



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

1

2018

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 577.352.5

РЕГУЛЯЦИЯ ПРОВОДИМОСТИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ СИНАПСОВ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭКСТРАСИНАПТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

А. В. СИДОРОВ¹⁾

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

Рассмотрены вопросы структурно-функциональной организации щелевых контактов и регуляции их проводимости. На примере идентифицированного электротонического синапса между нейронами V. D. 1 и R. Pa. D. 2 из состава центральной нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis* проанализированы реакции таких соединений в разных температурных условиях, при сдвигах кислотно-основного равновесия (рН) и возрастании уровня активных форм кислорода (пероксида водорода) в межклеточном пространстве. Временная динамика наблюдаемых эффектов (минуты) свидетельствует о быстрой динамической модуляции электротонической передачи, связанной с изменением проводимости уже имеющихся каналов щелевого соединения (иннексонов), а не с увеличением их количества в области межклеточного контакта. Предполагается, что влияние указанных факторов реализуется за счет обратимых конформационных изменений структурных белков (иннексинов) контакта.

Ключевые слова: объемная передача; температура; кислотно-основное равновесие; активные формы кислорода; идентифицированные нейроны.

Благодарность. Работа выполнена в рамках тем Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проекты № Б05М-055, Б08Р-075) и государственной программы научных исследований «Конвергенция» (задание 3.3.03.4).

Образец цитирования:

Сидоров А. В. Регуляция проводимости электрических синапсов в условиях действия неспецифических экстраинаптических факторов // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 3–12.

For citation:

Sidorov A. V. Control of conductance through electrical synapses by non-specific extrasynaptic agents. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 3–12 (in Russ.).

Автор:

Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Author:

Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), docent; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
sidorov@bsu.by

CONTROL OF CONDUCTANCE THROUGH ELECTRICAL SYNAPSES BY NON-SPECIFIC EXTRASYNAPTIC AGENTS

A. V. SIDOROV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

The article deals with the structure functional configuration of gap junctions and control of their permeability. Based on the reactions of identified electrical synapse between V.D.1 and R.Pa.D.2 neurons within central nervous system of mollusc *Lymnaea stagnalis* the responses of mentioned above connections to temperature changes, acid-base balance (pH) shifts and increase of reactive oxygen species (hydrogen peroxide) level were analysed. Time-course of effects observed (minutes), give the evidence of fast dynamic modulation of electrotonical coupling. The fluctuations in its conductance seems to be due to the changes in conductivity of exist gap junctions channels (innexons), but not to the alterations in their number in the junction area. It is assumed that the action of these agents realize by reversible conformational transition of gap junction structural proteins (innexins).

Key words: volume transmission; temperature; acid-base balance; reactive oxygen species; identified neurons.

Acknowledgements. This work supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grants No. B05M-055, B08R-075) and State Programs for Scientific Research «Convergence» (task 3.3.03.4).

Неспецифические влияния и объемная передача сигнала. Исследование вопросов, связанных с особенностями взаимодействий между нервными клетками, привело к созданию концепции объемной передачи сигнала (volume transmission) в мозге [1; 2]. Ее дальнейшее развитие способствовало формированию представлений о генерализованных влияниях, когда в ответную реакцию на действие того или иного сигнала вовлекается целая совокупность клеточных элементов ткани. Первоначально указанные воззрения были применены для оценки широты действия газообразных нейромодуляторов, особенно монооксида азота (NO) [3], а также ряда классических сигнальных молекул, например дофамина [4], на клетки-мишени.

Вместе с тем влияние, оказываемое спектром физико-химических начал (температура, концентрация свободных протонов (pH), уровень свободнорадикальных форм и т. п.) на функциональную активность нервных центров, тоже может быть отнесено к генерализованным воздействиям в самом широком понимании данного термина. О приемлемости и принятии подобной точки зрения свидетельствует ряд крупных обзорных работ [5–7]. Признание данного факта неизбежно порождает вопросы, связанные с регуляцией нейронных функций во вновь возникающих условиях с точки зрения терморегуляции, кислотно-основного баланса, свободнорадикального фона. При этом основная трудность состоит в том, что каждая клетка мозга демонстрирует ту или иную степень чувствительности к действию указанных начал и должна реагировать на отмеченные воздействия, что автоматически означает всеобщее возбуждение или торможение в нейронных сетях, а следовательно, отсутствие координированных моторных ответов со стороны организма. В действительности этого не наблюдается, поскольку живые организмы характеризуются определенным паттерном поведения при изменении внешних или внутренних условий существования.

Использование химических веществ в качестве передатчика межклеточных сигналов позволяет избежать отмеченных затруднений за счет избирательного оснащения нейронов сети рецепторами во всем их структурном разнообразии. В результате большая часть клеток сети остается безучастной к сенсорным входам, что позволяет в итоге доминировать лишь небольшой нейронной популяции, напрямую определяющей итоговый моторный ответ в соответствии с требуемым полезным приспособительным результатом. Следствием этого будет формирование так называемого транзиттер-зависимого, или контекст-зависимого, поведения – феномена, описанного в отношении целого ряда модельных организмов [8–10]. Заметим, что при таком характере организации мозга центральное представительство нейронов находится в условиях постоянства внутренней среды и лишь их специализированные «афферентные» отростки подвергаются действию детектируемых факторов.

Электрические синапсы и межклеточные взаимодействия. Реализация нейронной активности невозможна без надлежащей межклеточной коммуникации. Для ее должного функционирования требуется наличие специализированных структур – синапсов, определяемых как область специализированного контакта между нейронами. Традиционно считается, что химическая синаптическая передача является основным типом межнейронных взаимодействий, в то время как электрическая занимает хотя и не «подчиненное», но не равноправное положение [11; 12]. Между тем синапсы, использующие

электрическую передачу сигнала, широко распространены между клетками как возбудимых, так и невозбудимых тканей [13; 14]. Из них наибольший интерес представляют так называемые щелевые соединения (gap junctions), использующие трансмембранные белки коннексины (позвоночные) или иннексины (беспозвоночные) в качестве структурной составляющей контактов подобного рода – коннексонов и иннексонов [15–17]. Другие группы синапсов, опосредующих прямую передачу электрического сигнала от клетки к клетке, фактически являют собой контакты с химическим способом передачи – тормозные синапсы на маутнеровских нейронах рыб [18] или синапс цилиарного ганглия цыпленка [19; 20]. Их структурные особенности, связанные с большой площадью контакта пре- и постсинаптических мембран и окружением области синаптической щели клетками глии с развитой миелиновой оболочкой, позволяют избежать потерь в пространстве интерстиция, обеспечив прямую передачу электрического импульса от пресинаптической клетки к постсинаптической. При этом такая начальная трансмиссия электрического сигнала подкрепляется выбросом нейромедиатора в пространство синаптической щели и развитием «классического» постсинаптического потенциала. Еще одна группа синапсов с электрической передачей сигнала представлена эфасмами [21; 22], когда трансдукцию электрического импульса от клетки к клетке можно рассматривать с позиции сбоя нормального проведения импульса по системе изолированных нервных волокон вследствие тех или иных дефектов их миелиновой оболочки.

Проводимость щелевых соединений, а следовательно, и степень сопряженности связанных таким образом клеток могут быть модифицированы за счет изменения конформации составляющих их белков (быстрая регуляция – от долей секунды до минут) и (или) их количества (медленная регуляция, часы) в области контакта [23; 24]. Тем не менее сведения о факторах быстрой динамической регуляции относительно немногочисленны в научной литературе. Поскольку структурные основы электрических синапсов (щелевых контактов) принципиально схожи как у разных представителей животного мира (подробный сравнительный анализ коннексинов и иннексинов представлен в работе [25]), так и у клеток из состава разных тканей, то для исследования их функциональных характеристик подходит широкий спектр модельных организмов и систем: нервные клетки беспозвоночных (ракообразные, насекомые, моллюски, черви), эпителиальные клетки печени, бластомеры лягушки и т. п. [16; 25; 26].

Идентифицированные нейроны моллюсков как модельная система для изучения свойств электрических синапсов. В составе центральной нервной системы (ЦНС) пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) в начале 1970-х гг. была идентифицирована пара двусторонне электрически связанных клеток – нейроны V.D.1 и R.Pa.D.2 [27; 28], а также охарактеризованы основные показатели указанной электрической связи: сопротивление, область локализации, электрические показатели [29]. При этом клетка V.D.1 и является ведущим образованием пары, обладая собственной пейсмейкерной активностью, и фактически навязывает ритм связанному с ней нейрону R.Pa.D.2 [30]. Эти клетки могут быть удобной моделью для изучения функциональных характеристик электрических синапсов, поскольку их размеры и расположение в пределах нервных ганглиев моллюска обеспечивают беспрепятственный доступ к ним микроэлектродов.

Одной из важнейших характеристик электрических соединений является коэффициент связи (КС), указывающий на степень сопряжения контактирующих клеток. Это безразмерная величина, позволяющая оценить степень падения амплитуды сигнала при передаче от клетки к клетке. На практике он определяется как отношение изменения мембранного потенциала постсинаптического нейрона к такому в пресинаптической клетке. Поскольку рассматриваемый синапс характеризуется способностью к проведению возбуждения в обоих направлениях, это позволяет рассчитать значения как прямого (ток подается в V.D.1), так и обратного (ток подается в R.Pa.D.2) коэффициента связи, а также величины общего входного сопротивления цепи R при подаче тока в V.D.1 и R.Pa.D.2 по следующим формулам: $\Delta V_{\text{Пос}}/\Delta V_{\text{Прс}}$ (для КС) и $\Delta V_{\text{Прс}}/I_{\text{Прс}}$ (для R цепи), где ΔV – изменение мембранного потенциала пресинаптического (Прс) или постсинаптического (Пос) нейрона; I – величина тока, инъецируемого в соответствующий нейрон (по [30]).

В ходе многолетних исследований установлено, что проводимость идентифицируемого двустороннего электротонического контакта между нейронами V.D.1 и R.Pa.D.2 в ЦНС *Lymnaea stagnalis* может быть обратимо модифицирована при действии целого ряда неспецифических экстраинаптических факторов. В частности, речь идет о ее температурной чувствительности и зависимости от уровня pH и концентрации АФК в интерстиции.

Температурная зависимость электрической передачи. Температурная зависимость КС и R цепи носили линейный характер с отрицательным коэффициентом корреляции для КС: $-0,88 \pm 0,11$ (прямой) и $-0,90 \pm 0,10$ (обратный) и положительным для R цепи: $0,76 \pm 0,21$. Температурный коэффициент Q_{10} , рассчитанный при повышении температуры от 15 до 25 °С, составил $0,60 \pm 0,03$ и $0,59 \pm 0,03$ для прямой и обратной передач соответственно. Другими словами, повышение температуры приводит

к уменьшению степени сопряженности между указанными клетками. Так, при 35 °С величина КС снижалась в 2,5–3,0 раза, а R цепи увеличивалось всего в 1,3 раза по сравнению со значением при 15 °С [31]. Нормализация температурных условий полностью восстанавливала параметры электрической связи до исходных значений. Данные результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе сведениями. При изучении температурных реакций гигантского моторного синапса, вовлекаемого в реализацию рефлекса избегания у *Procambarus clarkii* и *Pacifastacus leniusculus*, была экспериментально установлена возможность надежной передачи сигнала при пониженных (менее 5 °С) температурах [32], в то время как гипертермия приводила к нарушению синаптической передачи уже при 12–25 °С. Такой эффект объяснялся авторами холодовой модуляцией свойств пре- и постсинаптической мембран – удлинением потенциала действия в пресинаптическом нейроне в сочетании с увеличением входного сопротивления и снижением порога для постсинаптической клетки [33]. При низких температурах отмечалось увеличение электрической связи между саливарными нейронами пачечного типа и мотонейронами протракции, сопровождаемое повышением входного сопротивления у слизня *Limax maximus* [34]. Повышение температуры вызывает ограничение протекания тока через аксонные веточки и электрические синапсы у мутантов *Drosophila melanogaster*, у которых наступал паралич при содержании в условиях повышенных температур [35].

Зависимость электрической передачи от рН. Закисление внеклеточной среды (рН 6,5–6,8) приводит к почти двукратному падению прямого КС на фоне практически неизменного уровня R цепи для нейронов V.D.1 и R. Pa.D.2 [36]. Статистически достоверных колебаний значения обратного КС и входного сопротивления цепи отмечено не было. Защелачивание интерстиция (рН 8,3–8,8) не вызывало статистически достоверных изменений показателей проводимости. Нормализация рН приводила к полной реставрации тестируемых параметров. Таким образом, электротоническая передача сигнала в ЦНС *Lymnaea* оказалась малочувствительной к умеренным, порядка 0,5 ед., изменениям рН. Это может быть следствием наличия ряда механизмов поддержания постоянства рН внутри клеток [37], поскольку проводимость щелевого контакта во много раз более чувствительна именно к колебаниям уровня рН цитозоля, а не интерстиция [38; 39].

Схожие реакции на изменение рН характерны и для электрических синапсов других беспозвоночных. Указывается, что рН-зависимость КС в септальных синапсах *Procambarus clarkia* характеризуется куполообразной кривой с максимумом при рН цитоплазмы 7,1 с прогрессивным его снижением по мере закисления (защелачивания) внутриклеточного содержимого в диапазоне 6,2–8,0 [40]. Подобная картина документирована и в электротонически связанных нейронах *Aplysia* [41]. Однако изменение рН цитоплазмы определяется (в том числе) и сдвигами рН интерстиция. В частности, при действии CO_2 , т. е. фактически при закислении, отмечено возрастание сопротивления связи на уровне щелевого контакта и, как следствие, разобщение взаимодействующих клеток для септальных синапсов гигантского аксона речного рака и нейронов буккальных ганглиев моллюска *Navanax inermis* [42]. Примечательно, что проводимость некоторых электрических синапсов, опосредованная коннексинами позвоночных с молекулярной массой 36 кДа, в большей степени угнетается при защелачивании цитозоля, нежели при его закислении [43].

Зависимость электрической передачи от уровня активных форм кислорода. Двусторонний электротонический контакт между нейронами V.D.1 и R. Pa.D.2 оказался подверженным влиянию пероксида водорода (конечная концентрация – 10^{-4} моль/л). Статистически значимое – в 1,9 и 1,8 раза – падение прямого и обратного КС наблюдалось через 3 мин после аппликации пероксида водорода (10^{-4} моль/л) на центральное кольцо ганглиев *Lymnaea* при неизменности R цепи в этих условиях. Заметим, что указанный эффект отмечен на фоне отсутствия статистически достоверных колебаний уровня мембранного потенциала и амплитуды потенциала действия для обеих клеток, а нормализация внеклеточного окружения (5-кратная смена нормального раствора Рингера в экспериментальной камере) статистически достоверно возвращала рассмотренные показатели к исходному значению. Предварительная аппликация нифедипина (10^{-4} моль/л), блокатора потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, практически полностью отменяла вызываемую приложением пероксида водорода (10^{-4} моль/л) модификацию электрической связи [44].

Сведения о действии пероксида водорода на щелевые соединения крайне скудны. Так, на эпителиальных клетках печени установлено прямое угнетающее действие пероксида водорода ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) на коммуникацию, опосредованную щелевыми соединениями [45], а использование различных антиоксидантов позволяет предотвратить разобщение клеток, вызываемое H_2O_2 [46].

Динамическая регуляция проводимости электрических синапсов при действии неспецифических экстрасинаптических факторов. Известно, что время полужизни белков щелевых контактов в ряде случаев составляет около 5 ч [23; 47]. Временная динамика отмеченных колебаний КС между

нейронами V.D.1 и R.Pa.D.2 нервной системы *Lymnaea stagnalis* при смене температуры, pH и действии активных форм кислорода исчисляется несколькими минутами. Этот факт свидетельствует о быстрой динамической модуляции электротонической передачи, связанной с изменением проводимости уже имеющихся каналов щелевого соединения, а не с увеличением их количества в области межклеточного контакта.

Среди основных механизмов, опосредующих быстрые изменения эффективности электрических синапсов, отдельно стоит остановиться на потенциал-чувствительности. Различают чувствительность к трансмембранной разности потенциалов и чувствительность к трансконтактной разности потенциалов. Все известные коннексоны и иннексоны демонстрируют зависимость своих свойств от трансконтактной разности потенциалов, но величина ответа, как правило, невелика и (или) не имеет физиологического значения [48]. Реакция каналов щелевого соединения на изменение мембранного потенциала может быть различной, сопровождаясь как снижением, так и увеличением проводимости в ответ на деполяризацию [49]. При этом в плане потенциал-чувствительности каждый полуканал соединения ведет себя независимо [50], что обеспечивает выпрямляющие свойства соединения, т. е. преимущественно одностороннюю передачу сигнала [51; 52].

Рассмотренный синапс между клетками V.D.1 и R.Pa.D.2 нервной системы *Lymnaea* относится к двусторонним, хотя КС для передачи в прямом направлении у него и выше. Одинаковая степень проведения возбуждения в обоих направлениях обеспечивает скорость и (или) синхронность ответа [41; 53], что необходимо для координации работы кардиореспираторной сети моллюска (синхронизации активности крупных нейронных ансамблей висцерального и париетального ганглиев). Температурная зависимость КС в этом межнейронном контакте носит линейный характер, а изменения потенциала покоя клеток и частоты их спонтанной импульсации описываются куполообразной кривой с максимумом при 15 и 25 °С соответственно [54]. Такое различие в динамике указанных показателей не позволяет рассматривать потенциал-чувствительность белков щелевого контакта между V.D.1 и R.Pa.D.2 в качестве основного механизма температурной зависимости этого соединения. Схожие рассуждения могут быть применены и к анализу реакций на сдвиги pH, и действие пероксида водорода – это отсутствие корреляции между изменениями потенциала покоя рассматриваемых клеток в новых условиях и показателями электрической связи [44; 55].

Альтернативный механизм быстрой динамической модуляции эффективности электрической синаптической передачи связан с различными системами внутриклеточных посредников [23–25]. Именно он позволяет объяснить регуляторное влияние «классических» нейромедиаторов (например, серотонина [56]), действие которых ассоциируется со связыванием с мембранными рецепторами, на функциональные характеристики щелевого соединения [57]. Известно о способностях циклических нуклеотидов выраженно изменять свойства контакта между клетками V.D.1 и R.Pa.D.2, что может лежать в основе NO-зависимого увеличения степени их сопряженности [31; 58]. Считается, что падение эффективности электротонической передачи при пониженных значениях pH цитоплазмы обусловлено влиянием растворимых внутриклеточных посредников [59]. С другой стороны, ацидофикация цитоплазмы клетки при снижении уровня pH интерстиция приводит к возрастанию концентрации ионов водорода (H^+), а протонирование белков, в том числе коннексинов и иннексинов, рассматривается в качестве одного из основных механизмов, опосредующих закрытие каналов щелевого соединения при низких pH [23; 51].

Одними из важнейших внутриклеточных посредников являются свободные ионы кальция (Ca^{2+}). Кальциевая гипотеза, согласно которой эффективность электрической передачи сигнала зависит от уровня Ca^{2+} в цитоплазме, была выдвинута еще в 1966 г. [60], возрастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} приводит к разобщению клеток [48; 51]. Полученные результаты по влиянию пероксида водорода на характеристики электрической связи между V.D.1 и R.Pa.D.2 в полной мере согласуются с этими представлениями. При этом возрастание внутриклеточной концентрации Ca^{2+} при действии пероксида водорода не только может являться следствием активации соответствующих каналов плазмалеммы (блокада которых при помощи нифедипина отменяла рассмотренный эффект [44]), но быть обусловленным усилением выхода Ca^{2+} из внутриклеточных депо [61] за счет окислительно-восстановительной модификации IP_3 -рецепторов [62]. По всей видимости, речь идет об универсальном защитном механизме, когда разобщение связанных посредством щелевого контакта клеток позволяет предотвратить гибель всего множества нейронов, поскольку электрически синапсы проницаемы и для крупных молекул (до 1 кДа), в том числе и для индукторов апоптоза, некроза и т. п. [63]. В частности, разобщители щелевых соединений (карбенексолон) предотвращают вызываемую высокой степенью сопряженности гибель гиппокампальных нейронов, обработанных H_2O_2 [64], а возрастание уровня экспрессии белков щелевых контактов ассоциируется с увеличением гибели клеток [65]. Интересно, что и действие температуры может быть опосредовано

сдвигами концентрации свободного Ca^{2+} внутри клетки и, как следствие, изменением активности кальмодулина, способного напрямую связываться с белками щелевого контакта, вызывая их закрытие [32].

Таким образом, проводимость идентифицируемого двустороннего электротонического контакта между нейронами V.D.1 и R.Pa.D.2 в нервной системе моллюска *Lymnaea stagnalis* в различной степени подвержена модулирующему влиянию температуры, pH и активных форм кислорода. Указанные начала могут рассматриваться в качестве экстрасинаптических неспецифических факторов, действие которых направлено на модификацию проводящих свойств белков щелевых контактов. Обратимый характер их действия может предопределять доминирование одних нейронных сетей мозга над другими и лежать в основе устойчивого функционирования нервных центров беспозвоночных при объемной передаче сигнала.

Библиографические ссылки

1. Agnati L. F., Fuxe K., Zoli M., et al. A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and β -endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission // *Acta Physiol. Scand.* 1986. Vol. 128, issue 2. P. 201–207. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1986.tb07967.x.
2. Agnati L. F., Leo G., Zanardi A., et al. Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives // *Acta Physiol.* 2006. Vol. 187, issues 1–2. P. 329–344. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2006.01579.x.
3. Murad F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase // *Neurotransmissions.* 1994. Vol. 10. P. 1–4.
4. Bjelke B., Goldstein M., Tinner B., et al. Dopaminergic transmission in the rat retina: evidence for volume transmission // *J. Chem. Neuroanat.* 1996. Vol. 12, issue 1. P. 37–50. DOI: 10.1016/S0891-0618(96)00176-7.
5. Agnati L. F., Cortelli P., Biagini G., et al. Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves // *Neuroreport.* 1994. Vol. 6. P. 9–12.
6. Sykova E., Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space // *Physiol. Rev.* 2008. Vol. 88, issue 4. P. 1277–1340. DOI: 10.1152/physrev.00027.2007.
7. Nicholson C. Diffusion and related transport properties in brain tissue // *Rep. Prog. Phys.* 2001. Vol. 64, № 7. P. 815–884. DOI: 10.1088/0034-4885/64/7/202.
8. Дьяконова В. Е., Сахаров Д. А. Нейротрансмиттерная основа поведения моллюска: управление выбором между ориентировочным и оборонительным ответом на предъявление незнакомого объекта // *Журн. высш. нерв. деятельности им. И. П. Павлова.* 1994. Т. 44, № 3. С. 526–531.
9. Дьяконова В. Е. Поведенческие эффекты октопамина и серотонина: некоторые парадоксы сравнительной физиологии // *Успехи физиол. наук.* 2007. Т. 38, № 3. С. 3–20.
10. Дьяконова В. Е. Нейротрансмиттерные механизмы контекст-зависимого поведения // *Журн. высш. нерв. деятельности им. И. П. Павлова.* 2012. Т. 62, № 6. С. 1–17.
11. Cowan W. M., Kandel E. R. A brief history of synapses and synaptic transmission // *Synapses* / ed. by W. M. Cowan [et al.]. Baltimore : Johns Hopkins University Press, 2001.
12. Bennett M. V. Gap junctions as electrical synapses // *J. Neurocytol.* 1997. Vol. 26, issue 6. P. 349–366. DOI: 10.1023/A:1018560803261.
13. Falk M. M. Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells // *J. Cell. Sci.* 2000. Vol. 113, issue 22. P. 4109–4120.
14. Connors B. W., Long M. A. Electrical synapses in the mammalian brain // *Annu. Rev. Neurosci.* 2004. Vol. 27. P. 393–418. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128.
15. Sosinsky G. E., Nicholson B. J. Structural organization of gap junction channels // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1711, issue 2. P. 99–125. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.04.001.
16. Goodenough D. A., Goliger J. A., Paul D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. Vol. 65. P. 475–502. DOI: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355.
17. Phelan P. Innexins: Members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1711. P. 225–245. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.10.004.
18. Weiss S. A., Preuss T., Faber D. S. A role of electrical inhibition in sensorimotor integration // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, issue 46. P. 18047–18052. DOI: 10.1073/pnas.0806145105.
19. Cantino D., Mugnaini E. The structural basis for electrotonic coupling in the avian ciliary ganglion. A study with thin sectioning and freeze-fracturing // *J. Neurocytol.* 1975. Vol. 4, issue 5. P. 505–536. DOI: 10.1007/BF01351535.
20. Nagy J. I., Pereda A. E., Rash J. E. On the occurrence and enigmatic functions of mixed (chemical plus electrical) synapses in the mammalian CNS // *Neurosci. Lett.* 2017. PII: S0304-3940(17)30755-3. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.09.021.
21. Blumberg H., Jänig W. Activation of fibers via experimentally produced stump neuromas of skin nerves: ephaptic transmission or retrograde sprouting? // *Exp. Neurol.* 1982. Vol. 76. P. 468–482.
22. Rasminsky M. Spontaneous activity and cross-talk in pathological nerve fibers // *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 1987. Vol. 65. P. 39–49.
23. Saez J. C., Berthoud V. M., Branes M. C., et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions // *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83, issue 4. P. 1359–1400. DOI: 10.1152/physrev.00007.2003.
24. Goodenough D. A., Paul D. L. Gap junctions // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009. DOI: 10.1101/cshperspect.a002576.
25. Skerrett I. M., Williams J. A Structural and functional comparison of gap junction channels composed of connexins and innexins // *Dev. Neurobiol.* 2017. Vol. 77, issue 5. P. 522–547. DOI: 10.1002/dneu.22447.

26. Winlow W., Qazzaz M. M., Johnson A. S. Bridging the gap – the ubiquity and plasticity of electrical synapses // EC Neurology. 2017. Vol. 7, issue 1. P. 7–12.
27. Benjamin P. R., Ings C. T. Golgi-Cox studies on the central nervous system of a gastropod mollusk // Z. Zellforsch. 1972. Vol. 128. P. 564–582.
28. Soffe S. R., Benjamin P. R. Morphology of two electrically-coupled giant neurosecretory neurons in the snail *Lymnaea stagnalis* // Comp. Biochem. Physiol. 1980. Vol. 67A. P. 35–46.
29. Benjamin P. R., Pilkington J. B. The electrotonic location of low-resistance intercellular junctions between a pair of giant neurons in the snail *Lymnaea* // J. Physiol. 1986. Vol. 370. P. 111–126. PMID: PMC1192671.
30. Wildering W. C., van der Roest M., de Vlieger T. A., et al. Age-related changes in junctional and non-junctional conductances in two electrically coupled peptidergic neurons of the mollusc *Lymnaea stagnalis* // Brain Res. 1991. Vol. 547, issue 1. P. 96–102. DOI: 10.1016/0006-8993(91)90578-J.
31. Sidorov A. V., Kazakevich V. B. Electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons: Nitric monoxide and temperature action // Protein Modules in Cellular Signalling. NATO Science Series: Life Sciences / ed. by L. Heilmeyer, P. Friedrich. 2001. Vol. 318. P. 150–153.
32. Arellano R. O., Ramón F., Rivera A., et al. Calmodulin acts as an intermediary for the effects of calcium on gap junctions from crayfish lateral axons // J. Membr. Biol. 1988. Vol. 101, issue 1. P. 119–131. DOI: 10.1007/BF01872827.
33. Heitler W. J., Edwards D. H. Effect of temperature on a voltage-sensitive electrical synapse in crayfish // J. Exp. Biol. 1998. Vol. 201, № 4. P. 503–513.
34. Prior D. J., Grega D. S. Effects of temperature on the endogenous activity and synaptic interactions of the salivary burster neurones in the terrestrial slug *Limax maximus* // J. Exp. Biol. 1982. Vol. 98. P. 415–428.
35. Nelson J. C., Wyman R. J. Examination of paralysis in *Drosophila* temperature-sensitive paralytic mutations affecting sodium channels; a proposed mechanism of paralysis // J. Neurobiol. 1990. Vol. 21, issue 3. P. 453–469. DOI: 10.1002/neu.480210307.
36. Сидоров А. В. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск : БГУ, 2011.
37. Сидоров А. В. Регуляция и модуляция нейронных функций при колебаниях уровня pH интерстиция // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. 2008. № 3. С. 67–72.
38. Spray D. C., Harris A. L., Bennett M. V. L. Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH // Science. 1981. Vol. 211, issue 4483. P. 712–715. DOI: 10.1126/science.6779379.
39. Spray D. C., Stern J. H., Harris A. L., et al. Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. Vol. 79, issue 2. P. 441–445. PMID: PMC345759.
40. Campos de Carvalho A., Spray D. C., Bennett M. V. pH Dependence of transmission at electrotonic synapses of the crayfish septate axon // Brain Res. 1984. Vol. 321, issue 2. P. 279–286. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90180-X.
41. Bodmer R., Verselis V., Levitan I. B., et al. Electrotonic synapses between *Aplysia* neurons in situ and in culture: aspects of regulation and measurement of permeability // J. Neurosci. 1988. Vol. 8, issue 5. P. 1656–1670.
42. Giaume C., Spira M. E., Korn H. Uncoupling of invertebrate electrotonic synapses by carbon dioxide // Neurosci. Lett. 1980. Vol. 17, issues 1–2. P. 197–202. DOI: 10.1016/0304-3940(80)90084-1.
43. Gonzalez-Nieto D., Gomez-Hernandez J. M., Larroza B. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105, issue 44. P. 17169–17174. DOI: 10.1073/pnas.0804189105.
44. Sidorov A. V. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons // Invert. Neurosci. 2012. Vol. 12, issue 1. P. 63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
45. Upham B. L., Kang K. S., Cho H. Y., et al. Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells // Carcinogenesis. 1997. Vol. 18, issue 1. P. 37–42. DOI: 10.1093/carcin/18.1.37.
46. Hwang J. W., Jung J. W., Lee Y. S., et al. Indole-3-carbinol prevents H₂O₂-induced inhibition of gap junctional intercellular communication by inactivation of PKB // J. Vet. Med. Sci. 2008. Vol. 70, issue 10. P. 1057–1063. DOI: 10.1292/jvms.70.1057.
47. Fallon R. F., Goodenough D. A. Five hour half-life of mouse liver gap junction protein // J. Cell. Biol. 1981. Vol. 90, issue 2. P. 521–526. DOI: 10.1083/jcb.90.2.521.
48. Spray D. C., White R. L., Mazet F., et al. Regulation of gap junctional conductance // Am. J. Physiol. 1985. Vol. 248, issue 6. P. H753–H764. DOI: 10.1152/ajpheart.1985.248.6.H753.
49. Verselis V. K., Bennett M. V., Bargiello T. A. A voltage-dependent gap junction in *Drosophila melanogaster* // Biophys. J. 1991. Vol. 59, issue 1. P. 114–126. DOI: 10.1016/S0006-3495(91)82204-4.
50. Palacios-Prado N., Huetteroth W., Pereda A. E. Hemichannel composition and electrical synaptic transmission: molecular diversity and its implications for electrical rectification // Front. Cell. Neurosci. 2014. Vol. 8. P. 324. DOI: 10.3389/fncel.2014.00324.
51. Harris A. L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap // Q. Rev. Biophysics. 2001. Vol. 34, issue 3. P. 325–472. DOI: 10.1017/S0033583501003705.
52. Phelan P., Goulding L. A., Tam J. L., et al. Molecular mechanism of rectification at identified electrical synapses in the *Drosophila* giant fiber system // Curr Biol. 2008. Vol. 18, issue 24. P. 1955–1960. DOI: 10.1016/j.cub.2008.10.067.
53. Marder E. Roles for electrical coupling in neuronal circuits as revealed by selective neuronal deletions // J. Exp. Biol. 1984. Vol. 112, № 1. P. 147–167.
54. Sidorov A. V. Effect of acute temperature change on lung respiration of the mollusk *Lymnaea stagnalis* // J. Therm. Biol. 2005. Vol. 30, issue 2. P. 163–171. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2004.10.002.
55. Sidorov A. V., Polyana I. P. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis* // J. Evol. Biochem. Physiol. 2003. Vol. 39, issue 5. P. 555–561. DOI: 10.1023/B:JOEY.0000015963.87905.1d.
56. Wildering W. C., Janse C. Serotonergic modulation of junctional conductance in an identified pair of neurons in the mollusc *Lymnaea stagnalis* // Brain Res. 1992. Vol. 595, issue 2. P. 343–352. DOI: 10.1016/0006-8993(92)91070-U.
57. Smith M., Pereda A. E. Chemical synaptic activity modulates nearby electrical synapses // Proc. Natl. Acad. Sci. 2003. Vol. 100, issue 8. P. 4849–4854. DOI: 10.1073/pnas.0734299100.
58. Sidorov A. V., Kazakevich V. B., Moroz L. L. Nitric oxide selectively enhances cAMP levels and electrical coupling between identified RPaD2/VD1 neurons in the CNS of *Lymnaea stagnalis* (L.) // Acta Biol. Hung. 1999. Vol. 50, № 1–3. P. 229–233.
59. Arellano R. O., Ramón F., Rivera A., et al. Lowering of pH does not directly affect the junctional resistance of crayfish lateral axons // J. Membr. Biol. 1986. Vol. 94, issue 3. P. 293–299. DOI: 10.1007/BF01869725.

60. Loewenstein W. R. Permeability of membrane junctions // *Ann. NY Acad. Sci.* 1966. Vol. 137, issue 2. P. 441–472. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1966.tb50175.x.
61. Garry A., Edwards D. H., Fallis I. F., et al. Ascorbic acid and tetrahydrobiopterin potentiate the EDHF phenomenon by generating hydrogen peroxide // *Cardiovasc. Res.* 2009. Vol. 84, issue 2. P. 218–226. DOI: 10.1093/cvr/cvp235.
62. Edwards D. H., Li Y., Griffith T. M. Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca²⁺ mobilization // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. Vol. 28. P. 1774–1781. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.172692.
63. Loewenstein W. R., Rose B. Calcium in (junctional) intercellular communication and a thought on its behavior in intracellular communication // *Ann. NY Acad. Sci.* 1978. Vol. 307. P. 285–307. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1978.tb41958.x.
64. Rouach N., Calvo C. F., Duquenois H., et al. Hydrogen peroxide increases gap junctional communication and induce astrocyte toxicity: regulation by brain macrophages // *Glia.* 2004. Vol. 45, issue 1. P. 28–38. DOI: 10.1002/glia.10300.
65. Ramachandran S., Xie L.-H., John S. A., et al. A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury // *PLoS One.* 2007. Vol. 2, issue 8. E. 712. DOI: 10.1371/journal.pone.0000712.

References

1. Agnati L. F., Fuxe K., Zoli M., et al. A correlation analysis of the regional distribution of central enkephalin and β -endorphin immunoreactive terminals and of opiate receptors in adult and old male rats. Evidence for the existence of two main types of communication in the central nervous system: the volume transmission and the wiring transmission. *Acta Physiol. Scan.* 1986. Vol. 128, issue 2. P. 201–207. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1986.tb07967.x.
2. Agnati L. F., Leo G., Zanardi A., et al. Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: history and perspectives. *Acta Physiol.* 2006. Vol. 187, issues 1–2. P. 329–344. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2006.01579.x.
3. Murad F. The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase. *Neurotransmissions.* 1994. Vol. 10. P. 1–4.
4. Bjelke B., Goldstein M., Tinner B., et al. Dopaminergic transmission in the rat retina: evidence for volume transmission. *J. Chem. Neuroanat.* 1996. Vol. 12, issue 1. P. 37–50. DOI: 10.1016/S0891-0618(96)00176-7.
5. Agnati L. F., Cortelli P., Biagini G., et al. Different classes of volume transmission signals exist in the central nervous system and are affected by metabolic signals, temperature gradients and pressure waves. *Neuroreport.* 1994. Vol. 6. P. 9–12.
6. Sykova E., Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol. Rev.* 2008. Vol. 88, issue 4. P. 1277–1340. DOI: 10.1152/physrev.00027.2007.
7. Nicholson C. Diffusion and related transport properties in brain tissue. *Rep. Prog. Phys.* 2001. Vol. 64, No. 7. P. 815–884. DOI: 10.1088/0034-4885/64/7/202.
8. D'yakonova V. E., Sakharov D. A. [The neurotransmitter basis of mollusk behavior: the control of the choice between exploratory and defensive responses to the presentation of an unknown object]. *Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. im. I. P. Pavlova.* 1994. Vol. 44, No. 3. P. 526–531 (in Russ.).
9. D'yakonova V. E. Behavioral functions of serotonin and octopamine: Some paradoxes of comparative physiology. *Uspekhi Fiziol. Nauk.* 2007. Vol. 38, No. 3. P. 3–20 (in Russ.).
10. D'yakonova V. E. Neurotransmitter mechanisms of context-dependent behavior. *Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. im. I. P. Pavlova.* 2012. Vol. 62, No. 6. P. 1–17 (in Russ.).
11. Cowan W. M., Kandel E. R. A brief history of synapses and synaptic transmission. In: *Synapses.* Baltimore : Johns Hopkins University Press, 2001.
12. Bennett M. V. Gap junctions as electrical synapses. *J. Neurocytol.* 1997. Vol. 26, issue 6. P. 349–366. DOI: 10.1023/A:1018560803261.
13. Falk M. M. Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *J. Cell. Sci.* 2000. Vol. 113, issue 22. P. 4109–4120.
14. Connors B. W., Long M. A. Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004. Vol. 27. P. 393–418. DOI: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128.
15. Sosinsky G. E., Nicholson B. J. Structural organization of gap junction channels. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1711, issue 2. P. 99–125. DOI: 10.1016/j.bbamem.2005.04.001.
16. Goodenough D. A., Goliger J. A., Paul D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu. Rev. Biochem.* 1996. Vol. 65. P. 475–502. DOI: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002355.
17. Phelan P. Innexins: Members of an evolutionarily conserved family of gap-junction proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. Vol. 1711. P. 225–245. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.10.004.
18. Weiss S. A., Preuss T., Faber D. S. A role of electrical inhibition in sensorimotor integration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, issue 46. P. 18047–18052. DOI: 10.1073/pnas.0806145105.
19. Cantino D., Mugnaini E. The structural basis for electrotonic coupling in the avian ciliary ganglion. A study with thin sectioning and freeze-fracturing. *J. Neurocytol.* 1975. Vol. 4, issue 5. P. 505–536. DOI: 10.1007/BF01351535.
20. Nagy J. I., Pereda A. E., Rash J. E. On the occurrence and enigmatic functions of mixed (chemical plus electrical) synapses in the mammalian CNS. *Neurosci. Lett.* 2017. PII: S0304-3940(17)30755-3. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.09.021.
21. Blumberg H., Jänig W. Activation of fibers via experimentally produced stump neuromas of skin nerves: ephaptic transmission or retrograde sprouting? *Exp. Neurol.* 1982. Vol. 76. P. 468–482.
22. Rasminsky M. Spontaneous activity and cross-talk in pathological nerve fibers. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 1987. Vol. 65. P. 39–49.
23. Saez J. C., Berthoud V. M., Branes M. C., et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* 2003. Vol. 83, issue 4. P. 1359–1400. DOI: 10.1152/physrev.00007.2003.
24. Goodenough D. A., Paul D. L. Gap junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009. DOI: 10.1101/cshperspect.a002576.
25. Skerrett I. M., Williams J. A Structural and functional comparison of gap junction channels composed of connexins and innexins. *Dev. Neurobiol.* 2017. Vol. 77, issue 5. P. 522–547. DOI: 10.1002/dneu.22447.
26. Winlow W., Qazzaz M. M., Johnson A. S. Bridging the gap – the ubiquity and plasticity of electrical synapses. *EC Neurology.* 2017. Vol. 7, issue 1. P. 7–12.

