума № 7 от 14 января 2014 г.

Образец цитирования:
Мороз М. Д., Липинская Т. П., Лаенко Т. М. Фауна водных моллюсков (Mollusca: Gastropoda, Bivalvia) реки Неман и ее притоков // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 97–102.

For citation:
Moroz M. D., Lipinskaya T. P., Laenko T. M. Fauna of the aquatic mollusks (Mollusca: Gastropoda, Bivalvia) of the Neman river and its tributaries. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 97–102 (in Russ.).

Авторы:
Михаил Дмитриевич Мороз – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории гидробиологии.
Татьяна Петровна Липинская – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории гидробиологии.
Татьяна Максимовна Лаенко – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории гидробиологии.

Authors:
Michail Moroz, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of hydrobiology.
mdmoroz@bk.ru
Tatsiana Lipinskaya, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of hydrobiology.
tatsiana.lipinskaya@gmail.com
Tatsiana Laenko, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of hydrobiology.
tlaenko@gmail.com

FAUNA OF THE AQUATIC MOLLUSKS (MOLLUSCA: GASTROPODA, BIVALVIA) OF THE NEMAN RIVER AND ITS TRIBUTARIES

M. D. MOROZ[a], *T. P. LIPINSKAYA*[a], *T. M. LAENKO*[a]

[a]*The Scientific and Practical Center of the National Academy of Science of Belarus for Bioresources, Akademiečnaja Street, 27, 220072, Minsk, Belarus*

Corresponding author: M. D. Moroz (mdmoroz@bk.ru)

The aquatic mollusks of the Neman river and its tributaries were studied. 42 species of aquatic mollusks belonging to 7 orders: Neritopsina – 1; Architaenioglossa – 2; Neotaenioglossa – 3; Ectobranchia – 3; Pulmonata – 19; Unionoida – 4; Veneroidea – 10 species were registered. Important feature of studied rivers is availability of habitats for rare and protected species of the aquatic molluscs in Belarus and different European countries. Registered a protected species *Unio crassus* Philipsson, 1788 and two invasive species – *Lithoglyphus naticoides* (C. Pfeiffer, 1828) and *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) were found. Our research has shown that the studied rivers are important to maintain biological diversity of the water mollusks. The Neman river can play the role of the Natural Migration Corridor for f aquatic mollusks Central and Eastern Europe.

Key words: waterways; taxonomical structure; rare species; the protected and invasive species; Belarus.

Acknowledgements. Authors expresses deep gratitude to V. P. Semenchenko for support and councils in carrying out researches and T. M. Rybkina for the help in performance of field works. Researches are executed with assistance of a separate grant of the National Academy of Science of Belarus approved by the resolution of Bureau of Presidium No. 7 of 14.01.2014.

Введение

Водные моллюски являются одной из многочисленных групп бентосных животных, обитающих в текучих и стоячих континентальных водоемах. Необходимо признать, что в настоящее время базовых данных о видовом составе и численности этой группы гидробионтов, обитающих в р. Неман и ее притоках, недостаточно или они представлены фрагментарно [1–3]. Это и обусловило цель настоящего исследования: изучить фауну водных моллюсков на разных участках р. Неман и ее притоках, к которым принадлежат реки Котра, Зельвянка, Дитва, Гавья, Уша и Ислочь [4; 5].

Неман является одной из наиболее крупных рек Беларуси (после Днепра и Западной Двины). Ее длина достигает 937 км (в том числе на территории Беларуси – 459 км). Площадь водосбора в пределах Беларуси охватывает 35 000 км^2. Общее падение реки в Беларуси составляет 96,5 м, средний наклон водной поверхности равен 0,21 ‰. Дно песчаное, на перекатах песчано-каменистое и галечное. Течение спокойное, со средней скоростью 0,6–0,8 м/с и колебаниями от 0,2 до 2,0 м/с в половодье. Среднегодовой расход воды составляет 680 м^3/с.

Река Котра имеет длину 140 км, площадь водосбора составляет 2060 км^2, среднегодовой расход воды в устье достигает 12,8 м^3/с, средний наклон водной поверхности равен 0,2 ‰. Истоки реки расположены в Алитусском уезде Литвы, практически на всем протяжении она течет через лес. В нижнем течении русло извилистое.

Река Зельвянка имеет длину 170 км, площадь водосбора составляет 1940 км^2, среднегодовой расход воды в устье достигает 11 м^3/с. Пойма заболоченная, ровная, шириной 2,5 км, в среднем течении и низовье – от 0,4 до 0,6 км. Русло извилистое, местами канализировано.

Река Дитва имеет длину 93 км (в границах Беларуси – около 90 км). Площадь водосбора составляет 1220 км^2, среднегодовой расход воды в устье достигает 8,2 м^3/с, средний наклон водной поверхности равен 0,4 ‰. Пойма двусторонняя, заболоченная.

Река Гавья имеет длину 100 км (в границах Беларуси – 68 км), площадь водосбора составляет 1680 км^2, среднегодовой расход воды в устье достигает 13,6 м^3/с, средний наклон водной поверхности равен 0,9 ‰. Пойма луговая, русло извилистое, берега крутые.

Река Уша имеет длину 75 км, площадь водосбора составляет 780 км^2, среднегодовой расход воды в устье достигает 6,01 м^3/с, средний наклон водной поверхности равен 2,2 ‰. Ширина поймы – от 0,4 до 0,7 км, русло на протяжении 35 км канализовано.

Река Ислочь имеет длину 102 км, площадь водосбора составляет 1330 км^2, среднегодовой расход воды в устье достигает 10 м^3/с, средний наклон водной поверхности равен 1,9 ‰. Пойма в верховье ровная, русло извилистое, зарегулировано тремя плотинами, берега крутые, обрывистые.

Материалы и методы исследования

Сборы, послужившие материалом для настоящей работы, были проведены в апреле – мае и сентябре 2014 и 2015 гг. в прибрежной части рек на глубине 0,5 м.

Пробы брались с использованием стандартного гидробиологического сачка. На каменистых грунтах и в местах развития макрофитов производилась выемка камней, коряг и растений с последующим осмотром и отбором животных. За время исследований собрано и проанализировано около 100 проб, изучено 4835 экземпляра водных моллюсков.