27. Benjamin P. R., Ings C. T. Golgi-Cox studies on the central nervous system of a gastropod mollusk. *Z. Zellforsch.* 1972. Vol. 128. P. 564–582.
28. Soffe S. R., Benjamin P. R. Morphology of two electrically-coupled giant neurosecretory neurons in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1980. Vol. 67A. P. 35–46.
29. Benjamin P. R., Pilkington J. B. The electrotonic location of low-resistance intercellular junctions between a pair of giant neurons in the snail *Lymnaea*. *J. Physiol.* 1986. Vol. 370. P. 111–126. PMID: PMC1192671.
30. Wildering W. C., van der Roest M., de Vlieger T. A., et al. Age-related changes in junctional and non-junctional conductances in two electrically coupled peptidergic neurons of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res.* 1991. Vol. 547, issue 1. P. 96–102. DOI: 10.1016/0006-8993(91)90578-J.
31. Sidorov A. V., Kazakevich V. B. Electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons: Nitric monoxide and temperature action. In: *Protein Modules in Cellular Signalling. NATO Science Series: Life Sciences.* 2001. Vol. 318. P. 150–153.
32. Arellano R. O., Ramón F., Rivera A., et al. Calmodulin acts as an intermediary for the effects of calcium on gap junctions from crayfish lateral axons. *J. Membr. Biol.* 1988. Vol. 101, issue 1. P. 119–131. DOI: 10.1007/BF01872827.
33. Heitler W. J., Edwards D. H. Effect of temperature on a voltage-sensitive electrical synapse in crayfish. *J. Exp. Biol.* 1998. Vol. 201, No. 4. P. 503–513.
34. Prior D. J., Grega D. S. Effects of temperature on the endogenous activity and synaptic interactions of the salivary burster neurones in the terrestrial slug *Limax maximus*. *J. Exp. Biol.* 1982. Vol. 98. P. 415–428.
35. Nelson J. C., Wyman R. J. Examination of paralysis in *Drosophila* temperature-sensitive paralytic mutations affecting sodium channels; a proposed mechanism of paralysis. *J. Neurobiol.* 1990. Vol. 21, issue 3. P. 453–469. DOI: 10.1002/neu.480210307.
36. Sidorov A. V. [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk : BSU, 2011 (in Russ.).
37. Sidorov A. V. Regulation and modulation of neuronal functions under interstitial pH alterations. *Vestnik BGU. Ser. 2, Khim. Biol. Geogr.* 2008. No. 3. P. 67–72 (in Russ.).
38. Spray D. C., Harris A. L., Bennett M. V. L. Gap junctional conductance is a simple and sensitive function of intracellular pH. *Science.* 1981. Vol. 211, issue 4483. P. 712–715. DOI: 10.1126/science.6779379.
39. Spray D. C., Stern J. H., Harris A. L., et al. Gap junctional conductance: comparison of sensitivities to H and Ca ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. Vol. 79, issue 2. P. 441–445. PMID: PMC345759.
40. Campos de Carvalho A., Spray D. C., Bennett M. V. pH Dependence of transmission at electrotonic synapses of the crayfish septate axon. *Brain Res.* 1984. Vol. 321, issue 2. P. 279–286. DOI: 10.1016/0006-8993(84)90180-X.
41. Bodmer R., Verselis V., Levitan I. B., et al. Electrotonic synapses between *Aplysia* neurons in situ and in culture: aspects of regulation and measurement of permeability. *J. Neurosci.* 1988. Vol. 8, issue 5. P. 1656–1670.
42. Giaume C., Spira M. E., Korn H. Uncoupling of invertebrate electrotonic synapses by carbon dioxide. *Neurosci. Lett.* 1980. Vol. 17, issues 1–2. P. 197–202. DOI: 10.1016/0304-3940(80)90084-1.
43. Gonzalez-Nieto D., Gomez-Hernandez J. M., Larroza B. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. Vol. 105, issue 44. P. 17169–17174. DOI: 10.1073/pnas.0804189105.
44. Sidorov A. V. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons. *Invert. Neurosci.* 2012. Vol. 12, issue 1. P. 63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
45. Upham B. L., Kang K. S., Cho H. Y., et al. Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells. *Carcinogenesis.* 1997. Vol. 18, issue 1. P. 37–42. DOI: 10.1093/carcin/18.1.37.
46. Hwang J. W., Jung J. W., Lee Y. S., et al. Indole-3-carbinol prevents H₂O₂-induced inhibition of gap junctional intercellular communication by inactivation of PKB. *J. Vet. Med. Sci.* 2008. Vol. 70, issue 10. P. 1057–1063. DOI: 10.1292/jvms.70.1057.
47. Fallon R. F., Goodenough D. A. Five hour half-life of mouse liver gap junction protein. *J. Cell. Biol.* 1981. Vol. 90, issue 2. P. 521–526. DOI: 10.1083/jcb.90.2.521.
48. Spray D. C., White R. L., Mazet F., et al. Regulation of gap junctional conductance. *Am. J. Physiol.* 1985. Vol. 248, issue 6. P. H753–H764. DOI: 10.1152/ajpheart.1985.248.6.H753.
49. Verselis V. K., Bennett M. V., Bargiello T. A. A voltage-dependent gap junction in *Drosophila melanogaster*. *Biophys. J.* 1991. Vol. 59, issue 1. P. 114–126. DOI: 10.1016/S0006-3495(91)82204-4.
50. Palacios-Prado N., Huetteroth W., Pereda A. E. Hemichannel composition and electrical synaptic transmission: molecular diversity and its implications for electrical rectification. *Front. Cell. Neurosci.* 2014. Vol. 8. P. 324. DOI: 10.3389/fncel.2014.00324.
51. Harris A. L. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q. Rev. Biophysics.* 2001. Vol. 34, issue 3. P. 325–472. DOI: 10.1017/S0033583501003705.
52. Phelan P., Goulding L. A., Tam J. L., et al. Molecular mechanism of rectification at identified electrical synapses in the *Drosophila* giant fiber system. *Curr Biol.* 2008. Vol. 18, issue 24. P. 1955–1960. DOI: 10.1016/j.cub.2008.10.067.
53. Marder E. Roles for electrical coupling in neuronal circuits as revealed by selective neuronal deletions. *J. Exp. Biol.* 1984. Vol. 112, No. 1. P. 147–167.
54. Sidorov A. V. Effect of acute temperature change on lung respiration of the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *J. Therm. Biol.* 2005. Vol. 30, issue 2. P. 163–171. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2004.10.002.
55. Sidorov A. V., Polyanina I. P. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2003. Vol. 39, issue 5. P. 555–561. DOI: 10.1023/B:JOEY.0000015963.87905.1d.
56. Wildering W. C., Janse C. Serotonergic modulation of junctional conductance in an identified pair of neurons in the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Brain Res.* 1992. Vol. 595, issue 2. P. 343–352. DOI: 10.1016/0006-8993(92)91070-U.
57. Smith M., Pereda A. E. Chemical synaptic activity modulates nearby electrical synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003. Vol. 100, issue 8. P. 4849–4854. DOI: 10.1073/pnas.0734299100.
58. Sidorov A. V., Kazakevich V. B., Moroz L. L. Nitric oxide selectively enhances cAMP levels and electrical coupling between identified RPaD2/VD1 neurons in the CNS of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Acta Biol. Hung.* 1999. Vol. 50, No. 1–3. P. 229–233.
59. Arellano R. O., Ramón F., Rivera A., et al. Lowering of pH does not directly affect the junctional resistance of crayfish lateral axons. *J. Membr. Biol.* 1986. Vol. 94, issue 3. P. 293–299. DOI: 10.1007/BF01869725.
60. Loewenstein W. R. Permeability of membrane junctions. *Ann. NY Acad. Sci.* 1966. Vol. 137, issue 2. P. 441–472. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1966.tb50175.x.

61. Garry A., Edwards D. H., Fallis I. F., et al. Ascorbic acid and tetrahydrobiopterin potentiate the EDHF phenomenon by generating hydrogen peroxide. *Cardiovasc. Res.* 2009. Vol. 84, issue 2. P. 218–226. DOI: 10.1093/cvr/cvp235.
62. Edwards D. H., Li Y., Griffith T. M. Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca²⁺ mobilization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. Vol. 28. P. 1774–1781. DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.172692.
63. Loewenstein W. R., Rose B. Calcium in (junctional) intercellular communication and a thought on its behavior in intracellular communication. *Ann. NY Acad. Sci.* 1978. Vol. 307. P. 285–307. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1978.tb41958.x.
64. Rouach N., Calvo C. F., Duquennoy H., et al. Hydrogen peroxide increases gap junctional communication and induce astrocyte toxicity: regulation by brain macrophages. *Glia.* 2004. Vol. 45, issue 1. P. 28–38. DOI: 10.1002/glia.10300.
65. Ramachandran S., Xie L.-H., John S. A., et al. A novel role for connexin hemichannel in oxidative stress and smoking-induced cell injury. *PLoS One.* 2007. Vol. 2, issue 8. E. 712. DOI: 10.1371/journal.pone.0000712.

Статья поступила в редколлегию 23.01.2018.
Received by editorial board 23.01.2018.

ПОЛУЧЕНИЕ ЖЕЛАТИНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ КЛЕТКАМИ

Т. О. СУХАН¹⁾, Т. Г. ШУТОВА²⁾,
А. М. УШЕНКИНА²⁾, А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

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

²⁾Институт химии новых материалов НАН Беларуси,
ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Беларусь

Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности использования желатиновых наночастиц в качестве средств доставки фармакологически активных субстанций в культивируемые нормальные и раковые клетки человека. Показано, что при инкубации наноструктурированного красителя нильского красного с клетками аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231 и нормальными фибробластами содержание красителя в клетках возрастает с увеличением времени инкубации и достигает максимума через 24 ч, при этом накопление красителя в раковых клетках происходит значительно быстрее, чем в фибробластах. Установлено, что включение кверцетина в желатиновые наночастицы приводило к достоверному усилению его цитотоксического действия в отношении раковых клеток.

Ключевые слова: желатиновые наночастицы; фибробласты; клеточная линия MDA-MB-231; кверцетин; нильский красный.

Образец цитирования:

Сухан Т. О., Шутова Т. Г., Ушенкина А. М., Потапович А. И., Костюк В. А. Получение желатиновых наночастиц и исследование их взаимодействия с культивируемыми клетками // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 13–19.

For citation:

Suhan T. O., Shutava T. G., Ushenkina A. M., Potapovich A. I., Kostyuk V. A. Preparation of gelatinum nanoparticles and investigation of their interaction with cultivated cells. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 13–19 (in Russ.).

Авторы:

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

Татьяна Геннадьевна Шутова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории биополимерных капсулированных структур.

Анастасия Михайловна Ушенкина – лаборант лаборатории биополимерных капсулированных структур.

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Tatyana O. 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

Tatyana G. Shutava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of biopolymer encapsulated structures.

shutova@ichnm.basnet.by

Anastasiya M. Ushenkina, laboratory assistant at the laboratory of biopolymer encapsulated structures.

aushenkina@gmail.com

Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the scientific research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

pot-alla@rambler.ru

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the scientific research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

kostyuk@bsu.by

PREPARATION OF GELATINUM NANOPARTICLES AND INVESTIGATION OF THEIR INTERACTION WITH CULTIVATED CELLS

*T. O. SUHAN^a, T. G. SHUTAVA^b,
A. M. USHENKINA^b, A. I. POTAPOVICH^a, V. A. KOSTYUK^a*

^a*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*

^b*Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus,
36 F. Skaryny Street, Minsk 220141, Belarus*

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Experimental data showing that gelatin nanoparticles may be used as a means of delivery of pharmacologically active substances into cultured human normal and cancer cells are presented in the paper. It was found that the incubation of the encapsulated dye Nile red with the cells of the human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 and normal fibroblasts resulted to the increase of the dye content in the cells with the increasing incubation time and reached a maximum after 24 h, with the accumulation of dye in cancer cells much faster than in fibroblasts. It was found that the inclusion of quercetin in gelatin nanoparticles led to a significant increase in cytotoxic effect of this polyphenol against cancer cells.

Key words: gelatin nanoparticles; fibroblasts; cell line MDA-MB-231; quercetin; Nile red.

Введение

В качестве потенциальных средств хемопревенции в последние годы рассматриваются растительные полифенольные соединения (РПС). Некоторые из них, например куркумин и кверцетин, обладают цитотоксичностью в отношении многих типов опухолевых клеток. Кроме того, РПС характеризуются выраженным антиоксидантным действием [1]. Известно, что влияние на организм негативных физико-химических факторов приводит к гиперпродукции сильных оксидантов, повреждению тканей и развитию хронического воспаления, которое, в свою очередь, может стать причиной канцерогенеза и возникновения различных форм рака [2; 3]. В таких случаях в качестве онкопротекторов могут быть использованы антиоксиданты. Антиоксидантная терапия может оказаться эффективной и после проведения курса химиотерапии или лучевой терапии. Несмотря на выявленное в многочисленных эпидемиологических исследованиях положительное воздействие полифенолов на здоровье животных и человека, их фармацевтическое и медицинское использование все еще незначительно как в силу ограниченной растворимости, так и из-за низкой всасываемости в кишечнике. Кроме того, низкая биодоступность РПС обусловлена активно протекающими процессами биотрансформации (конъюгация, метилирование и окисление) в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта и гепатоцитах [4].

Перспективным подходом для повышения биодоступности и улучшения терапевтического потенциала РПС стало использование в качестве средств доставки полимерных и липидных наноразмерных контейнеров-переносчиков. Включение РПС в наночастицы не только повышает их растворимость, но и защищает фитопрепараты от неблагоприятного внешнего воздействия, увеличивает физико-химическую стабильность и время их хранения, расширяет тканевую биодоступность, позволяет контролировать процесс высвобождения лекарственной субстанции [5]. Желатиновые нанокapsулы широко используются в качестве транспортных наноконтeйнеров, повышающих биодоступность лекарственных средств. Преимуществом желатиновых наночастиц (ЖН) является прекрасная биосовместимость, а также отсутствие токсичности как у самого желатина (классифицируется Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США как безопасное вещество), так и у продуктов его деградации. Кроме того, ЖН можно вводить неинвазивно (назально), что позволяет миновать гематоэнцефалический барьер, не дающий попасть в мозг через кровь большинству фармакологических препаратов [6; 7]. В настоящей работе предпринята попытка оценить возможности использования ЖН, полученных методом двухстадийной десольватации, в качестве средств доставки в культивируемые нормальные и раковые клетки человека фармакологически активных субстанций.

Материалы и методы исследований

Материалы. Желатин типа А (300 Блум), глутаровый альдегид (50 % водный раствор), полиэтиленмин (ПЭИ) (50 % водный раствор), полистиролсульфонат (ПСС) натрия, полиаллиламина гидрохлорид, изотонический фосфатный буфер (ИФБ) (рН 7,4), диметилсульфоксид (ДМСО), нильский

красный (НК), твин-80 поставлялись компанией *Sigma-Aldrich* (Германия). Ростовую среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), покупали у фирмы *Lonza* (Бельгия), эмбриональную сыворотку – у фирмы *Gibco* (США).

Клеточные культуры. В работе использовали нормальные фибробласты человека линии FL (*human lung fibroblasts*) и клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231. Клетки растили в полной среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамин и антибиотиков (100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂).

Пролиферативная активность и жизнеспособность клеток. Пролиферативную активность и жизнеспособность клеток определяли в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (*Invitrogen*, США), содержащий нефлуоресцентный компонент голубого цвета резазурин, который модифицируется жизнеспособными клетками в высокофлуоресцентное соединение красного цвета резозурин. Реактив PrestoBlue™ разводили в культуральной среде (1 : 9) и добавляли к клеткам в количестве 100 мкл на лунку. Перед этим клетки отмывали один раз, добавляя в каждую лунку по 200 мкл ИФБ. На каждом планшете оставляли лунки с культуральной средой без клеток для определения базового уровня флуоресценции. Флуоресценцию измеряли после инкубации планшетов в CO₂-инкубаторе в течение 2 ч, используя значения Ex 560 нм (±25 нм), Em 590 нм (±10 нм).

Получение желатиновых наночастиц. Желатиновые наночастицы получали методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ (ПАВ) по модифицированной методике [8]. Концентрацию ЖН в растворе в пересчете на сухое вещество рассчитывали по формуле

$$c = \frac{m_1 - m_0}{V}, \quad (1)$$

где c – концентрация ЖН, мг/мл; m_1 – масса пробирки с ЖН после высушивания, мг; m_0 – масса пустой пробирки, мг; V – объем аликвоты, мл.

Массовую долю желатина в ЖН определяли по формуле

$$w = \frac{m_1 - m_0}{m_2 - m_0} \cdot 100 \%, \quad (2)$$

где w – массовая доля желатина в частицах, %; m_1 – масса пробирки с ЖН после высушивания, мг; m_0 – масса пустой пробирки, мг; m_2 – масса пробирки с ЖН перед высушиванием, мг.

Для измерения гидродинамических размеров и коэффициента полидисперсности желатиновых частиц методом динамического рассеяния света (ДРС), а также дзета-потенциала частиц (ζ -потенциал) методом электрофоретического рассеяния света использовали прибор Zetasizer Nano ZS (*Malvern*, Великобритания).

Исследование морфологии наночастиц желатина проводили при помощи атомно-силового микроскопа MultiMode Nanoscope III (США). При сканировании применяли зонды NPS-1 из нитрида кремния. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения *Nanoscope v5.31*. На поверхности кремниевых подложек формировали один бислой ПЭИ/ПСС, полимеры адсорбировали из их водных растворов с концентрацией 1 мг/мл в течение 5 мин и тщательно промывали дистиллированной водой. Затем на подложки наносили 20 мкл дисперсии ЖН, разбавленной до концентрации 1 мг/мл. Через 1 мин раствор отбирали с поверхности подложек, а подложки с ЖН сушили на воздухе в течение суток.

Получение желатиновых наночастиц, содержащих кверцетин. Для получения желатиновых наночастиц, содержащих кверцетин (Кв-ЖН), к 15 мл дисперсии ЖН в воде с концентрацией 1,4 мг/мл добавляли по каплям 3 мл 0,24 мг/мл раствора кверцетина в этиловом спирте при постоянной обработке ультразвуком. Смесь оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Полученные ЖН отделяли центрифугированием (центрифуга Z36НК, Германия) при 6000 об/мин в течение 10 мин и редицергировали в 2 мл дистиллированной воды. Для удаления остатков органического растворителя и неадсорбированных молекул кверцетина ЖН промывали водой. Полученный образец содержал ~10 мг/мл ЖН с 0,052 ммоль/г кверцетина (0,52 ммоль/л кверцетина).

Получение желатиновых наночастиц, содержащих НК. Для получения желатиновых наночастиц, содержащих флуоресцентный краситель НК, к 30 мл дисперсии ЖН в дистиллированной воде с концентрацией 5,25 мг/мл порциями (по 0,2 мл) добавляли 6 мл раствора НК (0,45 мг/мл) и обрабатывали образец ультразвуком в течение 1 мин после введения каждой порции красителя. Полученную дисперсию оставляли на 30 мин при комнатной температуре, после чего разделяли на аликвоты по 1 мл и отделяли ЖН от супернатанта путем центрифугирования при 5500 об/мин в течение 10 мин. Желатиновые наночастицы диспергировали в 0,5 мл дистиллированной воды и объединяли аликвоты. Полученный

образец хранили при температуре 4 °С. Содержание НК в ЖН определяли спектрофлуориметрически при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 650 нм. Предварительно краситель дважды экстрагировали этиловым спиртом.

Для визуализации процесса накопления нильского красного в клетках использовали флуоресцентный микроскоп Axiovert 25 (*Carl Zeiss*, Германия), оснащенный цифровой фотокамерой.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*. Результаты представлены как среднее значение и стандартная ошибка среднего ($\text{Mean} \pm \text{SE}$). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Физико-химические свойства желатиновых наночастиц. Средний гидродинамический диаметр (D) желатиновых частиц, полученных методом двухстадийной десольватации, по интенсивности светорассеяния равен 264 ± 5 нм. В дисперсии ЖН в наибольшей степени представлены фракции частиц, имеющих диаметр в диапазоне от 190 до 220 нм (рис. 1, *a*). Их содержание достигает 46,9 % общего числа частиц. Средний диаметр и диаметр частиц, составляющих наибольшую долю в образце, различаются незначительно, что указывает на узкое распределение ЖН по размерам. Коэффициент полидисперсности ЖН равен $0,030 \pm 0,012$. Для ЖН характерно высокое значение ζ -потенциала, равное $+20,50 \pm 0,23$ мВ. Достаточно большой положительный заряд на поверхности частиц обуславливает высокую коллоидную устойчивость раствора. Хранение ЖН в течение шести месяцев при температуре 4 °С не приводит к их укрупнению.

Согласно атомно-силовой микроскопии (АСМ) (рис. 1, *б*) средний диаметр ЖН составляет около 360 нм, а их высота не превышает 70 нм. Некоторое увеличение латеральных размеров частиц на АСМ-изображениях по сравнению с диаметром, определенным методом ДРС, связано с высушиванием ЖН, нанесенных на подложку, при приготовлении препаратов для атомно-силовой микроскопии. Тем не менее с учетом этого данные АСМ хорошо согласуются с результатами, полученными методом ДРС.

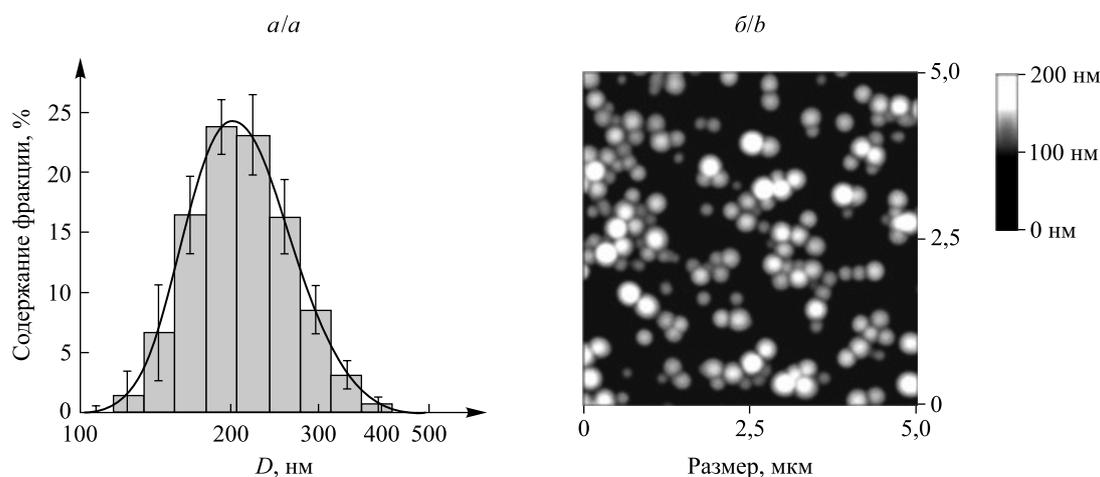


Рис. 1. Распределение по размерам (*a*) и изображение желатиновых наночастиц, полученное с помощью атомно-силовой микроскопии (*б*)

Fig. 1. The distribution in size (*a*) and the image of gelatin nanoparticles, obtained using atomic force microscopy (*b*)

Определение способности желатиновых наночастиц проникать и накапливаться в нормальных фибробластах и раковых клетках человека (MDA-MB-231). Для оценки эффективности клеточного поглощения свободного (НК) или инкапсулированного (НК-ЖН) нильского красного клетки растили в 24-луночных планшетах до конфлюэнтности 60 %, затем заменяли полную среду на среду без сыворотки (1 мл на лунку), содержащую 10 мкмоль/л свободного или инкапсулированного красителя, инкубировали 1, 4 и 24 ч, после чего удаляли среду инкубации, клеточный монослой дважды промывали ИФБ (рН 7,4) и замораживали прикрепленные клетки при температуре -70 °С. После оттаивания клеток при комнатной температуре в каждую лунку 24-луночного планшета добавляли по 300 мкл ДМСО и выдерживали планшет 1 ч в темноте при постоянном перемешивании на мини-шейкере (PSU-2Т, *BioSan*, Латвия), после чего аликвоты из каждой лунки в трех повторах переносили в лунки 96-луночного планшета (100 мкл на лунку) и измеряли интенсивность флуоресценции ($\text{Ex/Em} = 550/650$).

Таблица 1

Концентрация нильского красного, экстрагируемого ДМСО из клеток, предварительно инкубированных с НК или НК-ЖН, мкмоль/л

Table 1

The concentration of Nile red, extracted by DMSO from cells pre-incubated with Nile red or Nile red – nanoparticles, $\mu\text{mol/l}$

Время инкубации, ч	MDA-MB-231		Фибробласты	
	НК	НК-ЖН	НК	НК-ЖН
1	$4,6 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,7^{**}$	$2,4 \pm 0,6$	$0,3 \pm 0,1^{**\#}$
4	$4,1 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,2^{**}$	$4,1 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2^{**\#}$
24	$4,1 \pm 0,2$	$9,4 \pm 0,6^{**}$	$4,3 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,1^{*\#}$

*, ** Различия достоверны по отношению к клеткам, инкубированным с НК, при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно; # – различия достоверны по отношению к MDA-MB-231, инкубированным с НК-ЖН, при $p < 0,01$.

При инкубации НК-ЖН с клетками линии MDA-MB-231 установлено, что содержание красителя в клетках возрастает с увеличением времени инкубации и достигает максимума через 24 ч (табл. 1). При этом через 1 ч инкубации количество нильского красного в клетках составляло 25 %, а через 4 ч – 71 % от максимального значения. При инкубации НК-ЖН с фибробластами содержание красителя в клетках также возрастает с увеличением времени инкубации и достигает максимума через 24 ч, однако в этом случае клеточное поглощение желатиновых наночастиц происходит существенно медленнее: через 1 и 4 ч инкубации количество красителя в клетках составляло 6 и 21 % от максимального значения соответственно. Следует также отметить, что максимальное содержание красителя в клетках аденокарциномы молочной железы человека (MDA-MB-231) было в 1,8 раза выше ($p < 0,01$), чем в нормальных фибробластах. При внесении в культуральную среду свободного НК максимальное содержание красителя в клетках MDA-MB-231 наблюдалось через 1 ч, а в фибробластах – через 4 ч инкубации (см. табл. 1).

Увеличение в клетках содержания нильского красного в ходе их инкубации с наноструктурированным красителем подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 2).

Поглощение клетками желатиновых наночастиц может быть обусловлено неспецифическим адсорбционным эндоцитозом. Кроме того, известно, что на поверхности фибробластов и клеток линии MDA-MB-231 присутствуют Arg-Gly-Asp-зависимые коллагеновые рецепторы [9; 10], посредством которых может осуществляться специфическое связывание ЖН с плазматической мембраной, облегчающее их

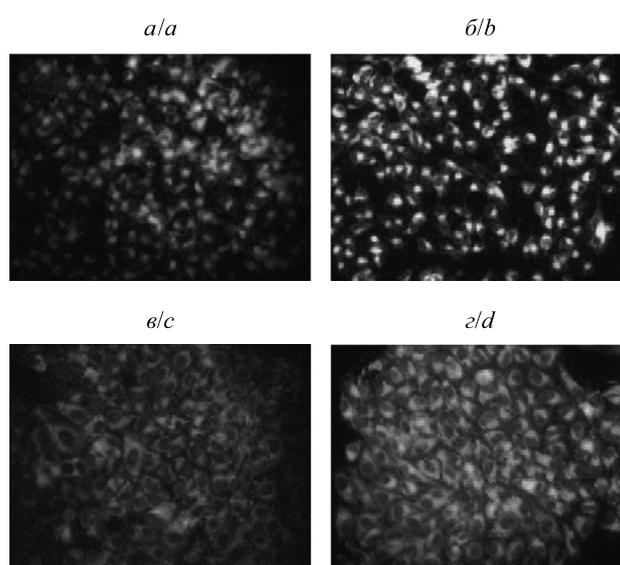


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток MDA-MB-231 (а, б) и фибробластов (в, г) через 1 ч (а, в) и 6 ч (б, г) инкубации с НК-ЖН в концентрации 10 мкмоль/л

Fig. 2. Representative fluorescent micrographs of MDA-MB-231 cells (a, b) and fibroblasts (c, d) after 1 h (a, c) and 6 h (b, d) incubation with Nile red – gelatin nanoparticles at the concentration of 10 $\mu\text{mol/l}$

последующее поглощение клеткой. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что процессы адсорбции и эндоцитоза ЖН эффективнее протекают в трансформированных клетках линии MDA-MB-231, чем в нормальных фибробластах.

Влияние кверцетина и кверцетина в составе желатиновых наночастиц на пролиферативную активность и жизнеспособность культивируемых клеток человека. Цитостатическая и цитотоксическая активность природных и синтетических соединений свидетельствует об их потенциальной способности блокировать рост опухоли в результате прямого токсического воздействия на раковые клетки. Для первичного выявления такого рода активности оценивают влияние потенциальных противораковых средств на рост и пролиферацию различных линий раковых клеток.

Таблица 2

**Пролиферативная активность и жизнеспособность клеток
(в % по отношению к контролю (100 %)) через 24 ч инкубации с Кв или Кв-ЖН**

Table 2

**Proliferative activity and cell viability (in % to control (100 %))
after 24 h incubation with quercetin or quercetin – gelatin nanoparticles**

Тип клеток	Кв, мкмоль/л			Кв-ЖН, мкмоль/л		
	12	25	50	12	25	50
MDA-MB-231	95,0 ± 5,8	94,0 ± 9,6	94,3 ± 8,0	100,0 ± 5,4	92,0 ± 8,4	69,0 ± 9,7*
Фибробласты	94,1 ± 6,3	94,9 ± 7,2	73,3 ± 4,6**	92,4 ± 8,0	88,7 ± 8,2	65,6 ± 5,6**

*, **Различия достоверны по отношению к контрольным клеткам при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно.

В данном разделе представлены результаты сравнительного исследования цитотоксического действия наноструктурированного и свободного кверцетина в отношении культивируемых клеток аденокарциномы молочной железы линии MDA-MB-231 и нормальных фибробластов. В этих экспериментах в культуральную среду клеток, культивируемых в 96-луночных планшетах, добавляли кверцетин в виде раствора в ДМСО (Кв) или наноструктурированный кверцетин в ЖН (Кв-ЖН). В обоих случаях конечные концентрации кверцетина находились в диапазоне от 12 до 50 мкмоль/л. Как следует из данных, приведенных в табл. 2, Кв в рассматриваемом диапазоне концентраций не оказывал статистически достоверного воздействия на жизнеспособность клеток MDA-MB-231, но при концентрации 50 мкмоль/л снижал пролиферативную активность и жизнеспособность нормальных фибробластов на 27 %. Включение кверцетина в ЖН приводило к усилению его цитотоксического действия в отношении нормальных фибробластов и особенно раковых клеток. Так, наноструктурированный кверцетин Кв-ЖН в концентрации 50 мкмоль/л снижал пролиферативную активность и жизнеспособность нормальных фибробластов и клеток линии MDA-MB-231 на 34 и 31 % соответственно.

Принимая во внимание данные, приведенные в табл. 1, свидетельствующие о выраженной способности исследованных клеток поглощать ЖН, можно предположить, что повышение цитотоксичности наноструктурированного кверцетина (см. табл. 2) обусловлено облегчением его трансмембранного переноса и, как следствие, более высокой внутриклеточной концентрацией в сравнении с растворимой формой.

Выводы

Желатиновые наночастицы, полученные методом двухстадийной десольватации без использования ПАВ, могут быть предложены в качестве средств доставки фармакологически активных субстанций к клеткам-мишеням. Показано, что желатиновые наночастицы поглощаются раковыми клетками значительно быстрее, чем нормальными фибробластами. Включение кверцетина в желатиновые наночастицы приводит к достоверному усилению его цитотоксического действия в отношении раковых клеток.

Библиографические ссылки

1. Костюк В. А., Потапович А. И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск : БГУ, 2004.
2. Shacter E., Beecham E. J., Covey J. M., et al. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells // *Carcinogenesis*. 1988. Vol. 9, issue 12. P. 2297–2304.
3. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors // *Antioxid. Redox Signal*. 2011. Vol. 15, issue 8. P. 2335–2381. DOI: 10.1089/ars.2010.3534.
4. Костюк В. А. Биотрансформация и биодоступность растительных полифенольных соединений // *Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем*. 2016. Т. 11, ч. 2. С. 47–55.

5. Conde J., Doria G., Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer // *J. Drug Deliv.* 2012. Article ID: 751075. DOI: 10.1155/2012/751075.
6. Jin Y., Kim I. Y., Kim I. D., et al. Biodegradable gelatin microspheres enhance the neuroprotective potency of osteopontin via quick and sustained release in the post-ischemic brain // *Acta Biomater.* 2014. Vol. 10, issue 7. P. 3126–3135. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.045.
7. Joachim E., Kim I. D., Jin Y., et al. Gelatin nanoparticles enhance the neuroprotective effects of intranasally administered osteopontin in rat ischemic stroke model // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2014. Vol. 4, issues 5–6. P. 395–399. DOI: 10.1007/s13346-014-0208-9.
8. Coester C. J., Langer K., Van Briesen H., et al. Gelatin nanoparticles by two-step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake // *J. Microencapsul.* 2000. Vol. 17, issue 2. P. 187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.
9. Lu M. L., McCarron R. J., Jacobson B. S. Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton // *J. Cell Sci.* 1992. Vol. 101. P. 873–883.
10. Agrez M. V., Bates R. C., Boyd A. W., et al. Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: implications for wound healing // *Cell Regul.* 1991. Vol. 2, issue 12. P. 1035–1044.

References

1. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. [Bioradicals and bioantioxidants]. Minsk : BSU, 2004 (in Russ.).
2. Shacter E., Beecham E. J., Covey J. M., et al. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis.* 1988. Vol. 9, issue 12. P. 2297–2304.
3. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 15, issue 8. P. 2335–2381. DOI: 10.1089/ars.2010.3534.
4. Kostyuk V. A. [Biotransformation and Bioavailability of Plant Polyphenolic Compounds]. *Proc. BSU. Ser.: Physiol., biochem. and mol. basis of funct. of biosyst.* 2016. Vol. 11, part 2. P. 47–55 (in Russ.).
5. Conde J., Doria G., Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. *J. Drug Deliv.* 2012. Article ID: 751075. DOI: 10.1155/2012/751075.
6. Jin Y., Kim I. Y., Kim I. D., et al. Biodegradable gelatin microspheres enhance the neuroprotective potency of osteopontin via quick and sustained release in the post-ischemic brain. *Acta Biomater.* 2014. Vol. 10, issue 7. P. 3126–3135. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.045.
7. Joachim E., Kim I. D., Jin Y., et al. Gelatin nanoparticles enhance the neuroprotective effects of intranasally administered osteopontin in rat ischemic stroke model. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2014. Vol. 4, issues 5–6. P. 395–399. DOI: 10.1007/s13346-014-0208-9.
8. Coester C. J., Langer K., Van Briesen H., et al. Gelatin nanoparticles by two-step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J. Microencapsul.* 2000. Vol. 17, issue 2. P. 187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.
9. Lu M. L., McCarron R. J., Jacobson B. S. Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 1992. Vol. 101. P. 873–883.
10. Agrez M. V., Bates R. C., Boyd A. W., et al. Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: implications for wound healing. *Cell Regul.* 1991. Vol. 2, issue 12. P. 1035–1044.

Статья поступила в редколлегию 10.01.2018.
Received by editorial board 10.01.2018.

УДК 57.033+57.054

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ РЕЧЕВОГО ДЫХАНИЯ И СЕРДЕЧНОГО РИТМА АРАБОГОВОРЯЩИХ СТУДЕНТОВ ПРИ ПОЛЬЗОВАНИИ РУССКИМ ЯЗЫКОМ

К. М. ЛЮЗИНА¹⁾, Н. АЛЬ-ТАВИЛ¹⁾, А. Г. ЧУМАК¹⁾

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

С помощью компьютерных методов исследования проведен анализ динамики изменений речевого дыхания и вариабельности сердечного ритма, который выявил закономерности активации автономной нервной системы у студентов с родным арабским языком при освоении университетского курса на русском языке. Обследованы шесть практически здоровых человек, граждан Ливии (четверо мужчин и две женщины), в возрасте от 23 до 32 лет. Установлено, что манифестация речевого дыхания у студентов, для которых родным языком является арабский, различается при разговоре на русском и арабском языках. Паттерны дыхания не соответствуют друг другу, хотя основные параметры внешнего дыхания отличаются в меньшей степени на фоне сохранения насыщения периферической крови кислородом на уровне нормы. Определено, что вариабельность сердечного ритма резко возрастает при чтении или произнесении фраз на русском языке, т. е. она гораздо больше, чем при разговоре на арабском языке. Проанализированные показатели вариабельности сердечного ритма свидетельствуют о напряжении механизмов вегетативного сопровождения речевой функции при изучении нового языка.

Ключевые слова: паттерны дыхания; вариабельность сердечного ритма; изучение иностранного языка.

BREATHING AND HEART RATE OF ARAB-SPEAKING STUDENTS USING THE RUSSIAN LANGUAGE

K. M. LIUZINA^a, N. AL-TAWIL^a, A. G. CHUMAK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: K. M. Liuzina (liuzina@bsu.by)

The analysis of the dynamics of changes in speech breathing and heart rate variability, conducted using computer-based methods of investigation, revealed the patterns of activation of the autonomic nervous system in students with native Arabic when mastering a university course in Russian. Six healthy people, citizens of Libya (4 men and 2 women), aged 23 to 32 years were examined. Only certified instruments available at the Department of Human and Animal Physiology: spirometer MAC-1, manufactured by Unitechprom (Belarus), Neurosoft-psychotest, multifunctional computer complex Neuron-Spectrum, manufactured by Neurosoft, Russia were used. The manifestation of speech breathing in

Образец цитирования:

Люзина К. М., Аль-Тавил Н., Чумак А. Г. Вариабельность речевого дыхания и сердечного ритма арабговорящих студентов при пользовании русским языком // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 20–30.

For citation:

Liuzina K. M., Al-Tawil N., Chumak A. G. Breathing and heart rate of Arab-speaking students using the Russian language. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 20–30 (in Russ.).

Авторы:

Ксения Михайловна Люзина – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Ноха Аль-Тавил – магистр биологических наук.

Анатолий Георгиевич Чумак – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Kseniya M. Liuzina, PhD (biology), docent; associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

liuzina@bsu.by

Noha Al-Tawil, master of biological sciences.

Anatoly G. Chumak, doctor of science (biology), full professor; head of the department of human and animal physiology, faculty of biology.

chumaka@bsu.by

students who have a native Arabic language is different when speaking in Russian and Arabic. The patterns of respiration do not correspond to each other, although the main parameters of external respiration differ to a lesser extent with preservation of saturation of peripheral blood of oxygen at normal level. The variability of the heart rhythm increases dramatically when reading or pronouncing phrases in Russian, then when speaking in Arabic. The analyzed parameters of heart rate variability confirm the tension of the mechanisms of vegetative accompaniment of the speech function when learning a new language for yourself.

Key words: patterns of breathing; heart rate variability; studying of foreign language.

Введение

Разговор как физиологическое явление включает зависимые от воли, но неосознаваемые компоненты – фонацию, артикуляцию и речевое дыхание. Столь комплексный аспект поведения организма человека не может не затрагивать [1] и более обширные реакции, не явные на первый взгляд. Фонация, артикуляция и речевое дыхание требуют соответствующего вегетативного сопровождения. Дыхание есть процесс, вовлекающий прежде всего висцеральные органы и системы. При этом активируются симпатические и парасимпатические механизмы для обеспечения соответствия кровотока и насыщения крови кислородом в легких. Это тем более присуще речевому дыханию, паттерн которого включает постоянный переход от «молчаливого» физиологического типа к «разговорному». Имеются публикации, в которых характеризуются этнические особенности влияния фонационной нагрузки на показатели частоты сердечных сокращений и дыхания [2]. Но эти работы опубликованы фрагментарно и не дают полной картины перестройки систем производства речи при изучении, например, иностранного языка. Распространенная в современной высшей школе академическая мобильность требует свободного владения языком обучения. Не всегда язык обучения и язык мышления у студентов близки. Примером этому может служить освоение бакалаврской или магистерской программы на русском или английском языке арабоязычными слушателями. Арабский язык по фонетике, графике письма и иным показателям коренным образом отличается от русского, на котором приходится обучаться и общаться студентам и аспирантам в БГУ. Следовательно, освоение русского языка как иностранного требует от обучаемых напряжения многих функциональных систем. Проблему интенсивного изучения русского языка как иностранного решали прежде всего лингвисты, поскольку в физиологии отсутствовали приборные средства для анализа систем реагирования организма на интенсивные ментальные нагрузки, такие как освоение предметов на иностранном – русском – языке. Современные нейрофизиологические аппаратно-программные комплексы позволяют приблизиться к пониманию тех перестроек в регуляции функций, которые происходят при разговоре на иностранном языке.

Актуальность темы настоящей работы определяется высокой потребностью в сведениях о путях адаптации иностранных студентов и аспирантов к учебному процессу и неизученностью конкретных вегетативных проявлений регуляции процессов жизнедеятельности при обучении арабоязычных студентов и аспирантов в русскоязычных вузах. Имеются работы, доказывающие трудность адаптации молодых людей с родным арабским языком к обучению на русском языке (например, из-за противоположности графики письма и только частичного совпадения гласных звуков речи). На начальном этапе учебы студенты магистратуры обладают недостаточными языковыми навыками, поэтому в данном случае их обучение можно рассматривать как своеобразный стресс, требующий напряжения функциональных систем организма.

Традиционно для исследования таких процессов применяют современные методы анализа вариабельности сердечного ритма, устойчивости механизмов контроля артериального давления, вегетативного обеспечения моторных навыков. Однако по конкретной теме исследования сведений в литературе крайне мало.

Данные публикаций, характеризующих применение метода спирометрии [3], свидетельствуют о том, что основные показатели внешнего дыхания у человека не являются неизменными и зависят от конкретных потребностей организма в данное время. Дыхательный объем постоянно используется при формировании речевого акта, но реально в фонацию вовлекается и резервный объем вдоха и выдоха, т. е. вся жизненная емкость легких.