Исследования проведены на следующих створах рек:

1 – р. Котра (д. Котра, Гродненский р-н), 53° 35′ 02,6″ с. ш., 024° 11′ 30,5″ в. д.;
2 – р. Неман (г. п. Гожа, Гродненский р-н), 53° 48′ 33,6″ с. ш., 023° 50′ 56,1″ в. д.;
3 – р. Неман (г. п. Лунно, Мостовский р-н), 53° 27′ 32,2″ с. ш., 024° 16′ 44,0″ в. д.;
4 – р. Зельвянка (д. Пески, Мостовский р-н), 53° 21′ 34,3″ с. ш., 024° 37′ 50,1″ в. д.;
5 – р. Дитва (д. Малое Ольжево, Лидский р-н), 53° 49′ 36,9″ с. ш., 025° 08′ 06,2″ в. д.;
6 – р. Гавья (д. Залейки, Ивьевский р-н), 53° 50′ 42,4″ с. ш., 025° 35′ 48,1″ в. д.;
7 – р. Неман (д. Дындылишки, Ивьевский р-н), 53° 51′ 44,1″ с. ш., 025° 44′ 21,1″ в. д.;
8 – р. Неман (г. п. Любча, Новогрудский р-н), 53° 45′ 37,9″ с. ш., 026° 04′ 01,7″ в. д.;
9 – р. Уша (д. Трощицы, Кореличский р-н), 53° 29′ 37,9″ с. ш., 026° 22′ 59,5″ в. д.;
10 – р. Неман (д. Дрозды, Столбцовский р-н), 53° 29′ 14,4″ с. ш., 027° 01′ 13,9″ в. д.;
11 – р. Неман (д. Николаевщина, Столбцовский р-н), 53° 25′ 31,3″ с. ш., 026° 48′ 44,1″ в. д.;
12 – р. Ислочь (агрогородок Раков, Воложинский р-н), 53° 58′ 22,7″ с. ш., 026° 40′ 49,4″ в. д.

Результаты исследования и их обсуждение

Всего выявлено 42 вида водных моллюсков, относящихся к двум классам (Gastropoda, Bivalvia) и входящих в состав семи отрядов: Neritopsina (1 вид), Architaenioglossa (2), Neotaenioglossa (3), Ectobranchia (3), Pulmonata (19), Unionoida (4), Veneroidea (10 видов) (см. таблицу).

Среди изученных моллюсков доминирующим видом был *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758) – 1200 экз. (24,73 % всех собранных животных), субдоминантом являлся вид *Bithynia tentaculata* (Linnaeus, 1758) – 638 экз. (13,15 %). Эти виды моллюсков характеризуются большой экологической пластичностью, обитают в реках, каналах и пойменных стоячих водоемах. Они широко распространены на территории Беларуси [1].

К охраняемым видам в Беларуси относится перловица толстая – *Unio crassus* Philipsson, 1788, имеющая национальный статус охраны III. Этот вид также охраняется в Европе (Приложение II Бернской конвенции «Об охране дикой фауны, флоры и природных сред обитания (биотопов) в Европе») и входит в национальные Красные списки ряда европейских стран, а также России [6].

Перловица толстая относится к европейскому ареалу, но к северу встречается реже. Обитает в реках с прозрачной водой и быстрым течением. С прошлого века этот моллюск находится под угрозой исчезновения [7; 8]. Продолжительность его жизни может достигать 20–30 лет. Ювенильные особи *U. crassus* очень чувствительны к эвтрофикации [1]. Материал: р. Неман (д. Дрозды, Столбцовский р-н) – 1 экз. (12.09.2015); р. Неман (д. Николаевщина, Столбцовский р-н) – 2 экз. (08.09.2014).

Несколько выявленных нами видов водных моллюсков также входят в национальные Красные списки ряда стран Европы. К ним относятся *Viviparus contectus* (Millet, 1813), *V. viviparus*, *Valvata cristata* (O. F. Müller, 1774), *Valvata macrostoma* Mörch, 1864, *Marstoniopsis scholtzi* (A. Schmidt, 1856), *Radix ampla* (Hartmann, 1841), *Physa fontinalis* (Linnaeus, 1761), *Anisus leucostoma* (Millet, 1813), *Pisidium amnicum* (O. F. Müller, 1774), *Sphaerium rivicola* (Lamarck, 1818).

Важная особенность выявленного комплекса водных моллюсков р. Неман и ее притоков – присутствие там инвазивных видов, а именно *Lithoglyphus naticoides* (C. Pfeiffer, 1828) и *Physella acuta* (Draparnaud, 1805).

Моллюск *L. naticoides* (сем. Hydrobiidae) по происхождению относится к понто-каспийскому виду [9]. Распространен в пределах бассейнов Рейна и Дуная на западе до Западной Двины и Днепра на востоке. В Беларуси *L. naticoides* отмечается в бассейнах Немана, Припяти, Днепра и Западной Двины [1; 10]. Этот вид предпочитает реки, каналы и проточные пойменные озера с заиленными грунтами, питается диатомовыми и нитчатыми водорослями [1]. Материал: р. Неман (г. п. Гожа, Гродненский р-н); р. Неман (г. п. Лунно, Мостовский р-н); р. Неман (д. Дындылишки, Ивьевский р-н); р. Неман (г. п. Любча, Новогрудский р-н); р. Неман (д. Николаевщина, Столбцовский р-н).

Таксономический состав и количество водных моллюсков, коллектированных в р. Неман и ее притоках

Taxonomical composition and quantity of the aquatic molluscs collected in the Neman river and its tributaries

Отряд, вид	Водоток*												Всего, экз.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Класс Gastropoda													
Neritopsina													
Theodoxus fluviatilis (Linnaeus, 1758)	12	159	64	–	–	1	89	8	–	2	17	–	352
Architaenioglossa													
Viviparus contectus (Millet, 1813)	4	23	81	–	20	–	2	–	–	–	–	–	130
Viviparus viviparus (Linnaeus 1758)	3	325	342	326	1	–	129	23	27	11	13	–	1200
Neotaenioglossa													
Marstoniopsis scholtzi (A. Schmidt, 1856)	–	–	–	–	32	–	–	–	26	1	–	1	60
Bithynia tentaculata (Linnaeus, 1758)	101	30	4	–	165	76	87	2	66	11	96	–	638
Lithoglyphus naticoides (C. Pfeiffer, 1828)	–	1	1	–	–	–	34	201	–	–	10	–	247
Ectobranchia													
Valvata cristata (O. F. Müller, 1774)	2	–	–	–	3	–	1	–	–	–	–	–	6
Valvata macrostoma Mörch, 1864	–	2	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–	7
Valvata piscinalis (O. F. Müller, 1774)	8	–	4	–	1	1	–	1	11	23	–	1	50
Pulmonata													
Acroloxus lacustris (Linnaeus, 1758)	3	–	–	–	19	–	–	–	6	1	–	–	29
Lymnaea stagnalis (Linnaeus, 1758)	1	11	2	–	3	1	28	–	–	2	4	12	64
Radix ampla (Hartmann, 1841)	–	5	–	–	–	–	3	–	1	–	–	–	9
Radix auricularia (Linnaeus, 1758)	2	16	4	–	1	–	15	1	1	1	2	5	48
Radix balthica (Linnaeus, 1758)	12	23	77	–	11	5	82	4	7	19	42	34	316
Radix sp.	–	1	–	–	2	2	3	4	1	–	1	–	14
Stagnicola corvus (Gmelin, 1791)	–	–	–	–	–	2	–	4	2	–	1	1	10
Stagnicola palustris (O. F. Müller, 1774)	1	–	–	–	3	–	–	–	1	1	–	–	6
Physa fontinalis (Linnaeus, 1761)	32	4	–	–	38	11	28	–	21	1	40	–	175
Physella acuta (Draparnaud, 1805)	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Ancylus fluviatilis (O. F. Müller, 1774)	–	–	–	–	3	2	–	–	–	–	–	–	5
Anisus leucostoma (Millet, 1813)	–	–	–	–	4	–	–	–	–	–	–	–	4
Anisus vortex (Linnaeus, 1758)	7	7	1	–	10	1	–	–	30	–	–	1	57
Bathyomphalus contortus (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	2	–	–	–	1	–	–	3	6
Gyraulus albus (O. F. Müller, 1774)	6	4	1	–	23	61	18	–	38	8	7	35	201
Gyraulus crista (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	7	–	–	–	–	–	2	–	9
Gyraulus riparius (Westerlund, 1865)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1
Planorbarius corneus O. F. Müller, 1774	3	11	3	–	3	7	–	3	5	5	3	4	47
Planorbis planorbis (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	1
Класс Bivalvia													
Unionoida													
Anodonta anatina (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	–	–	–	–	2	1	3	–	6