Как указывается в руководствах [4], дыхание при речи, или так называемое речевое дыхание, по сравнению с обычным спокойным дыханием имеет существенные отличия, обусловленные особыми изменениями паттерна дыхания. Вибрация голосовых связок происходит в экспираторную фазу. Для слитного выговора целых смысловых фраз, своеобразных квантов речевой информации, используется удлиненный выдох. Вдох же, напротив, должен быть коротким. В соответствии с этим доля вдоха в обычной периодике дыхания короче выдоха в 5–8 раз. Наблюдается и брадипноэ. Вместо 16–20 дыхательных циклов за 1 мин во время разговора число дыхательных движений составляет 8–10 за 1 мин [5].

Изменения указанных показателей при разговоре одним и тем же субъектом на разных языках не проанализированы в литературе. Вместе с тем они могут характеризовать не только физиологические особенности дыхательной системы данного человека, но и его подготовленность к практическому использованию иностранного языка.

Цель настоящей работы – установить особенности внешнего дыхания и вариабельности сердечного ритма у арабговорящих студентов при использовании русского и арабского языков.

Методы исследований

Были обследованы шесть практически здоровых добровольцев, граждан Ливии, проживающих в Беларуси (четверо мужчин и две женщины), в возрасте от 23 до 32 лет, обучающихся в БГУ по программам магистерской подготовки. Обследование проводилось на кафедре физиологии человека и животных биологического факультета БГУ в дневное время, при комнатной температуре, с соблюдением инструкций и методических рекомендаций, имеющихся в документации к применявшимся приборным комплексам. Объем выборки привлеченных для анализа лиц соответствует принятому в литературе при изучении функций мозга у человека [6].

В работе использовались сертифицированные приборы, имеющиеся на кафедре физиологии человека и животных БГУ: спирометр МАС-1 («Унитехпром», Беларусь), Нейрософт-психотест («Нейрософт», Россия). В качестве адекватного функционального теста проводилась оценка состояния кардиореспираторной системы в покое (молчание с открытыми глазами), во время чтения арабского и русского текстов вслух и про себя. Добровольцы при тестах находились в пяти функциональных состояниях: молчание; чтение арабского текста вслух; чтение русского текста вслух; чтение арабского текста про себя; чтение русского текста про себя.

Во время записи показателей вариабельности сердечного ритма (ВСР) каждый этап занимал 5 мин. Регистрация показателей внешнего дыхания осуществлялась с помощью спирометра МАС-1. Во время регистрации сатурации крови кислородом (пульсоксиметрия) длительность этапов измерения составляла 1–2 мин. Количество проб – не менее 10 для каждого испытания и измерения. Программное обеспечение пульсоксиметра позволяет прибору выделять пульсовый объем крови (так называемый артериальный компонент).

Регистрацию электрокардиограммы (ЭКГ) для определения показателей ВСР осуществляли с использованием программы «НС-Психотест.NET», записывали активность сердца во втором стандартном отведении. Исследование проводили в первой половине дня (до 12 ч), в тишине, без наличия яркого освещения, не ранее чем через 1 ч после приема пищи. Испытуемым предварительно не предъявлялись физические или психоэмоциональные нагрузки. Запись ЭКГ проводили в положении полусидя. При анализе ВСР на коротком (5–10 мин) участке записи ритмограммы использовали следующие характеристики: частоту сердечных сокращений (ЧСС) (уд./мин); RRNN (мс); SDNN (мс); RMSSD (мс); pNN50 % [7–8]. Выявлены также показатели кардиоинтервалографии по Р. М. Баевскому [7]: индекс вегетативного равновесия (ИВР) – соотношение между активностью симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы (ВНС). При преобладании активности парасимпатической нервной системы (ПНС) ИВР уменьшается, при активации симпатической нервной системы (СНС) – увеличивается, вегетативный показатель ритма (ВПР) отражает вегетативный баланс с точки зрения оценки активности автономного контура регуляции. Чем меньше ВПР, тем выше эта активность и тем в большей мере вегетативный баланс смещен в сторону преобладания ПНС.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программного комплекса *Microsoft Excel*. Использован пакет статистических программ *StatPlus*. Результаты представлены как среднее значение плюс-минус стандартные отклонения. Для выявления достоверности различий между группами использовали *t*-критерий Стьюдента (различия считали достоверными при $p < 0,05$), критерий Манна – Уитни.

Результаты исследований и их обсуждение

Речевое дыхание при воспроизведении текстов на русском и арабском языках. На первом этапе исследований добровольцам предлагалось проговаривать идентичный по смыслу текст на русском и арабском языках при регистрации функций внешнего дыхания с помощью аппарата МАС-1.

Как и ожидалось, было обнаружено коренное отличие паттернов дыхания в указанных случаях. Установлено, что при чтении вслух показатели внешнего дыхания изменялись (рис. 1).

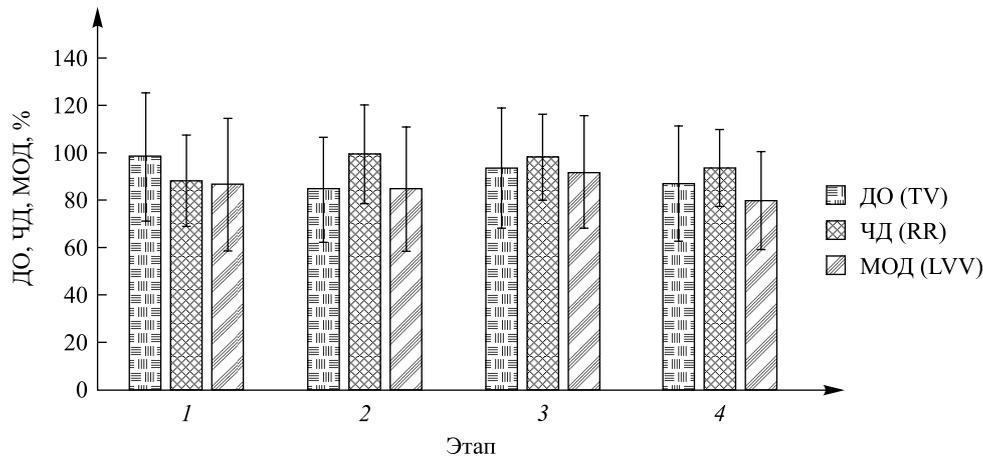


Рис. 1. Относительные изменения показателей внешнего дыхания во время чтения текстов по этапам: 1 – чтение арабского текста вслух; 2 – чтение русского текста вслух; 3 – чтение арабского текста про себя; 4 – чтение русского текста про себя. За 100 % для каждого испытуемого приняты показатели, зарегистрированные во время спокойного дыхания. ДО – дыхательный объем; ЧД – частота дыхания; МОД – минутный объем дыхания

Fig. 1. Relative changes in the parameters of external respiration while reading texts. On the abscissa – stages: 1 – reading the Arabic text out loud; 2 – reading the Russian text out loud; 3 – reading the Arabic text about yourself; 4 – reading the Russian text about yourself. For 100 % for each volunteer, the indicators recorded during quiet breathing were taken. TV – tidal volume; RR – respiratory rate; LVV – low voluntary ventilation

Если проанализировать полученные данные по внешнему дыханию при выполнении функциональных проб с чтением на разных языках, можно обнаружить, что при чтении вслух арабского и русского текстов, а также при чтении арабского текста про себя МОД как увеличивался, так и уменьшался у разных испытуемых. Чтение русского текста про себя приводило к снижению МОД во всех зарегистрированных случаях. Рост МОД при чтении вслух происходил по «неэкономному» пути – за счет роста ЧД и снижения ДО. У одного из испытуемых при чтении арабского текста вслух и у двух других при чтении арабского текста про себя МОД вырос за счет увеличения и ДО, и ЧД. В некоторых случаях при чтении русского текста и вслух, и про себя и арабского текста про себя происходило снижение МОД на фоне увеличения ЧД. Однако по показателю пульсоксиметрии сатурация периферической артериальной крови кислородом оставалась на уровне нормы. Данные свидетельствуют об отсутствии общих единообразных изменений функций внешнего дыхания у испытуемых на фоне индивидуальных резких модификаций разных показателей у каждого из них. Усредненные показатели приведены в табл. 1. Видно, что ДО ниже при чтении русского текста (и вслух, и про себя). Во время чтения на родном языке ЧД не отличается от ЧД при спокойном дыхании, однако при чтении на изучаемом языке ЧД снижается. Применение критерия Манна – Уитни позволило обнаружить, что при сравнении МОД при спокойном дыхании и чтении русского текста про себя различия в уровнях выборок существенны.

Таблица 1

Показатели внешнего дыхания у добровольцев

Table 1

Indices of external respiration in volunteers

Показатели внешнего дыхания	Функциональное состояние				
	Спокойное	Вслух арабский текст	Вслух русский текст	Про себя арабский текст	Про себя русский текст
ДО, л	0,63 ± 0,30	0,56 ± 0,16	0,47 ± 0,09	0,55 ± 0,21	0,49 ± 0,12
ЧД, 1/мин*	16,57 ± 4,58	14,25 ± 3,72	16,08 ± 3,55	16,58 ± 6,30	15,42 ± 4,46
МОД, л/мин	9,81 ± 3,66	7,52 ± 1,19	7,45 ± 1,58	8,19 ± 1,82	7,12 ± 1,51

*1/мин – одно дыхательное движение в минуту.

Обнаруженная вариативность показателей внешнего дыхания разных лиц при выполнении идентичного речевого задания потребовала поиска интегральной оценки для сопоставления реакции дыхательной системы на предъявленную задачу.

Существующие межсистемные взаимосвязи между сердечно-сосудистой и дыхательной системами математически принято рассчитывать с помощью коэффициента Хильдебрандта, определяемого как отношение числа сердечных сокращений к частоте дыхания. Обычно коэффициент, равный 2,8–4,9, свидетельствует о нормальных межсистемных соотношениях. Отклонение от этих показателей указывает на рассогласование в деятельности висцеральных систем [9]. В результате проведенных расчетов в наших обследованиях получилось, что в состоянии покоя, при молчании и речевом тестировании добровольцев коэффициент Хильдебрандта изменялся. У одного испытуемого указанный коэффициент при спокойном дыхании был ниже табличных значений и 83 % от нормы, указанной в [9], у остальных – выше, т. е. в среднем на уровне (132 ± 26) %. Для расчета статистических показателей по спокойному дыханию за 100 % приняли нормативное значение коэффициента Хильдебрандта. В функциональных пробах с чтением за 100 % приняли коэффициент Хильдебрандта, рассчитанный для каждого добровольца при спокойном дыхании.

Чтение вслух на любом из двух языков (т. е. реальная генерация речевого дыхания) приводило к неодинаковым по выраженности, но однотипным изменениям отношения частоты сердцебиений к частоте дыхания. Оно зависело прежде всего от специфики произнесения гласных звуков в используемых языках.

Коэффициент Хильдебрандта менялся и при чтении про себя, указывая на перестройку дыхания в случае фактического молчания. Механизмы генерации дыхательного и сердечного ритмов находились в напряжении, причем при пользовании родным языком индекс практически соответствовал спокойному дыханию, без разговорной нагрузки. Величины коэффициента Хильдебрандта при чтении вслух достоверно не различались. При чтении про себя на русском языке коэффициент Хильдебрандта существенно и достоверно повышался (от $4,18 \pm 0,67$ (в покое) до $5,51 \pm 0,69$, $p < 0,05$), не достигая, впрочем, уровня устной речи.

К сказанному следует добавить, что не только дыхательный объем, частота, но и паттерны дыхания у испытуемых различались при пользовании разными языками. Им было предложено вначале спокойно молча дышать, затем читать вслух на родном языке, после чего читать вслух по-русски.

Из бланка распечатанного стандартного протокола-отчета об обследовании видно (рис. 2, кривая «вентиляция»), что характер дыхания при чтении на двух языках студентом, недостаточно владеющим русским языком, вернее амплитуда и время вдоха и выдоха, был различным. Кривая «вентиляция» демонстрирует, что плавное и размеренное чередование вдохов и выдохов при чтении по-арабски сменяется «рваным» ритмом дыхания при чтении по-русски, т. е. видны остановки и задержки.

На фоне сохранения нормального насыщения периферической артериальной крови кислородом (кривая «пульсоксиметрия» – SpO_2 – составила 98 %, что соответствует норме) резко меняются частота сердечных сокращений и индекс наполнения пульса (ИНП), что может свидетельствовать об активации симпатической нервной системы.

В протоколах наблюдений всей серии анализов дыхания пяти других добровольцев при применении указанных тестов зафиксированы результаты, совпадающие с описанным выше.

Функциональный характер рассмотренных паттернов и возможность улучшения показателей внешнего дыхания по мере овладения языком обучения косвенно могут быть проиллюстрированы результатом тестирования студента, в совершенстве владеющего русским языком. На рис. 4 трудно отличить периоды чтения по-русски (этап 2) и по-арабски (этап 3) по показателям внешнего дыхания, поскольку отсутствует значительная вариативность частоты сердечных сокращений и частоты пульса. Рисунок речевого дыхания отличается от спокойного дыхания при молчании, но динамика дыхания при произнесении текста по-арабски и по-русски фактически совпадает.

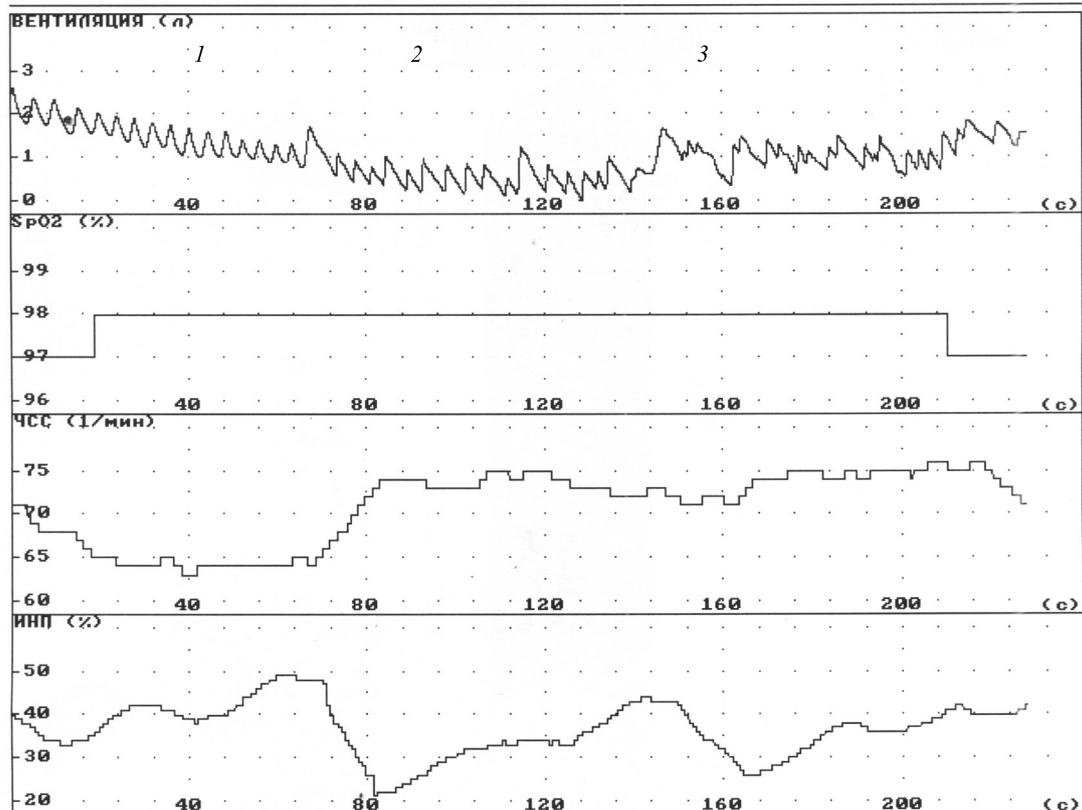
Таким образом, в результате исследования установлена манифестация разного паттерна дыхания и частоты сердечного ритма при чтении одинаковых по смыслу текстов на русском и арабском языках у студентов, еще только овладевающих русским языком как языком обучения. Более тонкие изменения вегетативной регуляции сердца выявлены при анализе вариативности сердечного ритма.

Особенности регуляции сердечного ритма у испытуемых при чтении на русском и арабском языках. К наиболее важным «маркерам» активности автономной нервной системы у человека относят вариативность межимпульсных интервалов при регистрации ЭКГ. Максимальный разброс R–R-интервалов, известный как дыхательная синусовая аритмия [10], свидетельствует о повышении тонуса блуждающих нервов. По выраженности высокочастотных колебаний сердечного ритма судят о вагусных механизмах регуляции. С симпатическим сегментарным и надсегментарным, а также гуморальным влиянием на деятельность сердца связаны более медленные низкочастотные R–R-интервалы. Их относят к недыхательной синусовой аритмии.

ПУЛЬСОКСИМЕТРИЯ: 26январь2017

"БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"
"МАС-1" зав.№ 11166 Дата поверки: 27май2015
Дата обследования пациента: 26январь2017, Начало: 14:23, Окончание: 14:27
А.Х.А. (М), 25лет, 171см, 59кг, ИМТ = 20, ИКЧ = 0

		Этап1 СПОКОЙНОЕ ДЫХАНИЕ	Этап2	32-31	Этап3	33-31
DO	л	0.59	0.63		0.47	
ЧД	1/мин	14	14		17	
МОД	л/мин	8.33	8.91		8.08	
SpO2ср	%	98	98	0	98	0
SpO2min	%	97	98		97	
SpO2max	%	98	98		98	
ЧССср	1/мин	65	72	+7	74	+9
ЧССmin	1/мин	63	64		71	
ЧССmax	1/мин	71	75		76	
ИНПср	%	40	33	-7	36	-4
ИНПmin	%	33	21		26	
ИНПmax	%	49	48		44	
Длительность	с	66	76		86	



Пульсоксиметрия: SpO2 в норме (SpO2=98%)

Рис. 2. Фотография бланка результатов: паттерны дыхания при чтении по-арабски и по-русски испытуемым N. Этапы: 1 – спокойное дыхание при молчании (фон); 2 – чтение вслух по-арабски; 3 – чтение вслух по-русски. Равномерный «рисунок» характерен для арабского, вариативный – для русского прочтения

Fig. 2. Photo of the results form: patterns of breathing when reading in Arabic and in Russian subjects N. Stages: 1 – calm breathing with silence (background); 2 – reading aloud in Arabic; 3 – reading aloud in Russian. Uniform «drawing» for Arabic, variative – for Russian reading

В рассматриваемом случае у испытуемых при речевой нагрузке обнаружены значительные изменения R–R-интервалов и их распределение в зависимости от их длительности.

Если принять размах вариальности сердечного ритма (RMSSD) в состоянии покоя за 100 %, а затем определить воздействие на сердечный ритм разговорной нагрузки, то при чтении арабского текста вслух показатель RMSSD увеличился до $(122 \pm 9) \%$, при чтении русского текста вслух возрастал до $(117 \pm 18) \%$, при чтении про себя арабского текста в большинстве случаев снижался до $(85 \pm 7) \%$,

во время чтения русского текста про себя в половине случаев повышался до $(127 \pm 33) \%$, что совпадает с описанными выше изменениями коэффициента Хильдебрандта.

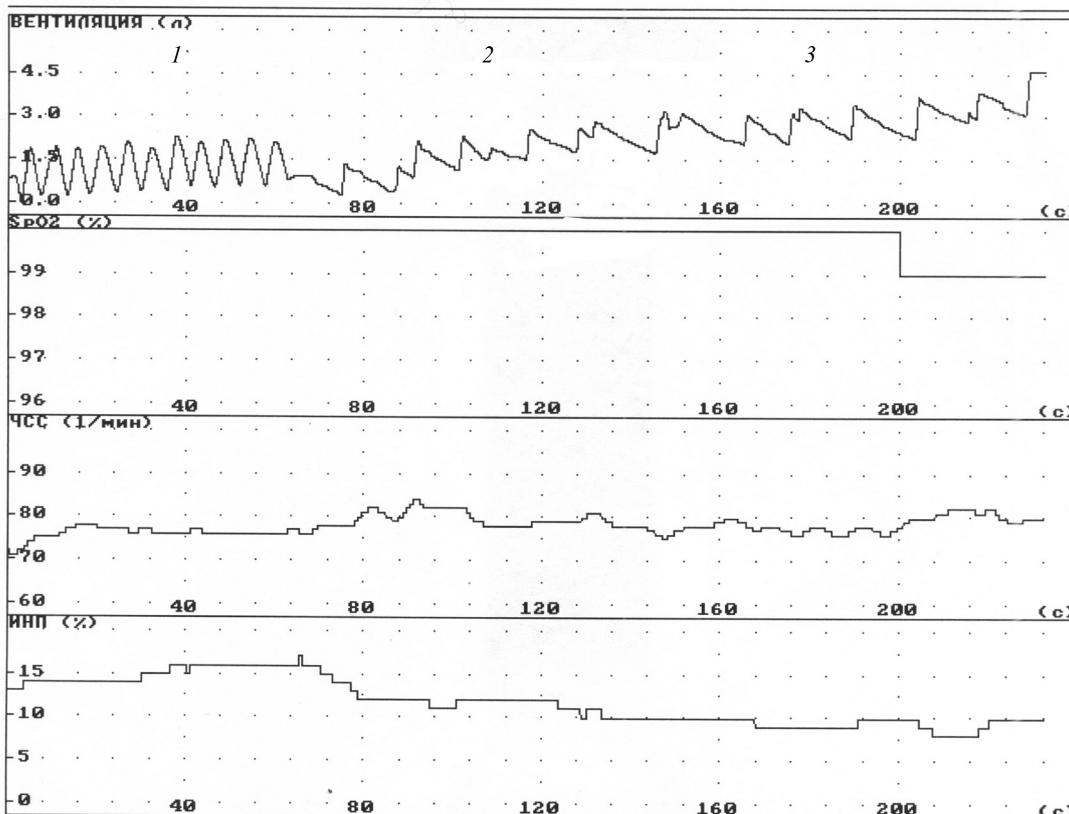
Наконец, в работе был рассчитан стресс-индекс (рис. 4, табл. 2) при предъявлении разговорных тестов. В соответствии с принятыми методическими условиями стресс-индекс отражает влияние центрального контура регуляции на работу сердца. Его повышение может свидетельствовать об увеличении тонуса симпатической нервной системы [11], что наблюдается в половине случаев чтения русского текста про себя.

Величина, на которую различаются кардиоинтервалы, называется вариационным размахом. Если по оси абсцисс отложить длительности кардиоинтервалов, а по оси ординат – количество повторений

ПУЛЬСОКСИМЕТРИЯ: 30январь2017

"БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"
 "МАС-1" зав.№ 11166 Дата поверки: 27май2015
 Дата обследования пациента: 30январь2017, Начало: 10:58, Окончание: 11:01
 Я.М.А. (М), 23года, 165см, 60кг, ИМТ = 22, ИКЧ = 0

		Этап1 СПОКОЙНОЕ ДЫХАНИЕ	Этап2	Этап3	Этап2-Этап1	Этап3-Этап1
ДО	л	1.50	0.45	0.46		
Чд	1/мин	11	13	10		
МОД	л/мин	17.17	5.68	4.66		
SpO2ср	%	100	100	100	0	0
SpO2min	%	100	100	99		
SpO2max	%	100	100	100		
ЧССср	1/мин	76	79	79	+3	+3
ЧССmin	1/мин	71	75	76		
ЧССmax	1/мин	78	84	82		
ИНПср	%	15	12	9	-3	-6
ИНПmin	%	13	10	8		
ИНПmax	%	16	17	10		
Длительность	с	65	83	83		



Пульсоксиметрия: SpO2 в норме (SpO2=100%)

Рис. 3. Фотография бланка результатов: паттерны дыхания при чтении по-арабски и по-русски испытуемым М. Этапы: 1 – спокойное дыхание (фон); 2 – чтение вслух по-арабски; 3 – чтение вслух по-русски

Fig. 3. Photo of the results form: patterns of breathing when reading in Arabic and in Russian subjects M. Stages: 1 – calm breathing (background); 2 – reading aloud in Arabic; 3 – reading aloud in Russian

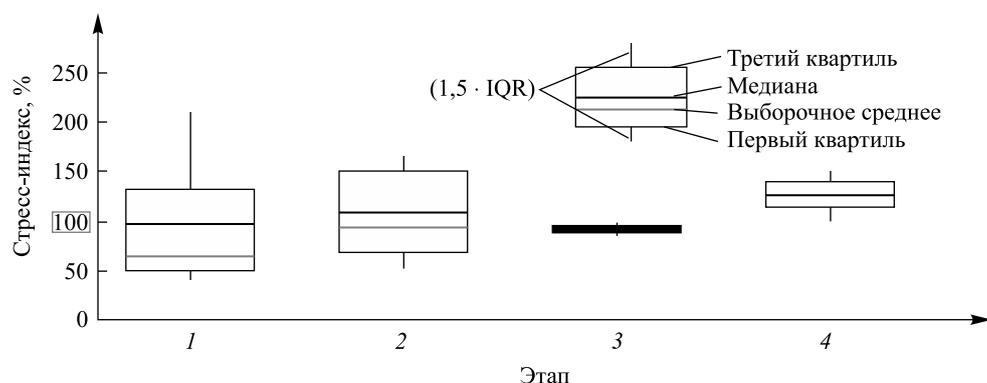


Рис. 4. Изменения стресс-индекса при чтении по-арабски и по-русски.

Этапы: 1 – чтение вслух по-арабски; 2 – чтение вслух по-русски;

3 – чтение про себя по-арабски; 4 – чтение про себя по-русски;

100 % – значение стресс-индекса в состоянии покоя; IQR – межквартильный диапазон

Fig. 4. Changes in the stress index when reading in Arabic and Russian.

Stages: 1 – reading aloud in Arabic; 2 – reading aloud in Russian;

3 – reading about yourself in Arabic; 4 – reading about yourself in Russian;

100 % is the value of the stress index at rest; IQR is the interquartile range

кардиоинтервала с этой длительностью (предварительно округлив длительности кардиоинтервалов до 50 Мс), получим график, который называется гистограммой. Основание гистограммы будет отражать вариационный размах, проекция вершины гистограммы на основание – моду (наиболее часто встречающуюся длительность кардиоинтервала), а вершина гистограммы – амплитуду моды. Диагностически значимы все эти показатели, и они учтены в стресс-индексе (индексе напряжения), который показывает степень вовлеченности организма в стресс. Индекс напряжения был введен Р. М. Баевским и вычисляется по формуле

$$\text{Ин} = \text{АМo} / (2 \cdot \text{Мо} \cdot \text{МхDMn}),$$

где АМo – амплитуда моды, %; Мо – мода, с; МхDMn – вариационный размах, мс.

Таблица 2

Изменения стресс-индекса

Table 2

Changes in the stress index

Испытуемый	Функциональное состояние (покой или чтение)				
	Молчание, %	Вслух арабский текст, %	Вслух русский текст, %	Про себя арабский текст, %	Про себя русский текст, %
Владеет русским	100	59 ± 18	71 ± 21	86 ± 13	81 ± 15
Недостаточно хорошо говорит по-русски	100	47 ± 20	108 ± 6	74 ± 19	137 ± 9

Динамика изменения ИВР и ВПР представлена на рис. 5. Эти показатели отражают активность отделов автономной нервной системы.

Таким образом, интервалометрия и компьютерный анализ рассеяния показателей вариации сердечного ритма позволили определить, что чтение на родном, арабском языке и русском как языке обучения вызывает разные паттерны активации симпатической и парасимпатической нервной системы. Чтение на русском языке представляет собой задачу, требующую напряжения вегетативных механизмов регуляции сердечного ритма, и, следовательно, указывает на необходимость перестройки кровообращения.

Фактическое совпадение результатов измерения состояния паттернов дыхания и вариации кардиоинтервалов при чтении на двух языках может дополнительно свидетельствовать о том, что оба процесса у активно обучающегося человека регулируются из общего центра.

В генерацию речи вовлечены многие структуры центральной нервной системы, а не только классическая область П. Брока. В современных источниках довольно подробно охарактеризованы центральные механизмы формирования речевого дыхания. Так, в [12] указано, что вокализации генерируются

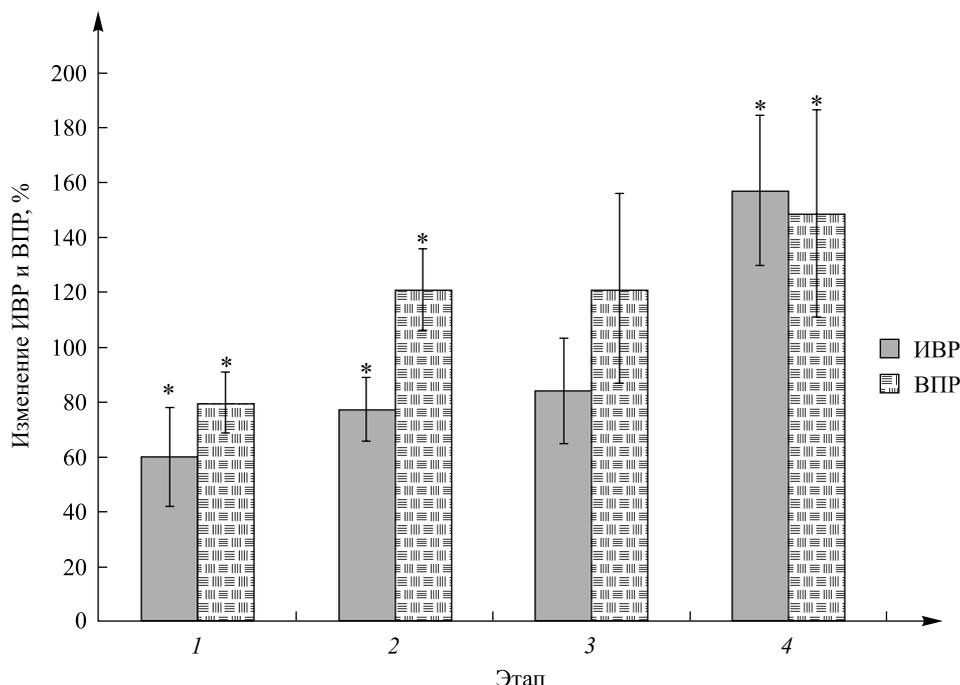


Рис. 5. Динамика изменения ИВР и ВІР. Этапы: 1 – чтение вслух арабского текста; 2 – чтение вслух русского текста; 3 – чтение про себя арабского текста; 4 – чтение про себя русского текста. * Результаты статистически значимы, $p < 0,05$

Fig. 5. Dynamics of changes in the index of vegetative equilibrium and the vegetative index of rhythm. Stages: 1 – reading the text aloud Arabic; 2 – reading the text aloud Russian; 3 – reading the text about himself Arabic; 4 – reading the text about himself Russian. * The results are statistically significant, $p < 0.05$

эмоциональной двигательной системой, в которой центральная роль принадлежит околотоводопроводному серому веществу, связанному с поясной извилиной, островковой корой и орбитофронтальной областью коры. В свою очередь, околотоводопроводное серое вещество имеет обширные связи с каудальнее расположенными медуллярными ядрами, среди которых упоминаются *N. ambiguus* и соседствующее с ним *N. retroambiguus* и совокупность ядер, известная как комплекс Bötzingер, задающий ритмику вдоха и выдоха. Это общий выход дыхательной и вокализационной систем к мотонейронам, участвующим в контроле артикуляционных и дыхательных мышц, т. е. к группам клеток, иннервирующих мягкое нёбо, глотку и гортань, а также диафрагму, межреберные, брюшные и тазовые мышцы. Вместе они определяют внутрибрюшное, внутригрудное и субглоточное давление, контроль над которым необходим для генерирования звуков. У людей этот комплекс ядер контролируется моторной корой, которая имеет прямой доступ к мотонейронам, иннервирующим мышцы лица, рта, языка, гортани и глотки [5]. Наряду с указанным эти нейроны являются кардиоингибирующими. Отрицательные кардиотропные эффекты направлены на регуляцию ЧСС при быстрых изменениях кровяного давления. В сочетании с реципрокными эффектами симпатической нервной системы эти нейроны обуславливают кардиогенный вагусный тонус. В составе рассматриваемого ядра обнаружены и клетки, направляющие бронхоконстрикторные волокна в бронхолегочную систему, которая может вызывать рефлекторное снижение легочного бронхиального потока воздуха. Таким образом, современное понимание механизмов ритмогенеза и генеза паттернов дыхания анатомически ассоциировано со стволовыми структурами мозга, как это описывали и в классических руководствах [13]. Физиологическая значимость этой системы плохо изучена, но в литературе имеются указания на ее значительный вклад в формирование речевого дыхания.

В последние годы обобщены сведения о том, что ментальные усилия сопровождаются откликом в регуляции сердечного и дыхательного ритмов [14]. Указывается, что обучение языку, выполнение домашней работы школьниками или решение другой когнитивной задачи могут повлиять на дыхание. Однако сведений об этих изменениях дыхания недостаточно. Постулировано, что дыхание заметно меняется при высокой степени умственной нагрузки, благоприятствуя оксигенации крови. Для оценки действия умственной нагрузки на дыхание исследователи обычно применяют когнитивные задачи [15]. Они включают в себя несколько аспектов когнитивной обработки, таких как восприятие, контролируемое внимание, рассуждение, память, решение проблем, принятие решений и тормозной контроль, а также контроль речевой

и двигательной активности, поскольку необходимо представление отчета. В литературе отмечено, что существующие обзоры физиологических данных о когнитивной нагрузке и дыхании в основном посвящены реакциям сердечно-сосудистой системы, кожно-гальванической реакции, но сравнительно меньше исследовались вариации дыхания при умственной деятельности, такой как речь. Дыхание – самый большой «водитель ритма» в организме, который участвует в регулировании процессов гомеостаза [14]. Поэтому все процессы дыхания контролируются автономной нервной системой.

Меньше внимания уделено в литературе вопросам, относящимся к характеристике вегетативных процессов организма при решении ментальных задач, таких как формирование и распознавание речи. Еще меньше внимания уделено этим процессам у студентов при изучении иностранных языков или пользовании иностранными языками при освоении программы обучения в университетах. К сожалению, использование иностранного языка для обучения часто происходит параллельно с его изучением, что формирует у участников образовательного процесса устойчивое «стрессующее» состояние, вовлекающее в организацию ментальных, когнитивных процессов ВНС. Это участие ВНС осуществляется в соответствии с принципами, которые еще в 1960-х гг. обосновал классик советской физиологии И. А. Булыгин. Среди них есть представление о том, что всякая interoцептивная реакция организма обязательно включает вегетативный и анимальный компоненты, а структура рефлекса, в том числе экстероцептивного, также включает вегетативный компонент, что очень хорошо теоретически согласуется с теми изменениями, которые могут встречаться при освоении предметов биологического или иного естественно-научного профиля на до конца не освоенном иностранном (в нашем случае – русском) языке.

Заключение

Манифестация речевого дыхания у студентов, у которых родным языком является арабский, отличается при разговоре на русском и арабском языках. Паттерны дыхания не соответствуют друг другу, хотя основные параметры внешнего дыхания отличаются в меньшей степени на фоне сохранения насыщения периферической крови кислородом на уровне нормы.

Вариабельность сердечного ритма возрастает при чтении или произнесении фраз на русском языке в большей степени, чем при разговоре на арабском языке. Проанализированные показатели вариабельности сердечного ритма свидетельствуют о напряжении механизмов вегетативного сопровождения речевой функции при изучении и практическом использовании нового для себя языка.

Библиографические ссылки

1. Булыгин И. А. Аfferентное звено interoцептивных рефлексов. Минск : Наука и техника, 1971.
2. Агаджанян Н. А., Смирнова А. И. Этнические особенности влияния фонационной нагрузки на показатели функционирования кардиореспираторной системы // Экология человека. 2004. № 5. С. 11–15.
3. Бреслав И. С. Физиология дыхания. СПб. : Питер, 2014.
4. Бреслав И. С. Паттерны дыхания. СПб. : Питер, 2014.
5. Нейман Л. В., Богомилский М. Р. Анатомия, физиология и патология органов слуха и речи. М. : ВЛАДОС, 2001.
6. Heck Detlef H., McAfee Samuel S., Liu Yu, et al. Breathing as a Fundamental Rhythm of Brain Function // Front. Neural Circuits. 2016. Vol. 10. PMID: PMC5226946. DOI: 10.3389/fncir.2016.00115.
7. Бань А. С., Загородный Г. М. Возможные ошибки при проведении анализа вариабельности ритма сердца // Пробл. здоровья и экологии. 2010. № 3 (25). С. 119–123.
8. Алиева А. М., Копелев А. М., Касатова Т. Б. Оценка вариабельности сердечного ритма при артериальной гипертензии // Леч. дело. 2004. № 1. С. 53–55.
9. Вейн А. М. Вегетативные расстройства: Клиника, лечение, диагностика / под ред. А. М. Вейна. М. : Мед. информ. а-во, 2000.
10. Porges W. The Polyvagal Perspective // Biol. Psychol. 2007. Vol. 74, issue 2. P. 116–143.
11. Бабунц И. В., Мараджанян Э. М., Машаех Ю. А. Азбука анализа вариабельности сердечного ритма. Ставрополь : Принт-мастер, 2011.
12. Holstege G., Subramanian H. Two different motor systems are needed to generate human speech // J. Comp. Neurol. 2016. Vol. 524, issue 8. P. 1558–1577. DOI: 10.1002/cne.23898.
13. Кульчицкий В. А. Функции вентральных отделов продолговатого мозга. Минск : Наука и техника, 1993.
14. Grassmann M., Vlemingx E., von Leupoldt A., et al. Respiratory Changes in Response to Cognitive Load: A Systematic Review // Neural Plast. 2016. Vol. 2016. Article ID: 8146809. DOI: 10.1155/2016/8146809.
15. Baars B. J., Gage N. Cognition, brain, and consciousness: introduction to cognitive neuroscience. 2nd ed. Burlington : Elsevier Ltd., 2010.

References

1. Bulygin I. A. [Afferent link of interoceptive reflexes]. Minsk : Science and Technology, 1971 (in Russ.).
2. Agadzhanyan N. A., Smirnova A. I. Ethnic features of fonation load impact on functioning indices of the cardio vascular system. *Ekologiya chelov.* 2004. No. 5. P. 11–15 (in Russ.).
3. Breslav I. S. [The physiology of breathing]. Saint Petersburg : Piter, 2014 (in Russ.).

4. Breslav I. S. [Patterns of respiration]. Saint Petersburg : Piter, 2014 (in Russ.).
5. Neiman L. V., Bogomilsky M. R. [Anatomy, physiology and pathology of the organs of hearing and speech]. Moscow : VLA-DOS, 2001 (in Russ.).
6. Heck Detlef H., McAfee Samuel S., Liu Yu, et al. Breathing as a Fundamental Rhythm of Brain Function. *Front. Neural Circuits*. 2016. Vol. 10. PMID: PMC5226946. DOI: 10.3389/fncir.2016.00115.
7. Ban A. S., Zagorodny G. M. Possible mistakes in the analysis of heart rate variability. *Probl. health ecology*. 2010. No. 3 (25). P. 119–123 (in Russ.).
8. Alieva A. M., Kopelev A. M., Kasatova T. B. [Assessment of heart rate variability in hypertension]. *Lechebnoe delo*. 2004. No. 1. P. 53–55 (in Russ.).
9. Wayne A. M. [Vegetative disorders: Clinic, treatment, diagnosis]. Moscow : Med. News Agency, 2000 (in Russ.).
10. Porges W. The Polyvagal Perspective. *Biol. Psychol.* 2007. Vol. 74, issue 2. P. 116–143.
11. Babunts I. V., Marajanyan E. M., Mashaheh Yu. A. [Azbuka analysis of heart rate variability]. Stavropol : Printmaster, 2011 (in Russ.).
12. Holstege G., Subramanian H. Two different motor systems are needed to generate human speech. *J. Comp. Neurol.* 2016. Vol. 524, issue 8. P. 1558–1577. DOI: 10.1002/cne.23898.
13. Kulchitsky V. A. [Functions of the ventral divisions of the medulla oblongata]. Minsk : Nauka i tekhnika, 1993 (in Russ.).
14. Grassmann M., Vlemingx E., von Leupoldt A., et al. Respiratory Changes in Response to Cognitive Load: A Systematic Review. *Neural Plast.* 2016. Vol. 2016. Article ID: 8146809. DOI: 10.1155/2016/8146809.
15. Baars B. J., Gage N. Cognition, brain, and consciousness: introduction to cognitive neuroscience. 2nd ed. Burlington : Elsevier Ltd., 2010.

Статья поступила в редколлегию 24.01.2018.
Received by editorial board 24.01.2018.