Окончание таблицы
Ending table

Отряд, вид	Водоток*												Всего, экз.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Unio crassus Philipsson, 1788	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	2	–	3
Unio pictorum (Linnaeus, 1758)	–	–	2	–	1	–	4	2	6	5	5	–	25
Unio tumidus (Linnaeus, 1758)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	1
Veneroidea													
Pisidium amnicum (O. F. Müller, 1774)	–	–	–	–	–	26	69	15	9	22	19	27	187
Pisidium casertanum (Poli, 1791)	–	1	–	–	–	4	–	–	–	–	–	–	5
Pisidium henslowanum (Sheppard, 1823)	–	–	–	–	20	23	15	–	32	–	12	1	103
Pisidium nitidum Jenyns, 1832	–	–	–	–	4	–	–	–	1	–	–	–	5
Pisidium subtruncatum Malm, 1855	4	–	–	–	6	55	80	3	77	25	65	59	374
Pisidium supinum A. Schmidt, 1851	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	1
Pisidium sp.	27	–	–	–	3	3	20	12	22	6	39	3	135
Sphaerium corneum (Linnaeus 1758)	8	–	–	–	37	22	52	3	9	1	17	3	152
Sphaerium rivicola (Lamarck, 1818)	–	1	–	–	1	3	20	8	2	18	49	–	102
Sphaerium sp.	–	–	–	–	–	8	2	8	1	–	9	15	43
Всего, экз.	236	625	586	326	423	314	786	302	406	165	460	206	4835

*Створы: 1 – р. Котра (д. Котра); 2 – р. Неман (г. п. Гожа); 3 – р. Неман (г. п. Лунно); 4 – р. Зельвянка (д. Пески); 5 – р. Дитва (д. Малое Ольжево); 6 – р. Гавья (д. Залейки); 7 – р. Неман (д. Дындылишки); 8 – р. Неман (г. п. Любча); 9 – р. Уша (д. Трощицы); 10 – р. Неман (д. Дрозды); 11 – р. Неман (д. Николаевщина); 12 – р. Ислочь (агрогородок Раков).

У *P. acuta* (сем. Physidae) естественно-исторический сложившийся ареал охватывает северо-восток США и сопредельные территории Канады [11]. В настоящее время вид широко распространен в водоемах Западной и Средней Европы. В Беларуси обнаружен только в трех местах: в р. Неман, канале очистных сооружений (г. Гомель) и водоеме-охладителе Березовской ГРЭС (г. Белоозерск) [1]. *P. acuta* чаще встречается в малых реках и ручьях, где заселяет мелководную зону на глубине 0,05–0,5 м, обитает в зарослях водных макрофитов и чаще на твердых субстратах (камни, погруженная в воду древесина). Материал: р. Неман (г. п. Гожа, Гродненский р-н).

Заключение

Таким образом, можно сделать вывод о том, что в р. Неман и ее притоках сложилась богатая фауна водных моллюсков. Многие ее представители являются редкими не только в Беларуси, но и в Европе. Вероятно, изученные водотоки играют большую роль в качестве рефугиумов для охраняемых водных моллюсков Беларуси и Европы. Река Неман служит естественным коридором, по которому возможен обмен видами водных моллюсков (включая инвазивные) между Средней и Восточной Европой.

Библиографические ссылки

1. *Лаенко Т. М.* Фауна водных моллюсков Беларуси. Минск, 2012.

2. *Мороз М. Д.* Фауна водных беспозвоночных гидроузла Гродненской ГЭС // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов : материалы III Междунар. конф., посвящ. 110-летию со дня рождения акад. Н. В. Смольского (Минск, 7–9 окт. 2015 г.) : в 2 ч. Минск, 2015. Ч. 2. С. 191–196.

3. *Мороз М. Д., Байчоров В. М., Гигиняк Ю. Г. и др.* Фауна водных беспозвоночных рек северо-запада Беларуси // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2014. № 1. С. 47–51.

4. Блакітная кніга Беларусі : Водныя аб'екты Беларусі. Минск, 1994.

5. География Белоруссии / под ред. В. А. Дементьева, Н. Т. Романовского, И. И. Трухана [и др.]. Минск, 1977.

6. Красная книга Республики Беларусь. Животные. Минск, 2015.

7. *Douda K.* Effects of nitrate nitrogen pollution on Central European unionid bivalves revealed by distributional data and acute toxicity testing // Aquatic Conserv.: Marine Freshwater Ecosyst. 2010. Vol. 20, issue 2. P. 189–197.

8. *Douda K., Horký P., Bílý M.* Host limitation of the thick-shelled river mussel: identifying the threats to declining affiliate species // Animal Conserv. 2012. Vol. 15, issue 5. P. 536–544.

9. *Жадин В. И.* Моллюски пресных и солоноватых вод СССР. М. ; Ленинград, 1952.
10. Черная книга инвазивных видов животных Беларуси / под общ. ред. В. П. Семенченко. Минск, 2016.
11. *Taylor D. W.* Introduction to Physidae (Gastropoda, Hygrophila) biogeography, classification, morphology // Rev. Biol. Trop. 2003. Vol. 51, suppl. 1. P. 1–287.