УДК 591.041

ВРЕМЕННЫЕ И АМПЛИТУДНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

А. В. СИДОРОВ¹⁾

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

При помощи микроэлектродной техники проанализированы параметры спонтанных потенциалов действия идентифицированных дофаминсодержащих (R.Pe.D.1) и серотонинсодержащих (L.Pe.D.1) нейронов при действии пероксида водорода. Установлено, что нанесение H₂O₂ в концентрации 1 ммоль/л на поверхность препарата изолированной центральной нервной системы (ЦНС) не приводит к статистически достоверным изменениям временных и амплитудных характеристик спайка в обоих исследованных нейронах. Повышение действующей концентрации H₂O₂ (100 ммоль/л) вызывает увеличение длительности фаз де- и реполяризации потенциала действия, уменьшение амплитуды спайка, следовой гиперполяризации и порога для R.Pe.D.1. Для L.Pe.D.1 схожие по направленности изменения установлены лишь в отношении длительности фазы деполяризации, а также амплитуд спайка и порога. Предполагается, что отмеченные особенности электрических свойств мембраны являются следствием различной чувствительности Na⁺- и K⁺-проводимости к действию активных форм кислорода, что обуславливает функциональную специфичность идентифицированных нейронов ЦНС *Lymnaea stagnalis* и отличия в реакциях клеток разных нейронных сетей при нарушении редокс-равновесия в нервной ткани.

Ключевые слова: потенциал покоя; спайк; активные формы кислорода; моллюск.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственных программ научных исследований «Конвергенция» (задание 3.3.03.4) и «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» (задание 1.08).

TIME-COURSE AND AMPLITUDE CHARACTERISTICS OF ACTION POTENTIALS OF IDENTIFIED *LYMNAEA STAGNALIS* NEURONS UNDER THE HYDROGEN PEROXIDE IMPACT

A. V. SIDOROV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Microelectrode technique was used to determine the parameters of spontaneous spikes of two identified dopamine-containing (R.Pe.D.1) and serotonin-containing (L.Pe.D.1) neurons under the action of hydrogen peroxide. H₂O₂ (1 mmol/l) bath application on the surface of isolated CNS did not result in significant changes of time-course and amplitude characteristics of the neurons under study. Strengthening of H₂O₂ concentration (100 mmol/l) evoked the increase of action potential duration (de- and repolarization phases both) and decrease of spike, undershoot and threshold amplitudes in R.Pe.D.1.

Образец цитирования:

Сидоров А. В. Временные и амплитудные характеристики потенциала действия идентифицированных нейронов *Lymnaea stagnalis* при действии пероксида водорода // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 31–37.

For citation:

Sidorov A. V. Time-course and amplitude characteristics of action potentials of identified *Lymnaea stagnalis* neurons under the hydrogen peroxide impact. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 31–37 (in Russ.).

Автор:

Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, доцент; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Author:

Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), docent; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
sidorov@bsu.by

For L.Pe.D.1, the same trend was observing only for depolarisation phase duration, spike and threshold amplitudes. It is assume that peculiarities of electrical properties of membranes are due to the differences in the sensitivity of Na^+ - and K^+ -conductivity to reactive oxygen species. That state could underlie functional specificity of identified neurons within CNS of *Lymnaea stagnalis* and the diversity of neuronal response to the nervous tissue redox disbalance.

Key words: rest potential; spike; reactive oxygen species; mollusc.

Acknowledgements. This work supported by State Programs for Scientific Research «Convergence» (task 3.3.03.4) and «Fundamental and applied sciences for medicine» (task 1.08).

Введение

Активные формы кислорода (АФК) все шире рассматриваются в качестве одного из основных участников процессов внутриклеточной сигнализации и межклеточной коммуникации [1]. С учетом своих свободнорадикальных свойств, предполагающих неспецифический характер взаимодействия с молекулярными мишенями, они в полной мере способны играть роль медиаторов объемной передачи сигнала, обеспечивая единовременное воздействие на множество нейронов, сосредоточенных в определенном участке мозга [2]. По некоторым оценкам, в ряде участков центральной нервной системы (ЦНС) концентрация пероксида водорода (H_2O_2) как главного модулятора синаптической передачи среди всего семейства АФК может достигать 1 ммоль/л [3]. Очевидно, что это порождает вопросы, связанные с формированием устойчивости клеток нервной ткани в условиях действия АФК. Неизменность электрических свойств мембраны нейронов является наиболее значимой с точки зрения сохранения их функциональной специфичности. При этом ключевое значение приобретает устойчивость белков ионных каналов плазмалеммы, определяющих генерацию потенциала действия (спайка) – элементарного события, лежащего в основе передачи сигнала в нервной системе.

В составе ЦНС моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) крупные идентифицированные нейроны правого и левого pedalных ганглиев – R.Pe.D.1 (дофаминергический) и L.Pe.D.1 (серотонинергический) соответственно [4; 5] – широко используются для изучения различных нейронных механизмов [6]. Эти полифункциональные вставочные нейроны интегрированы в структуру центральных генераторов дыхательного (R.Pe.D.1) и локомоторного (L.Pe.D.1) ритмов [7; 8]. Ранее было отмечено, что пероксид водорода в неравной степени модифицирует электрические характеристики (частота генерации потенциала действия, уровень мембранного потенциала) отмеченных клеток [9]: L.Pe.D.1 проявляет бóльшую устойчивость к действию H_2O_2 , нежели R.Pe.D.1. В то же время вопрос о сохранности показателей спайка в этих условиях и в зависимости от функциональной принадлежности клеток остался открытым, что и предопределило проведение настоящего исследования.

Материалы и методы исследования

Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в осенний период года. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 0,5 л воды) при температуре 20 ± 1 °С. Воду меняли каждые три дня. Пищей служили листья салата и одуванчика (питание *ad libitum*). Использовали животных, имеющих одинаковые размеры (длина раковины составляла от 4,0 до 4,5 см) и массу (от 5 до 6 г).

Электрофизиологические исследования. Эксперименты были выполнены на препаратах изолированной ЦНС ($n = 9$). Нейроны R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 идентифицировали по размеру и расположению в пределах ЦНС. Для размягчения периневральной оболочки и облегченного проникновения микроэлектродов в нейроны препараты предварительно обрабатывали раствором проназы (Protease E, type XIV, Sigma, США) в концентрации 1 мг/мл, приготовленным на нормальном физиологическом растворе для *Lymnaea stagnalis* в течение 5 мин при температуре 20 °С. Электрическую активность нейронов регистрировали после промывки обработанного препарата свежим физиологическим раствором в течение 30 мин. Для перфузии (0,1 мл/мин) препаратов ЦНС использовали нормальный физиологический раствор (концентрация указана в миллимолях): NaCl – 44,0; KCl – 1,7; CaCl_2 – 4,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1,5; NEPES – 10,0; pH $7,5 \pm 0,03$. Внутриклеточную регистрацию электрических параметров нейронов осуществляли с помощью Ag/AgCl-электродов и микроэлектродного усилителя МС-01М («Линтех», Беларусь). Микропипетки заполняли раствором KCl в концентрации 2,5 моль/л (сопротивление микроэлектрода составляло 10–20 МОм). В качестве индифферентного электрода использовали хлорированную серебряную проволоку.

Для каждого препарата (нейрона) временные и амплитудные характеристики спонтанных потенциалов действия (спайков) определяли для трех произвольно выбранных спайков из 30-секундного участка нейрограммы (шаг квантования – 0,5 мс), сделанной до и через 5 мин после добавления пероксида водорода соответствующей концентрации. При помощи специальных возможностей программы электронного осциллографа InputWin [10] оценивали параметры потенциала действия: амплитуды спайка, следовой гиперполяризации и порога, длительности фаз де- и реполяризации (ДП и РП), следовой гиперполяризации (СГ).

Пероксид водорода («Изотрон», Беларусь) наносили на поверхность центрального кольца ганглиев последовательно в конечной концентрации 1 и 100 ммоль/л соответственно. Моменты аппликации были разделены не менее чем 10-минутным промежутком, достаточным для фиксации исследуемых показателей. При этом перфузию препарата временно прекращали. Контроль концентрации пероксида водорода в омывающем препарат растворе осуществляли спектрофотометрически ($\lambda = 240$ нм, коэффициент молярной экстинкции – $43,6$ (моль/л) $^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

Статистика. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [11]. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали при помощи *W*-теста Шапиро – Уилка. Поскольку нормальность распределения показателей не была подтверждена для всех без исключения экспериментальных серий, использовали непараметрические методы оценки. При сравнении нескольких зависимых групп применяли *F*-критерий Фридмана (*Friedman ANOVA*, аналог дисперсионного анализа для повторных измерений), при сравнении двух зависимых групп – критерий знаков (*Sigh test*, аналог *t*-критерия Стьюдента). Данные представлены в виде медианы (25-й и 75-й процентиля). Число наблюдений (*n*) приводится для каждого показателя и типа нейрона отдельно. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости $P \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что пероксид водорода в концентрации 1 ммоль/л не вызывает статистически значимых сдвигов ни одного из исследованных показателей потенциала действия нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 (табл. 1 и 2). Однако увеличение его действующей концентрации до 100 ммоль/л приводит к выраженным эффектам в отношении как временных, так и амплитудных характеристик исследованных нейронов.

В частности, для R.Pe.D.1 (см. табл. 1, рис. 1) отмечено 2-кратное возрастание по сравнению с контрольными условиями длительности фазы ДП ($z = 2,02$; $P = 0,0433$) и совсем незначительное (в 1,1 раза) увеличение фазы РП ($z = 2,41$; $P = 0,0159$), протекающее на фоне неизменной длительности следовой гиперполяризации. Амплитудные характеристики спайка указанного нейрона претерпевали статистически достоверное уменьшение по сравнению как с контролем, так и со значениями, полученными для условий действия пероксида водорода в концентрации 1 ммоль/л (см. табл. 2, рис. 1). Для общей амплитуды спайка снижение соответственно составило 1,6 и 1,7 раза ($z = 2,02$; $P = 0,0433$ и $z = 2,67$; $P = 0,0077$), для амплитуды СГ – 1,5 и 1,6 раза ($z = 3,17$; $P = 0,0015$ и $z = 2,67$; $P = 0,0077$), для амплитуды порога – 2,0 и 1,7 раза ($z = 2,02$; $P = 0,0433$ и $z = 2,67$; $P = 0,0077$).

Для L.Pe.D.1 (см. табл. 1, рис. 2) статистически значимые изменения длительности отмечены по отношению к фазе ДП: 2-кратное увеличение по сравнению с контролем ($z = 2,04$; $P = 0,041$) и 1,5-кратное по сравнению с действием 1 ммоль/л раствора пероксида водорода ($z = 2,04$; $P = 0,041$). Согласно данным дисперсионного анализа (см. табл. 1) справедливо говорить лишь о тенденции к возрастанию протяженности фазы РП, а также о неизменной длительности фазы СГ по мере увеличения действующей концентрации H_2O_2 . В отношении показателей амплитуды спайка L.Pe.D.1 отмеченные изменения были сходны с таковыми для R.Pe.D.1 (см. табл. 2, рис. 2). Речь, в частности, идет о снижении общей амплитуды спайка на величину около 5–10 мВ по сравнению с контролем ($z = 2,20$; $P = 0,0277$) и действием 1 ммоль/л раствора пероксида водорода ($z = 2,04$; $P = 0,0412$). Отмечено снижение амплитуды порога в 1,6 раза по сравнению с контролем ($z = 2,04$; $P = 0,0412$), а также статистически достоверная неизменность амплитуды СГ. Оговоримся, что в последнем случае попарное сравнение данных показывает статистически значимые отличия ($z = 2,04$; $P = 0,0412$) для двух экспериментальных групп (1 и 100 ммоль/л).

Согласно классическим представлениям формирование потенциала действия обеспечивается двумя основными механизмами, связанными с изменением ионной проницаемости мембраны нейрона [12; 13]. Фаза деполяризации реализуется за счет увеличения натриевой проводимости, а фазы реполяризации и следовой гиперполяризации – за счет калиевой проводимости. Предварительно заметим, что различия электрических свойств R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1, в том числе показателей спайка, были проанализированы ранее [14] и не являются предметом обсуждения в настоящей работе.

Таблица 1

Временные характеристики потенциалов действия нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 при действии пероксида водорода

Table 1

Time-course of action potentials of R.Pe.D.1 and L.Pe.D.1 neurons under the hydrogen peroxide impact

Исследованный нейрон и экспериментальная серия	Длительность фаз потенциала действия, мс		
	Деполаризация	Реполаризация	Следовая гиперполяризация
Нейрон R.Pe.D.1			
Контроль ($n = 15$)	6,5 (6; 8)	9,0 (7,5; 9,5)	141 (125; 156)
H ₂ O ₂ , 1 ммоль/л ($n = 12$)	8,0 (6; 9)	9,0 (8; 20)	128 (110; 142)
H ₂ O ₂ , 100 ммоль/л ($n = 12$)	13,5 (9; 20)*	10,0 (9,5; 23,0)*	163 (101; 200)
Статистика (Friedman ANOVA)	$\chi^2 = 6,08$ $P < 0,0484$	$\chi^2 = 5,89$ $P < 0,0527$	$\chi^2 = 0,40$ $P < 0,8187$
Нейрон L.Pe.D.1			
Контроль ($n = 9$)	11 (9,5; 13,5)	28,5 (27,5; 32)	143 (126; 153)
H ₂ O ₂ , 1 ммоль/л ($n = 9$)	14,5 (10,5; 35,5)	26,5 (25,5; 40)	189 (176; 330)
H ₂ O ₂ , 100 ммоль/л ($n = 6$)	23 (13,5; 30)*, #	33,5 (25; 43)	168 (126; 215)
Статистика (Friedman ANOVA)	$\chi^2 = 10,18$ $P < 0,0062$	$\chi^2 = 5,48$ $P < 0,0646$	$\chi^2 = 0,33$ $P < 0,8465$

Примечание. Здесь и в табл. 2: * – различия достоверны по сравнению с контролем ($P < 0,05$); # – различия достоверны по сравнению с действием H₂O₂ в концентрации 1 ммоль/л ($P < 0,05$).

Таблица 2

Амплитудные характеристики потенциалов действия нейронов R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 при действии пероксида водорода

Table 2

Amplitude characteristics of action potentials of R.Pe.D.1 and L.Pe.D.1 neurons under the hydrogen peroxide impact

Исследованный нейрон и экспериментальная серия	Амплитуда фаз потенциала действия, мВ		
	Общая	Порог	Следовая гиперполяризация
Нейрон R.Pe.D.1			
Контроль ($n = 15$)	58 (48; 72)	6 (5; 14)	12 (10; 15)
H ₂ O ₂ , 1 ммоль/л ($n = 12$)	62 (41; 83)	5 (4; 6)	13 (7; 17)
H ₂ O ₂ , 100 ммоль/л ($n = 12$)	36 (27; 54)*, #	3 (2; 4)*, #	8 (3; 11)*, #
Статистика (Friedman ANOVA)	$\chi^2 = 8,22$ $P < 0,0164$	$\chi^2 = 8,63$ $P < 0,0134$	$\chi^2 = 14,11$ $P < 0,0009$
Нейрон L.Pe.D.1			
Контроль ($n = 9$)	68 (62; 75)	8 (2; 9)	12 (8; 12)
H ₂ O ₂ , 1 ммоль/л ($n = 9$)	64 (50; 95)	5 (3; 10)	11 (6; 25)
H ₂ O ₂ , 100 ммоль/л ($n = 6$)	61 (58; 63)*, #	5 (4; 6)*, #	12 (8; 15)
Статистика (Friedman ANOVA)	$\chi^2 = 9,01$ $P < 0,0111$	$\chi^2 = 8,45$ $P < 0,0146$	$\chi^2 = 3,74$ $P < 0,1545$

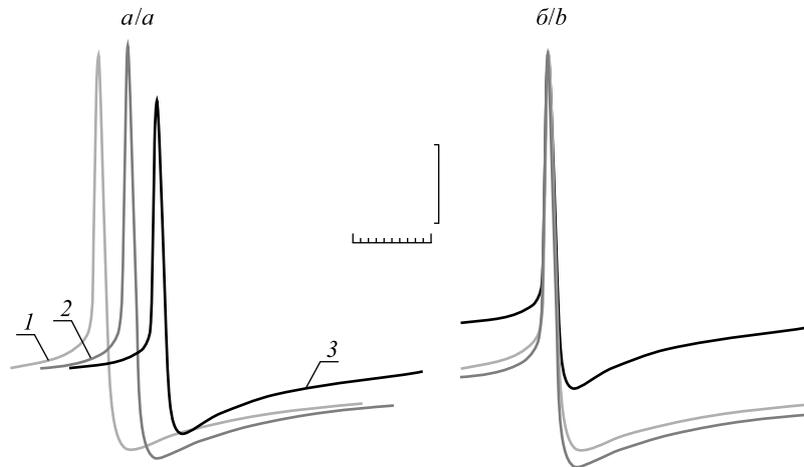


Рис. 1. Форма спайка R.Pe.D.1 при действии пероксида водорода.
Калибровка: по времени – 100 мс (большое деление), по амплитуде – 15 мВ.
Представлено изображение наложенных друг на друга потенциалов действия
одного и того же нейрона в разных условиях нахождения препарата ЦНС:
1 – контроль, 2 – пероксид водорода (1 ммоль/л), 3 – пероксид водорода (100 ммоль/л);
а – наложение со смещением вправо для иллюстрации изменений
амплитудных характеристик спайка, б – наложение с совмещением пикового значения,
отражающее изменение временных характеристик потенциала действия

Fig. 1. R.Pe.D.1 spike shape under the hydrogen peroxide impact.
Calibration: time – 100 ms (large scale), amplitude – 15 mV. Overlapping images of action
potentials presented (same neuron in different experimental conditions for isolated CNS):
1 – control, 2 – hydrogen peroxide (1 mmol/l), 3 – hydrogen peroxide (100 mmol/l);
а – overlapping with right shift, illustrating spike amplitude changes,
б – overlapping with peak value superposition, illustrating spike time-course changes

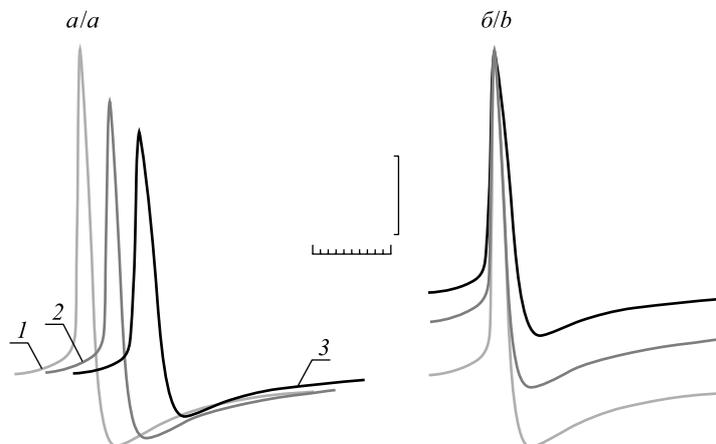


Рис. 2. Форма спайка L.Pe.D.1 при действии пероксида водорода.
То же, что и на рис. 1

Fig. 2. L.Pe.D.1 spike shape under the hydrogen peroxide impact.
The same as for fig. 1

Полученные нами данные позволяют сделать вывод об относительной устойчивости белков ионных каналов мембраны R.Pe.D.1 и L.Pe.D.1 к действию АФК в физиологическом диапазоне концентраций, не превышающих уровень 1 ммоль/л. С другой стороны, дальнейшее возрастание концентрации пероксида водорода в неравной степени сказывается на Na^+ - и K^+ -проводимости в исследованных клетках. Справедливо будет утверждать, что в отношении R.Pe.D.1 речь идет о модификации свойств как Na^+ -, так и K^+ -каналов плазмалеммы, поскольку изменению были подвержены длительность фазы деполяризации, амплитуды спайка и порога (обусловлены потоком ионов Na), а также длительность фазы реполяризации и амплитуда следовой гиперполяризации, реализация которых связана с перемещением ионов K. Известно, что в мембране R.Pe.D.1 насчитывается несколько типов калиевых каналов [15], а ее натриевая проницаемость связана с активацией неселективных Na^+ -каналов утечки [16].

Ранее отмечалось, что именно окислительная модификация *N*-концевого участка K^+ -канала типа Shaker (Sh) у *Drosophila* определяет потенциал-чувствительность и кинетику открытия/закрытия канала [17], и сообщалось о модуляции свойств АТФ-чувствительных K^+ -каналов мышей при экзогенной аппликации пероксида водорода [18].

Для L.Pe.D.1 стоит указать на относительно бóльшую устойчивость его K^+ -проницаемости по сравнению с таковой для R.Pe.D.1 в условиях кратковременного действия сверхвысоких доз пероксида водорода. В пользу этого говорят данные статистического анализа о неизменной длительности фазы реполяризации. Нельзя исключить, что в развитие потенциала действия в L.Pe.D.1 определен вклад вносит и Ca^{2+} -компонента, чувствительность которой к уровню АФК хорошо известна [19].

Отмеченная сохранность базовых электрических характеристик ключевых нейронов ЦНС *Lymnaea stagnalis* в условиях резкого возрастания уровня АФК в межклеточном пространстве может иметь приспособительное значение. В частности, у прудовика одним из источников свободнорадикальных форм кислорода в организме является НАДФН-оксидаза гемоцитов [20], генерирующая супероксид-анион (инициирующая последующее образование пероксида водорода, и гидроксильного радикала) как средство иммунного ответа на действие различных чужеродных агентов, с которыми моллюск сталкивается практически постоянно. Очевидно, что в этом случае сохранность и легочного дыхания (R.Pe.D.1), и локомоторной активности (L.Pe.D.1) крайне значима для выживания особи.

Таким образом, неодинаковая чувствительность молекулярных механизмов, лежащих в основе генерации потенциала действия в идентифицированных нейронах ЦНС *Lymnaea stagnalis*, составляет неотъемлемую характеристику функциональной специфичности клеток. Высокая степень сохранности механизмов электрогенеза при действии пероксида водорода способствует оптимальному функционированию нервных центров моллюска при кратковременном нарушении редокс-равновесия в мозге.

Библиографические ссылки

1. Holmström K. M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014. Vol. 6. P. 411–421. DOI: 10.1038/nrm3801.
2. Syková E., Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space // Physiol. Rev. 2008. Vol. 88, issue 4. P. 1277–1340. DOI: 10.1152/physrev.00027.2007.
3. Chen B. T., Avshalumov M. V., Rice M. E. H_2O_2 is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release // J. Neurophysiol. 2001. Vol. 85, issue 6. P. 2468–2476. DOI: 10.1152/jn.2001.85.6.2468.
4. Winlow W., Haydon P. G., Benjamin P. R. Multiple postsynaptic actions of the giant dopamine-containing neuron R.Pe.D.1 of *Lymnaea stagnalis* // J. Exp. Biol. 1981. Vol. 94. P. 137–148.
5. Winlow W., Haydon P. G. A behavioral and neuronal analysis of the locomotory system of *Lymnaea stagnalis* // Comp. Biochem. Physiol. 1986. Vol. 83A. P. 13–21.
6. Сидоров А. В. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск : БГУ, 2011.
7. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea* // Science. 1990. Vol. 250. P. 282–285.
8. Цыганов В. В. Координация активности моноаминергических педальных нейронов у пресноводных улиток // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2000. Т. 86. С. 369–378.
9. Сидоров А. В. Влияние пероксида водорода на электрическую активность нейронов локомоторной сети моллюска *Lymnaea stagnalis* // Новости мед.-биол. наук. 2009. № 1/2. С. 25–30.
10. Солтанов В. В., Бурко В. Е. Компьютерные программы обработки электрофизиологических данных // Новости мед.-биол. наук. 2005. № 1. С. 90–95.
11. Glantz S. A. Primer of Biostatistics. New York : McGraw-Hill, 1994.
12. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland ; Massachusetts : Sinauer Associates, 1992.
13. Kandel E. R. Cellular Basis of Behaviour. San Francisco : WH Freeman and Company, 1976.
14. Шахрани М., Сидоров А. В. Сравнительная характеристика электрофизиологических показателей идентифицированных дофаминергических (R.Pe.D.1) и серотонинергических (L.Pe.D.1) нейронов центральной нервной системы моллюска *Lymnaea stagnalis* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 3. С. 3–9.
15. Sakakibara M., Okuda F., Nomura K., et al. Potassium currents in isolated statocyst neurons and RPeD1 in the pond snail, *Lymnaea stagnalis* // J. Neurophysiol. 2005. Vol. 94, issue 6. P. 3884–3892. DOI: 10.1152/jn.01163.2004.
16. Lu T. Z., Sun C. L. F., Dong N., et al. High sensitivity of spontaneous spike frequency to sodium leak current in a *Lymnaea* pacemaker neuron // Eur. J. Neurosci. 2016. Vol. 44, issue 12. P. 3011–3022. DOI: 10.1111/ejn.13426.
17. Ueda A., Wu C.-F. Effects of *Hyperkinetic*, a beta subunit of *Shaker* voltage-dependent K^+ channels, on the oxidation state of presynaptic nerve terminals // J. Neurogenet. 2008. Vol. 22, issue 2. P. 1–13. DOI: 10.1080/01677060701807954.
18. Avshalumov M. V., Chen B. T., Koós T., et al. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels // J. Neurosci. 2005. Vol. 25, issue 17. P. 4222–4231. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4701-04.2005.
19. Bogeski I., Kappl R., Kummerow C., et al. Redox regulation of calcium ion channels: chemical and physiological aspects // Cell Calcium. 2011. Vol. 50, issue 5. P. 407–423. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.07.006.
20. Dikkeboom R., Tijnagel J. M., Mulder E. C., et al. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen // J. Invertebr. Pathol. 1987. Vol. 49. P. 321–331.

References

1. Holmström K. M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 6. P. 411–421. DOI: 10.1038/nrm3801.
2. Syková E., Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space. *Physiol. Rev.* 2008. Vol. 88, issue 4. P. 1277–1340. DOI: 10.1152/physrev.00027.2007.
3. Chen B. T., Avshalumov M. V., Rice M. E. H₂O₂ is a novel, endogenous modulator of synaptic dopamine release. *J. Neurophysiol.* 2001. Vol. 85, issue 6. P. 2468–2476. DOI: 10.1152/jn.2001.85.6.2468.
4. Winlow W., Haydon P. G., Benjamin P. R. Multiple postsynaptic actions of the giant dopamine-containing neuron R.Pe.D.1 of *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 1981. Vol. 94. P. 137–148.
5. Winlow W., Haydon P. G. A behavioral and neuronal analysis of the locomotory system of *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986. Vol. 83A. P. 13–21.
6. Sidorov A. V. [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk : BSU, 2011 (in Russ.).
7. Syed N. I., Bulloch A. G. M., Lukowiak K. *In vitro* reconstruction of the respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science*. 1990. Vol. 250. P. 282–285.
8. Tsyganov V. V. Coordination of the activity of monoaminergic pedal neurons in fresh water snails. *Ross. Fiziol. Zh. im. I. M. Sechenova* [Neurosci. Behav. Physiol.]. 2000. Vol. 86. P. 369–378 (in Russ.).
9. Sidorov A. V. Effect of hydrogen peroxide on electrical activity of locomotory network neurons within mollusk *Lymnaea stagnalis*. *News Biomed. Sci.* 2009. No. 1/2. P. 25–30 (in Russ.).
10. Soltanov V. V., Burko V. E. The software for processing of electrophysiological data. *News Biomed. Sci.* 2005. No. 1. P. 90–95 (in Russ.).
11. Glantz S. A. Primer of Biostatistics. New York : McGraw-Hill, 1994.
12. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland ; Massachusetts : Sinauer Associates, 1992.
13. Kandel E. R. Cellular Basis of Behaviour. San Francisco : WH Freeman and Company, 1976.
14. Shahrani M., Sidorov A. V. Comparative study of electrophysiological characteristics of identified dopamine-containing (R.Pe.D.1) and serotonin-containing (L.Pe.D.1) neurons within CNS of mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 3. P. 3–9 (in Russ.).
15. Sakakibara M., Okuda F., Nomura K., et al. Potassium currents in isolated statocyst neurons and RPeD1 in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 2005. Vol. 94, issue 6. P. 3884–3892. DOI: 10.1152/jn.01163.2004.
16. Lu T. Z., Sun C. L. F., Dong N., et al. High sensitivity of spontaneous spike frequency to sodium leak current in a *Lymnaea* pacemaker neuron. *Eur. J. Neurosci.* 2016. Vol. 44, issue 12. P. 3011–3022. DOI: 10.1111/ejn.13426.
17. Ueda A., Wu C.-F. Effects of *Hyperkinetic*, a beta subunit of *Shaker* voltage-dependent K⁺ channels, on the oxidation state of presynaptic nerve terminals. *J. Neurogenet.* 2008. Vol. 22, issue 2. P. 1–13. DOI: 10.1080/01677060701807954.
18. Avshalumov M. V., Chen B. T., Koos T., et al. Endogenous hydrogen peroxide regulates the excitability of midbrain dopamine neurons via ATP-sensitive potassium channels. *J. Neurosci.* 2005. Vol. 25, issue 17. P. 4222–4231. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4701-04.2005.
19. Bogeski I., Kappl R., Kummerow C., et al. Redox regulation of calcium ion channels: chemical and physiological aspects. *Cell Calcium*. 2011. Vol. 50, issue 5. P. 407–423. DOI: 10.1016/j.ceca.2011.07.006.
20. Dikkeboom R., Tijnagel J. M., Mulder E. C., et al. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *J. Invertebr. Pathol.* 1987. Vol. 49. P. 321–331.

Статья поступила в редколлегию 16.12.2017.
Received by editorial board 16.12.2017.

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 579.22

БИОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ *BACILLUS PUMILUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

О. В. ЕВДОКИМОВА¹⁾, В. Е. МЯМИН^{1), 2)}, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ^{1), 2)}

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Исследованы физиолого-биохимические и молекулярно-генетические свойства бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных из растений с признаками бактериального поражения, и штаммов, выделенных из почвы на территории Беларуси. Установлено, что изоляты из растений незначительно отличались от почвенных штаммов по фенотипическим признакам, вариации касались только целлюло- и пектолитической активности. Однако типирование с помощью RAPD- и REP-ПЦР выявило высокую генетическую гетерогенность исследованных штаммов, что может свидетельствовать о вариативности структуры геномов бактерий *B. pumilus* из различных мест обитания.

Образец цитирования:

Евдокимова О. В., Мямин В. Е., Валентович Л. Н. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 38–49.

For citation:

Evdokimova O. V., Miamin V. E., Valentovich L. N. Biochemical and molecular genetic characteristics of *Bacillus pumilus* bacteria isolated in Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 38–49 (in Russ.).

Авторы:

Олеся Владимировна Евдокимова – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Владислав Евгеньевич Мямин – кандидат биологических наук, доцент; старший научный сотрудник лаборатории средств биологического контроля¹⁾; доцент кафедры микробиологии биологического факультета²⁾.

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований»¹⁾; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета²⁾.

Authors:

Olesia V. Evdokimova, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

evdokimovalesia@gmail.com

Vlad E. Miamin, PhD (biology), docent; senior researcher at the laboratory of biological control agents^a; associate professor at the department of microbiology, faculty of biology^b.

vladmiamin@mail.ru

Leonid N. Valentovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research»^a; associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology^b.

valentovich@mbio.bas-net.by

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*; RAPD-ПЦР; REP-ПЦР; генетическая гетерогенность.

Благодарность. Авторы выражают благодарность ассистентам биологического факультета БГУ Е. И. Комар (кафедра микробиологии) и Ю. Н. Горовику (кафедра молекулярной биологии) за предоставленные штаммы бактерий *B. pumilus*.

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF *BACILLUS PUMILUS* BACTERIA ISOLATED IN BELARUS

O. V. EVDOKIMOVA^a, V. E. MIAMIN^{a, b}, L. N. VALENTOVICH^{a, b}

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, 2 Kuprevič Street, Minsk 220141, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: O. V. Evdokimova (evdokimovalesia@gmail.com)

Physiological biochemical and molecular genetic properties of *Bacillus pumilus* bacteria isolated from affected plants and soil in Belarus have been studied. There were no significant phenotypical differences between bacteria isolated from plants and soil, only distinctions in cellulolytic and pectolytic activity were observed. However, RAPD- and REP-PCR typing revealed high genetic heterogeneity of studied isolates, which may indicate variability of genome structure of *B. pumilus* bacteria from various habitats.

Key words: *Bacillus pumilus*; RAPD-PCR; REP-PCR; genetic heterogeneity.

Acknowledgements. The authors would like to thank E. I. Komar (Belarusian State University, department of the microbiology) and Y. N. Gorovik (department of the molecular biology) for provided *B. pumilus* strains.

Введение

В настоящее время отмечается значительный рост числа исследований, объектом которых являются бактерии *Bacillus pumilus*. Основным интерес к представителям данного вида связан со способностью отдельных штаммов продуцировать биологически активные вещества. Ряд внеклеточных ферментов *B. pumilus*, в том числе щелочная сериновая протеаза [1], ксиланаза [2], карбоксиметилцеллюлаза [3], β-маннаназа [4], лакказы [5], могут найти применение в различных областях биотехнологической промышленности. Синтез вторичных метаболитов с выраженной антибактериальной активностью и физиологически активных регуляторов роста растений делает представителей этого вида перспективными для разработки средств биологического контроля [6; 7] и препаратов, стимулирующих рост растений [8–10]. В то же время в литературе описаны случаи развития тяжелых форм бактериемии и сепсиса [11–13], пищевых отравлений [14], карбункулоподобных поражений кожных покровов [15], вызванных *B. pumilus*. Обнаружены штаммы *B. pumilus*, являющиеся причиной заболевания растений, на территории Египта [16], Мали [17], Китая [18; 19], Испании [20], Турции [21], Польши [22], а в последние годы и Беларуси [23; 24].

Считается, что такая широкая внутривидовая вариабельность свойств бактерий, адаптация к нетипичным условиям обитания, приобретение новых признаков отдельными штаммами – следствие динамичности и постоянной эволюции бактериального генома. Согласно современным представлениям внутривидовые различия обусловлены не только перестройками нуклеотидной последовательности отдельных генов, но и приобретением или утратой целого гена или даже кластера генов. Горизонтальный перенос ДНК играет значительную роль в распространении генетических детерминант, в том числе кодирующих факторы вирулентности [25]. Поиск генов, полученных в результате латерального переноса в полногеномных последовательностях 24 видов бактерий и архей, показал, что их доля колеблется от 1,56 до 14,47 %. Высокое содержание чужеродных генов регистрировалось у представителей вида *Bacillus subtilis*. В геномах архей и непатогенных бактерий количество заимствованных генетических детерминант было выше по сравнению с патогенными бактериями [26]. Например, в геноме штамма *B. pumilus*, изолированного из прибрежных вод Индии, выявлен ген *cesB*, кодирующий цереулидсинтеазу – один из ферментов, необходимых для образования термостабильного токсина цереулида [27]. Кластер генов, кодирующих нерибосомный синтез токсического пептида, несет в себе плазмиду pCER270, обнаруживаемая в клинических изолятах *Bacillus cereus* [28]. Присутствие гена *cesB* в геноме *B. pumilus* подтверждает возможность переноса ДНК между видами, относящимися к разным филогенетическим группам рода *Bacillus*.

Первые работы, описывающие фитопатогенные свойства *B. pumilus*, появились относительно недавно (2006) [16; 21]. Ранее встречались сообщения о способности данных бактерий вызывать мягкую гниль в различных овощах и фруктах [29; 30], однако в связи с их повсеместным распространением и традиционным отнесением к непатогенным особую внимания этим фактам не уделялось. В настоящее время выявлено и изучено более десяти штаммов *B. pumilus*, вызывающих заболевания растений [16–22; 24], но о механизмах патогенеза и свойствах, позволивших им перейти к паразитическому образу жизни, известно немного. До сих пор неясно, насколько специализированы в качестве фитопатогенов представители вида *B. pumilus* (как изменяются физиолого-биохимические свойства по сравнению со свободноживущими штаммами, есть ли существенные модификации в геномах данных бактерий).

Достаточно эффективными и быстрыми способами выявления внутривидового генетического разнообразия бактерий являются молекулярные методы на основе ПЦР. Из них наиболее часто применяются REP-ПЦР (*repetitive element palindromic PCR*) с использованием праймеров, комплементарных консервативным повторяющимся последовательностям ДНК [31], и RAPD-ПЦР (*random amplification of polymorphic DNA*), основанная на случайной амплификации полиморфной ДНК [32].

Целью настоящей работы является сравнение физиолого-биохимических и молекулярно-генетических характеристик бактерий *B. pumilus*, изолированных из растений с внешними признаками заболевания и из почвы на территории Беларуси.

Материалы и методы исследований

В эксперименте были использованы 6 штаммов *B. pumilus* из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов и 34 штамма из рабочих коллекций биологического факультета БГУ и лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси (табл. 1). Принадлежность анализируемых штаммов к виду *B. pumilus* была подтверждена с помощью ПЦР с видоспецифическими праймерами [33].

Таблица 1

Штаммы *B. pumilus*, использованные в эксперименте

Table 1

Investigated in the study *B. pumilus* strains

Штамм	Источник выделения	Место выделения
36.2	Растения огурца (<i>Cucumis sativus</i>), сорт Кураж	УП «Минский парниково-тепличный комбинат», Минский р-н, Минская обл.
19.6	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Эмоушен	КСУП «Светлогорская овощная фабрика», Светлогорский р-н, Гомельская обл.
39.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	УКАП «Фирма «Днепр»», Могилёвский р-н, Могилёвская обл.
39.3	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	
32.8	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Бомакс	
44.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	ЧУП «Озерицкий-Агро», Смолевичский р-н, Минская обл.
37.7	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	
38.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Зук	
51.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	КУП «Минская овощная фабрика», Минский р-н, Минская обл.
40.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Старбак	
41.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Раиса	
61.2	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Жеронимо	
61.3		
T1		
T2		

Окончание табл. 1
Ending table 1

Штамм	Источник выделения	Место выделения
33.4	Растение томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Барселона	РУП «Витебскэнерго» (филиал «Весна-энерго»), Полоцкий р-н, Витебская обл.
33.5		
4Л	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Форонти	УП «Агрокомбинат “Ждановичи”», Минский р-н, Минская обл.
6Л	Растения томата (<i>Solanum lycopersicum</i>), сорт Форонти	
1MRL	Растения льна-долгунца (<i>Linum usitatissimum</i>), сорт Ива	Минский р-н, Минская обл.
11-1-1	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Зарница	Бобруйский р-н, Могилёвская обл.
33-3	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Журавинка	РУП «Институт защиты растений», Минский р-н, Минская обл.
21-3	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Янка	
17-2	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Выток	РСДУП «Экспериментальная база “Зазерье”», Пуховичский р-н, Минская обл.
6-5-2	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Здабытак	
63-1-3	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Бриз	КСУП «Экспериментальная база “Натальевск”», Червенский р-н, Минская обл.
63-2-2		
65-4	Клубни картофеля (<i>Solanum tuberosum</i>), сорт Атлант	ОАО «Экспериментальная база “Дашковка”», Могилёвский р-н, Могилёвская обл.
43-3-1	Клубни картофеля, сорт неизвестен	Личное подсобное хозяйство, д. Туры, Столинский р-н, Брестская обл.
71-4-1	Неизвестен	Неизвестно
P10	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	Мядельский р-н, Минская обл.
P107	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	Памятник природы республиканского значения «Дубрава» у д. Щемыслица, Минский р-н, Минская обл.
P109	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	
P110	Растения сосны обыкновенной (<i>Pinus sylvestris</i>)	д. Боровляны, Минский р-н, Минская обл.
БИМ В-171	Дерново-подзолистая почва	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, д. Кулажин, Брагинский р-н, Гомельская обл.
БИМ В-211	Почва березового леса	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, д. Лесок, Хойникский р-н, Гомельская обл.
БИМ В-369	Дерново-подзолистая почва	Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, Гомельская обл.
БИМ В-373	Дерново-подзолистая почва	Ландшафтный заказник «Прилуцкий», Минский р-н, Минская обл.
БИМ В-401	Садово-огородная почва	
БИМ В-394	Дерново-подзолистая почва	агрогородок Соколище, Россонский р-н, Витебская обл.

Бактерии выращивали на поверхности агаризованной полноценной питательной среды (*LB*) или картофельном агаре [34] при температуре 28 °С в течение 24 ч. Физиолого-биохимическую характеристику исследуемых бактерий изучали согласно стандартным методикам, принятым для видовой

идентификации бактерий [34; 35]. Способность роста в присутствии антибиотика исследовали, высевая бактерии на поверхность агаризованной среды *LB*, содержащей эритромицин (50 мкг/мл), ампициллин (50 мкг/мл), стрептомицин (50 мкг/мл), тетрациклин (5 мкг/мл) или канамицин (15 мкг/мл).

Геномную ДНК бактерий выделяли с помощью набора реагентов «Нуклеосорб С» производства ОДО «Праймтех» согласно инструкции производителя или с применением цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ) [36]. Для выявления генетической гетерогенности изучаемых штаммов использовали RAPD-ПЦР с праймером 1254 (5'-ccgagccaa-3') и REP-ПЦР с праймером ERIC1 (5'-atgtaagctcctggggattcac-3'). Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей АМ-буфер с MgCl₂ (ОДО «Праймтех»); 0,2 ммоль/л дезоксинуклеотидтрифосфатов; 0,5 мкмоль/л праймера; 1 ед. *Taq*-полимеразы; 50 нг ДНК матрицы. Протокол амплификации включал в себя следующие стадии: начальную денатурацию – 5 мин при 95 °С; 4 цикла (денатурация – 5 мин при 94 °С, отжиг праймеров – 5 мин при 36 °С (праймер 1254) или 40 °С (праймер ERIC1), элонгация – 5 мин при 72 °С); 35 циклов (денатурация – 1 мин при 94 °С, отжиг праймеров – 1 мин при 36 °С (праймер 1254) или 55 °С (праймер ERIC1), элонгация – 2 мин при 72 °С и заключительная элонгация – 10 мин при 72 °С) [31; 32]. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР проводили в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) с использованием 1х ТАЕ-буфера. При анализе профилей фрагментов ПЦР учитывали общее количество фрагментов и их размер по электрофоретической подвижности в агарозном геле. В качестве маркера молекулярного веса ДНК применяли GeneRuler™ DNA Ladder 1 Kb (*Thermo Fisher Scientific*, США). Результаты визуализировали с помощью цифровой системы документирования видеоизображения ChemiDoc MP (*BioRad*).

Результаты исследований и их обсуждение

Одним из факторов фитопатогенности бактерий является продукция ферментов, разрушающих компоненты клеточной стенки растений [34]. Поэтому при исследовании физиолого-биохимических свойств анализируемых штаммов *B. pumilus*, большинство из которых были изолированы из растений с признаками бактериоза, особое внимание уделяли ферментативной активности гидролаз. Установлено, что все исследуемые штаммы не отличаются друг от друга по большинству тестируемых признаков (табл. 2). Различия наблюдаются только по признакам целлюло- и пектолитической активности. Штаммы, выделенные из почвы, не проявляли целлюлолитической активности в отличие от штаммов, изолированных из растений (рис. 1).

Таблица 2

Физиолого-биохимические свойства исследуемых штаммов *B. pumilus*

Table 2

Physiological and biochemical properties of *B. pumilus* strains used in the study

Штамм	Наличие или характер исследуемого признака										
	Продукция оксидазы	Продукция каталазы	Образование ацетона	Продукция нитрат-редуктаз	Гидролиз крахмала	Разжижение желатина	Гидролиз казеина	Продукция липазы (твин-80)	Продукция целлюлазы	Продукция пектаг-лиаз	О–F-тест
36.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
19.6	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
39.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
39.3	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
32.8	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
44.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
37.7	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
38.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
51.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
40.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
41.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F
61.2	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	F

Штамм	Наличие или характер исследуемого признака										
	Продукция оксидазы	Продукция каталазы	Образование ацетона	Продукция нитрат-редуктаз	Гидролиз крахмала	Разжижение желатина	Гидролиз казеина	Продукция липазы (твин-80)	Продукция целлюлазы	Продукция пектат-лиаз	O-F-тест
61.3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
T1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
T2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	±	F
33.4	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
33.5	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
4Л	-	+	+	-	-	+	+	+	+	±	F
6Л	-	+	+	-	-	+	+	+	+	±	F
1MRL	-	+	+	-	-	+	+	+	+	±	F
11-1-1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
33-3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
21-3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
17-2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
6-5-2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
63-1-3	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
63-2-2	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
65-4	-	+	+	-	-	+	+	+	+	±	F
43-3-1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
71-4-1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
P10	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
P107	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
P109	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
P110	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	F
БИМ В-171	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	F
БИМ В-211	-	+	+	-	-	+	+	+	-	±	F
БИМ В-369	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	F
БИМ В-373	-	+	+	-	-	+	+	+	-	±	F
БИМ В-394	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	F
БИМ В-401	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	F

Примечание. Знак «плюс» означает наличие признака; знак «минус» – отсутствие признака; знак «плюс/минус» – слабую выраженность признака.

Продукция пектат-лиаз выявлена у всех исследованных штаммов *B. pumilus*, за исключением коллекционных культур БИМ В-369 и БИМ В-401. Однако лунки на поверхности полипектатного геля формировались только на 3–4-е сутки инкубации бактерий, при этом у штаммов T2, 65-4, БИМ В-211 и БИМ В-373 область гидролиза представляла собой узкий ореол вокруг медальона. Следует отметить, что по сравнению с некротрофными фитопатогенными бактериями *Pectobacterium carotovorum*, взятыми в наших экспериментах в качестве положительного контроля, продукция (и(или) активность) пектат-лиаз и целлюлаз у бактерий *B. pumilus* была значительно ниже (см. рис. 1, а и б).

Проверка устойчивости бактерий к неблагоприятным факторам показала, что все исследованные штаммы росли в присутствии повышенного содержания хлорида натрия (до 10 %) и при пониженной температуре (до +10 °С).



Рис. 1. Результат тестирования целлюлолитической (а) и пектолитической (б) активности штаммов *B. pumilus*

Fig. 1. Result of cellulolytic (a) and pectolytic (b) activity test of *B. pumilus* strains

Изучение структурно-функциональной организации генома бактерий позволяет выявлять тонкие генетические различия и дифференцировать штаммы, не отличающиеся по своим морфологическим и биохимическим характеристикам. В литературе есть сведения о высокой степени генетической гетерогенности вида *B. pumilus* по сравнению с близкородственными видами [37; 38]. В наших исследованиях обнаружено, что у 18 из 40 изученных штаммов присутствует как минимум одна плазмида небольшого размера (6000–8000 п. н.) высокой копийности, достаточной для визуальной детекции на электрофореграммах (рис. 2). Наличие плазмидной ДНК регистрировали в препаратах геномной ДНК штаммов Т2, 19.6, 33.4, 36.2, 37.7, 40.2, 44.2, 33-3, 43-3-1, 63-1-3, 6-5-2, 71-4-1, 63-2-2, 1MRL, изолированных из растений, и в штаммах БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-394, БИМ В-401, выделенных из почвы. Эти данные согласуются с ранее опубликованными сведениями о наличии небольших плазмид у представителей рода *Bacillus* [39], однако считается, что частота распространенности внехромосомных генетических элементов у *B. pumilus* невысокая [40]. В последнее время среди грамположительных бактерий широко распространились плазмиды, несущие гены устойчивости к антибактериальным веществам [41; 42], при этом известно, что большинство мелких плазмид, характерных для представителей рода *Bacillus*, являются криптическими [43]. В экспериментах, выполненных нами, не удалось выявить фенотипических различий между плазмидсодержащими и бесплазмидными штаммами, в том числе в чувствительности к антибиотикам с различными механизмами действия.

При использовании праймера 1254 для анализа генетической гетерогенности *B. pumilus* получены 16 различных RAPD-профилей, содержащих от двух до девяти ампликонов размером от 250 до 3000 п. н. Штаммы *B. pumilus* 63-2-2, Т2, 61.2, 41.2, БИМ В-369, БИМ В-394, БИМ В-211, 4Л, 6Л, 1MRL характеризовались специфическими индивидуальными профилями, остальные штаммы разделились на шесть групп по типу профиля фрагментов ДНК, полученного с помощью RAPD-ПЦР (табл. 3). В самой многочисленной

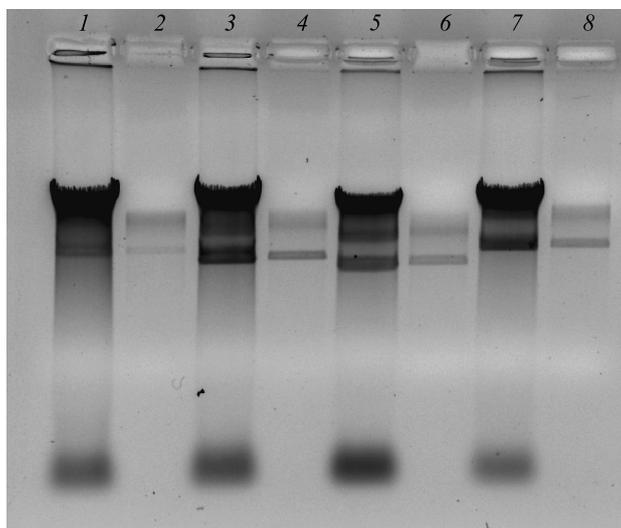


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов геномной (1, 3, 5, 7) и плазмидной (2, 4, 6, 8) ДНК штаммов *B. pumilus*: 1, 2 – *B. pumilus* Т2; 3, 4 – *B. pumilus* БИМ В-171; 5, 6 – *B. pumilus* 33-3; 7, 8 – *B. pumilus* 63-2-2
Fig. 2. Electrophoregram of genomic (1, 3, 5, 7) and plasmid (2, 4, 6, 8) DNA of *B. pumilus* strains: 1, 2 – *B. pumilus* Т2; 3, 4 – *B. pumilus* БИМ В-171; 5, 6 – *B. pumilus* 33-3; 7, 8 – *B. pumilus* 63-2-2

Таблица 3

Дифференциация изолятов *B. rituilus* по профилям фрагментов ДНК, полученным с помощью RAPD- и REP-ПЦР

Table 3

B. rituilus strains differentiation by DNA fragments profiles obtained with RAPD- and REP-PCR

Профиль фрагментов ДНК, полученный с праймером 1254	Штамм	Профиль фрагментов ДНК, полученный с праймером ERIC1	Штамм
	37.7, 33.4, 19.6, 40.2, 44.2, 36.2, 6-5-2, 43-3-1, 63-1-3, 71-4-1		37.7, 33.4, 19.6, 40.2, 44.2, 36.2, 6-5-2, 43-3-1, 63-1-3, 71-4-1
	61.2		61.2, 11-1-1, 32.8, 33.5, 38.2, 39.2, 39.3, 51.2, 61.3, T1
	11-1-1, 32.8, 33.5, 38.2, 39.2, 39.3, 51.2, 61.3, T1		
	17-2, 33-3		17-2, 33-3, 41.2
	41.2		
	63-2-2		63-2-2
	21-3, 65-4		21-3, 65-4
	БИМ В-369		БИМ В-369
	БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-401		БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-401
	БИМ В-211		БИМ В-211
	БИМ В-394		БИМ В-394
	T2		T2
	P10, P107, P109, P110		P10, P107, P109, P110
	4Л		4Л
	6Л		6Л
	1MRL		1MRL
	Маркер молекулярного веса ДНК		Маркер молекулярного веса ДНК

группе оказалось десять штаммов, изолированных из растений огурца (36.2), томата (37.7, 33.4, 19.6, 40.2, 44.2) и клубней картофеля (6-5-2, 43-3-1, 63-1-3, 71-4-1), выращенных в территориально удаленных районах Могилёвской, Минской, Брестской и Витебской областей. REP-профили данных штаммов также идентичны. Еще одной объединяющей характеристикой послужило наличие плазмидной ДНК размером около 8000 п. н. Вторую многочисленную группу на основании полученного отличающегося RAPD-профиля составили штаммы, выделенные из растений томата (32.8, 33.5, 38.2, 39.2, 39.3, 51.2, 61.3, T1) и картофеля (11-1-1). По результатам REP-ПЦР в этой же группе оказался и штамм 61.2. По специфическим наборам фрагментов ДНК, полученным при использовании REP- и RAPD-ПЦР, в третью группу объединены изоляты из растений сосны (P10, P107, P109, P110). Четвертую группу составили почвенные штаммы БИМ В-171, БИМ В-373, БИМ В-401. Штаммы 21-3, 65-4 и 17-2, 33-3, изолированные из клубней картофеля, образовали пятую и шестую группы. Кроме того, по результатам REP-ПЦР в шестую группу попал штамм 41.2, выделенный из растений томата. Некоторые типы профилей имели схожий набор фрагментов и отличались только наличием или отсутствием одной-двух полос на электрофореграмме (например, профили БИМ В-211 и БИМ В-369). Другие имели значительные различия в количестве и размере фрагментов, тем не менее ни в одной группе не оказались вместе штаммы, выделенные из растений и почвы. В целом дифференциация штаммов по профилям фрагментов ДНК, полученным методами RAPD- и REP-ПЦР, совпала, за исключением штаммов *B. pumilus* 61.2 и 41.2, REP-профили которых были не уникальны и попали в две различные группы, определенные ранее с помощью RAPD-ПЦР. Результаты осуществленного нами типирования подтверждают опубликованные другими авторами сведения о высокой степени генетической гетерогенности бактерий *B. pumilus* и позволяют отбирать штаммы, отличающиеся структурной организацией геномов, для дальнейшего детального молекулярно-генетического анализа.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что бактерии *B. pumilus*, изолированные из различных источников на территории Беларуси, фенотипически представляют собой довольно однородную группу. Для всех 40 протестированных штаммов характерно наличие ряда гидролаз, однако почвенные штаммы отличаются от изолятов из растений отсутствием целлюлолитической активности, а штаммы БИМ В-369 и БИМ В-401 – отсутствием продукции пектат-лиаз. Применение молекулярных методов RAPD- и ERIC-ПЦР выявило высокую степень генетической гетерогенности исследованных бактерий. Дифференцирующая способность RAPD-ПЦР с использованием праймера 1254 оказалась выше, чем REP-ПЦР с праймером ERIC1 для выявления генетических различий штаммов *B. pumilus*. Дифференциация изолятов *B. pumilus* по профилю полученных ампликонов RAPD- и REP-ПЦР показала, что сходство или различие в некоторой степени связано с источником выделения бактерий.

Библиографические ссылки

1. Huang Q., Peng Y., Li X., et al. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* // Curr. Microbiol. 2003. Vol. 46, issue 3. P. 169–173. DOI: 10.1007/s00284-002-3850-2.
2. Asha Poorna C., Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling // Biores. Technol. 2006. Vol. 98, issue 3. P. 485–490. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.033.
3. Balasubramanian N., Simões N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility // Int. J. Biol. Macromol. 2014. Vol. 67. P. 132–139. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.03.014.
4. Zang H., Xie S., Wu H. A novel thermostable GH5_7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production // Enzyme Microb. Technol. 2015. Vol. 78. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.007.
5. Guan Z.-B., Shui Y., Song C. M., et al. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2015. Vol. 22, issue 12. P. 9515–9523. DOI: 10.1007/s11356-015-4426-6.
6. Aunpad R., Na-Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4 // Curr. Microbiol. 2007. Vol. 55, issue 4. P. 308–313. DOI: 10.1007/s00284-006-0632-2.
7. Brack C., Mikolasch A., Schlueter R., et al. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus* // Mar. Biotechnol. 2015. Vol. 17, issue 3. P. 290–304. DOI: 10.1007/s10126-015-9614-3.
8. De-Bashan L. E., Hernandez J. P., Bashan Y., et al. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings // Environ. Exp. Bot. 2010. Vol. 69, issue 3. P. 343–352. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.04.014.
9. Kuan K. B., Othman R., Abdul Rahim K., et al. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of Maize under greenhouse conditions // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, issue 3. P. 1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0152478.

10. Gutiérrez-Mañero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins // *Physiol. Plant.* 2001. Vol. 111, issue 2. P. 206–211. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
11. Bentur H. N., Dalzell A., Riordan F. A. I. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2007. Vol. 6. P. 12. DOI: 10.1186/1476-0711-6-12.
12. Hernaiz C., Picardo A., Alos J. I., et al. Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient // *Clin. Microbiol. Infect.* 2003. Vol. 9, issue 9. P. 973–975. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00682.x.
13. Kimouli M., Vrioni G., Papadopoulou M., et al. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants // *J. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 61. P. 596–599. DOI: 10.1099/jmm.0.033175-0.
14. From C., Hormazabal V., Granum P. E. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice // *Int. J. Food Microbiol.* 2007. Vol. 115, issue 3. P. 319–324. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005.
15. Grass G., Bierbaum G., Molitor E., et al. Genome sequence of *Bacillus pumilus* strain bonn, isolated from an anthrax-like necrotic skin infection site of a child // *Genome Announc.* 2016. Vol. 4, issue 1. Article ID: e01741-15. DOI: 10.1128/genomeA.01741-15.
16. Galal A. A., El-Bana A. A., Janse J. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants // *Egypt. J. Phytopathol.* 2006. Vol. 34, № 1. P. 17–29.
17. Bathily H., Babana A. H., Samaké F. *Bacillus pumilus* a new pathogen on potato tubers in storage in Mali // *Afr. J. Microbiol. Res.* 2010. Vol. 4, issue 20. P. 2067–2071.
18. Peng Q., Yuan Y., Gao M. *Bacillus pumilus*, a novel ginger rhizome rot pathogen in China // *Plant Dis.* 2013. Vol. 97, № 10. P. 1308–1315. DOI: 10.1094/PDIS-12-12-1178-RE.
19. Li B., Qiu W., Tan Q. M., et al. Association of a bacillus species with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus pyrifolia*) in China // *J. Plant Pathol.* 2009. Vol. 91, № 3. P. 705–708. DOI: 10.4454/jpp.v91i3.565.
20. Font M. I., Bassimba D. D. M., Cebrián M. C., et al. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain // *Plant Pathol.* 2010. Vol. 59, issue 2. P. 400. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x.
21. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey // *J. Plant Dis. Prot.* 2006. Vol. 113, № 1. P. 8–13.
22. Mikiciński A., Pulawska J., Sobiczewski P., et al. Pectolytic bacteria associated with soft rot of dieffenbachia (*Dieffenbachia maculata*) // *Phytopathologia.* 2010. Vol. 58. P. 21–32.
23. Комар Е. И., Песнякевич А. Г. Характеристика возбудителей бактериальных гнилей картофеля на территории Беларуси // *Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География.* 2013. № 1. С. 78–82.
24. Kovaleva V. A., Shalovylo Y. I., Gorovik Y. N., et al. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine – Short Communication // *J. For. Sci.* 2015. Vol. 61, № 3. P. 131–137.
25. Mel S. F., Mekalanos J. J. Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by *in vivo* signals // *Cell.* 1996. Vol. 87, issue 5. P. 795–798. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81986-8.
26. Garcia-Vallvé S., Romeu A., Palau J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes // *Genome Res.* 2000. Vol. 10. P. 1719–1725. DOI: 10.1101/gr.130000.
27. Parvathi A., Krishna K., Jose J., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India // *Braz. J. Microbiol.* 2009. Vol. 40, issue 2. P. 269–275. DOI: 10.1590/S1517-838220090002000012.
28. Rasko D. A., Rosovitz M. J., Økstad O. A., et al. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1 // *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189, № 1. P. 52–64. DOI: 10.1128/JB.01313-06.
29. Gabr M. R., Gazar A. A. Gabbage head rot due to sporeforming bacteria [*Bacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus*; Egypt] // *Ann. Agric. Sci.* 2012. Vol. 28. P. 1163–1185.
30. Saleh O. I., Huang P.-Y., Huang J.-S. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt // *J. Phytopathol.* 1997. Vol. 145. P. 447–453. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1997.tb00348.x.
31. Shangkuan Y. H., Yang J.-F., Lin H.-C., et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains // *J. Appl. Microbiol.* 2000. Vol. 89, issue 3. P. 452–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01134.x.
32. Akopyanz N., Bukanov N. O., Westblom T. U., et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, № 19. P. 5137–5142.
33. Евдокимова О. В., Мямин В. Е., Валентович Л. Н. Идентификация бактерий *Bacillus pumilus* с помощью видоспецифичной ПЦР // *Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр.* 2016. Т. 21. С. 53–63.
34. Желдакова Р. А., Мямин В. Е. Фитопатогенные микроорганизмы. Минск : БГУ, 2006.
35. Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. и др. Практикум по микробиологии. М. : Академия, 2005.
36. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. P. 2.4.1–2.4.5. DOI: 10.1002/047142727.mb0204s56.
37. Wulff E. G., Mguni C. M., Mansfeld-Giese K., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* // *Plant Pathol.* 2002. Vol. 51, issue 5. P. 574–584. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x.
38. De Jonghe V., Coorevits A., Vandroemme J., et al. Intraspecific genotypic diversity of *Bacillus* species from raw milk // *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18, № 5. P. 496–505. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.007.
39. Guglielmetti S., Mora D., Parini C. Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: Organization, distribution, and their possible role in host physiology // *Plasmid.* 2007. Vol. 57, № 3. P. 245–264. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.09.002.
40. Garcia-Ramon D. C., Luque-Navas M. J., Molina C. A., et al. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1 // *Plasmid.* 2015. Vol. 82. P. 17–27. DOI: 10.1016/j.plasmid.2015.09.001.
41. Schwarz S., Shen J., Wendlandt S., et al. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Staphylococci* and other Firmicutes // *Microbiol. Spectr.* 2014. Vol. 2, issue 6. P. 421–444. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0020-2014.
42. Lanza V. F., Tedim A. P., Martinez J. L., et al. The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials // *Microbiol. Spectr.* 2015. Vol. 3, № 2. P. 1–37. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0039-2014.
43. Тумок М. А. Плазмиды грамположительных бактерий. Минск : БГУ, 2004.

References

1. Huang Q., Peng Y., Li X., et al. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Curr. Microbiol.* 2003. Vol. 46, issue 3. P. 169–173. DOI: 10.1007/s00284-002-3850-2.
2. Asha Poorna C., Prema P. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Biores. Technol.* 2006. Vol. 98, issue 3. P. 485–490. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.033.
3. Balasubramanian N., Simões N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. Vol. 67. P. 132–139. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.03.014.
4. Zang H., Xie S., Wu H. A novel thermostable GH5 7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production. *Enzyme Microb. Technol.* 2015. Vol. 78. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.007.
5. Guan Z.-B., Shui Y., Song C. M., et al. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2015. Vol. 22, issue 12. P. 9515–9523. DOI: 10.1007/s11356-015-4426-6.
6. Aunpad R., Na-Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr. Microbiol.* 2007. Vol. 55, issue 4. P. 308–313. DOI: 10.1007/s00284-006-0632-2.
7. Brack C., Mikolasch A., Schlueter R., et al. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Mar. Biotechnol.* 2015. Vol. 17, issue 3. P. 290–304. DOI: 10.1007/s10126-015-9614-3.
8. De-Bashan L. E., Hernandez J. P., Bashan Y., et al. *Bacillus pumilus* ES4: candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environ. Exp. Bot.* 2010. Vol. 69, issue 3. P. 343–352. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2010.04.014.
9. Kuan K. B., Othman R., Abdul Rahim K., et al. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of Maize under greenhouse conditions. *PLoS ONE.* 2016. Vol. 11, issue 3. P. 1–19. DOI: 10.1371/journal.pone.0152478.
10. Gutiérrez-Mañero F. J., Ramos-Solano B., Probanza A., et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 2001. Vol. 111, issue 2. P. 206–211. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
11. Bentur H. N., Dalzell A., Riordan F. A. I. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2007. Vol. 6. P. 12. DOI: 10.1186/1476-0711-6-12.
12. Hernaiz C., Picardo A., Alos J. I., et al. Nosocomial bacteremia and catheter infection by *Bacillus cereus* in an immunocompetent patient. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003. Vol. 9, issue 9. P. 973–975. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00682.x.
13. Kimouli M., Vrioni G., Papadopoulou M., et al. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. *J. Med. Microbiol.* 2012. Vol. 61. P. 596–599. DOI: 10.1099/jmm.0.033175-0.
14. From C., Hormazabal V., Granum P. E. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int. J. Food Microbiol.* 2007. Vol. 115, issue 3. P. 319–324. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005.
15. Grass G., Bierbaum G., Molitor E., et al. Genome sequence of *Bacillus pumilus* strain bonn, isolated from an anthrax-like necrotic skin infection site of a child. *Genome Announc.* 2016. Vol. 4, issue 1. Article ID: e01741-15. DOI: 10.1128/genomeA.01741-15.
16. Galal A. A., El-Bana A. A., Janse J. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants. *Egypt. J. Phytopathol.* 2006. Vol. 34, No. 1. P. 17–29.
17. Bathily H., Babana A. H., Samaké F. *Bacillus pumilus* a new pathogen on potato tubers in storage in Mali. *Afr. J. Microbiol. Res.* 2010. Vol. 4, issue 20. P. 2067–2071.
18. Peng Q., Yuan Y., Gao M. *Bacillus pumilus*, a novel ginger rhizome rot pathogen in China. *Plant Dis.* 2013. Vol. 97, No. 10. P. 1308–1315. DOI: 10.1094/PDIS-12-12-1178-RE.
19. Li B., Qiu W., Tan Q. M., et al. Association of a bacillus species with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *J. Plant Pathol.* 2009. Vol. 91, No. 3. P. 705–708. DOI: 10.4454/jpp.v91i3.565.
20. Font M. I., Bassimba D. D. M., Cebrián M. C., et al. First report of *Bacillus pumilus* on *Phaseolus vulgaris* in Spain. *Plant Pathol.* 2010. Vol. 59, issue 2. P. 400. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02172.x.
21. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from some fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey. *J. Plant Dis. Prot.* 2006. Vol. 113, No. 1. P. 8–13.
22. Mikiciński A., Pulawska J., Sobiczewski P., et al. Pectolytic bacteria associated with soft rot of dieffenbachia (*Dieffenbachia maculata*). *Phytopathologia.* 2010. Vol. 58. P. 21–32.
23. Komar E. I., Pesnyakevich A. G. Characterisation of bacteria cause soft rot potato in Belarus. *Vestnik BSU. Ser. 2, Chem. Biol. Geogr.* 2013. No. 1. P. 78–82 (in Russ.).
24. Kovaleva V. A., Shalovylo Y. I., Gorovik Y. N., et al. *Bacillus pumilus* – a new phytopathogen of Scots pine – Short Communication. *J. For. Sci.* 2015. Vol. 61, No. 3. P. 131–137.
25. Mel S. F., Mekalanos J. J. Modulation of horizontal gene transfer in pathogenic bacteria by *in vivo* signals. *Cell.* 1996. Vol. 87, issue 5. P. 795–798. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81986-8.
26. Garcia-Vallvé S., Romeu A., Palau J. Horizontal gene transfer in bacterial and archaeal complete genomes. *Genome Res.* 2000. Vol. 10. P. 1719–1725. DOI: 10.1101/gr.130000.
27. Parvathi A., Krishna K., Jose J., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Braz. J. Microbiol.* 2009. Vol. 40, issue 2. P. 269–275. DOI: 10.1590/S1517-838220090002000012.
28. Rasko D. A., Rosovitz M. J., Økstad O. A., et al. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189, No. 1. P. 52–64. DOI: 10.1128/JB.01313-06.
29. Gabr M. R., Gazar A. A. Gabbage head rot due to sporeforming bacteria [*Bacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus*; Egypt]. *Ann. Agr. Sci.* 2012. Vol. 28. P. 1163–1185.
30. Saleh O. I., Huang P.-Y., Huang J.-S. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt. *J. Phytopathol.* 1997. Vol. 145. P. 447–453. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1997.tb00348.x.
31. Shangkuan Y. H., Yang J.-F., Lin H.-C., et al. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *J. Appl. Microbiol.* 2000. Vol. 89, issue 3. P. 452–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01134.x.

32. Akopyanz N., Bukanov N. O., Westblom T. U., et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20, No. 19. P. 5137–5142.
33. Yeudakimava O. V., Miamin V. E., Valentovich L. N. Identification of *Bacillus pumilus* bacteria by using species-specific PCR assay. *Molecular and Applied Genetics* : proceedings. 2016. Vol. 21. P. 53–63 (in Russ.).
34. Zheldakova R. A., Miamin V. E. [Phytopathogenic microorganisms]. Minsk : BSU, 2006 (in Russ.).
35. Netrusov A. I., Egorova M. A., Zakharchuk L. M., et al. [Practical Microbiology]. Moscow : Akademiya, 2005 (in Russ.).
36. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. P. 2.4.1–2.4.5. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s56.
37. Wulff E. G., Mguni C. M., Mansfeld-Giese K., et al. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 2002. Vol. 51, issue 5. P. 574–584. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2002.00753.x.
38. De Jonghe V., Coorevits A., Vandroemme J., et al. Intraspecific genotypic diversity of *Bacillus species* from raw milk. *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18, No. 5. P. 496–505. DOI: 10.1016/j.idairyj.2007.11.007.
39. Guglielmetti S., Mora D., Parini C. Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: Organization, distribution, and their possible role in host physiology. *Plasmid.* 2007. Vol. 57, No. 3. P. 245–264. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.09.002.
40. Garcia-Ramon D. C., Luque-Navas M. J., Molina C. A., et al. Identification, sequencing and comparative analysis of pBp15.S plasmid from the newly described entomopathogen *Bacillus pumilus* 15.1. *Plasmid.* 2015. Vol. 82. P. 17–27. DOI: 10.1016/j.plasmid.2015.09.001.
41. Schwarz S., Shen J., Wendlandt S., et al. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Staphylococci* and other Firmicutes. *Microbiol. Spectr.* 2014. Vol. 2, issue 6. P. 421–444. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0020-2014.
42. Lanza V. F., Tedim A. P., Martinez J. L., et al. The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. *Microbiol. Spectr.* 2015. Vol. 3, No. 2. P. 1–37. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0039-2014.
43. Titok M. A. [Plasmids of gram-positive bacteria]. Minsk : BSU, 2004 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 22.12.2017.
Received by editorial board 22.12.2017.

Биохимия, биотехнология и микробиология

BIOCHEMISTRY, BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 637.14.04/.07+577.152.34

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, АНТИМУТАГЕННЫЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ КОРОВЬЕГО МОЛОЗИВА

**Т. Н. ГОЛОВАЧ¹⁾, Е. И. ТАРУН²⁾, Н. В. ДУДЧИК³⁾,
Р. В. РОМАНОВИЧ¹⁾, И. А. БУБРА¹⁾, В. П. КУРЧЕНКО¹⁾**

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

²⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова

Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

³⁾РУП «Научно-практический центр гигиены», ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Беларусь

Проведено сравнительное исследование белково-пептидного состава и биологически активных свойств гидролизованного коровьего молозива, полученного с применением различных эндопептидаз (алкалазы и нейтразы). После гидролиза алкалазой и ультрафильтрации установлено возрастание антиоксидантной активности пептидной

Образец цитирования:

Головач Т. Н., Тарун Е. И., Дудчик Н. В., Романович Р. В., Бубра И. А., Курченко В. П. Антирадикальная активность, антимутагенные и антигенные свойства ферментативных гидролизатов коровьего молозива // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 50–59.

For citation:

Halavach T. M., Tarun E. I., Dudchik N. V., Romanovich R. V., Bubra I. A., Kurchenko V. P. Antiradical activity, antimutagenic and antigenic properties of enzymatic bovine colostrum hydrolysates. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 50–59 (in Russ.).

Авторы:

Татьяна Николаевна Головач – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории прикладных проблем биологии биологического факультета.

Екатерина Ивановна Тарун – кандидат химических наук, доцент; доцент кафедры экологической химии и биохимии факультета экологической медицины.

Наталья Владимировна Дудчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий лабораторией микробиологии.

Роман Витальевич Романович – студент биологического факультета. Научный руководитель – Т. Н. Головач.

Илона Александровна Бубра – студент биологического факультета. Научный руководитель – Т. Н. Головач.

Владимир Петрович Курченко – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией прикладных проблем биологии биологического факультета.

Authors:

Tatsiana M. Halavach, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of applied biology, faculty of biology.

halavachtn@gmail.com

Ekaterina I. Tarun, PhD (chemistry), docent; associate professor at the department of environmental chemistry and biochemistry, faculty of environmental medicine.

ktarun@tut.by

Natalia V. Dudchik, doctor of science (biology), docent; head of the laboratory of microbiology.

n_dudchik@tut.by

Roman V. Romanovich, student at the faculty of biology.

muninn@tut.by

Ilona A. Bubra, student at the faculty of biology.

ilona.bubra96@gmail.com

Vladimir P. Kurchenko, PhD (biology), docent; head of the laboratory of applied biology, faculty of biology.

kurchenko@tut.by

фракции в 7,1 раза, тогда как при использовании нейтразы – в 3,5 раза. Максимальный антимутагенный эффект отмечен в экспериментах с алкалазой, что для штамма *Salmonella typhimurium* TA 98 составило 10,0–29,6 %, для штамма TA 100 равнялось 12,5–32,4 %. Ультрафильтрат гидролизата алкалазой обогащен специфическими короткоцепочечными пептидами, с которыми связаны его относительно высокие антимутагенные и антирадикальные свойства. По результатам электрофоретического анализа и реакции иммунопреципитации алкалаза эффективно расщепляет β -лактоглобулин, что обеспечивает получение гидролизата с низким аллергенным потенциалом. Нейтраза расщепляет данный белковый субстрат частично. С применением иммунохимического подхода лактоферрин выявлен во всех образцах гидролизованного молозива. Согласно экспериментальным данным возрастание антиоксидантного и антимутагенного потенциала, а также снижение антигенных свойств гидролизованного молозива обусловлены увеличением глубины протеолиза.

Ключевые слова: коровье молозиво; ферментативный гидролиз; алкалаза; нейтраза; белково-пептидный состав; антиоксидантные свойства; антимутагенная активность; антигенные свойства; β -лактоглобулин; лактоферрин.

ANTIRADICAL ACTIVITY, ANTIMUTAGENIC AND ANTIGENIC PROPERTIES OF ENZYMATIC BOVINE COLOSTRUM HYDROLYSATES

T. M. HALAVACH^a, E. I. TARUN^b, N. V. DUDCHIK^c,
R. V. ROMANOVICH^a, I. A. BUBRA^a, V. P. KURCHENKO^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

^cScientific Practical Centre of Hygiene,

8 Akademičnaja Street, Minsk 220012, Belarus

Corresponding author: T. M. Halavach (halavachtn@gmail.com)

A comparative analysis of protein and peptide profile, biological active properties of hydrolysed bovine colostrum obtained using various endopeptidases (alcalase and neutrase) was performed. It was found that hydrolysis with alcalase and ultrafiltration led to increase in antioxidant activity of the peptide fraction by 7.1 times whereas using neutrase by 3.5 times. Maximum antimutagenic effect was shown for experiment with alcalase, that attained 10.0–29.6 % for strain *Salmonella typhimurium* TA 98 and 12.5–32.4 % for strain TA 100. Ultrafiltrate of hydrolysate using alcalase is enriched with specific short-chain peptides which determine its relatively high antimutagenic and antiradical properties. According to SDS-electrophoresis and reaction of immunoprecipitation alcalase effectively cleaves β -lactoglobulin, that provides a hydrolysate producing with low allergen potential. Neutrase cleaves this protein substrate partially. Using immunochemical analysis lactoferrin was detected in all samples of hydrolysed colostrum. In accordance with experimental data the raise in antioxidant and antimutagenic potential and also the decline in antigenic properties of hydrolysed colostrum are due to an increase in depth of proteolysis.

Key words: bovine colostrum; enzymatic hydrolysis; alcalase; neutrase; protein and peptide profile; antioxidant properties; antimutagenic activity; antigenic properties; β -lactoglobulin; lactoferrin.

Введение

Молозиво, или первичное молоко, существенно отличается от зрелого молока по пищевой ценности и составу биологически активных веществ. Оно характеризуется повышенным содержанием легкоусвояемых сывороточных белков, защитных иммунных компонентов (иммуноглобулины, лактоферрины, лейкоциты-макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты), а также природных антиоксидантов (витамины А и Е, цинк, селен) [1]. Вместе с тем белки молока (казеиновая и сывороточная фракции) являются предшественниками биологически активных пептидов с иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимутагенным, гипотензивным, противомикробным, противовирусным и другими действиями [2].

Наряду с высокой ценностью компонентного состава коровье молоко содержит более 20 белков, способных вызвать аллергические реакции у человека. Основными из них являются казеины и сывороточные белки: β -лактоглобулин (β -лг), α -лактоальбумин (α -ла) и бычий сывороточный альбумин (БСА). β -Лактоглобулин составляет около 12 % общего белка молока и 60 % молочной сыворотки и обладает наибольшим аллергенным потенциалом среди сывороточных белков. Ферментативный гидролиз казеина и сывороточных белков направлен на получение пептидов с низким аллергенным действием

за счет расщепления областей антигенных детерминант [3]. Следует отметить, что в молозиве повышено содержание лактоферрина (ЛФ) – белка с широким спектром физиологических активностей. В связи с этим целесообразным является получение ферментативных гидролизатов молозива, которые содержат ЛФ и расщепленные белки-аллергены.

Для получения ферментативных гидролизатов с заданными показателями (пептидный профиль, биологические активности) используют различные эндо- и экзопептидазы, среди которых можно выделить ферменты микробного (алкалаза, нейтраза, флейворзим), растительного (папаин, фицин) и животного (пепсин, трипсин) происхождения [4]. Особенности ферментативного расщепления белковых субстратов определяются оптимальными условиями каталитической активности фермента, его субстратной специфичностью и сайт-специфичностью, физико-химическими свойствами расщепляемых белков.

Антирадикальный эффект зрелого молока и молозива определяется главным образом антиоксидантной активностью (АОА) казеина и сывороточных белков, в меньшей степени – наличием небелковой составляющей (витаминно-минеральный компонент). АОА нативных белков и продуктов их ферментативного расщепления обусловлена восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов [5; 6].

Биологическое явление подавления мутационного процесса, или антимуtagenез, выражается в снижении спонтанного и индуцированного мутирования под воздействием природных и синтетических соединений. Большинство сведений о влиянии биологически активных веществ на спонтанный и индуцированный мутагенез получены в экспериментах *in vitro* на прокариотических тест-моделях. Предложены количественный метод и критериальный показатель оценки антимуtagenного потенциала, основанные на модификации теста Эймса [6].

Актуальность работы обусловлена необходимостью детального изучения гидролизованной белковой фракции молозива с применением современной методической базы для получения специализированных продуктов питания с заданными белково-пептидным составом и биологически активными свойствами. Научная новизна заключается в выявлении новых данных об антирадикальном действии, антимуtagenных и антигенных свойствах ферментативных гидролизатов коровьего молозива, а также применении комплексного подхода для установления взаимосвязи физико-химических показателей и биологических активностей нативных белков молозива и продуктов их гидролиза различными протеазами.

Цель настоящей работы – характеристика белково-пептидного состава и биологически активных свойств гидролизованного коровьего молозива. Объекты исследования – экспериментальные образцы ферментативных гидролизатов молозива. Предмет исследования – молекулярно-массовое распределение белкового компонента, антиоксидантный эффект, антигенные и антимуtagenные свойства гидролизованного молозива.

Материалы и методы исследований

В работе использовали сухое обезжиренное молозиво (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Москва, Россия), ферменты алкалазу (КФ 3.4.21.62, протеаза из *Bacillus licheniformis*, 2,4 ЕА/г; *Sigma*, США) и нейтразу (КФ 3.4.24.28, протеаза из *Bacillus amyloliquefaciens*, 0,8 ЕА/г; *Sigma*, США). Готовили 5 % растворы молозива в фосфатном буфере (рН 7,0 и рН 8,0); полученные растворы центрифугировали для удаления нерастворимых частиц при 6000 об/мин в течение 30 мин; надосадочную жидкость использовали для гидролиза. Ферментативное расщепление проводили при соотношении «фермент – субстрат» 1 : 3 % для алкалазы и нейтразы соответственно при температуре 50 °С и активной кислотности среды рН 8,0 (оптимум для алкалазы) и рН 7,0 (при гидролизе нейтразой) в течение 3 ч. Реакцию катализа алкалазой останавливали фенолметилсульфонилфторидом (*Sigma*, США), нейтразу ингибировали внесением этилендиаминтетрауксусной кислоты (*Sigma*, США). Пробы замораживали при –20 °С для последующего анализа. В целях фракционирования гидролизатов применяли фильтры Spin-X UF Concentrator 20 (*Corning*, Англия) с разделяющей способностью 10 кДа.

Глубину протеолиза белков молока контролировали с использованием денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле [7]. Содержание общего азота в образцах обезжиренного молозива, ферментативных гидролизатах и ультрафильтратах гидролизатов определяли по СТБ ISO 8968-1–2008, массовую долю (м. д.) сухого вещества – по ГОСТ 3626–76 (п. 3).

В целях оценки АОА опытных образцов применяли флуориметрический метод – ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). ORAC-метод основан на измерении во времени уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ), что наблюдается при его связывании с кислородными радикалами. Антиоксиданты в реакционной среде, взаимодействуя с радикалами, замедляют свободнорадикальное

окисление ФЛ. Степень уменьшения флуоресценции – это мера степени деградации ФЛ под воздействием кислородных радикалов. Подход, использованный в работе, основан на определении АОА образцов по их способности связывать свободные радикалы, образованные в системе Фентона. В экспериментальной работе применяли методику, описанную в [8].

Для оценки антигенных свойств белков молока и продуктов их протеолиза применяли *двойную радиальную иммунодиффузию в агарозном геле* (по Ухтерлони) с использованием кроличьих антисывороток (Ас) к β-лг и ЛФ. Метод основан на образовании гетеромерных комплексов – [антиген – антитело]–, формирующих преципитат в агарозном геле в результате встречной диффузии Ас и компонентов раствора белка или гидролизата, анализируемых на содержание бивалентных антигенных детерминант [9].

Антимутагенную активность ультрафильтратов ферментативных гидролизатов молозива (без ингибиторов протеаз) определяли в модифицированном тесте Эймса по [10]. В краткосрочном тесте для изучения антимутагенных свойств тест-моделями выступали индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100. В качестве прямых мутагенов применяли этидиум бромид для штамма *S. typhimurium* TA 98 и азид натрия – для штамма TA 100. Антимутагенную активность оценивали в ряду концентраций гидролизатов молозива 0,033–8,7 мг на чашку не менее чем в трех повторностях. Уровень снижения мутирования (I_m , %) рассчитывали по предложенной формуле

$$I_m = 100 - \frac{N_1}{N_2} \cdot 100,$$

где N_1 – число ревертантов в опыте; N_2 – число ревертантов в позитивном контроле. Для проверки статистической значимости результатов проводили расчет по методу множественных сравнений Даннетта [11].