References

1. Laenko T. M. [Fauna of the aquatic mollusks of Belarus]. Minsk, 2012 (in Russ.).
2. Moroz M. D. [Aquatic invertebrates of the hydrosystem of Grodno hydropower station of Belarus]. *Problemy sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya i ispol'zovaniya biologicheskikh resursov* : materialy III Mezhdunar. konf., posvyashchennoi 110-letiyu so dnya rozhdeniya akademika N. V. Smol'skogo (Minsk, 7–9 okt., 2015). Minsk, 2015. Part 2. P. 191–196 (in Russ.).
3. Moroz M. D., Baichorov V. M., Giginyak J. G., et al. Fauna of the aquatic invertebrates in rivers of northwest of Belarus. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr*. 2014. No. 1. P. 47–51 (in Russ.).
4. Blakitnaya kniga Belarusi : Vodnyya ab'ekty Belarusi. Minsk, 1994 (in Russ.).
5. Dement'eva V. A., Romanovskii T. A., Trukhan I. I., et al. (eds.). Geografiya Belorussii. Minsk, 1977 (in Russ.).
6. [Red Book of Belarus. Animals]. Minsk, 2015 (in Russ.).
7. Douda K. Effects of nitrate nitrogen pollution on Central European unionid bivalves revealed by distributional data and acute toxicity testing. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* 2010. Vol. 20, issue 2. P. 189–197. DOI: 10.1002/aqc.1076.
8. Douda K., Horký P., Bílý M. Host limitation of the thick-shelled river mussel: identifying the threats to declining affiliate species. *Animal Conserv.* 2012. Vol. 15, issue 5. P. 536–544. DOI: 10.1111/j.1469-1795.2012.00546.x.
9. Zhadin V. I. [Mollusks of freshwater and brackish waters of USSR]. Moscow ; Leningrad, 1952 (in Russ.).
10. Semenchenko V. P. (ed.). [Black Book of invasive species of plants and animals]. Minsk, 2016 (in Russ.).
11. Taylor D. W. Introduction to Physidae (Gastropoda, Hygrophila) biogeography, classification, morphology. *Rev. Biol. Trop.* 2003. Vol. 51, suppl. 1. P. 1–287. DOI: 10.15517/rbt.v51i1.

Статья поступила в редколлегию 12.04.2016.
Received by editorial board 12.04.2016.

УДК 595.772

NEW RECORDS OF ROBBER FLIES (DIPTERA: ASILIDAE) FROM BELARUS

V. V. SAKHVON[a]

[a]*Belarusian State University, Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk, Belarus*

New records of robber flies (Diptera: Asilidae) from Belarus are presented, with new distribution records for 18 species: *Leptogaster cylindrica* (De Geer, 1776), *L. guttiventris* Zetterstedt, 1842, *Antipalus varipes* (Meigen, 1820), *Asilus crabroniformis* Linnaeus, 1758, *Dysmachus trigonus* (Meigen, 1804), *Echthistus rufinervis* (Meigen, 1820), *Erax barbatus* Scopoli, 1763, *Neomochtherus pallipes* (Meigen, 1820), *Pamponerus germanicus* (Linnaeus, 1758), *Tolmerus atricapillus* (Fallen, 1814), *T. cingulatus* (Fabricius, 1781), *Choerades marginata* (Linnaeus, 1758), *Dioctria atricapilla* Meigen, 1804, *D. hyalipennis* (Fabricius, 1794), *D. oelandica* (Linnaeus, 1758), *D. rufipes* (De Geer, 1776), *Cyrtopogon lateralis* (Fallén, 1814) and *Lasiopogon cinctus* (Fabricius, 1781). One subfamily: Stenopogoninae and two species: *Dysmachus trigonus* (Meigen, 1804) and *Cyrtopogon lateralis* (Fallén, 1814) are recorded from Belarus for the first time. So, at present moment the fauna of robber flies of Belarus includes 38 species.

Key words: robber flies; fauna; Belarus; Asilidae; new records.

Acknowledgements. The author is grateful to S. V. Buga, F. V. Sautkin, D. L. Petrov and A. S. Roginsky for providing the materials of robber flies, A. S. Lelej for the opportunity to examine robber flies from the collections of Institute of Biology and Soil Science, Vladivostok, Russia.

НОВЫЕ НАХОДКИ КТЫРЕЙ (DIPTERA: ASILIDAE) В БЕЛАРУСИ

В. В. САХВОН[1)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*

Приведены новые данные по видовому составу и распространению ктырей (Diptera: Asilidae) в условиях Беларуси: *Leptogaster cylindrica* (De Geer, 1776); *L. guttiventris* Zetterstedt, 1842; *Antipalus varipes* (Meigen, 1820); *Asilus crabroniformis* Linnaeus, 1758; *Dysmachus trigonus* (Meigen, 1804); *Echthistus rufinervis* (Meigen, 1820); *Erax barbatus* Scopoli, 1763; *Neomochtherus pallipes* (Meigen, 1820); *Pamponerus germanicus* (Linnaeus, 1758); *Tolmerus atricapillus* (Fallen, 1814); *T. cingulatus* (Fabricius, 1781); *Choerades marginata* (Linnaeus, 1758); *Dioctria atricapilla* Meigen, 1804; *D. hyalipennis* (Fabricius, 1794), *D. oelandica* (Linnaeus, 1758); *D. rufipes* (De Geer, 1776); *Cyrtopogon lateralis* (Fallén, 1814) and *Lasiopogon cinctus* (Fabricius, 1781). Подсемейство Stenopogoninae, а также два вида – *Dysmachus trigonus* (Meigen, 1804) и *Cyrtopogon lateralis* (Fallén, 1814) – являются новыми для территории Беларуси. К настоящему времени фауна ктырей Беларуси представлена 38 видами.

Ключевые слова: ктыри; фауна; Беларусь; Asilidae; новые регистрации.

Благодарность. Автор выражает благодарность С. В. Буге, Ф. В. Сауткину, Д. Л. Петрову и А. С. Рогинскому за помощь в сборе энтомологического материала, а также А. С. Лелею за возможность ознакомиться с коллекцией ктырей, хранящейся в Биолого-почвенном институте дальневосточного отделения Российской академии наук (Владивосток, Россия).

Образец цитирования:
Сахвон В. В. Новые находки ктырей (Diptera: Asilidae) в Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 103–107 (на англ.).

For citation:
Sakhvon V. V. New records of robber flies (Diptera: Asilidae) from Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 103–107.

Автор:
Виталий Валерьевич Сахвон – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры зоологии биологического факультета.

Author:
Vital Sakhvon, PhD (biology), docent; associate professor at the department of zoology, faculty of biology.
sakhvon@gmail.com

Introduction

The Asilidae is one of the largest families of Diptera, with over 7500 species in 555 genera [1]. By now 36 species have been record in Belarus [2–7]. For comparison, 30 species were recorded from Latvia [8], 35 species from Lithuania [9], about 50 species from the European part of Russia [10]. The present paper reviews the new data on the species of robber flies and their distribution in Belarus.

Materials and methods

The present study is based on the material collected by the author in 2015–2016. Robber flies were collected mostly by sweep net in preferable sites of robber flies. The author's material is deposited at the Department of Zoology of Belarusian State University, Minsk, Belarus. If the depository of the material is not indicated, it means that the specimens are kept at this institution. If the collector is not specified it means that this specimens are collected by author. Additionally the collections in the Institute of Biology and Soil Sciences, Vladivostok, Russia (IBSS) were examined. The species were identified mostly using the keys by Richter [10] and Geller-Grimm [11]. The classification and nomenclature follows Geller-Grimm [12]. The new records are asterisked (*).