Результаты исследований и их обсуждение

Представлены экспериментальные данные об алгоритме исследования белкового компонента нативного и гидролизованного коровьего молозива, оценке его антирадикального потенциала, антимутагенных и антигенных свойств.

Результаты анализа белково-пептидного состава обезжиренного молозива и его гидролизатов методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле отражены на рис. 1. Для образцов нативного молозива установлено высокое содержание фракции иммуноглобулинов (Igs, молекулярная масса составляет 50 кДа), сопоставимое с ним количество казеина (19–25 кДа), наличие БСА (66 кДа), ЛФ (80 кДа) и других белков сывороточной фракции (α-ла, β-лг – 14 и 18 кДа соответственно) (см. рис. 1, дорожки 2 и 5).

В гидролизате молозива, полученном с применением алкалазы, выявлены многочисленные продукты частичного протеолиза Igs, установлено расщепление казеина, а также сывороточных белков α-ла и β-лг (см. рис. 1, дорожка 3). Напротив, в гидролизате молозива, полученном при использовании нейтразы, сохраняются нативные Igs, отмечается частичное расщепление казеина и β-лг (см. рис. 1, дорожка 6). Ультрафильтраты гидролизатов содержат низкомолекулярную фракцию пептидов, которые не определяются данным методом (см. рис. 1, дорожки 4 и 7).

Таким образом, для экспериментального образца молозива, расщепленного алкалазой, характерна большая глубина гидролиза белковых субстратов, чем в ферментативной реакции с нейтразой.

Согласно результатам определения общего белка в нативных и гидролизованных образцах в гидролизате молозива, обезжиренного алкалазой, содержится $(29,1 \pm 1,2)$ % фракции с молекулярной массой, меньшей или равной 10 кДа, а при использовании нейтразы – $(32,6 \pm 1,0)$ %. Наряду с сопоставимым количеством низкомолекулярной фракции в обоих гидролизатах алкалаза за счет широкой сайт-специфичности обеспечивает расщепление белковых субстратов (казеина, α-ла и β-лг) на короткоцепочечные пептиды.

На следующем этапе работы представлена *характеристика антирадикальной активности образцов нативного и гидролизованного молозива согласно данным ORAC-метода*.

Определена АОА нативных и ферментативно расщепленных образцов по их способности связывать свободные радикалы, что приводит к замедлению свободнорадикального окисления ФЛ. Согласно полученным данным строили графики зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации сухого вещества в анализируемых образцах. Далее, рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50 % подавлению флуоресценции. Возрастание ингибирования свободнорадикального окисления ФЛ с 20 до 90 % отмечено при внесении в систему 0,1–1000,0 мкг/мл экспериментальных образцов. Максимальный антирадикальный эффект отмечен в экспериментах с применением ферментативных гидролизатов молозива и их ультрафильтратов.

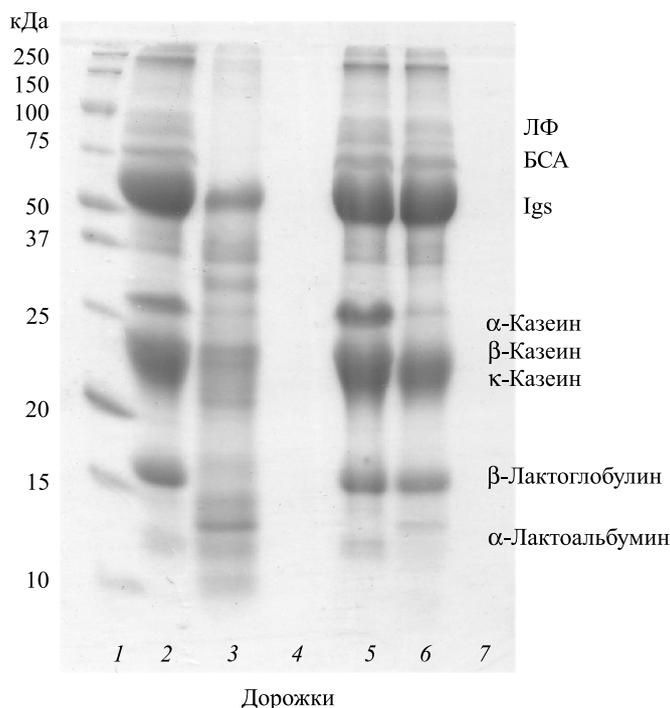


Рис. 1. Электрофореграмма опытных образцов обезжиренного молозива, его гидролизатов и ультрафильтратов гидролизатов: 1 – маркер; 2 – обезжиренное молозиво (контроль, без алкалазы); 3 – гидролизат обезжиренного молозива (внесение алкалазы); 4 – фильтрат гидролизата молозива (алкалаза); 5 – обезжиренное молозиво (контроль, без нейтразы); 6 – гидролизат обезжиренного молозива (внесение нейтразы); 7 – фильтрат гидролизата молозива (нейтраза)

Fig. 1. Electrophoregram of test samples of skimmed colostrum, its hydrolysates and ultrafiltrates of hydrolysates: 1 – marker; 2 – skimmed colostrum (control, without alkalase); 3 – hydrolysate of skimmed colostrum (addition of alkalase); 4 – filtrate of colostrum hydrolysate (alkalase); 5 – skimmed colostrum (control, without neutrase); 6 – hydrolysate of skimmed colostrum (addition of neutrase); 7 – filtrate of colostrum hydrolysate (neutrase)

Содержание белка в образцах нативного и гидролизованного молозива составило 28,7–33,9 мг/мл, тогда как в ультрафильтратах гидролизатов оно равнялось 8,7–10,7 мг/мл. Вместе с тем массовая доля белка в исходном обезжиренном молоке и гидролизатах по отношению к сухому веществу достигала 50,8–58,1 %, а в ультрафильтратах гидролизатов – лишь 23,6–30,5 %. В связи с этим уровень АОА рассчитывали на содержание как сухого вещества, так и белка, чтобы объективно оценить вклад белковой и небелковой составляющих.

Результаты сравнительного анализа антирадикальной активности образцов нативного и гидролизованного молозива, полученных с применением различных протеаз, представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Характеристика антиоксидантных свойств
 нативного и гидролизованного коровьего молозива**

Table 1

Characteristic of antioxidant properties of native and hydrolysed bovine colostrum

Наименование образца	IC ₅₀ , микрограммов сухого вещества на 1 мл	IC ₅₀ , микрограммов белка на 1 мл
Обезжиренное молозиво (контроль, без алкалазы)	180,0 ± 2,2	99,5 ± 1,2
Гидролизат обезжиренного молозива (внесение алкалазы)	35,7 ± 1,5	18,1 ± 0,7
Фильтрат гидролизата молозива (внесение алкалазы)	25,4 ± 2,3	6,2 ± 0,5
Обезжиренное молозиво (контроль, без нейтразы)	199,5 ± 7,7	104,0 ± 4,0

Окончание табл. 1
Ending table 1

Наименование образца	IC ₅₀ , микрограммов сухого вещества на 1 мл	IC ₅₀ , микрограммов белка на 1 мл
Гидролизат обезжиренного молозива (внесение нейтразы)	105,7 ± 4,6	61,4 ± 2,7
Фильтрат гидролизата молозива (внесение нейтразы)	56,2 ± 1,6	17,1 ± 0,5

Значения IC₅₀ для образцов нативного обезжиренного молозива достигали 180,0–199,5 мкг сухого вещества на 1 мл и 99,5–104,0 мкг белка на 1 мл. В результате ферментативного гидролиза алкалазой и нейтразой АОА увеличилась в 5,0 и 1,9 раза соответственно (в расчете на сухое вещество). После ультрафильтрации образцов зафиксировано возрастание антирадикальных свойств продуктов гидролиза алкалазой дополнительно в 1,4 и 2,9 раза согласно содержанию сухого вещества и белка, в случае расщепления нейтразой – в 1,9 и 3,6 раза. В соответствии с экспериментальными данными АОА ультрафильтрата не столь существенно превышает показатели, установленные после гидролиза алкалазой (в расчете на сухое вещество). Напротив, в связи с относительно невысокой глубиной гидролиза белков нейтразой образец после ультрафильтрации обогащается пептидной фракцией, обуславливающей антирадикальную активность.

В целом АОА ультрафильтрата гидролизата, полученного с применением алкалазы, возросла в 7,1 раза по сравнению с нативным коровьим молозивом, в случае нейтразы – в 3,5 раза (в расчете на сухое вещество). Установлено, что с увеличением глубины гидролиза белковых субстратов наблюдается возрастание их антирадикальной активности. Максимальный антиоксидантный потенциал показан для гидролизата молозива, изготовленного с использованием алкалазы, и соответствующего ультрафильтрата.

Изучены *антимутагенные свойства экспериментальных образцов ультрафильтратов гидролизатов молозива (пептидной фракции с молекулярной массой, меньшей или равной 10 кДа)*. При выборе диапазона концентраций объектов исследования учитывали антибактериальный эффект, а также результаты, полученные ранее при оценке антимутагенной активности сывороточных белков молока и их ферментативных гидролизатов [12]. Выявлено, что гидролизаты молозива в диапазоне концентраций 0,033–8,7 мг на чашку не проявляли бактериостатический или бактерицидный эффект в отношении тест-модели *S. typhimurium* штаммов TA 98 и TA 100, что могло бы привести к ложноположительным результатам.

Статистически значимое снижение индуцированного мутирования установлено для всех вариантов эксперимента с использованием опытных образцов гидролизатов молозива. Выявленные различия в числе ревертантов в контроле и опыте были статистически достоверны ($p < 0,05$) при внесении в тест-систему 0,033–8,7 мг образцов гидролизатов на чашку, что отражено в табл. 2–5. Наиболее выраженный эффект снижения уровня мутирования отмечен в экспериментах с опытным образцом гидролизата молозива, полученным с применением алкалазы, что для штамма *S. typhimurium* TA 98 составило 10,0–29,6 % и для штамма TA 100 равнялось 12,5–32,4 %. В случае гидролизата, полученного с использованием нейтразы, эффект снижения индуцированного мутирования при тестировании на штамме *S. typhimurium* TA 98 достигал 8,4–15,6 % и на штамме TA 100 он составил 7,9–12,6 %.

По результатам проведенного ранее электрофоретического анализа для экспериментального образца молозива, расщепленного алкалазой, характерна большая глубина гидролиза белковых субстратов, чем в ферментативной реакции с нейтразой.

Таблица 2

Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива (*гидролиз алкалазой*) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 98

Table 2

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (*hydrolysis with alcalase*) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 98

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	176 ± 6	29,6
2,175	191 ± 12	23,6

Окончание табл. 2
 Ending table 2

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
0,544	197 ± 5	21,2
0,136	211 ± 12	15,6
0,033	225 ± 9	10,0
0	21 ± 2	–
Контроль позитивный	250 ± 23	–

Примечание. Мутаген – этидиум бромид, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Таблица 3

Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива (*гидролиз алкалазой*) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 100

Table 3

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (*hydrolysis with alcalase*) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 100

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	588 ± 23	32,4
2,175	617 ± 24	29,1
0,544	696 ± 27	20,0
0,136	713 ± 13	18,0
0,033	761 ± 17	12,5
0	88 ± 7	–
Контроль позитивный	870 ± 56	–

Примечание. Мутаген – азид натрия, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Таблица 4

Статистическая оценка антимутагенной активности опытного образца гидролизата молозива (*гидролиз нейтразой*) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 98

Table 4

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (*hydrolysis with neutrase*) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 98

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	211 ± 9	15,6
2,175	214 ± 10	14,4
0,544	220 ± 15	12,0
0,136	225 ± 12	10,0
0,033	229 ± 13	8,4
0	21 ± 2	–
Контроль позитивный	250 ± 23	–

Примечание. Мутаген – этидиум бромид, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Таблица 5

Статистическая оценка антимуtagenной активности опытного образца гидролизата молозива (*гидролиз нейтразой*) в тесте Эймса на штамме *S. typhimurium* TA 100

Table 5

Statistical evaluation of antimutagenic activity of the colostrum hydrolysate test sample (*hydrolysis with neutrase*) by the Ames test performed on the strain *S. typhimurium* TA 100

Количество образца, миллиграммов на чашку	Количество ревертантов, $x_{cp} \pm \sigma$	Уровень снижения мутирования, %
8,7	760 ± 28	12,6
2,175	772 ± 23	11,3
0,544	775 ± 27	10,9
0,136	797 ± 12	8,4
0,033	801 ± 13	7,9
0	88 ± 7	–
Контроль позитивный	870 ± 56	–

Примечание. Мутаген – азид натрия, 10 мкг на чашку. Ответ штамма на мутаген был в стандартных пределах.

Наряду с сопоставимым количеством низкомолекулярной фракции в обоих гидролизатах алкалаза за счет широкой сайт-специфичности обеспечивает расщепление белковых субстратов (казеина, α -ла и β -лг) на короткоцепочечные пептиды. С увеличением глубины гидролиза белковых субстратов показано возрастание их антимуtagenной активности. Более высокий антимуtagenный потенциал установлен для гидролизата молозива (пептидной фракции с молекулярной массой, меньшей или равной 10 кДа), изготовленного с помощью алкалазы.

Полученные нами экспериментальные данные сопоставимы с результатами ряда авторов. Так, в [13] изучали биологически активные свойства α - и β -казеина, ферментированного термофильными молочнокислыми бактериями *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581. Показано снижение мутагенного действия 4-нитрохиолин-1-оксида на штаммах *S. typhimurium* TA 98 и TA 100 при внесении в тест-систему гидролизатов α - и β -казеина, при этом антимуtagenный эффект гидролизатов увеличился с возрастанием степени гидролиза белковых субстратов.

В соответствии с [6] определены антимуtagenные и антиоксидантные свойства пептидных фракций из образцов йогурта, полученных путем ферментации молока комбинациями пробиотических молочнокислых бактерий *Lactobacillus acidophilus* (ATCC® 4356™), *Lb. casei* (ATCC® 393™) и *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* (ATCC® ВАА52™). В качестве мутагена в систему вносили азид натрия (0,1–5,0 мкг на чашку). При измерении уровня АОА оценивали восстановление катион-радикала (ABTS^{•+}, полученного на основе диаммониевой соли 2,2'-азино-бис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты]). В эксперименте для изученных пептидных фракций со степенью гидролиза 5,38–11,91 % антимуtagenный эффект составил 15,87–26,35 %, тогда как IC₅₀ достигала 2,43–1,63 мг/мл. Увеличение степени расщепления белков молока коррелировало с возрастанием антимуtagenных и антирадикальных свойств.

Согласно литературным источникам [6; 14] и собственным экспериментальным данным показано возрастание антимуtagenного и антиоксидантного потенциала гидролизованных белков молока с увеличением глубины протеолиза.

Исследованы антигенные свойства одного из основных аллергенов молока (β -лг) до гидролиза и после гидролиза молозива ферментами алкалазой и нейтразой. Кроме того, с применением иммунохимического подхода оценена сохранность в гидролизатах ценного белка ЛФ.

В эксперименте определяли наличие бивалентных антигенных детерминант β -лг в образцах нативного и гидролизованного молозива (рис. 2, а). Преципитат образовался в реакции антисыворотки с образцом нативного молозива и гидролизата, полученного с применением нейтразы (см. рис. 2, а, 2 и 5). Вместе с тем β -лг расщепляется алкалазой и не выявляется иммунохимически (см. рис. 2, а, 3), что подтверждается результатами электрофоретического анализа (см. рис. 1, дорожка 3).

Фильтраты обоих гидролизатов не содержат бивалентных антигенных детерминант β -лг, которые были расщеплены либо ферментативно, либо удалены в процессе ультрафильтрации (см. рис. 2, а, 4 и 6). Так, применение высокоактивной сериновой протеазы (алкалазы) обеспечивает получение гипоаллергенных ферментативных гидролизатов коровьего молозива.

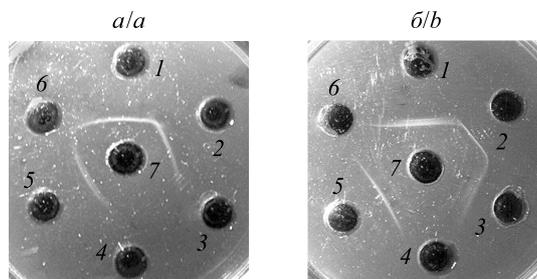


Рис. 2. Двойная радиальная иммунодиффузия в агарозном геле с применением антисывороток против β -лг (а) и ЛФ (б): оценка антигенных свойств β -лг (а) и сохранности ЛФ (б) до ферментативного гидролиза алкалазой и нейтразой и после него:

1 – белок-антиген (контроль): β -лг – 0,06 мг/мл (а), ЛФ – 1,0 мг/мл (б);

2 – молозиво (контроль, без фермента), 0,3 мг/мл (а), 30 мг/мл (б);

3 – гидролизат молозива (внесение алкалазы), 0,3 мг/мл (а), 30 мг/мл (б);

4 – фильтрат гидролизата молозива (алкалаза), 10 мг/мл;

5 – гидролизат молозива (внесение нейтразы), 0,3 мг/мл (а), 30 мг/мл (б);

6 – фильтрат гидролизата молозива (нейтразы), 10 мг/мл; 7 – Ас против β -лг (а) или ЛФ (б)

Fig. 2. Double radial immunodiffusion in an agarose gel using antiserum against β -lg (a) and LF (b): evaluation of antigenic properties of β -lg (a) and safety of LF (b) before and after enzymatic hydrolysis with alcalase and neutrase: 1 – protein-antigen (control): β -lg – 0.06 mg/ml (a), LF – 1.0 mg/ml (b);

2 – colostrum (control, without enzyme), 0.3 mg/ml (a), 30 mg/ml (b);

3 – colostrum hydrolysate (addition of alcalase), 0.3 mg/ml (a), 30 mg/ml (b);

4 – filtrate of colostrum hydrolysate (alcalase), 10 mg/ml;

5 – colostrum hydrolysate (addition of neutrase), 0.3 mg/ml (a), 30 mg/ml (b);

6 – filtrate of colostrum hydrolysate (neutrase), 10 mg/ml; 7 – As against β -lg (a) or LF (b)

По данным двойной радиальной иммунодиффузии, лактоферрин обнаружен в образцах исходного и гидролизованного молозива (см. рис. 2, б, 2, 3 и 5); полученные ультрафильтраты не содержат данный белок (см. рис. 2, б, 4 и б). Согласно результатам электрофореза следовое количество ЛФ выявлено в гидролизате молозива, полученном с применением нейтразы (см. рис. 1, дорожка б), однако данный белок не обнаружен после ферментативного расщепления алкалазой (см. рис. 1, дорожка 3). Очевидно, под действием сериновой протеазы образуется продукт частичного протеолиза ЛФ, содержащий бивалентные антигенные детерминанты, что обуславливает образование преципитата в реакции иммунодиффузии.

Заключение

Таким образом, представлена сравнительная характеристика биологически активных свойств ферментативных гидролизатов коровьего молозива, полученных с применением сериновой протеазы (алкалазы) и металлопротеазы (нейтразы). Для образца, подвергнутого гидролизу алкалазой и ультрафильтрации, установлено возрастание антирадикальных свойств в 7,1 раза, при расщеплении нейтразой – в 3,5 раза. В случае анализа пептидной фракции, полученной после гидролиза алкалазой, снижение уровня мутирования в тест-системе составило 10,0–29,6 % для штамма *S. typhimurium* TA 98, 12,5–32,4 % – для штамма TA 100, что превышает показатели, характерные для продуктов расщепления нейтразой. По результатам электрофоретического разделения образцов и иммунопреципитации алкалаза эффективнее расщепляет белки молозива, чем нейтразы, что обуславливает низкий аллергенный потенциал полученной пептидной фракции. В соответствии с данными иммунохимического анализа лактоферрин обнаружен в образцах нативного и гидролизованного молозива. Установлено, что уменьшение антигенных свойств гидролизатов и увеличение антирадикального и антимуtagenного действий пептидной фракции связаны с возрастанием степени расщепления белкового компонента молозива.

Библиографические ссылки

1. Conte F., Scarantino S. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment // Int. Food Research J. 2013. Vol. 20, № 2. P. 925–931.
2. Mills S., Ross R. P., Hill C., et al. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health // Int. Dairy J. 2011. Vol. 21, issue 6. P. 377–401. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.12.011.
3. El-Agamy E. I. The challenge of cow milk protein allergy // Small Rumin. Res. 2007. Vol. 68. P. 64–72.
4. Halavach T. M., Kurchenko V. P., Albulov A. I. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology // Nauka i studia. 2016. Vol. 3. P. 1196–1207.

5. Zulueta A., Maurizi A., Frigola A., et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk // *Int. Dairy J.* 2009. Vol. 19, issues 6–7. P. 380–385. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.02.003.
6. Sah B. N., Vasiljevic T., McKechnie S., et al. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt // *Food Chem.* 2014. Vol. 156. P. 264–270. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.105.
7. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М. : Наука, 1981.
8. Тарун Е. И. Сравнение антиоксидантных активностей галловой, кофейной и хлорогеновой кислот // *Тр. БГУ.* 2014. Т. 9 : в 2 ч. Ч. 1. С. 186–191.
9. Фримель Х. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. М. : Медицина, 1987.
10. Дудчик Н. В. Количественная оценка антимутагенной активности растительной композиции в краткосрочном тесте // *Здоровье и окружающая среда.* 2014. Вып. 24, т. 1. С. 218–221.
11. Гланц С. Медико-биологическая статистика : пер. с англ. М. : Практика, 1998.
12. Golovach T. N., Dudchik N. V., Veremeenko E. G., et al. Evaluation of antimutagenic and antifungal properties, parameters of acute toxicity and sensitizing activity of enzymatic whey protein hydrolysate // *Foods and Raw Mater.* 2016. Vol. 4, № 2. P. 38–47. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-38-47.
13. Espeche Turbay M. B., A. de Moreno de LeBlanc, Perdigon G., et al. β -Casein hydrolysate generated by the cell envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581 protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice // *J. Dairy Sci.* 2012. Vol. 95, issue 3. P. 1108–1118. DOI: 10.3168/jds.2011-4735.

References

1. Conte F., Scarantino S. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment. *Int. Food Research J.* 2013. Vol. 20, No. 2. P. 925–931.
2. Mills S., Ross R. P., Hill C., et al. Milk intelligence: mining milk for bioactive substances associated with human health. *Int. Dairy J.* 2011. Vol. 21, issue 6. P. 377–401. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.12.011.
3. El-Agamy E. I. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin. Res.* 2007. Vol. 68. P. 64–72.
4. Halavach T. M., Kurchenko V. P., Albulov A. I. Enzymatic hydrolysis of milk proteins as a basis of specialized food products biotechnology. *Nauka i studia.* 2016. Vol. 3. P. 1196–1207.
5. Zulueta A., Maurizi A., Frigola A., et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* 2009. Vol. 19, issues 6–7. P. 380–385. DOI: 10.1016/j.idairyj.2009.02.003.
6. Sah B. N., Vasiljevic T., McKechnie S., et al. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chem.* 2014. Vol. 156. P. 264–270. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.01.105.
7. Osterman L. A. [Methods for studying proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation]. Moscow : Nauka, 1981 (in Russ.).
8. Tarun E. I. [Comparison of antioxidant activities of gallic, coffee and chlorogenic acids]. *Proc. BSU.* 2014. Vol. 9 : in 2 parts. Part 1. P. 186–191 (in Russ.).
9. Frimel H. [Immunological methods]. Moscow : Meditsina, 1987 (in Russ.).
10. Dudchik N. V. [Quantitative evaluation of antimutagenic activity of plant composition in a short-term test]. *Zdor. okruzh. sreda.* 2014. Issue 24, vol. 1. P. 218–221 (in Russ.).
11. Glanz S. [Medico-biological statistics]. Moscow : Praktika, 1998 (in Russ.).
12. Golovach T. N., Dudchik N. V., Veremeenko E. G., et al. Evaluation of antimutagenic and antifungal properties, parameters of acute toxicity and sensitizing activity of enzymatic whey protein hydrolysate. *Foods and Raw Mater.* 2016. Vol. 4, No. 2. P. 38–47. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-38-47.
13. Espeche Turbay M. B., A. de Moreno de LeBlanc, Perdigon G., et al. β -Casein hydrolysate generated by the cell envelope-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* CRL 581 protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice. *J. Dairy Sci.* 2012. Vol. 95, issue 3. P. 1108–1118. DOI: 10.3168/jds.2011-4735.

Статья поступила в редакцию 15.01.2018.
Received by editorial board 15.01.2018.

УДК 615.322+615.017

ИССЛЕДОВАНИЕ АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ РОДОДЕНДРОНА АДАМСА (*RHODODENDRON ADAMSII* REHDER.) НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ *in vivo*

О. И. ГУБИЧ¹⁾, К. В. ПУЧКОВА¹⁾, Н. А. ЗАЛЕССКАЯ¹⁾, Н. В. КРЮЧКОВА¹⁾

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

Изучено влияние препарата рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.) на показатели энергетического и углеводного обмена лабораторных мышей в условиях повышенной физической нагрузки. Проведен анализ возможности коррекции величин биохимических маркеров углеводного обмена у лабораторных крыс с экспериментальным сахарным диабетом и экспериментальной гиперфагией. Установлено, что в условиях физической нагрузки отвар рододендрона проявляет адаптогенные свойства, которые обуславливают более высокие значения содержания креатинфосфата и общего пула макроэргов в скелетной мускулатуре и концентрации глюкозы в крови животных, получавших данный препарат, по сравнению с соответствующим контролем. При этом рододендрон Адамса оказывает минимальное влияние на энергетический и углеводный обмен интактных животных, а его двукратная передозировка не сопровождается появлением судорог, гиперактивности и повышенной агрессивности в отличие от коммерческого энергетика «Hell» (препарат сравнения). Показано, что употребление отвара рододендрона крысами с экспериментальной гиперфагией и экспериментальным сахарным диабетом способствует частичной нормализации ряда маркеров углеводного обмена (активность α -амилазы, концентрация глюкозы, содержание пирувата). В условиях аллоксанового диабета действие отвара оказалось более эффективным, чем противодиабетического сбора «Садифит». Полученные результаты могут быть обусловлены наличием в составе рододендрона Адамса флавоноидов, аскорбиновой кислоты и ненасыщенных жирных кислот, проявляющих антиоксидантный эффект, а также гликозидов, терпенов и дитерпенов, способствующих повышению проницаемости клеточной мембраны для глюкозы.

Ключевые слова: адаптоген; углеводный обмен; энергетический обмен; физическая нагрузка; экспериментальная гиперфагия; аллоксаниндуцированный сахарный диабет.

THE INVESTIGATION OF THE ADAPTOGENIC PROPERTIES OF *RHODODENDRON ADAMSII* REHDER. ON EXPERIMENTAL MODELS *in vivo*

A. I. HUBICH^a, K. V. PUCHKOVA^a, N. A. ZALESSKAYA^a, N. V. KRYUCHKOVA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. I. Hubich (hubich_oksana@tut.by)

This work is devoted to the study of the influence of *Rhododendron adamsii* Rehder. on the energy and carbohydrate metabolism of laboratory mice under conditions of physical activity, as well as to the analysis of the possibility of correction of biochemical markers of carbohydrate metabolism in laboratory rats with experimental diabetes mellitus and

Образец цитирования:

Губич О. И., Пучкова К. В., Залеская Н. А., Крючкова Н. В. Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.) на экспериментальных моделях *in vivo* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 60–68.

For citation:

Hubich A. I., Puchkova K. V., Zalesskaya N. A., Kryuchkova N. V. The investigation of the adaptogenic properties of *Rhododendron adamsii* Rehder. on experimental models *in vivo*. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 60–68 (in Russ.).

Авторы:

Оксана Игоревна Губич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.
Кристина Вячеславовна Пучкова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.
Наталья Александровна Залеская – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.
Наталья Владимировна Крючкова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Authors:

Aksana I. Hubich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology. hubich_oksana@tut.by
Kristina V. Puchkova, student at the faculty of biology. kristina_8835@mail.ru
Natalya A. Zalesskaya, student at the faculty of biology. natik-name@mail.ru
Natalya V. Kryuchkova, student at the faculty of biology. knv1563@tut.by

experimental hyperphagia. It has been established that in the conditions of physical activity the *Rhododendron* decoction shows adaptogenic properties, which is manifested by higher values of the content of creatine phosphate and the total pool of macroergs in skeletal muscles, as well as the glucose concentration in the blood of the animals received this preparation, in comparison with the corresponding control, while *Rhododendron adamsii* has a minimal effect on the energy and carbohydrate metabolism of intact animals, and its double overdose is not accompanied by the appearance of seizures, hyperactivity and increased aggression, in contrast to the commercial energy drink «Hell» (the reference drug). It is shown that the use of *Rhododendron* decoction by the rats with experimental hyperphagia and experimental diabetes mellitus contributes to the partial normalization of carbohydrate metabolism markers (α -amylase activity, glucose concentration, pyruvate content). The effect of the preparation tested was more pronounced under alloxan diabetes than the effect of the anti-diabetic «Sadifit» collection. The results obtained may be due to the presence of flavonoids, ascorbic acid and unsaturated fatty acids showing an antioxidant effect, as well as glycosides, terpenes and diterpenes, which promote the permeability of the cell membrane for glucose.

Key words: adaptogen; carbohydrate metabolism; energy exchange; exercises; experimental hyperphagy; alloxan-induced diabetes mellitus.

Введение

Изменение темпа жизни, вредное воздействие окружающей среды и производственной деятельности, наблюдаемые в наше время, зачастую приводят к резкому снижению адаптационных возможностей и функциональных резервов организма [1]. По данным некоторых авторов, образование свободных радикалов во время стресса может приводить к более чем 100 различным заболеваниям [2]. Именно поэтому изучение закономерностей адаптационного процесса и поиск средств и способов повышения функциональных резервов организма являются одной из основных задач современных медико-биологических наук.

Для повышения устойчивости организма к воздействию неблагоприятных факторов используются лекарственные препараты различных групп, наиболее универсальными из которых являются природные адаптогены, повышающие работоспособность организма и переводящие его в состояние неспецифической повышенной сопротивляемости [3; 4]. Относительная безвредность и широта терапевтического действия этих природных средств делают их особо ценными для повышения работоспособности людей в необычных климатических условиях, при статических и динамических производственных перегрузках, для профессиональных спортсменов, пожилых людей, в том числе страдающих хроническими заболеваниями, а также повышения работоспособности и умственной активности любого человека [5; 6]. Установлено, что действие адаптогенов на организм человека многовекторно: они проявляют иммуностимулирующую активность и улучшают пластический обмен, стимулируют центральную нервную и эндокринную системы, модулируют чувствительность клеточных рецепторов к гормонам и избирательную проницаемость биологических мембран, регулируют экспрессию ряда генов, оказывают антиоксидантное действие и активируют ферменты энергетического обмена, что в конечном итоге приводит к «экономизации» обмена веществ и адаптации организма к неблагоприятным условиям [7–11]. Благодаря своим уникальным свойствам многие природные адаптогены используются достаточно широко: женьшень (*Panax ginseng* C. A. Mey), элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*), имбирь аптечный (*Zingiber officinale*), аралия маньчжурская (*Aralia mandshurica* Rupr. et Maxim), лимонник китайский (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill), мумиё, прополис, пантокрин [5]. Другие находятся на этапе всестороннего исследования и внедрения в фармакологическую практику. Одним из таких препаратов является рододендрон Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.), более известный как саган-дайля. Встречается данное растение на Дальнем Востоке, Алтае, северо-восточных предгорьях Тибета, побережье Охотского моря, о. Сахалин, в Прибайкалье, Восточном и Западном Саяне. Отвары и спиртовые настойки рододендрона Адамса широко применяются в тибетской и монгольской народной медицине благодаря своим тонизирующим, антибактериальным, иммуностимулирующим, противовоспалительным и антиоксидантным свойствам [12–15]. Изучение химического состава позволило установить в надземной части данного растения наличие флавоноидов (кверцетин, дигидрокверцетин, мирицетин, нарингин, арбутин, гиперозид, авикулярин), дубильных веществ (4,85–6,9 %), гликозидов, кумаринов, эфирных масел (3-фарнезен, аромадендрен, *транс*-неролидол), жирных кислот (0,02 %) (в листьях – бегеновой кислоты, в стеблях – линолевой), кислот с циклопропановым фрагментом (0,1–0,5 %), пренилированных фенолов (даурихромоновая кислота, метиловый эфир каннабигероциновой кислоты и соединения циклобутаоктагидроксантиенового типа) [16–18]. Ряд авторов обращают внимание на присутствие в зеленых листьях растения карденолидов, аскорбиновой кислоты, фенолкарбоновых кислот (салициловая, протокатеховая, ванилиновая) и гидроксикоричных кислот (феруловая, синаповая, кофейная), ксантенола [19; 20].

По-видимому, именно богатый химический состав позволяет использовать данное растение в нетрадиционной медицине в качестве вспомогательного средства для стимуляции сердечной деятельности, укрепления иммунитета при простудных заболеваниях, болезнях почек и пищеварительной системы, воспалительных заболеваниях горла и полости рта, мочевыводящей системы и суставов, а также для промывания ран и язв на коже и слизистых оболочек [21; 22]. В традиционной медицине данное растение не используется, однако в последние годы оно начало активно проникать на белорусский рынок и пользуется большим спросом среди любителей траволечения и обычных граждан как сильно тонизирующее и адаптогенное средство.

В связи с отсутствием в доступной литературе достоверной информации о результатах всестороннего клинико-биологического тестирования действия данного растения целью настоящей работы стало изучение влияния отвара рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.) на показатели энергетического и углеводного обмена лабораторных мышей в условиях повышенной физической нагрузки, а также анализ возможности коррекции биохимических маркеров углеводного обмена у лабораторных крыс с экспериментальным сахарным диабетом и ожирением, вызванным экспериментальной гиперфагией.

Материалы и методы исследований

Работа выполнена на беспородных белых мышках-самцах массой 30–50 г (исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса в условиях физической нагрузки) и беспородных белых крысах-самцах массой 180–200 г (модель экспериментальной гиперфагии и экспериментальная модель аллоксаниндуцированного сахарного диабета). Лабораторные мыши были предоставлены сотрудниками вивария ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Все эксперименты выполнялись в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях на биологическом факультете БГУ, составленными на основании рекомендаций и требований Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Страсбург, 1986).

Во всех экспериментальных моделях использовали коммерческий препарат рододендрона Адамса (ООО «Иван-чай», Республика Бурятия, Россия), отвар которого готовили в соответствии с прилагающейся инструкцией и предоставляли для питья соответствующим группам экспериментальных животных вместо питьевой воды (экспериментальные модели сахарного диабета и гиперфагии) или вводили в дозе 2 мл/кг однократно перорально с помощью пипетки перед проведением экспериментальных процедур (изучение адаптогенных свойств в условиях физической нагрузки).

Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса в условиях физической нагрузки предполагало плавание животных в воде комнатной температуры (24,5 °C) в течение 15 мин. Наступление утомления фиксировали по убыли концентрации глюкозы в крови, содержания суммарной фракции макроэргов и отдельно креатинфосфата в скелетной мускулатуре, приросту концентрации пирувата (предшественник молочной кислоты) в крови подопытных мышей. В качестве препарата сравнения в данной модели эксперимента использовали коммерческий энергетический напиток «Hell» (*Хелл Энерджи Магьярорсзаг Кфт.*, Будапешт, Венгрия). Энергетик вводили лабораторным мышам однократно перорально с помощью пипетки в экспериментально подобранной дозе 2 мл/кг за 10 мин до начала эксперимента.

Для создания экспериментальной модели гиперфагии использовалась «ресторанная диета», составленная из продуктов компании *McDonald's*. Рацион диеты на 1 крысу в день включал: гамбургер – 22 г, картофель фри – 15 г, маффин с черной смородиной – 20 г, кока-колу – 50 мл. Перечисленные продукты в измельченном виде были предоставлены крысам как постоянный выбор. Продолжительность диеты – 7 дней. Среднее энергопотребление у крыс, находившихся на данной диете, равнялось 210 ккал/сут. Содержание белков на 1 крысу составляло 5,6 г, жиров – 12,2 г, углеводов – 22,4 г.

Экспериментальный сахарный диабет индуцировался однократным внутривенным введением аллоксана в дозе 100 мг/кг, забой производился через 7 сут после введения. В качестве препарата сравнения в данной серии использовали аптечный противодиабетический сбор «Садифит» (ЗАО «Лектравы», Житомир, Украина), в состав которого входили: побеги черники (0,2 г/г), створки плодов фасоли обыкновенной (0,2 г/г), чай зеленый листовой (0,15 г/г), листья мяты перечной (0,05 г/г), клубни топинамбура (0,2 г/г), листья стевии (0,2 г/г). Отвар данного препарата готовили в соответствии с прилагающейся инструкцией и предоставляли лабораторным животным для питья вместо питьевой воды в течение 7 сут.

По истечении времени эксперимента лабораторных животных подвергали декапитации и проводили измерение активности α -амилазы и креатинкиназы, содержания глюкозы и пировиноградной кислоты

в крови, определение суммарного содержания основных макроэргов и концентрации креатинфосфата в безбелковом экстракте скелетной мускулатуры, приготовленном, как описано в [23]. Установление активности α -амилазы выполняли по методу Каравея [24], креатинкиназы – по методу Оливера [24], количественное определение суммарного содержания основных макроэргов – по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты [23], содержания креатинфосфата – в соответствии с [23], пирувата – модифицированным методом Умбрайт [24], глюкозы – глюкозоксидазным методом с помощью коммерческого набора реагентов. Для статистических расчетов использовали лицензионный пакет программ *Stadia 6.0*.

Результаты исследований и их обсуждение

Первый этап нашей работы был посвящен изучению адаптогенных свойств отвара рододендрона Адамса в условиях повышенной физической нагрузки, которая, как отмечалось выше, представляла собой плавание в воде лабораторных мышей при температуре 24,5 °С в течение 15 мин. Данная нагрузка приводила к наступлению состояния утомления, проявляющегося в неспособности животных совершать дальнейшие активные плавательные движения, что было проявлением закономерного снижения содержания макроэргов в скелетной мускулатуре животных (суммарное содержание макроэргов оказалось ниже начальных значений на 60 %, содержание креатинфосфата – на 44 %), почти полного истощения концентрации глюкозы в крови (до 15,1 % от начального уровня) и, соответственно, накопления пирувата (+262 % к контролю) (табл. 1). Отсутствие достоверных изменений активности креатинкиназы сыворотки крови свидетельствовало об отсутствии повреждений скелетной мускулатуры и миокарда (данные не приводятся).

Иная картина наблюдалась при аналогичной физической нагрузке, но после однократного приема животными отвара рододендрона в экспериментально подобранной максимально эффективной дозе (2 мл/кг) за 10 мин до начала эксперимента. Так, снижение уровня макроэргов в скелетной мускулатуре было менее выраженным (суммарное содержание составило 63,5 % от исходного, содержание креатинфосфата – 70,9 % к контролю), как и снижение концентрации глюкозы в крови (–56,6 % к контролю) (см. табл. 1). Таким образом, в условиях физической нагрузки рододендрон Адамса проявил важнейшие свойства препаратов группы адаптогенов – обеспечение более экономного расходования субстратов и появление у организма способности оптимального функционирования при меньших затратах энергии, что и обеспечивает адаптацию к повышенным нагрузкам [5]. Примечательно, что наблюдаемый эффект реализовался уже после первого приема отвара, что характерно для немногих растительных адаптогенов (например, для железницы крымской). С другой стороны, инструкция по применению и доступные источники литературы, приведенные в разделе «Введение» настоящей работы, не указывают на необходимость повторного применения препарата для достижения желаемого стимулирующего эффекта. Отмечается также необходимость соблюдения осторожности при приеме препарата лицами с лабильной нервной системой, прием отвара разрешается не позднее чем за пять часов до сна. Высокая скорость реализации стимулирующего эффекта указывает на то, что, вероятно, непосредственные мишени действия активных компонентов исследуемого отвара располагаются не в скелетной мускулатуре, действие оказывается опосредованным образом – через центральную нервную систему или путем выброса простагландинов. Для установления более точного механизма действия отвара рододендрона Адамса в условиях физической нагрузки требуются дополнительные исследования.

Обращает на себя внимание тот факт, что пероральное введение исследуемого отвара интактным мышам в отсутствие физической нагрузки не сопровождалось выраженными изменениями анализируемых показателей углеводного и энергетического обмена (см. табл. 1), что соответствует первому требованию, предъявляемому к препаратам адаптогенного действия, указывающему на возможность действия адаптогена только на соответствующем фоне, с минимальными сдвигами в нормальных условиях или без них [4; 5].

Интересно, что близкие изменения анализируемых показателей наблюдались и при использовании препарата сравнения – энергетика «Hell» в аналогичной дозе (см. табл. 1), однако даже незначительное ее превышение приводило к выраженным признакам передозировки – гиперактивности с последующим периодом покоя, повышенной агрессивности, судорогам. По всей вероятности, наблюдаемые эффекты были вызваны избыточно стимулирующим воздействием на центральную нервную и сердечно-сосудистую системы находящимся в составе напитка кофеином (32 мг/100 мл). Использование отвара рододендрона Адамса в дозах, превышающих описанные в 1,5–2,0 раза, к подобным эффектам не приводило, что подтверждает его относительную безопасность.

На следующем этапе работы изучались возможности коррекции отваром рододендрона Адамса величин маркеров углеводного обмена у крыс с экспериментальным аллоксаниндуцированным сахарным

диабетом. Аллоксан вызывает гибель инсулинпродуцирующих β -клеток в островке поджелудочной железы *in vivo*, что связано с продуцированием во внеклеточной среде и непосредственно в β -клетках супероксиданион-радикалов (O_2^-) [25].

Таблица 1

Значение параметров углеводного и энергетического обмена у лабораторных мышей, подвергнутых физической нагрузке, при использовании энергетического напитка «Hell» и отвара рододендрона Адамса

Table 1

The value of the carbohydrate and energy metabolism parameters of laboratory mice subjected to physical activity when using energy drink «Hell» and *Rhododendron adamsii* decoction

Серия эксперимента	Содержание макроэргов в мышцах, мкмоль/г (% к контролю)	Содержание креатинфосфата в мышцах, мкмоль/г (% к контролю)	Содержание ПВК, мкг/мл (% к контролю)	Концентрация глюкозы, ммоль/л (% к контролю)
Интактные мыши	0,27 ± 0,07 (100,0 %)	2,65 ± 0,17 (100,0 %)	0,29 ± 0,06 (100,0 %)	10,60 ± 1,45 (100,0 %)
Мыши, подвергнутые физической нагрузке	0,11 ± 0,05 (40,1 %)*	1,49 ± 0,04 (56,0 %)*	1,05 ± 0,25 (362,1 %)*	1,60 ± 0,29 (15,1 %)*
Интактные мыши плюс отвар рододендрона Адамса	0,24 ± 0,06 (88,9 %)	2,40 ± 0,10 (90,6 %)	0,26 ± 0,04 (89,7 %)	9,70 ± 0,36 (91,5 %)
Отвар рододендрона Адамса плюс физическая нагрузка	0,17 ± 0,07 (63,5 %)**	1,88 ± 0,08 (70,9 %)**	1,10 ± 0,27 (379,3 %)	4,60 ± 0,35 (43,4 %)**
Интактные мыши плюс энергетик «Hell»	0,28 ± 0,05 (102,2 %)	2,50 ± 0,16 (94,3 %)	0,36 ± 0,04 (124,1 %)*	9,40 ± 0,49 (88,7 %)*
Энергетик «Hell» плюс физическая нагрузка	0,03 ± 0,01 (12,2 %)**	1,87 ± 0,15 (70,64 %)**	0,92 ± 0,10 (317,24 %)	5,0 ± 0,95 (47,17 %)**

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, ** Результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность влияния физической нагрузки, энергетика «Hell» и отвара рододендрона Адамса рассчитана по отношению к значениям анализируемых маркеров интактных мышей (*), а эффектов исследуемых препаратов при физической нагрузке – к показателям интактных животных, подвергнутых плаванию в воде в течение 15 мин (**).

В нашем эксперименте аллоксановый диабет был вызван однократным внутрибрюшинным введением крысам раствора аллоксана в дозе 100 мг/кг. Эффективность используемой модели определялась измерением концентрации глюкозы в сыворотке крови крыс. Уровень глюкозы в сыворотке крови интактных крыс составил ($6,5 \pm 0,9$) ммоль/л, что хорошо согласуется с данными литературы [26]; развитие эффекта аллоксана сопровождалось повышением данного показателя в крови в 5,1 раза, что подтверждает развитие у крыс сахарного диабета (табл. 2). Кроме того, как свидетельствуют результаты табл. 2, развитие экспериментального сахарного диабета у крыс сопровождалось изменением величин важнейших маркеров углеводного обмена – повышением активности α -амилазы на 53,8 % и увеличением содержания пирувата в цельной крови на 69,0 %.

Следующий этап нашего эксперимента был посвящен изучению возможной коррекции углеводного обмена у крыс с экспериментальным сахарным диабетом анализируемым отваром. Основанием для проведения исследования послужил тот факт, что в ряде работ показан достоверный поддерживающий эффект природных адаптогенов растительного происхождения у людей с инсулинозависимым сахарным диабетом [4; 27]. Более того, ранее проведенное на кафедре биохимии биологического факультета БГУ исследование возможной коррекции изменений углеводного и белкового обмена у крыс с аллоксановым диабетом, равно как и у животных, находившихся на экспериментальной «ресторанной диете» с преобладанием легкоусвояемых углеводов, путем ежедневного введения крысам аптечных препаратов элеутерококка, женьшеня, аралии маньчжурской, железницы крымской также подтверждает возможность использования для этих целей растительных адаптогенов [28–31].

Использование отвара рододендрона крысами с аллоксановым диабетом значительно улучшало анализируемые маркеры сыворотки крови (см. табл. 2). Так, концентрация глюкозы в данном случае снижалась в 4,7 раза по сравнению с крысами, страдающими диабетом, но не получавшими данный препарат,

активность α -амилазы – в 2,1 раза, содержание пирувата – на 28 %. Таким образом, препарат рододендрона Адамса, в соответствии с нашими результатами, действительно способен значительно улучшать показатели углеводного обмена у крыс с экспериментальным диабетом без достоверного влияния на таковые интактных животных.

Таблица 2

Влияние отваров растительных адаптогенов на показатели углеводного обмена в сыворотке крови у крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Table 2

The effect of plant adaptogen's decoctions on carbohydrate metabolism serum markers in rats with experimental diabetes mellitus

Серия	Показатели углеводного обмена		
	Содержание ПВК, мкг/мл (% к контролю)	Активность α -амилазы, граммов крахмала на 1 л в час (% к контролю)	Концентрация глюкозы, ммоль/л (% к контролю)
Интактные крысы (контроль)	8,4 ± 0,9 (100,0 %)	23,2 ± 1,1 (100,0 %)	6,5 ± 0,72 (100,0 %)
Экспериментальный сахарный диабет	14,2 ± 0,9 (169,0 %)*	35,7 ± 6,0 (153,8 %)*	32,8 ± 1,1 (507,1 %)*
Отвар рододендрона Адамса (7 сут)	6,5 ± 2,3 (77,4 %)*	23,5 ± 1,7 (101,6 %)	6,7 ± 0,2 (102,5 %)
Экспериментальный сахарный диабет плюс отвар рододендрона Адамса (7 сут)	12,1 ± 1,2 (143,1 %)**	17,2 ± 0,9 (74,3 %)**	7,0 ± 1,9 (107,5 %)**
Отвар сбора «Садифит» (7 сут)	10,7 ± 0,9 (126,9 %)*	22,2 ± 1,1 (95,8 %)	9,1 ± 1,3 (140,6 %)*
Сахарный диабет плюс отвар сбора «Садифит» (7 сут)	12,3 ± 1,3 (146,2 %)**	32,4 ± 1,0 (139,5 %)**	5,4 ± 0,7 (84,9 %)**

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, ** Результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность эффектов аллоксана и растительных отваров оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов растительных отваров, вводимых крысам с экспериментальным сахарным диабетом, – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших отвар (**).

В качестве препарата сравнения на данном этапе мы использовали аптечный растительный сбор «Садифит», рекомендуемый пациентам с легкими формами сахарного диабета, а также при сахарном диабете средней тяжести.

Считается, что компоненты сбора, описанные в разделе «Материалы и методы исследований», обеспечивают оптимальное соотношение инулина, аминокислот, гликозидов, дубильных веществ, витаминов, эфирных масел, флавоноидов, сапонинов, органических кислот, микро- и макроэлементов, обладающих гипогликемизирующим действием при сахарном диабете, что в соответствии с инструкцией в ряде случаев даже позволяет снизить суточную дозу пероральных антидиабетических средств. Как свидетельствуют данные табл. 2, «Садифит» действительно значительно нормализует изучаемые параметры у крыс. Установлено, что в его присутствии концентрация глюкозы снизилась у крыс, страдающих сахарным диабетом, в 6,0 раза, активность α -амилазы – на 14,3 %, концентрация пирувата – на 23 %.

Таким образом, растительный сбор «Садифит» и отвар рододендрона Адамса оказывали выраженное нормализующее действие при использовании в модели сахарного диабета, вызванного введением аллоксана, однако эффект рододендрона проявлялся сильнее.

На заключительном этапе работы нами была проанализирована способность изучаемого препарата корректировать изменения углеводного обмена у крыс с экспериментальной гиперфагией. Известно, что гиперфагия является основной причиной развития диетиндуцированного ожирения как у животных, так и у людей, поэтому изучение путей коррекции обмена веществ у пациентов с первичным алиментарным ожирением важно в связи с широким распространением данной патологии, негативным влиянием на качество жизни больных и риском развития сопутствующих заболеваний [32].

В нашей работе гиперфагия вызывалась нахождением животных на «ресторанной диете», составленной из продуктов компании *McDonald's*. Содержание животных на данной диете с преобладанием

легкоусвояемых углеводов и жиров в течение 7 сут привело к заметным изменениям важнейших биохимических маркеров углеводного обмена. Так, концентрация глюкозы в крови животных возросла на 48,6 % к контролю, содержание пировиноградной кислоты увеличилось на 86,0 %, активность α -амилазы – на 19 % (табл. 3). Несбалансированное питание при ежедневном употреблении отвара рододендрона Адамса в течение 7 сут (среднее потребление – 10 мл на 1 крысу) характеризовалось снижением нежелательного изменения анализируемых биохимических маркеров. Так, снижение содержания пирувата в данной серии эксперимента оказалось ниже показателей у крыс, употреблявших высококалорийную пищу, на 66 %, уменьшение концентрации глюкозы происходило до уровня, характерного для интактных животных, снижение активности α -амилазы – ниже этого уровня (см. табл. 3).

Таблица 3

Влияние препарата рододендрона Адамса на показатели углеводного обмена в сыворотке крови у крыс с экспериментальной гиперфагией

Table 3

The effect of *Rhododendron adamsii* preparation on the carbohydrate metabolism serum parameters in rats with experimental hyperphagia

Серия	Показатели углеводного обмена		
	Содержание ПВК, мкг/мл (% к контролю)	Активность α -амилазы, граммов крахмала на 1 л в час (% к контролю)	Концентрация глюкозы, ммоль/л (% к контролю)
Интактные крысы (контроль)	8,40 ± 0,01 (100,0 %)	23,2 ± 0,01 (100,0 %)	6,5 ± 0,7 (100,0 %)
Гиперфагия (7 сут)	15,59 ± 2,3 (186,1 %)*	27,63 ± 2,2 (119,4 %)*	9,57 ± 0,9 (148,6 %)*
Отвар рододендрона Адамса (7 сут)	6,5 ± 0,85 (77,4 %)*	23,5 ± 1,7 (101,6 %)	6,7 ± 0,2 (102,5 %)
Гиперфагия (7 сут) плюс отвар рододендрона Адамса (7 сут)	31,9 ± 1,12 (110,8 %)**	18,57 ± 2,02 (80,2 %)**	6,02 ± 0,01 (92,2 %)**

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm Sx$. *, ** Результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии): достоверность изменения показателей крыс с гиперфагией и эффектов препаратов, вводимых интактным животным, оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*); достоверность эффектов адаптогенов на маркеры углеводного обмена крыс с гиперфагией рассчитывалась по отношению к соответствующим значениям крыс с указанной патологией (**).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что отвар рододендрона Адамса оказывает стабилизирующий эффект на углеводный обмен у крыс как при экспериментальном диабете, так и при индуцированной гиперфагии, что может быть обусловлено наличием в составе данного растения флавоноидов, аскорбиновой кислоты и непредельных жирных кислот, проявляющих антиоксидантный эффект, а также дитерпенов, терпенов и гликозидов, способствующих, как известно, повышению проницаемости клеточных мембран для глюкозы.

Библиографические ссылки

1. Кривошеева Е. М. Растительные адаптогены: перспективы и возможности использования в экстремальных условиях // Здоровье для всех : материалы III Междунар. науч.-практ. конф. (Пинск, 19–20 мая 2011 г.). Пинск, 2011. С. 142–145.
2. Резенькова О. В. Изучение влияния экстракта солодки голой на процессы адаптации организма. Ставрополь : Ставроп. гос. ун-т, 2003.
3. Поветьева Т. Н. Механизмы адаптогенных действий лекарственных растений Сибири. Томск : Изд-во Рос. акад. мед. наук, 2002.
4. Студенцов Е. П. Адаптогены и родственные группы лекарственных препаратов: 50 лет поисков // Обзоры по клин. фармакологии и лек. терапии. 2013. Т. 13, № 4. С. 3–43.
5. Яременко К. В. Учение Н. В. Лазарева о СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины // Психофармакология и биол. наркология. 2005. Т. 5, № 4. С. 1089–1092.
6. Некрасова В. Б. Роль адаптогенов в питании человека // Рынок БАД. 2010. № 5. С. 30–32.
7. Шабанов П. Д. Адаптогены и антигипоксанты // Обзоры по клин. фармакологии и лек. терапии. 2003. Т. 2, № 3. С. 50–80.
8. Кузнецов К. В., Горшков Г. И. Элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*) – адаптоген, стимулятор функций организма животных и иммуномодулятор // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. 2016. Ч. 3, № 11. С. 477–485.

9. Попов А. М. Механизмы биологической активности гликозидов женьшеня: сравнение с гликозидами голотурий // Вестн. Дальневост. отд-ния РАН. 2006. № 6. С. 92–104.
10. Советкина Т. М. Оценка лечебно-профилактических свойств биотехнологической культуры женьшеня // Изв. Дальневост. федер. ун-та. 2009. № 4. С. 86–94.
11. Саратиков А. С. Золотой корень (родиола розовая). Томск : Слово, 1984.
12. Воробьев Д. П. Дикорастущие деревья и кустарники Дальнего Востока. М. : Наука, 1968.
13. Усенко Н. В. Деревья, кустарники и лианы Дальнего Востока. Хабаровск : Кн. изд-во, 1984.
14. Усов Л. А., Минович В. М., Левента А. И. К сравнительной оценке тонизирующего и стимулирующего действия экстракта рододендрона Адамса // Сиб. мед. журн. 1995. Т. 4, № 3. С. 37–40.
15. Усов Л. А., Минович В. М., Кичигин Е. Л. К противовоспалительному действию рододендронов Прибайкалья // Сиб. мед. журн. 1997. Т. 10, № 3. С. 31–32.
16. Рогачев А. Д. Фитохимическое исследование *Rhododendron adamsii* Rehder. Новосибирск : Новосиб. гос. ун-т, 2009.
17. Минович В. М., Федосеева Г. М., Левента А. И. Определение суммарного содержания флавоноидов в наземной части *Rhododendron adamsii* спектрофотометрическим методом // Раст. ресурсы. 2005. № 4. С. 67–73.
18. Белоусов М. В., Басова Е. В., Юсубов М. С. и др. Эфирные масла некоторых видов рода *Rhododendron* // Химия раст. сырья. 2000. № 3. С. 45–64.
19. Минаева В. Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск : Наука, 1991.
20. Rogachev A. D., Kotarova N. I., Korchagina D. V., et al. Some prenylated phenols of *Rhododendron adamsii*: isolation, modification and pharmacological tests // Chem. Sustain. Devel. 2008. № 1. P. 17–22.
21. Мазуренко Т. М. Рододендроны Дальнего Востока. М. : Наука, 1980.
22. Соколов П. Д. Обзор растений СССР. Л. : Наука, 1986.
23. Северин С. Е., Соловьев Г. А. Практикум по биохимии. М. : Изд-во Моск. ун-та, 1989.
24. Камышников В. С. Справочник по клинической химии. Минск : Беларусь, 1982.
25. Кленова Н. А. Биохимия патологических состояний. Самара : Изд-во Самар. ун-та, 2006.
26. Мирошниченко И. И. Биомаркеры в современной медико-биологической практике // Биомед. химия. 2009. Т. 55, вып. 4. С. 425–440.
27. Gonzales-Burgos E., Carretero M. E., Gomes-Serranillos M. P. *Sideritis* spp.: uses, chemical composition and pharmacological activities // J. Ethnopharmacol. 2011. Vol. 135, issue 2. P. 209–225. DOI: 10.1016/j.jep.2011.03.014.
28. Дервановская В. В., Губич О. И. Влияние растительных адаптогенов на углеводный обмен крыс с экспериментальной гиперфагией и экспериментальным сахарным диабетом // Актуальные вопросы современной медицины : тез. 80-й юбил. Всерос. Байк. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием (Иркутск, 22–24 апр. 2013 г.). Иркутск, 2013. С. 327.
29. Губич О. И., Зырянова Т. Н., Мамай Т. Н. Изучение влияния экстракта элеутерококка на показатели углеводного обмена и перекисного окисления липидов у крыс в экспериментальной модели гиперфагии // Тр. БГУ. 2012. Т. 7, ч. 1. С. 173–178.
30. Николаева Е. В., Губич О. И. Влияние препарата железницы крымской (*Sideritis scandica*) на показатели углеводного обмена сыворотки крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом // Біологічні дослідження – 2015 : матеріали VI Всеукр. науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов (Житомир, 10–11 марта 2015 г.). Житомир, 2015. С. 414–415.
31. Жабурюнок А. И., Губич О. И. Влияние отвара лимонника китайского (*Schizandra chinensis*) на показатели углеводного обмена крыс с экспериментальным сахарным диабетом // Сборник работ 73-й научной конференции студентов и аспирантов БГУ (Минск, 16–25 мая 2016 г.). Минск, 2016. Т. 1. С. 252–255.
32. Губич О. И. Медицинская биохимия. Минск : БГУ, 2015.

References

1. Krivosheeva E. M. [Vegetative adaptogens: perspectives and possibilities of use in extreme conditions]. *Zdorov'e dlya vsekh* : proc. of the III Int. sci. and pract. conf. (Pinsk, 19–20 May, 2011). Pinsk, 2011. P. 142–145 (in Russ.).
2. Rezenkova O. V. [The study of the effect of an extract of licorice naked on the processes of adaptation of the organism]. Stavropol : Stavropol State Univ., 2003 (in Russ.).
3. Poveteva T. N. [Mechanisms of adaptogenic actions of medicinal plants in Siberia]. Tomsk : Publ. house of the Russ. Acad. of Med. Sci., 2002 (in Russ.).
4. Studentov E. P. [Adaptogens and related drug groups: 50 years of research]. *Obzory po klinicheskoi farmakol. i lekarstvennoi ter.* 2013. Vol. 13, No. 4. P. 3–43 (in Russ.).
5. Yaremenko K. V. [The theory of N. V. Lazarev about CNPS and adaptogens as a basic theory of preventive medicine]. *Psikhofarmakologiya biol. narkol.* 2005. Vol. 5, No. 4. P. 1089–1092 (in Russ.).
6. Nekrasova V. B. [The role of adaptogen in human nutrition]. *Rynok BAD.* 2010. No. 5. P. 30–32 (in Russ.).
7. Shabanov P. D. [Adaptogens and antihypoxants]. *Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther.* 2003. Vol. 2, No. 3. P. 50–80 (in Russ.).
8. Kuznetsov K. V., Gorshkov G. I. [Eleutherococcus senticosus (*Eleutherococcus senticosus*) – adaptogen, stimulator of animal body functions and immunomodulator]. *Mezhdunar. zh. prikl. fundamental'nykh issled.* 2016. Part 3, No. 11. P. 477–485 (in Russ.).
9. Popov A. M. [Mechanisms of biological activity of glycosides of *Ginseng*: comparison with glycosides of holothurians]. *Vestnik Dal'nevostochnogo oid. Ross. Akad. Nauk* [Vestnik of the Far East Branch of the Russ. Acad. of Sci.]. 2006. No. 6. P. 92–104 (in Russ.).
10. Sovetkina T. M. [Evaluation of therapeutic and prophylactic properties of biotechnological culture of *Ginseng*]. *Izv. Dal'nevostochnogo federal'nogo univ.* 2009. No. 4. P. 86–94 (in Russ.).
11. Saratikov A. S. [Golden root (*Rhodiola rosea*)]. Tomsk : Slovo, 1984 (in Russ.).
12. Vorobiev D. P. [Wild trees and bushes of the Far East]. Moscow : Nauka, 1968 (in Russ.).
13. Usenko N. V. [Trees, bushes and vines of the Far East]. Khabarovsk : Book Publ. house, 1984 (in Russ.).
14. Usov L. A., Mirovich V. M., Leventa A. I. [To a comparative evaluation of the tonic and stimulating effect of the extract of the *Rhododendron adamsii*]. *Sib. med. zh.* 1995. Vol. 4, No. 3. P. 37–40 (in Russ.).
15. Usov L. A., Mirovich V. M., Kichigin E. L. [To the anti-inflammatory effect of rhododendrons of the Baikal region]. *Sib. med. zh.* 1997. Vol. 10, No. 3. P. 31–32 (in Russ.).
16. Rogachev A. D. [Phytochemical study of *Rhododendron adamsii* Rehder.]. Novosibirsk : Novosibirsk State Univ., 2009 (in Russ.).

17. Mirovich V. M., Fedoseeva G. M., Leventa A. I. [Determination of the total content of flavonoids in the ground part of *Rhododendron adamsii* by spectrophotometric method]. *Rastit. resursy*. 2005. No. 4. P. 67–73 (in Russ.).
18. Belousov M. V., Basova E. V., Yusubov M. S., et al. [Essential oils of some species of the genus *Rhododendron*]. *Khim. rastit. syr'ya*. 2000. No. 3. P. 45–64 (in Russ.).
19. Minaeva V. G. [Medicinal plants of Siberia]. Novosibirsk : Nauka, 1991 (in Russ.).
20. Rogachev A. D., Komarova N. I., Korchagina D. V., et al. Some prenylated phenols of *Rhododendron adamsii*: isolation, modification and pharmacological tests. *Chem. Sustain. Devel.* 2008. No. 1. P. 17–22 (in Russ.).
21. Mazurenko T. M. [Rhododendrons of the Far East]. Moscow : Nauka, 1980 (in Russ.).
22. Sokolov P. D. [Review of plants of the USSR]. Leningrad : Nauka, 1986 (in Russ.).
23. Severin S. E., Soloviev G. A. [Workshop on biochemistry]. Moscow : Publ. house of the Moscow Univ., 1989 (in Russ.).
24. Kamyshnikov V. S. [Handbook of Clinical Chemistry]. Minsk : Belarus, 1982 (in Russ.).
25. Klenova N. A. [Biochemistry of pathological conditions]. Samara : Publ. house of the Samara State Univ., 2006 (in Russ.).
26. Miroshnichenko I. I. Biomarkers in the modern medical and biologic practice. *Biomeditsinskaya khim.* [Biochemistry]. 2009. Vol. 55, issue 4. P. 425–440 (in Russ.).
27. Gonzales-Burgos E., Carretero M. E., Gomes-Serranillos M. P. *Sideritis spp.*: uses, chemical composition and pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 2011. Vol. 135, issue 2. P. 209–225. DOI: 10.1016/j.jep.2011.03.014.
28. Dervanovskaya V. V., Hubich A. I. [The influence of plant adaptogens on the carbohydrate metabolism of rats with experimental hyperphagia and experimental diabetes mellitus]. *Aktual'nye voprosy sovremennoi meditsiny* : abstr. of the 80th anniv. All-Russ. Baikal sci. and pract. conf. of young sci. with int. particip. (Irkutsk, 22–24 April, 2013). Irkutsk, 2013. P. 327 (in Russ.).
29. Hubich A. I., Zyryanova T. N., Mamay T. N. [Study of the effect of the extract of *Eleutherococcus* on the parameters of carbohydrate metabolism and lipid peroxidation in rats in the experimental model of hyperphagia]. *Proc. BSU*. 2012. Vol. 7, part 1. P. 173–178 (in Russ.).
30. Nikalaenya A. V., Hubich A. I. [Influence of the preparation of *Sideritis scandica* on the parameters of carbohydrate metabolism of blood serum of rats with experimental diabetes mellitus]. *Biologichni doslidzhennja – 2015* : proc. of the VI All-Ukrainian sci. and pract. conf. of young sci. and students (Zhitomir, 10–11 March, 2015). Zhitomir, 2015. P. 414–415 (in Russ.).
31. Zhaburonak A. I., Hubich A. I. [Influence of the *Schizandra chinensis* broth on the indices of carbohydrate metabolism in rats with experimental diabetes mellitus]. In: *Abstracts of the 73rd scientific conference of students and post-graduate students of BSU* (Minsk, 16–25 May, 2016). Minsk, 2016. Vol. 1. P. 252–255 (in Russ.).
32. Hubich A. I. [Medical Biochemistry]. Minsk : BSU, 2015 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 20.01.2018.
Received by editorial board 20.01.2018.

УДК 579.64:632.937.1

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТИВНОЙ ФОРМЫ БИОПЕСТИЦИДА «БЕТАПРОТЕКТИН»

А. В. БЕРЕЖНАЯ¹⁾

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

В ходе исследований проведена оценка стабильности и эффективности действия разработанной сухой препаративной формы биоpestицида «Бетапротектин» при долгосрочном хранении. В качестве стабилизаторов использованы минеральные добавки – мел, измельченный трепел и доломитовая мука. Установлено, что наиболее перспективным носителем для получения «Бетапротектина» в сухой форме является доломитовая мука, добавление которой позволяет увеличить срок хранения биопрепарата до 12 мес.

Ключевые слова: биоpestицид; препаративная форма; носитель; трепел; доломитовая мука.

DEVELOPMENT OF FORMULATION OF BIOPESTICIDE «BETAPROTECTIN»

A. V. BEREZHNYAYA^a

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Kuprevič Street, Minsk 220141, Belarus

During research, the stability and efficacy of the action in the long-term storage of dry formulation of the biopesticide «Betaprotectin» was evaluated. As carriers for dry formulations were tested two mineral additives were tested – tripoli powder and dolomite flour. It has been established that the most promising carrier for getting dry formulation of «Betaprotectin» is a dolomite flour. Addition of this mineral component allows prolonging the shelf life of the biopreparation till 12 months and stabilizes its pH level.

Key words: biopesticide; dry formulation; carrier; tripoli powder; dolomite flour.

Введение

Одним из путей повышения стабильности и эффективности действия биологических средств защиты растений является научно аргументированный подбор их компонентного состава, основанный на понимании механизмов действия вносимых добавок. Многие биопрепараты, созданные на основе микроорганизмов, высокочувствительны к различным факторам окружающей среды, таким как солнечный свет, высушивание, перепады температур, критические значения pH. Защитить клетки продуцента от их негативного влияния можно путем добавления в препарат определенных компонентов-протекторов. Доказано положительное влияние неорганических минеральных добавок на жизнеспособность и антагонистическую активность бактерий рода *Vacillus* и эффективность биопрепаратов на их основе [1]. Имобилизация бактерий на минеральном носителе обеспечивает им дополнительную механическую защиту,

Образец цитирования:

Бережная А. В. Разработка препаративной формы биоpestицида «Бетапротектин» // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 69–75.

For citation:

Berezhnaya A. V. Development of formulation of biopesticide «Betaprotectin». *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 69–75 (in Russ.).

Автор:

Анастасия Валерьевна Бережная – научный сотрудник лаборатории средств биологического контроля.

Author:

Anastasiya V. Berezhnaya, researcher at the laboratory of biological control agents.
domilazo@bk.ru

предотвращает агрегирование спор и обуславливает стабильность биопрепаратов при хранении. Кроме того, многие микро- и макроэлементы, входящие в состав минеральных протекторов, становятся более доступными для растений при их совместном внесении в почву с биопрепаратами [2].

Большинство биопрепаратов на основе клеток бактерий рода *Bacillus* выпускаются в виде жидкости, текучей пасты или смачивающегося порошка. Жидкая форма удобна для применения, но, как правило, имеет небольшой срок годности, занимает много места при хранении и транспортировке. Кроме того, эта форма обладает существенным недостатком при внесении в грунт или на поверхность растений: клетки штамма – продуцента биопрепарата не защищены от воздействия внешних физических факторов и микроорганизмов, которые уже колонизировали субстрат до внесения биопрепарата. Паста обладает лучшей эффективностью, чем жидкая форма, за счет более высокой концентрации клеток на единицу объема, но также имеет небольшой срок хранения. Сухие формы биопрепаратов (порошок, смачивающийся порошок, таблетки) характеризуются большим сроком хранения и являются наиболее перспективными ввиду удобства их применения и простоты транспортировки [3]. Однако стоит учитывать, что высушивание клеток и спор без добавления протектора приводит к слеживанию и агрегированию компонентов препарата, кроме того, нейтральный носитель обеспечивает дополнительную защиту иммобилизованным на его поверхности клеткам от воздействия высоких температур [1].

В качестве перспективных добавок-протекторов для биопрепаратов можно рассматривать широкий спектр соединений: производные лигнина, активированный уголь, карбонатные минеральные размолы, природные цеолиты, в том числе трепел, диатомиты и др. Природные цеолиты – это группа близких по составу и свойствам минералов, обладающих уникальными адсорбционными, ионообменными, каталитическими и пролонгирующими свойствами. Стоит отметить, что на территории Беларуси имеются залежи различных цеолитов, что исключает необходимость их ввоза из-за границы и обуславливает их широкое применение. Трепел является уникальным комплексным минералом, содержащим практически все важные макро- и микроэлементы. Доказано, что адсорбирующая эффективность трепелов зависит не столько от их химического состава, сколько от способности содержащихся в них монтмориллонита и клиноптилолита поглощать и удерживать на своей поверхности молекулы других веществ, увеличивая их концентрации. Регулярное внесение трепела в почву предотвращает вымывание питательных элементов из плодородного слоя и повышает степень их усвоения культурными растениями. Доказано, что добавление трепела в состав органоминеральных удобрений улучшает физико-химические и агрохимические свойства почвы. Это минеральное соединение широко используется в животноводческой практике – в производстве кормовых добавок для животных и птицы. Опыт применения трепелов в хозяйствах Германии, Китая, России, США, Японии и других стран показал, что его включение в рационы животных повышает усвояемость кормов, укрепляет иммунитет, сокращает падеж молодняка, нормализует обмен веществ, предупреждает появление диспепсии [4; 5].

Доломитовая (известняковая) мука – это размельченный доломит, относящийся к группе карбонатных горных пород, распространенный минерал гидротермальных месторождений. Она широко применяется в качестве универсального удобрения – при длительном воздействии на почву доломитовая мука способствует нормализации уровня pH, повышает эффективность других вносимых удобрений, обогащает почву кальцием и магнием, связывает вредные радионуклиды, а также используется для борьбы с насекомыми, имеющими хитиновый покров. В биопрепаратах доломитовая мука повышает жизнеспособность входящих в их состав микроорганизмов и таким образом увеличивает их срок годности [6].

Широкое использование цеолитов и размолы известняковых пород в качестве минеральных удобрений обусловлено тем, что эти природные соединения, обладая высокой адсорбционной и ионообменной емкостью, обеспечивают удержание влаги в пахотном слое почвы. Месторождения этих минералов разрабатываются на территории Республики Беларусь, что делает их применение экономически обоснованным.

В настоящей работе представлены результаты исследований по созданию сухой формы биопестицида «Бетапротектин», основой которого являются клетки, споры и метаболиты бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д (штамм выделен сотрудниками лаборатории средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси). Жидкая форма препарата с выраженным фунгицидным действием используется в Беларуси и за ее пределами для борьбы с кагатной гнилью сахарной и столовой свеклы, серой и прикорневой гнилями огурца и томата в закрытом грунте, гнилью корнеплодов, пенициллезом и фузариозом луковичных, клубнелуковичных и цветочных культур, диплоидозом хвойных. В ходе предыдущих исследований были оптимизированы условия глубинного культивирования бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д. Показано, что оптимальным консервантом является раствор NaCl в концентрации 4 %, при добавлении которого количество жизнеспособных клеток и спор, определяющих антифунгальную активность, сохранялось на высоком уровне при комнатной температуре в течение 3 мес. (полностью отвечал требованиям ТУ ВУ 100289066.045–2008) [7]. Анализ влияния различных прилипателей на адгезионную способность

клеток и спор штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д позволил установить, что добавление хитозана или гидрогеля «Гисинар» в концентрации 1 % повышает эффективность действия биопестицида «Бетапротектин» в отношении возбудителей кагатной гнили корнеплодов сахарной свеклы на 15,0 и 2,9 % соответственно [8].

Цель настоящей работы – создание стабильной сухой формы биопрепарата «Бетапротектин» с увеличенным сроком хранения.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служил штамм спорообразующих бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д – основа биопестицида «Бетапротектин».

В качестве тест-культуры для определения антагонистической активности штамма использовали фитопатогенный гриб *Fusarium oxysporum* БИМ F-381 – типовой возбудитель кагатной гнили сахарной свеклы, выделенный сотрудниками УО «Гродненский государственный аграрный университет» и депонированный в коллекции Института микробиологии НАН Беларуси.

В работе использовали жидкие питательные среды: бульон Хоттингера агаризованный (БХА) (50,0 мл); глюкозу (10,0 г/л); пептон (5,0 г/л); NaCl (5,0 г/л); агар-агар (12,0–20,0 г/л); воду водопроводную (до 1,0 л); Мейнелла (меласса – 30,0 г/л; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 7,0 г/л; KH_2PO_4 – 3,0 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1 г/л; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5 г/л; Na-цитрат – 0,5 г/л; вода дистиллированная – до 1,0 л) и картофельно-глюкозный бульон (КГБ) (глюкоза – 20,0 г/л; картофельный бульон – 1,0 л). Агаризованные среды содержали 1,2–2,0 % агар-агара.

Глубинное культивирование бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д осуществляли в питательной среде Мейнелла в колбах Эрленмейера с аэрацией (при режиме перемешивания 180–200 об/мин, температуре 30 °С) в течение 48 ч. Для оценки полученного препарата проверяли его качественные характеристики на соответствие ТУ ВУ 100289066.045–2008 (рН 6,8–7,4, титр спор составлял не менее 1,0 млрд/см³, диаметр зоны подавления роста тест-культуры *F. oxysporum* БИМ F-381 был равен 28–32 мм).

Культуру фитопатогенных грибов выращивали в среде КГБ в колбах Эрленмейера с аэрацией (200 об/мин, температура 23–24 °С) в течение 32–48 ч.

Для приготовления сухих образцов препарата перед сушкой культуральную жидкость (КЖ) бактерий смешивали с минеральными добавками в различных соотношениях. В качестве протекторов и стабилизаторов использовали измельченный трепел, доломитовую муку и измельченный мел. Бактерии высушивали при температуре 55–60 °С в сухожаровом шкафу Memmert UFE 500 (Германия) до состояния сухого вещества (СВ), контроль влажности проводили на анализаторе влажности Sartorius MA150 (Германия). Установлено, что при стандартных условиях культивирования в 1 л КЖ содержалось 40 г сухого вещества. Хранение высушенных форм препарата осуществляли в течение 15 мес. в условиях, рекомендованных указанными ТУ (от 4 до 15 °С в сухом проветриваемом помещении). Через каждые 3 мес. хранения (через 3, 6, 9, 12 и 15 мес. хранения соответственно) высушенные образцы разводили стерильной водой до исходного объема КЖ и определяли количество жизнеспособных клеток и спор, антагонистическую активность и значение рН. Титр клеток и спор бактерий-антагонистов устанавливали методом предельных разведений [9]. Антагонистическую активность оценивали методом лунок [10], результаты учитывали через 18–24 ч по диаметру зон задержки роста тест-культуры, выращенной на агаризованной среде БХА. Уровень рН в образцах измеряли на ионометре рН-150М (Беларусь).

Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам в программе *Microsoft Excel*.

Результаты исследований и их обсуждение

Определено влияние различных минеральных добавок на жизнеспособность бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д при высушивании жидкой споровой культуры штамма в лабораторных условиях. Основным критерием при выборе минерального носителя и его оптимального соотношения с культуральной жидкостью бактерий служили данные о количестве жизнеспособных клеток и спор в 1 г сухой формы (таблица). Высокие показатели титров (не менее 10⁹ КОЕ/1 г) регистрировали в сухих препаративных формах с добавлением трепела или доломитовой муки практически во всех вариантах соотношений (за исключением 1 : 4). В то же время при смешивании культуральной жидкости бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д с измельченным мелом количество жизнеспособных клеток и спор в концентрации 10⁹ КОЕ/1 г выявляли только при соотношении 1 : 1. Таким образом, наибольший защитный эффект при высушивании КЖ бактерий достигался при добавлении трепела или доломитовой муки. Поскольку в сухих формах препарата с добавлением трепела или доломитовой муки в соотношении 1 : 2 содержалось достаточное количество жизнеспособных

клеток и спор (более $7 \cdot 10^9/1$ г), в полной мере обеспечивающих антифунгальные свойства, оно представлялось наиболее экономически целесообразным. Дело в том, что вследствие невысокой цены на носители (стоимость трепела составляет 0,45 руб./кг, доломитовой муки – 0,2 руб./кг) основная стоимость препарата зависит от количества используемой культуральной жидкости бактерий. Подсчеты показали, что использование КЖ и носителя в соотношении 1 : 1 в значительной степени увеличивает себестоимость конечного продукта и является экономически необоснованным.

**Количество жизнеспособных клеток и спор
 в сухой форме препарата с минеральными стабилизаторами**
**The titer of CFU and spores of CL (cultural liquid) strain
 during drying with the addition of mineral carrier**

Стабилизатор	Соотношение культуральной жидкости и стабилизатора	Количество жизнеспособных клеток и спор в 1 г сухого препарата, КОЕ	
		Клетки	Споры
Мел	1 : 1	$9,5 \cdot 10^9$	$8,0 \cdot 10^9$
	1 : 2	$7,1 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^8$
	1 : 3	$2,3 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$
	1 : 4	$2,0 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$
Трепел	1 : 1	$2,2 \cdot 10^{10}$	$1,9 \cdot 10^{10}$
	1 : 2	$9,2 \cdot 10^9$	$6,3 \cdot 10^9$
	1 : 3	$3,3 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^9$
	1 : 4	$1,1 \cdot 10^9$	$8,9 \cdot 10^8$
Доломитовая мука	1 : 1	$2,3 \cdot 10^{10}$	$1,8 \cdot 10^{10}$
	1 : 2	$8,9 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^9$
	1 : 3	$3,5 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^9$
	1 : 4	$9,0 \cdot 10^8$	$8,1 \cdot 10^8$

Согласно полученным данным оптимальными протекторами для бактерий штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ В-439Д являются измельченный трепел и доломитовая мука, добавленные при высушивании культуральной жидкости в соотношении 1 : 2.

На следующем этапе работы проводили анализ качественных показателей сухих препаратов с добавлением трепела и доломитовой муки при долгосрочном хранении. Для этого в течение 15 мес. определяли количество жизнеспособных клеток и спор, а также антагонистическую активность у высушенных образцов (анализ проводили через каждые 3 мес.). Параллельно эти показатели контролировали для препарата в жидкой форме, который был заложен на хранение одновременно с сухими формами. Исходный титр двухсуточного жидкого препарата, на основе которого были созданы все образцы препаративных форм, составлял $1,4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и $1,3 \cdot 10^9$ спор/мл, антагонистическая активность, определяемая зоной задержки роста грибного патогена *Fusarium oxysporum* БИМ F-381, равнялась ($32,0 \pm 0,6$) мм, показатель рН имел нейтральное значение (7,1). В результате этих экспериментов было показано, что в высушенной форме препарата с носителями (трепел, доломитовая мука) в течение 12 мес. стабильно сохранялись жизнеспособные клетки и споры (титр составил не менее $1,1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл) и он обладал высокой антагонистической активностью по отношению к патогенному грибу *Fusarium oxysporum* БИМ F-381 (рис. 1–3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что за 12 мес. хранения в высушенных образцах с добавлением носителей контролируемые показатели остались в пределах нормы (соответствовали ТУ ВУ 100289066.045–2008). При этом количество жизнеспособных клеток и спор через 12 мес. хранения в сухом препарате с доломитовой мукой незначительно превышало эти показатели в образце с трепелом (на 5,8 % – КОЕ и на 8,0 % – споры). Установлено, что значение рН в сухих образцах оставалось в пределах нормы (в соответствии с ТУ) на протяжении всего периода хранения. Например, через 15 мес. хранения значение рН в сухой форме препарата составляло $6,9 \pm 0,05$. В то же время в жидком препарате уже через 7 мес. хранения наблюдалось повышение концентрации ионов H^+ , а через 12 мес. хранения показатель

pH снизился до 6,5. Стоит отметить, что на протяжении первых 6 мес. контролируемые показатели (титр клеток и спор, а также антагонистическая активность) жидкой формы препарата оставались в пределах нормы (соответствовали ТУ ВУ 100289066.045–2008), а затем неуклонно снижались. Результаты исследований свидетельствуют о том, что иммобилизация клеток и спор на минеральных носителях не оказывает негативного влияния на жизнеспособность и активность бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* БИМ-439Д, более того, она создает клеткам дополнительную механическую защиту при высушивании жидкой культуры, предотвращает агрегирование спор и обуславливает стабильность биопрепаратов при долгосрочном хранении.