Results and discussion

Family **ASILIDAE**

Subfamily Leptogasterinae

***Leptogaster cylindrica* (De Geer, 1776)**

Material examined. **Brest Prov**.: Ivatsevichi Distr., near Koziki vill., 52º38′20.81″ N and 25º30′0.01″ E, 18.07.2015, 1 ♀; Luninets Distr., near Mikashevichi, 52º12′25.84″ N and 27º27′39.07″ E, polder, on herbs, 07.06.2015, 1 ♀; same place, 25.07.2015, 1 ♂, 3 ♀.

Notes. This species was recorded from *Brest and Minsk Prov. and should be distributed in Belarus everywhere [7].

***Leptogaster guttiventris* Zetterstedt, 1842**

Material examined. **Minsk Prov**.: Dzerzhinsk Distr., near Staraya Mezenovka vill., 53º32′11.93″ N and 26º58′40.71″ E, pine clearing, 06.08.2016, 1 ♀.

Notes. This species was recorded from Minsk (the record is the most southern one for species) and Vitebsk Prov. [7; 13].

Subfamily Asilinae

***Antipalus varipes* (Meigen, 1820)**

Material examined. **Brest Prov**.: near Pinsk, 22–23.07.1970, 2 specimens (A. Lelej); same place, 28.07–02.08.1979, 8 specimens (A. Lelej); same place, 10–22.07.1987, 6 specimens (A. Lelej) (all material – in IBSS); **Minsk Prov**.: Dzerzhinsk Distr., near Staraya Mezenovka vill., 53º32′28.95″ N and 26º58′7.23″ E, pine clearing, on herbs and logs, 06.08.2016, 1 ♂; Molodechno Distr., near Udranka vill., 25.07.2016, 1 ♂ (D. Petrov).

Notes. This species was recorded from *Brest and *Minsk Prov. It should be noted that this species was previously recorded from Belarus by P. Lehr [14] but without label data.

***Asilus crabroniformis* Linnaeus, 1758**

Material examined. **Brest Prov**.: Luninets Distr., near Mikashevichi, 52º12′25.84″ N and 27º27′39.07″ E, polder, on sandy road, 20–21.08.2015, 2 ♂.

Notes. This species was recorded from Brest (the record in Luninets Distr. is the most southeastern one for species), Minsk, Mogilev and Vitebsk Prov. [2; 4; 5; 7] and should be distributed in Belarus everywhere.

****Dysmachus trigonus* (Meigen, 1804)**

Material examined. **Brest Prov**.: Bereza Distr., 52º37′33.99″ N and 24º47′8.98″ E, near Zubachi vill., meadow near Selets Pond, on herbs, 24.05.2016, 1 ♂, 1 ♀; Ivatsevichi Distr., near Chemely vill., 52º46′27.80″ N and 25º32′22.34″ E, dry meadow, on herbs, 29.05.2016, 2 ♂, 2 ♀; near Ivatsevichi, 52º43′33.11″ N and 25º22′7.27″ E, 30.05.2015, 3 ♂, 3 ♀ (some in copula).

Notes. This species was recorded from *Belarus (*Brest Prov.) for the first time.

***Echthistus rufinervis* (Meigen, 1820)**

Material examined. **Brest Prov**.: near Pinsk, 16.06.1973, 1 ♂, 1 ♀ (A. Lelej) (IBSS).

Notes. This species was recorded from *Brest, Mogilev and Vitebsk Prov. [2; 7].

***Erax barbatus* Scopoli, 1763**

Material examined. **Gomel Prov**.: Zhitkovichi distr., near Lenin vill., 52º22′39″ N and 27º27′46″ E, 03.04.2016, pine forest, on sandy road, 2 ♂, 1 ♀.

Notes. This species was recorded from Minsk and *Gomel Prov. [7].

***Neomochtherus pallipes* (Meigen, 1820)**

Material examined. **Grodno Prov**.: Smorgon, 17.07.2015, 1 ♂ (A. Roginsky).

Notes. This species was recorded from Brest, *Grodno and Minsk Prov. and should be distributed in Belarus everywhere [7; 14].

***Pamponerus germanicus* (Linnaeus, 1758)**

Material examined. **Vitebsk Prov**.: Dokshitsy Distr., near Stanislavtsy vill., 01–05.06.2016, edge of mixed forest with pine and field, 2 ♀.

Notes. This species was recorded from Brest, Minsk, Mogilev and *Vitebsk Prov. and should be distributed in Belarus everywhere [2; 4; 7].

***Tolmerus atricapillus* (Fallén, 1814)**

Material examined. **Brest Prov**.: Kobrin Distr., near Radostovo vill., 31.07.2016, 1 ♀ (A. Roginsky); **Grodno Prov**.: Grodno, Kolozhskii Park, on leaves of *Syringa vulgaris*, 10.07.2015, 1 ♂, 1 ♀ (F. Sautkin); Smorgon Distr., near Selets vill., 21.07.2015, 1 ♀ (S. Buha).

Notes. This species was recorded from Brest (the record in Kobrin Distr. is the most western one for Brest Prov.), Minsk, *Grodno and Vitebsk Prov. and should be distributed in Belarus everywhere [6; 7].

***Tolmerus cingulatus* (Fabricius, 1781)**

Material examined. **Grodno Prov**.: Grodno, Kolozhskii Park, on leaves of *Syringa vulgaris*, 10.07.2015, 2 ♂ (F. Sautkin); Lida, 16.07.2015, 1 ♂ (A. Roginsky); **Vitebsk Prov**., Gorodok Distr., near Mininy vill., 28.08.2016, 1 ♂ (A. Roginsky).

Notes. This species was recorded from Brest, Minsk, *Grodno and Vitebsk Prov. (the record in Gorodok Distr. is the most northern one for Belarus) and should be distributed in Belarus everywhere [7].

Subfamily Laphriinae

***Choerades marginata* (Linnaeus, 1758)**

Material examined. **Vitebsk Prov**., Gorodok Distr., near Astapkovichi vill., 28.08.2016, 1 ♂ (A. Roginsky).

Notes. This species was recorded from Brest, Minsk and Vitebsk Prov. (the record in Gorodok Distr. is the most northern one for Belarus) and should be distributed in Belarus everywhere [7].

Subfamily Dioctriinae

***Dioctria atricapilla* Meigen, 1804**

Material examined. **Vitebsk Prov**.: Dokshitsy Distr., near Stanislavtsy vill., 01–05.06.2016, edge of mixed forest with pine and field, 1 ♂, 1 ♀.

Notes. This species was recorded from Brest, Minsk, Mogilev and *Vitebsk Prov. and should be distributed in Belarus everywhere [2; 7].

***Dioctria hyalipennis* (Fabricius, 1794)**

Material examined. **Grodno Prov**.: Grodno, Kolozhskii Park, on leaves of *Syringa vulgaris*, 10.07.2015, 1 ♀ (F. Sautkin); **Mogilev Prov**.: Kostyukovichi, on *Salix* sp., 10.06.2016, 1 ♂ (A. Roginsky); **Vitebsk Prov**., Chashniki Distr., near Marintsy vill., 26.07.2015, 1 ♂ (A. Roginsky).

Notes. This species was recorded from Brest, *Grodno, Minsk, *Mogilev and Vitebsk Prov. (the record in Chashniki Distr. is the most northern one for Belarus) and should be distributed in Belarus everywhere [5–7].

***Dioctria oelandica* (Linnaeus, 1758)**

Material examined. **Brest Prov**.: near Ivatsevichi, 52º43′33.11″ N and 25º22′7.27″ E, edge of mixed forest with pine, on leaves of *Urtica* sp., 28.05.2016, 2 ♂; **Minsk Prov**.: Minsk (near Roshcha railway station), spruce-dominated forest, on herbs, 07.06.2016, 1 ♂.

Notes. This species was recorded from Brest (the record in Ivatsevichi Distr. is the most western one for Belarus) and *Minsk Prov. [7].

***Dioctria rufipes* (De Geer, 1776)**

Material examined. **Minsk Prov**.: Volozhin Distr., near Yatskovo-Zamostnye vill., 53º59′2.55″ N and 26º41′1.52″ E, meadow of Isloch Riv., on leaves of *Urtica* sp., 31.05.2016, 1 ♂.

Notes. This species was recorded from Brest, *Minsk and Vitebsk Prov. [3; 5; 7].

Subfamily Stenopogoninae

***Cyrtopogon lateralis* (Fallén, 1814)**

Material examined. **Brest Prov**.: Luninets Distr., near Mikashevichi, 52º12′20.49″ N and 27º27′13.38″ E, floodplain oak forest, on oak logs, 06.06.2015, 2 ♂, 1 ♀; **Minsk Prov**.: Uzda Distr., near Zenkovichi vill., 53º32′49.80″ N and 27º15′12.48″ E, oak-hornbeam clearing, on oak logs, 1 ♂, 1 ♀ (A. Pisanenko).

Notes. This species was recorded from *Belarus (*Brest and *Minsk Prov.) for the first time.

Subfamily Stichopogoninae

***Lasiopogon cinctus* (Fabricius, 1781)**

Material examined. **Gomel Prov**.: Zhitkovichi distr., near Lenin vill., 52º21′25.15″ N and 27º27′14.47″ E, pine clearing, 30.04.2016, 2 ♂, 2 ♀.

Notes. This species was recorded from Brest, *Gomel and Minsk Prov. and should be distributed in Belarus everywhere [5; 7].

So, new distribution data 18 species are presented above. Among them, one subfamily: Stenopogoninae and two species: *Dysmachus trigonus* (Meigen, 1804) and *Cyrtopogon lateralis* (Fallén, 1814) are newly recorded from Belarus. According with these data the fauna of robber flies of Belarus includes 38 species.

Библиографические ссылки

1. *Pape T., Blagoderov V., Mostovski M. B.* Order Diptera Linnaeus, 1758. In: Z.-Q. Zhang (ed.). Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness // Zootaxa. 2011. Vol. 3148. P. 222–229.

2. *Арнольд Н.* Каталог насекомых Могилевской губернии. СПб., 1901.

3. *Бирг А. В.* К фауне двукрылых Беларуси // Вопр. естествознания. 1978. С. 41–49.

4. *Бирг А. В.* Редкие виды двукрылых в БССР // Организация работ по выявлению и охране редких и находящихся под угрозой исчезновения видов животных и растений, занесенных в Красные книги СССР и БССР : материалы Бел. респ. науч.-техн. конф. (Домжерицы, 15–16 окт. 1985 г.). 1985. С. 51–54.

5. Catalogue of the fauna of Białowieża Primaeval Forest / J. M. Gutowski, B. Jaroszewicz (eds.). Warsaw, 2001.

6. *Trojan P.* Occurrence of *Rhagionidae*, *Therevidae* and *Asilidae* (*Diptera*) in the pine forests of the Berezinsky Biospheric Reserve // Fragm. Faunistica. 1995. Vol. 38, № 9. P. 187–189.

7. *Sakhvon V. V.* A contribution to the fauna of robber flies (Diptera: Asilidae) of Belarus // Zoosyst. Rossica. 2015. Vol. 24, № 2. P. 292–302.

8. *Karpa A.* Catalogue of Latvian flies (Diptera: Brachycera) // Latvijas Entomol. 2008. Vol. 46. P. 4–43.

9. *Pakaliniškis S., Bernotienė R., Lutovinovas E., et. al.* Checklist of Lithuanian Diptera // New and rare for Lithuania Insect Species. 2006. Vol. 18. P. 16–154.

10. *Рихтер В. А.* Сем. Asilidae – Ктыри // Определитель насекомых Европейской части СССР : в 5 т. Л., 1969. Т. 5, ч. 1. С. 504–531.

11. *Geller-Grimm F.* Photographic atlas and identifi cation key to the robber flies of Germany (Diptera: Asilidae). Halle (Saale), 2003. 1 электрон. опт. диск (CD-ROM).

12. *Geller-Grimm F.* Fauna Europaea: Asilidae. Fauna Europaea version 2.6.2 [Electronic resource]. URL: http://www.faunaeur.org.htm (date of access: 29.08.2013).

13. *Лер П. А.* Летающие ктыри подсемейства Leptogastrinae (Diptera, Asilidae) в фауне СССР // Энтомол. обозрение. 1961. Vol. 40, № 3. P. 686–703.

14. *Лер П. А.* Ктыри подсемейства Asilinae (Diptera, Asilidae) Палеарктики. Эколого-морфологический анализ, систематика и эволюция. Владивосток, 1996.

References

1. Pape T., Blagoderov V., Mostovski M. B. Order Diptera Linnaeus, 1758. In: Z.-Q. Zhang (ed.). Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*. 2011. Vol. 3148. P. 222–229.

2. Arnol'd N. Katalog nasekomykh Mogilevskoi gubernii [The catalogue of insects of Mogilev Province]. Saint Petersburg, 1901 (in Russ.).

3. Birg A. V. [Contribution to the fauna of Diptera in Belarus]. *Voprosy estestvoznaniya.* 1978. P. 41–49 (in Russ.).

4. Birg A. V. [Rare species of Diptera from BSSR]. *Organizatsiya rabot po vyyavleniyu i okhrane redkikh i nakhodyashchikhsya pod ugrozoi ischeznoveniya vidov zhivotnykh i rastenii, zanesennykh v Krasnye knigi SSSR i BSSR* : materialy Belorusskoi resp. nauchn.-tekhn. konf. (Domzheritsy, 15–16 Oct. 1985). 1985. P. 51–54 (in Russ.).

5. Gutowski J. M., Jaroszewicz B. (eds.). Catalogue of the fauna of Białowieża Primaeval Forest. Warsaw, 2001.

6. Trojan P. Occurrence of *Rhagionidae*, *Therevidae* and *Asilidae* (*Diptera*) in the pine forests of the Berezinsky Biospheric Reserve. *Fragm. Faunistica*. 1995. Vol. 38, No. 9. P. 187–189.

7. Sakhvon V. V. A contribution to the fauna of robber flies (Diptera: Asilidae) of Belarus. *Zoosyst. Rossica*. 2015. Vol. 24, No. 2. P. 292–302.

8. Karpa A. Catalogue of Latvian flies (Diptera: Brachycera). *Latvijas Entomol*. 2008. Vol. 46. P. 4–43.

9. Pakaliniškis S., Bernotienė R., Lutovinovas E., et al. Checklist of Lithuanian Diptera. *New and rare for Lithuania Insect Species*. 2006. Vol. 18. P. 16–154.

10. Richter V. A. Fam. Asilidae, robber flies. *A key to insects of the European part of the USSR* : in 5 vol. Leningrad, 1969. Vol. 5, part 1. P. 504–531 (in Russ.).

11. Geller-Grimm F. Photographic atlas and identification key to the robber flies of Germany (Diptera: Asilidae). Halle (Saale), 2003. CD-ROM.

12. Geller-Grimm F. Fauna Europaea: Asilidae. Fauna Europaea version 2.6.2. URL: http://www.faunaeur.org.htm (date of access: 29.08.2013).

13. Lehr P. A. Robber flies of the subfamily Leptogastrinae (Diptera, Asilidae) in the fauna of USSR. *Entomol. obozrenie.* 1961. Vol. 40, No. 3. P. 686–703 (in Russ.).

14. Lehr P. A. [Robber flies of the subfamily Asilinae (Diptera, Asilidae) of the Palaearctic. Ecological and morphological analysis, taxonomy and evolution]. Vladivostok, 1996 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 21.12.2016.
Received by editorial board 21.12.2016.

Наши юбиляры

Our jubilee

Владимир Андреевич КОСТЮК

Vladimir Andreevich KOSTYUK

Весной текущего года 65 лет исполнилось известному отечественному физиологу и биохимику, специалисту в области биологического окисления и свободнорадикальной биологии Владимиру Андреевичу Костюку.

Владимир Андреевич родился 11 марта 1952 г. в Минске. В 1974 г. окончил Белорусский государственный университет (кафедра физиологии человека и животных). После службы в Советской армии в 1976 г. был зачислен в штат биологического факультета БГУ. Работал младшим (1976–1981), старшим (1981–1989) и ведущим (1989–1992) научным сотрудником. С 1992 г. заведует научно-исследовательской лабораторией при кафедре физиологии человека и животных. В 1981 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Доктор химических наук по специальности «Биохимия». В 1994 г. защитил диссертацию «Механизмы действия природных и синтетических многоатомных фенолов и хинонов при инициировании свободнорадикальных процессов в биологических системах» в Институте химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук. В 1988 г. Владимиру Андреевичу присвоено звание старшего научного сотрудника по специальности «Биохимия». В 2014 г. присвоено ученое звание доцента.

В разные годы Владимир Андреевич Костюк разрабатывает и читает студентам биологического и химического факультетов следующие лекционные курсы: «Избранные главы биохимии и физиологии клетки», «Молекулярные основы биосигнализации», «Основы биологии и физиологии человека». В настоящее время читает специальный курс «Основы клеточной физиологии».

Главное направление научных исследований ученого – выяснение роли биорадикалов и антиоксидантов в процессах жизнедеятельности в норме и при предпатологических состояниях организма. Под руководством Владимира Андреевича выполнен ряд фундаментальных исследований в области молекулярной токсикологии асбеста и галогензамещенных углеводородов, биохимии и молекулярной фармакологии природных и синтетических полифенолов и хинонов. Результаты фундаментальных исследований развивают представления

о механизмах гепатотоксического действия галогензамещенных углеводородов и молекулярных механизмах защитного действия природных и синтетических полифенолов и хинонов в условиях воспаления и окислительного стресса. Установлен факт и раскрыт механизм активирующего влияния ионов металлов на биологическую активность биофлавоноидов.

Владимир Андреевич Костюк опубликовал монографию, учебное пособие и более 200 научных работ, включая 140 статей, 37 из которых вышли в ведущих международных англоязычных журналах. Цитируемость изданных работ составляет 3400, индекс Хирша равен 26 (*Google Scholar*). При его консультировании выполнены и защищены три кандидатские диссертации. В настоящее время под научным руководством В. А. Костюка обучаются иностранные аспиранты. Ученый является автором пяти изобретений, награжден знаком «Изобретатель СССР». Разработанные им методы исследования свободнорадикальных процессов в биологических объектах получили широкую известность и используются во многих научных лабораториях Беларуси, Украины, Польши, России, Индии, США и других стран. Владимир Андреевич поддерживает многочисленные научные контакты, проводит совместные исследования и имеет общие публикации с известными учеными из России, Чехии, Германии, Канады, Италии и Японии. Он являлся стипендиатом Германской службы академических обменов (DAAD), в качестве приглашенного ученого работал в научных центрах Японии, Канады и Италии. Сведения о научной деятельности В. А. Костюка включены в ряд изданий Международного биографического центра (Кембридж, Великобритания) и биографический справочник «Кто есть кто в науке и технике» (США). С 2004 г. В. А. Костюк является членом Исследовательского совета Американского биографического института. Принимал участие в работе более чем 50 научных, в том числе международных, конференций (в Японии, Китае, Греции, Франции, Португалии, Люксембурге, Великобритании, Норвегии, Испании).

Владимир Андреевич Костюк является председателем экспертного совета № 34 (физико-химическая биология) ВАК Беларуси, членом совета по защите диссертаций Д 01.21.01, членом совета биологического факультета. За успешную научно-педагогическую деятельность награжден почетными грамотами БГУ (2002; 2007). В 2016 г. В. А. Костюку присвоено звание «Заслуженный работник Белорусского государственного университета».

Коллектив биологического факультета и редколлегия «Журнала Белорусского государственного университета» желают Владимиру Андреевичу хорошего здоровья, дальнейших творческих успехов, благодарных учеников и удачи в научной и педагогической деятельности.

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

Ильюшёнок И. Н., Саврицкая А. А., Яцков Н. Н., Скакун В. В., Гринев В. В. Расширяя гипотезу «двух ударов»: молекулярные механизмы *RUNX1-RUNX1T1*-опосредованного лейкозогенеза 3

Сухан Т. О., Невмержицкая А. С. Экспрессия белков GRP78 и GRP94 в микро- и макроциркуляторных эндотелиальных клетках человека в условиях гипоксии 17

Чалый Ю. В., Нашкевич Н. Н. Ингибирующий эффект антагонистов рецептора P2X7 на продукцию интерлейкина-8 макрофагами человека в ответ на действие нейтрофильных α-дефензинов 25

Адамович А. В., Римжа Е. А., Шерстюк Г. В., Дудчик Н. В. Анализ изменения состава периферической крови крыс при длительном воздействии различных доз многокомпонентного средства 31

Мазец Ж. Э., Суша О. А., Еловская Н. А., Калацкая Ж. Н., Бонина Т. А. Исследование физиологических эффектов низкоинтенсивного электромагнитного излучения на гречихе посевной 36

ГЕНЕТИКА, МИКРОБИОЛОГИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Острикова К. В., Потапович М. И., Прокулевич В. А. Биосинтез рекомбинантного овечьего интеферона-α в клетках *Escherichia coli* 43

Мельникова А. А., Леонович С. И., Храмцова Е. А. Молекулярно-генетический анализ *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 51

БИОХИМИЯ

Жидецкий А. В., Шолух М. В., Ханнеман Ю. Р., Хандрик Р., Мотылевич Ж. В., Химанен Ю.-П. Оптимизация условий очистки и рефолдинга рекомбинантного эфрина-А5 из телец включения *Escherichia coli* 58

Кохановская Е. Ю., Семак И. В. Кинетический анализ лактопероксидазы сыворотки молока коровы 66

Орёл Н. М. Эффективность использования рекомбинантного лактоферрина для коррекции биохимических нарушений у крыс в моделях доксициклинового холестаза и аллоксанового диабета 72

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

Козулько Н. Г., Козулько Г. А. Структура сообщества жужелиц (*Coleoptera: Carabidae*) на раннем этапе лесовосстановления после санитарной рубки ельника кисличного в Беловежской пуще 80

Синчук О. В., Блинов В. В. Особенности экологии и географическое распространение четырехточечного муравья (*Dolichoderus quadripunctatus* (Linnaeus, 1771)) на территории Беларуси 90

СИСТЕМАТИКА

Мороз М. Д., Липинская Т. П., Лаенко Т. М. Фауна водных моллюсков (Mollusca: Gastropoda, Bivalvia) реки Неман и ее притоков 97

Сахвон В. В. Новые находки ктырей (Diptera: Asilidae) в Беларуси 103

НАШИ ЮБИЛЯРЫ

Владимир Андреевич Костюк 108

CONTENTS

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

Ilyushonak I. M., Saurytskaya H. A., Yatskov N. N., Skakun V. V., Grinev V. V. Extending the «two-hits» hypothesis: the molecular mechanisms of *RUNX1-RUNX1T1*-mediated leukemogenesis 3

Suhan T. O., Nevmerzhitskaya A. S. Expression of GRP78 and GRP94 proteins in the human micro- and macrovascular endothelial cells under hypoxia 17

Chaly Y. V., Nashkevich N. N. Inhibitory effect of P2X7 receptor antagonists on neutrophil α-defensin-induced interleukin-8 production by human macrophages 25

Adamovich A. V., Rimzha E. A., Sherstyuk G. V., Dudchik N. V. Analysis of changes of the rats' peripheral blood with prolonged exposure to various dose multicomponent means 31

Mazets Z. E., Susha O. A., Yalouskaya N. A., Kalatskaja J. N., Bonina T. A. Investigation of physiological effects of low intensity electromagnetic radiation on buckwheat 36

GENETICS, MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY

Vostrykava K. U., Patapovich M. I., Prakulevich U. A. Biosynthesis of ovine recombinant interferon-α in *Escherichia coli* cells 43

Melnikava A. A., Leanovich S. I., Khramtsova A. A. Molecular-genetic analysis of *acdS* gene of *Pseudomonas putida* B-37 51

BIOCHEMISTRY

Zhydzetski A. V., Sholukh M. V., Hannemann J. R., Handrick R., Motylevich Z. V., Himanen J.-P. Optimizing purification and refolding conditions of the recombinant ephrin-A5 from inclusion bodies of *Escherichia coli* 58

Kakhanouskaya K. Y., Semak I. V. Kinetic studies of cow milk lactoperoxidase 66

Oryol N. M. The effectiveness of the use of recombinant lactoferrin for correcting biochemical irregularities in rats with experimental doxycycline-induced cholestasis and alloxan model of diabetes 72

ECOLOGY AND CONSERVANCY

Kazulka M. H., Kazulka H. A. Ground beetle (*Coleoptera: Carabidae*) community structure at the early stage of forest regeneration after sanitary logging of oxalidosum spruce forest in Belovezhskaya Pushcha 80

Sinchuk A. V., Blinov V. V. Features of ecology and distribution *Dolichoderus quadripunctatus* (Linnaeus, 1771) in Belarus 90

TAXONOMY

Moroz M. D., Lipinskaya T. P., Laenko T. M. Fauna of the aquatic mollusks (Mollusca: Gastropoda, Bivalvia) of the Neman river and its tributaries 97

Sakhvon V. V. New records of robber flies (Diptera: Asilidae) from Belarus 103

OUR JUBILEE

Vladimir Andreevich Kostyuk 108

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

Журнал Белорусского государственного университета. Биология. № 2. 2017

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4, 220030, Минск.
Почтовый адрес: ул. Кальварийская, 9, каб. 636, 637, 220004, г. Минск.
Тел. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: vestnikbsu@mail.ru
vestnikbsu@bsu.by

«Журнал Белорусского государственного университета. Биология» издается с января 1969 г. До 2017 г. выходил под названием «Вестник БГУ. Серия 2, Химия. Биология. География» (ISSN 2308-9164).

Редактор *О. Л. Диброва*
Технический редактор *Ю. А. Тарайковская*
Корректоры *К. Б. Скакун, Д. В. Русс*

Подписано в печать 04.09.2017.
Тираж 105 экз. Заказ 533.

Республиканское унитарное предприятие «Издательский центр Белорусского государственного университета».
ЛП № 02330/117 от 14.04.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, г. Минск.

© БГУ, 2017

Journal of the Belarusian State University. Biology. No. 2. 2017

Founder:
Belarusian State University

Registered address: Niezaliežnasci Avenue, 4, 220030, Minsk.
Correspondence address: Kal'varyjskaja Street, 9, office 636, 637, 220004, Minsk.
Tel. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: vestnikbsu@mail.ru
vestnikbsu@bsu.by

«Journal of the Belarusian State University. Biology» published since January, 1969.
Until 2017 named «Vestnik BGU. Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya» (ISSN 2308-9164).

Editor *O. L. Dibrova*
Technical editor *Y. A. Taraikouskaya*
Proofreaders *K. B. Skakun, D. V. Russ*

Signed print 04.09.2017.
Edition 105 copies. Order number 533.

Publishing Center of BSU.
License for publishing No. 02330/117, 14 April, 2014.
Čyrvonaarmiejskaja Street, 6, 220030, Minsk.

© BSU, 2017