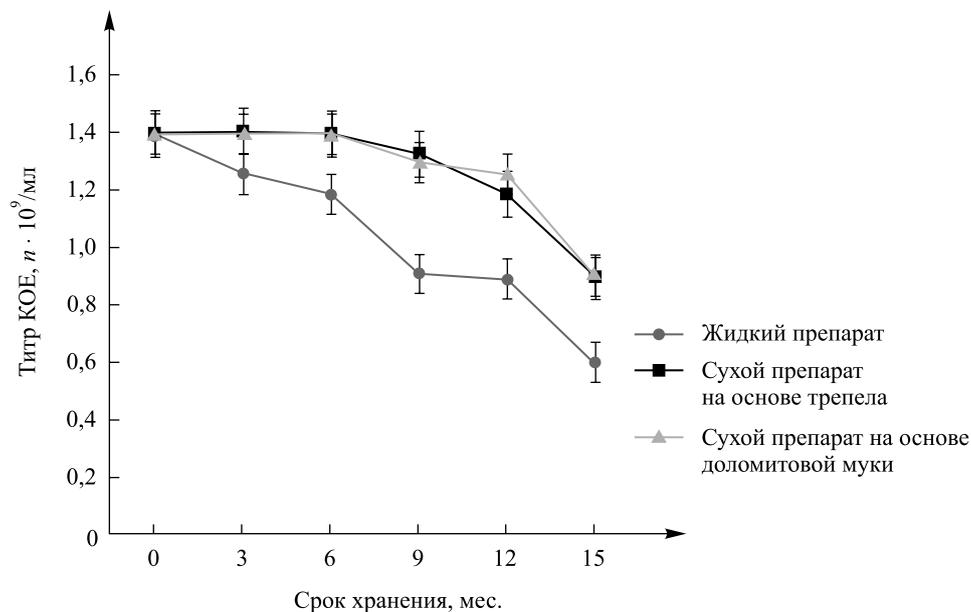


Рис. 1. Количество жизнеспособных клеток в образцах препарата при хранении

Fig. 1. The dynamics of the titer of CFU in the samples of Betaprotectin during storage

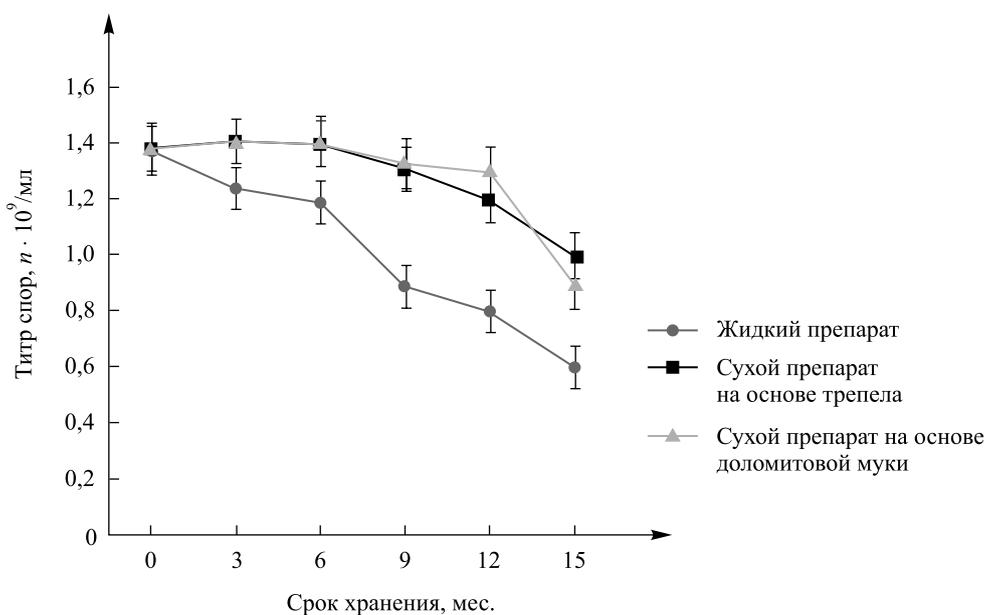


Рис. 2. Количество спор в образцах препарата при хранении

Fig. 2. The dynamics of the titer of spores in the samples of Betaprotectin during storage

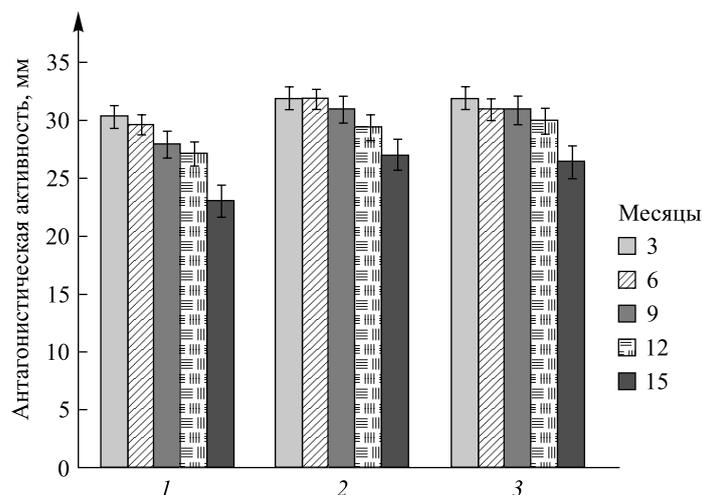


Рис. 3. Антагонистическая активность образцов препарата при хранении:

1 – жидкий препарат; 2 – сухой препарат на основе трепела;

3 – сухой препарат на основе доломитовой муки

Fig. 3. Dynamics of antagonistic activity of the samples of Betaprotectin during storage:

1 – liquid preparation; 2 – dry preparation on a tripoli powder;

3 – dry preparation based on a dolomite flour

Заключение

Согласно полученным данным наиболее перспективной для долгосрочного хранения биопестицида «Бетапротектин» является сухая форма с добавлением в качестве носителя доломитовой муки в соотношении 1 : 2 (КЖ – носитель) в пересчете на сухое вещество. Данная препаративная форма обеспечивает более длительный срок хранения биопестицида, способствует поддержанию его качественных характеристик в течение 12 мес., что в 4 раза превышает рекомендованный срок хранения жидкого препарата. Такой эффект может быть обусловлен тем, что минеральный компонент, на частицах которого иммобилизованы клетки штамма-продуцента, создает им дополнительную механическую защиту от внешних воздействий, предотвращает агрегирование спор, закисление препарата, а также является еще одним фактором защиты культуры от контаминации патогенной микрофлорой [1; 6]. Таким образом, разработанная сухая препаративная форма «Бетапротектина», обеспечивающая стабильность и эффективность действия биопрепарата, может быть рекомендована для долгосрочного хранения.

Библиографические ссылки

1. Синицын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И. и др. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М. : Изд-во МГУ, 1994.
2. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, обеспечивающие восстановление микробиоценозов почвы и желудочно-кишечного тракта животных, обладающие бактерицидной, фунгицидной и вирулицидной активностью, и препарат на основе этих штаммов : пат. 2482174 RU, IPC A 01 N 63/00, A 61 K 35/74, C 12 N 1/20 / А. И. Леляк, А. А. Леляк ; заявл. 10.02.2011 ; опубл. 20.05.2013 // Офиц. бюл. / Федер. служба по интеллектуал. собственности. 2013. № 14.
3. Ефимова М. С., Марквичев Н. С. Разработка новой препаративной формы для защиты корневой системы растений на основе клеток *Bacillus subtilis* для внесения в торфосубстраты // Успех в химии и хим. технологии. 2011. Т. XXV, № 11 (127). С. 48–52.
4. Голушко В., Козинец А., Надаринская М. и др. Знакомьтесь – трепел, кормовой адсорбент [Электронный ресурс]. 2013. URL: <http://agriculture.by/articles/zhivotnovodstvo/znakomtes-%E2%80%94-trepel-kormovoj-adsorbent> (дата обращения: 30.08.2017).
5. Надаринская М. А., Кветковская А. В., Голушко О. Г. и др. Влияние трепела на морфофункциональные свойства крови у высокопродуктивных коров в период раздоя // Актуал. пробл. интенсив. развития животноводства : сб. науч. тр. : в 2 ч. 2011. Вып. 14, ч. 1. С. 140–145.
6. Способ получения биоминеральных удобрений и мелiorантов (варианты) : пат. 2512277 RU, IPC C 05 F, 11/08 / В. К. Чеботарь, Е. В. Ерофеев ; заявл. 10.10.2012 ; опубл. 10.04.2014 // Офиц. бюл. / Федер. служба по интеллектуал. собственности. 2014. № 10.
7. Коломиец Э. И., Кильчевская О. С., Романовская Т. В. Разработка препаративной формы биопестицида для защиты сахарной свеклы от кагатной гнили // Биологическая защита растений, перспективы и роль в фитосанитарном оздоровлении агроценозов и получении экологически безопасной сельскохозяйственной продукции : материалы V Междунар. конф. (Краснодар, 23–25 сент. 2008 г.). Краснодар, 2008. С. 250–252.
8. Свиридов А. В., Коломиец Э. И. Бактерии-антагонисты в защите сахарной свеклы от кагатной гнили. Гродно : Гродн. гос. аграр. ун-т, 2012.
9. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхард : в 3 т. М. : Мир, 1984. Т. 3.
10. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. М. : Колос, 1983.

References

1. Sinitsyn A. P., Rainina E. I., Lozinsky V. I., et al. [Immobilized cells of microorganisms]. Moscow : Publ. house of Moscow State Univ., 1994 (in Russ.).
2. Strains of bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, providing restoration of microbiocenoses of soil and gastrointestinal tract of animals, possessing bactericidal, fungicidal and virulent activity, and preparation based on these strains : pat. 2482174 RU, IPC A 01 N 63/00, A 61 K 35/74, C 12 N 1/20. I. A. Lelyak, A. A. Lelyak ; declar. 10.02.2011 ; publ. 20.05.2013. *Off. bull. Federal service for intellectual own.* 2013. No. 14 (in Russ.).
3. Efimova M. S., Markvichev N. S. [Development of a new formulation for the protection of the root system of plants based on *Bacillus subtilis* cells for incorporation into peat]. *Usp. v khim. i khim. tekhnol.* 2011. Vol. XXV, No. 11 (127). P. 48–52 (in Russ.).
4. Golushko V., Kozinets A., Nadarinskaya M., et al. [Meet – Tripoli, feed adsorbent]. 2013. URL: <http://agriculture.by/articles/zhivotnovodstvo/znakomtes-%E2%80%94-trepel-kormovoj-adsorbent> (date of access: 30.08.2017) (in Russ.).
5. Nadarinskaya M. A., Kwiatkowskaya A. V., Galushko O. G., et al. [Effect of diatomaceous earth on the morphological and functional properties of blood of high yielding cows in period of milking]. In: *Aktual. probl. intensivn. razvit. zhivotnovod.* : collect. of sci. pap. : in 2 parts. 2011. Issue 14, part 1. P. 140–145 (in Russ.).
6. Method for producing biomineral fertilizers and meliorants (variants) : pat. 2512277 RU, IPC C 05 F, 11/08. V. K. Chebotar, E. V. Erofeev ; declar. 10.10.2012 ; publ. 10.04.2014. *Off. bull. Federal service for intellectual own.* 2014. No. 10 (in Russ.).
7. Kolomiets E. I., Kilchevsky O. S., Romanovskaya T. V. [Development of formulations of biopesticide for protection of sugar beet against the clamp rot]. *Biological plant protection, prospects and the role of phytosanitary improvement of agriculture and production of ecologically safe agricultural production* : mater. of the V Int. conf. (Krasnodar, 23–25 Sept., 2008). Krasnodar, 2008. P. 250–252 (in Russ.).
8. Sviridov A. V., Kolomiets E. I. [Bacteria-antagonists in the protection of sugar beet against the clamp rot]. Grodno : Grodno State Agric. Univ., 2012 (in Russ.).
9. Gerhard F. (ed.). [Methods of General bacteriology] : in 3 vols. Moscow : Mir, 1984. Vol. 3 (in Russ.).
10. Sagi Ye. [Methods of soil Microbiology]. Moscow : Kolos, 1983 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 12.01.2018.
Received by editorial board 12.01.2018.

УДК 582.281.14.(476)

PERONOSPORA STIGMATICOLA RAUNK. – НОВЫЙ ВИД ГРИБОПОДОБНЫХ ОРГАНИЗМОВ В МИКОБИОТЕ БЕЛАРУСИ

А. К. ХРАМЦОВ¹⁾

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

Изложены материалы о первой находке в Беларуси микромицета *Peronospora stigmaticola* Raunk. (Peronosporaceae, Peronosporales, Oomycetes, Oomycota, Chromista), который является облигатным паразитическим грибоподобным организмом и, вызывая ложную мучнистую росу (пероноспороз) растений из родов *Mentha* L. и *Satureja* L., образует спороношение только на цветках хозяев. Приведены сведения о распространении данного микромицета, его хромистические особенности, круг растений-хозяев и признаки пероноспороза на цветках. Микромицет *P. stigmaticola* обнаружен на цветках *Mentha spicata* L. в единственном локалитете Беларуси. По итогам изучения гербарных образцов представлена краткая морфологическая характеристика выявленного патогена. Указан гербарный материал, послуживший основанием для настоящей работы и хранящийся в Гербарии Белорусского государственного университета (MSKU). Полученные результаты исследования грибоподобного организма *P. stigmaticola* дополняют данные о его распространении, морфометрических характеристиках и могут быть учтены при инвентаризации микобиоты Беларуси. Информация о возможном круге хозяев *P. stigmaticola* в Беларуси будет полезна для выявления пораженных растений и разработки мероприятий по защите культивируемых представителей родов *Mentha* L. и *Satureja* L. от пероноспороза цветков.

Ключевые слова: микромицет *Peronospora stigmaticola*; грибоподобный организм; пероноспороз; цветки; *Mentha spicata*; растения-хозяева; микобиота; Беларусь.

Благодарность. Автор выражает благодарность доценту кафедры ботаники БГУ Т. А. Сауткиной за помощь в идентификации *Mentha spicata* и ценные консультации, а также лаборантам кафедры ботаники БГУ Е. А. Митрошиной и Д. Д. Бурвель за техническое содействие при выполнении работы.

Образец цитирования:

Храмцов А. К. *Peronospora stigmaticola* Raunk. – новый вид грибоподобных организмов в микобиоте Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 76–81.

For citation:

Khramtsov A. K. *Peronospora stigmaticola* Raunk. – new species of pseudofungi in mycobiota of Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 76–81 (in Russ.).

Автор:

Александр Константинович Храмцов – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Author:

Alexander K. Khramtsov, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology. alexkhramtsov@mail.ru

PERONOSPORA STIGMATICOLA RAUNK. – NEW SPECIES OF PSEUDOFUNGI IN MYCOBIOTA OF BELARUS

A. K. KHRAMTSOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

The data concerning the first findings of the micromycetes *Peronospora stigmaticola* Raunk. (Peronosporaceae, Peronosporales, Oomycetes, Oomycota, Chromista) within Belarus is presented. This species is an obligate parasitic pseudofungus and causes downy mildew on the plants of the genus *Mentha* L. and *Satureja* L. Sporulation is formed only on the flowers of the host-plants. We supply data about distribution of this micromycetes, its chorologic features, host-plants and symptoms of downy mildew on flowers. Micromycetes *P. stigmaticola* is found on the flowers of *Mentha spicata* L. in the one location of Belarus. We provide a brief morphological description of this pathogen based on the assessing of collected samples. The herbarium samples that are referred to in our work and serve as the grounds for this article are retained in Belarusian State University Herbarium (MSKU). The results of this research work extend our knowledge of morphometric characteristics and distribution of pseudofungus *P. stigmaticola* and might be taken into consideration when compiling the inventory of mycobiota of Belarus. The information about possible host-plants *P. stigmaticola* in Belarus is valuable for the detection of diseased plants and development of measures for protection cultivated plants of the genus *Mentha* L. and *Satureja* L. from downy mildew of flowers.

Key words: micromycetes *Peronospora stigmaticola*; pseudofungus; downy mildew; flowers; *Mentha spicata*; host-plants; mycobiota; Belarus.

Acknowledgements. The author expresses his gratitude to the associated professor of the department of botany of the Belarusian State University T. A. Sautkina for the help in authentication of *Mentha spicata* and for valuable consultations and to the laboratory assistants of the department of botany of Belarusian State University E. A. Mitroshina and D. D. Burvel for a technical assistance at implementation of work.

Микромицет *Peronospora stigmaticola* Raunk. (Peronosporaceae, Peronosporales, Oomycetes, Oomycota, Chromista) является облигатным паразитическим грибоподобным организмом, который, вызывая ложную мучнистую росу (пероноспороз) растений из родов *Mentha* L. и *Satureja* L., образует спороношение только на цветках хозяев [1–9].

P. stigmaticola описал К. Раункиер в публикации за 1892–1893 гг. по собственным сборам 1887 г. на цветках *Mentha aquatica* L. из Дании [1; 2]. Позже этот микромицет был найден также в Северной Америке (Канада) и странах Евразии (Азербайджан, Германия, Румыния, Финляндия, Франция, Швеция и др.) [3–6]. По хорологическим особенностям *P. stigmaticola* характеризуется как голарктический географический элемент [3]. Из числа государств, сопредельных с Республикой Беларусь, данный грибоподобный организм отмечен в России (Смоленская область) и является провизорным для Польши [4; 5]. До настоящего времени он не указывался в составе микобиоты Беларуси [10].

Из литературы известно, что кроме *Mentha aquatica* микромицет *P. stigmaticola* паразитирует на других представителях рода *Mentha* (*M. arvensis* L., *M. longifolia* (L.) L., *M. × piperita* L., *M. × verticillata* L., *M. × villosa* Huds.), а также на *Satureja hortensis* L. [3–9]. В соцветиях растений-хозяев поражаются и засыхают цветки, покрываясь серовато-фиолетовым рыхлым налетом спороношения паразита. Дерновинки спороношения преимущественно сосредоточены на рыльце пестика и тычиночных нитях [3–5].

В сентябре 2017 г. микромицет *P. stigmaticola* впервые отмечен нами на территории Беларуси в пределах геоботанической подзоны дубово-темнохвойных лесов в одном местонахождении из Ошмянско-Минского геоботанического округа Минско-Борисовского геоботанического района [11]. Данный грибоподобный организм развивался на *Mentha spicata* L. в условиях ее культуры. Встречаемость *P. stigmaticola* оценена по шкале Гааса как «только в одном месте» [12].

Признаки пероноспороза выявлены на отдельных цветках в нижней части соцветия растения-хозяина (рис. 1). Пораженные цветки имели побуревший засохший венчик, который незначительно выдавался из чашечки. На пораженных частях цветка (лепестках, тычиночных нитях, пестике) отмечался нежный, рассеянный серовато-фиолетовый налет спороношения паразита. На изученных цветках мяты колосистой вместе с возбудителем пероноспороза обнаружены грибы из рода *Alternaria* Nees.

Ниже приводим краткую морфологическую характеристику выявленного микромицета.

Peronospora stigmaticola Raunk., Bot. Tidskr. 18: 108 (1892–1893).

Мицелий эндофитный, несептированный, разветвленный.



Рис. 1. Внешний вид соцветий *Mentha spicata*: а – с непораженными цветками; б – с цветками, пораженными микромицетом *Peronospora stigmaticola*
Fig. 1. The appearance of inflorescences of *Mentha spicata*: а – with unaffected flowers; б – with flowers affected by micromycetes *Peronospora stigmaticola*

Конидиеносцы (159,0–) 245,7 (–327,0) × (5,6–) 9,1 (–11,2) мкм (по Kochman and Majewski: 400–500 × 8 мкм [4]; по Новотельновой и Пыстиной: 400–500 × 8–15 мкм [5]; по Ульяницеву, А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому: 500 × 8–15 мкм [3; 7]; по Thines and Kummer: (165–) 290–373–456 (–515) мкм; (115–) 139–180–221 (–240) мкм [6]), одиночные или в небольших пучках, вздутые у основания (до 14,0 мкм), 4–7-кратно дихотомически разветвленные под острым углом, слабо серовато-фиолетовые или почти бесцветные. Разветвленная часть конидиеносца составляет примерно 1/4 его длины. Конечные веточки длиной 7 мкм, толщиной 2,8 мкм (по Kochman and Majewski: 13 × 2,5–3,5 мкм [4]; по Новотельновой и Пыстиной: 6–13 мкм длиной [5]; по Ульяницеву, А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому: 6–12 мкм длиной [3; 7]; по Thines and Kummer: (2,0–) 3,6–5,2–6,8 (–9,0) мкм и (1,0–) 4,0–5,2–6,4 (–9,5) мкм длиной [6]), прямые или немного изогнутые, заостренные, раздвоенные под прямым углом (рис. 2).

Конидии одноклеточные, продолговато-яйцевидные, эллипсоидальные, на вершине с сосочком, светло-коричневые с фиолетовым оттенком, (25,2–) 33,8 (–44,8) × (14,0–) 15,7 (–19,6) мкм (среднее отношение длины к ширине 2,2) (по Raunkjær и Ульяницеву: 30–50 × 10–15 мкм [1; 3]; по Kochman and Majewski: 31–37 × 14–18 мкм [4]; по Новотельновой и Пыстиной: 30–40 × 10–16 мкм [5]; по А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому: 30–50 × 10–16 мкм [7]; по Thines and Kummer: (27,0–) 32,0–36,6–40,3 (–48,0) × (10,0–) 11,2–13,2–15,2 (–21,0) мкм; (27,0–) 30,5–34,5–38,5 (–41,0) × (11,0–) 12,1–13,3–14,5 (–15,5) мкм [6]; по [9] размер конидий составляет 23–31 × 11–13 мкм) (рис. 3).

Ооспоры преимущественно в тканях лепестков и пестика, многочисленные, шаровидные, (28,0–) 31,8 (–36,4) мкм в диаметре (по Raunkjær, Новотельновой и Пыстиной, А. А. Ячевскому и П. А. Ячевскому: 25–35 мкм в диаметре [1; 5; 7]; по Thines and Kummer: (26,0–) 26,0–29,2–32,4 (–35,0) [6]), желто-коричневые, с толстой гладкой оболочкой (рис. 4). Необходимо отметить, что некоторые исследователи наблюдали ооспоры в основном или только в тканях рыльца пестика [5; 7], в то время как на изученных нами образцах многочисленные ооспоры паразита развивались также в пораженных лепестках.

Местонахождение изученных образцов. Беларусь, Минская обл., г. Минск, Ботанический сад БГУ. 08.09.2017 г. А. К. Храмцов. Гербарий БГУ (MSKU) (рис. 5).

Учитывая хоровологические особенности и круг питающих растений *P. stigmaticola*, по данным литературы, можно предположить, что его обнаружение в Беларуси возможно, кроме *Mentha spicata*, на дикорастущих и культивируемых представителях родов *Mentha* и *Satureja*.

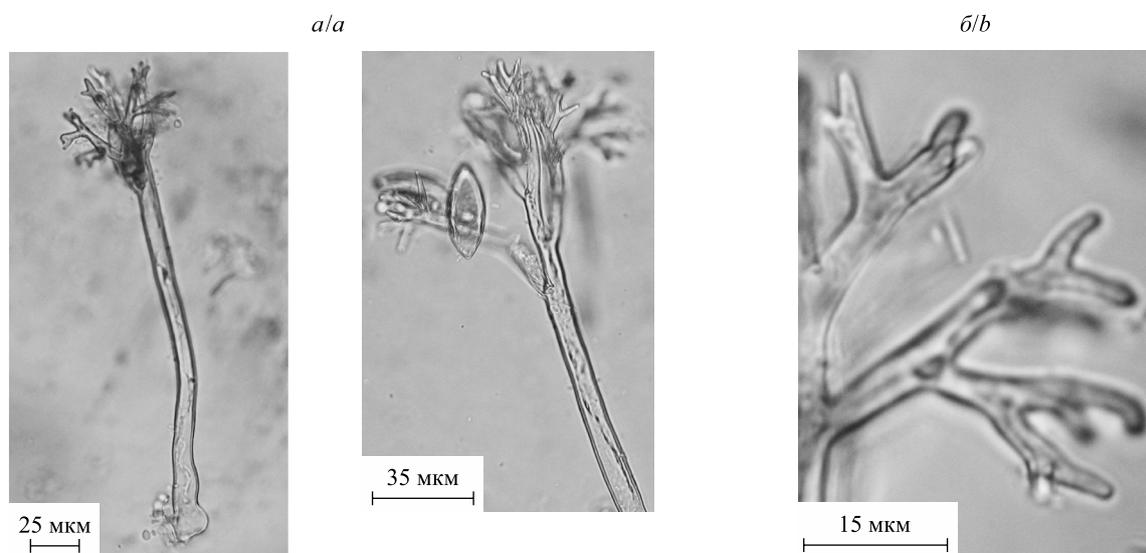


Рис. 2. Конидиеносцы *Peronospora stigmaticola*:
a – общий вид; б – фрагмент с конечными веточками
Fig. 2. Conidiophores of *Peronospora stigmaticola*:
a – general view; b – fragment with the ultimate branchlets

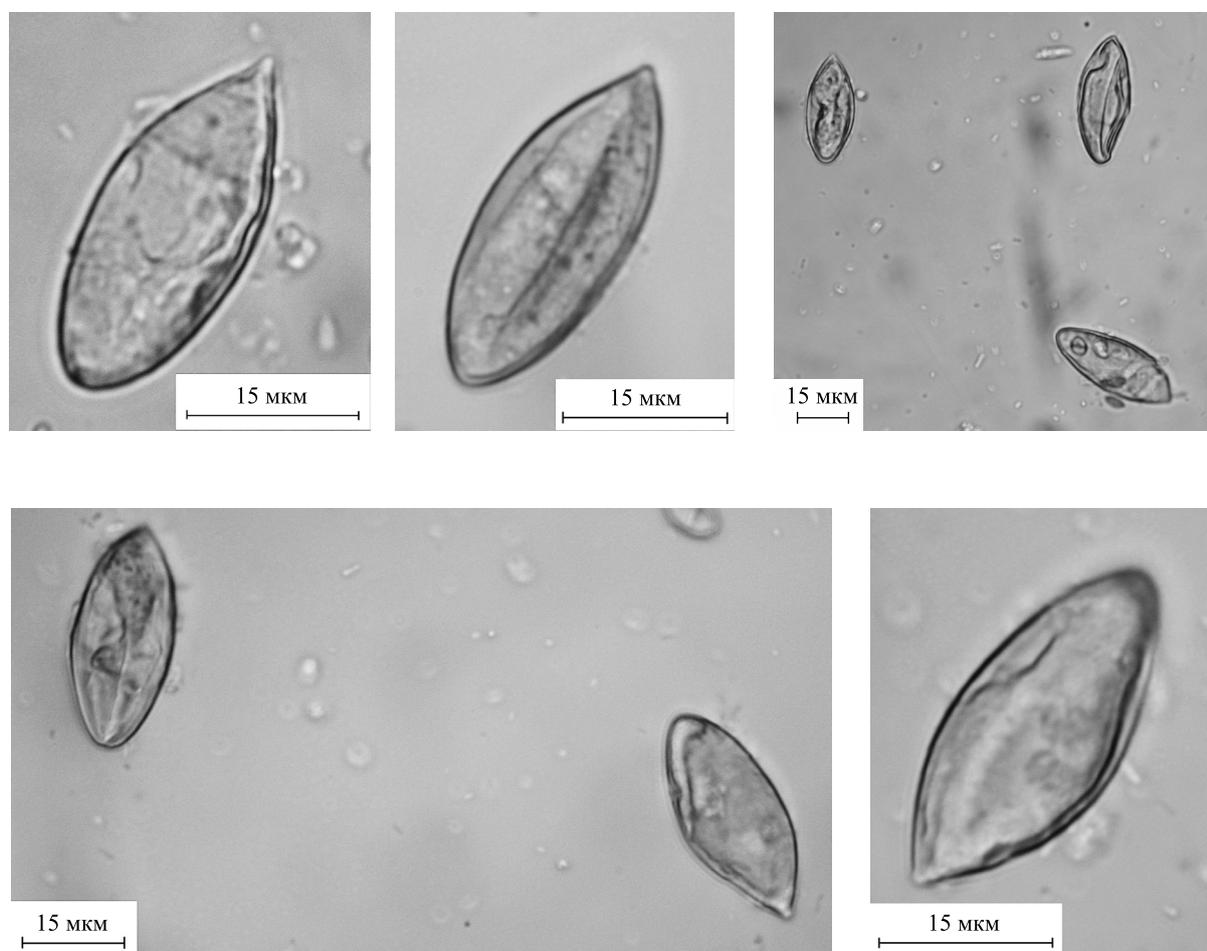


Рис. 3. Конидии *Peronospora stigmaticola*
Fig. 3. Conidia of *Peronospora stigmaticola*

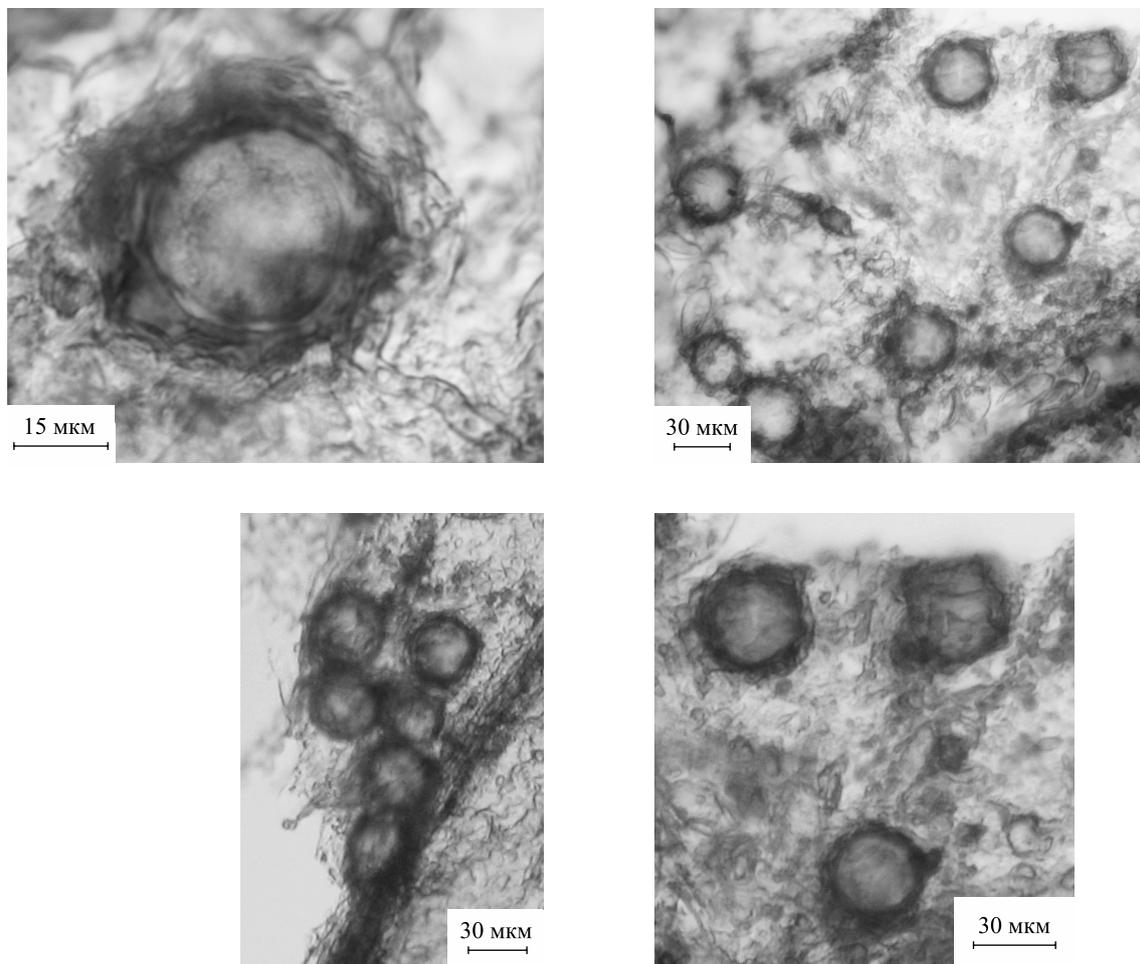


Рис. 4. Ооспоры *Peronospora stigmaticola*
Fig. 4. Oospores of *Peronospora stigmaticola*



Рис. 5. Местонахождение микромицета *Peronospora stigmaticola*
на территории Беларуси (на карте отмечено ■)
Fig. 5. Location of micromycetes
Peronospora stigmaticola in Belarus (on the map ■)

Из числа других микромицетов рода *Peronospora*, образующих спороношение только на цветках растений-хозяев, можно назвать *P. radii* de Bary (на видах родов *Tripleurospermum* Sch. Bip., *Matricaria* L., *Chamomilla* Gray, *Leucanthemum* Mill), *P. tranzscheliana* Bakhtin (на *Melampyrum pratense* L.), *P. corollae* Tranzschel (на растениях из рода *Campanula* L.), *P. scutellariae* Gäum. (на *Scutellaria galericulata* L.), *P. violacea* Berk. (на растениях из семейства Dipsacaceae), *P. jagei* Thines and Kummer (на *Stachys palustris* L.) [8–10].

Микромицет *P. stigmaticola* является в Беларуси четвертым представителем рода *Peronospora*, развивающим спороношение только на цветках хозяев (ранее в нашей республике из подобных патогенов назывались *P. radii* на *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. Bip. [10; 13], *P. corollae* на *Campanula rotundifolia* L. и *C. glomerata* L. [13; 14], а также *P. violacea* на *Knautia arvensis* (L.) Coult. [14; 15]).

Приведенная информация о грибоподобном организме *P. stigmaticola* дополняет данные о его распространении, морфометрических характеристиках и может быть учтена при инвентаризации микобиоты Беларуси. Сведения о возможном круге хозяев *P. stigmaticola* в Беларуси будут полезны для выявления пораженных растений и разработки мероприятий по защите культивируемых хозяев патогена от пероноспороза цветков.

Библиографические ссылки

1. Raunkiær C. Et Par nye Snyltesvampe // *Botanisk Tidsskrift*. 1892–1893. Bind 18. S. 108–109.
2. Constantinescu O. An annotated list of *Peronospora* names // *Thunbergia*. 1991. № 15. P. 84.
3. Ульяницев В. И. Микофлора Азербайджана. Баку : Изд-во АН АзССР, 1967. Т. IV : Пероноспоровые грибы.
4. Kochman J., Majewski T. Grzyby (Mycota). Warszawa : Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 1970. Т. IV : Glonowce (Phycomycetes), Wroślikowe (Peronosporales). S. 239–241.
5. Новотельнова Н. С., Пыстина К. А. Флора споровых растений СССР. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1985. Т. XI : Грибы, вып. 3 : Порядок Peronosporales (сем. Pythiaceae, Phytophthoraceae, Peronosporaceae, Cystopaceae). С. 284.
6. Thines M., Kummer V. Diversity and species boundaries in floricolous downy mildews // *Mycol. Progr.* 2013. Vol. 12, issue 2. P. 321–329. DOI: 10.1007/s11557-012-0837-7.
7. Ячевский А. А., Ячевский П. А. Определитель грибов. Совершенные грибы (Диплоидные стадии). М. ; Л. : Гос. изд-во с.-х. и колхоз.-кооп. лит., 1931. Т. 1 : Фикомицеты. С. 146–147.
8. Plant Parasites of Europe: leafminers, galls and fungi [Электронный ресурс]. URL: <http://bladmineerders.nl> (дата обращения: 03.12.2017).
9. Phytoparasitische Kleinpilze [Электронный ресурс]. URL: <http://jule.pflanzenbestimmung.de> (дата обращения: 26.11.2017).
10. Гирилович И. С. Грибоподобные организмы (порядок Peronosporales) Беларуси. Минск : БГУ, 2013.
11. Растительный покров Белоруссии (с картой м. 1 : 1 000 000). Минск : Наука и техника, 1969. С. 26.
12. Великанов Л. Л., Сидорова И. И., Успенская Г. Д. Полевая практика по экологии грибов и лишайников. М. : МГУ, 1980. С. 46.
13. Храмов А. К. Микромицеты рода *Peronospora* Corda – возбудители пероноспороза растений с симптомами на цветках в Беларуси // Современная микология в России : материалы IV съезда микологов России (Москва, 12–14 апр. 2017 г.). М., 2017. Т. 7. С. 49–51.
14. Храмов А. К., Тихомиров Вал. Н. *Peronospora corollae* Tranzschel – новый вид грибоподобных организмов в микобиоте Беларуси // Биология, систематика и экология грибов и лишайников в природных экосистемах и агрофитоценозах : материалы II Междунар. науч. конф. (г. Минск – д. Каменюки, 20–23 сент. 2016 г.). Минск, 2016. С. 249–252.
15. Храмов А. К. Первые находки микромицета *Peronospora violacea* Berk. в Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 116–121.

References

1. Raunkiær C. Et Par nye Snyltesvampe. *Botanisk Tidsskrift*. 1892–1893. Bind 18. S. 108–109 (in Dan.).
2. Constantinescu O. An annotated list of *Peronospora* names. *Thunbergia*. 1991. No. 15. P. 84.
3. Ul'yanishev V. I. [Mycoflora of Azerbaijan]. Baku : Publishing House of the Academy of Sciences of AzSSR, 1967. Vol. IV : [Downy mildews] (in Russ.).
4. Kochman J., Majewski T. Grzyby (Mycota). Warszawa : Państwowe Wydawnictwo Naukowe, 1970. Т. IV : Glonowce (Phycomycetes), Wroślikowe (Peronosporales). S. 239–241 (in Pol.).
5. Novotel'nova N. S., Pystina K. A. [Flora of the cryptogamic plants of the USSR]. Moscow ; Leningrad : Publ. house of the USSR Academy of Sciences, 1985. Vol. XI : Fungi, issue 3 : Order Peronosporales (fam. Pythiaceae, Phytophthoraceae, Peronosporaceae, Cystopaceae). P. 284 (in Russ.).
6. Thines M., Kummer V. Diversity and species boundaries in floricolous downy mildews. *Mycol. Progr.* 2013. Vol. 12, issue 2. P. 321–329. DOI: 10.1007/s11557-012-0837-7.
7. Yachevskii A. A., Yachevskii P. A. [Manual of fungi. Perfect fungi (Diploid stages)]. Moscow ; Leningrad : State Publ. house of Agric. and Collect. Cooperative Lit., 1931. Vol. 1 : Phycomycetes. P. 146–147 (in Russ.).
8. Plant Parasites of Europe: leafminers, galls and fungi. URL: <http://bladmineerders.nl> (date of access: 03.12.2017).
9. Phytoparasitische Kleinpilze. URL: <http://jule.pflanzenbestimmung.de> (date of access: 26.11.2017).
10. Girilovich I. S. [Pseudofungi (order Peronosporales) of Belarus]. Minsk : BSU, 2013 (in Russ.).
11. [Vegetation cover of Belarus (map s. 1 : 1 000 000)]. Minsk : Nauka i tekhnika, 1969. P. 26 (in Russ.).
12. Velikanov L. L., Sidorova I. I., Uspenskaya G. D. [Field practice on ecology of fungus and lichens]. Moscow : MSU, 1980. P. 46 (in Russ.).
13. Khramtsov A. K. [Micromycetes of the genus *Peronospora* Corda are cause of downy mildew on the plants affecting the flowers in Belarus]. *Modern mycology in Russia : mater. of the IV Congr. of mycol. of Russia* (Moscow, 12–14 April, 2017). Moscow, 2017. Vol. 7. P. 49–51 (in Russ.).
14. Khramtsov A. K., Tikhomirov Val. N. [*Peronospora corollae* Tranzschel – new species of pseudofungi in Belarusian mycobiota]. *Biology, Systematics and Ecology of Fungi and Lichen in Natural and Agricultural Ecosystems* : mater. of the II Int. of sci. conf. (Minsk – Kamenyuki, 20–23 Sept., 2016). Minsk, 2016. P. 249–252 (in Russ.).
15. Khramtsov A. K. First records of micromycetes *Peronospora violacea* Berk. in Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 116–121 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 10.01.2018.
Received by editorial board 10.01.2018.

УДК 633.367:631.52;632.752.2(476)

ЗАСЕЛЯЕМОСТЬ РАЗНЫХ ВИДОВ И ФОРМ ЛЮПИНА (*LUPINUS* SPP.) ЛЮПИНОВОЙ ТЛЕЙ (*MACROSIPHUM ALBIFRONS* ESSIG, 1911) В УСЛОВИЯХ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Д. Г. ЖОРОВ¹⁾, В. С. АНОХИНА¹⁾, И. Ю. РОМАНЧУК¹⁾

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

Представлены результаты исследования степени заселенности разных видов и форм люпина люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911). Оценена зависимость ее численности от вида и количественного содержания алкалоидов в листьях растений. Установлено, что люпин желтый характеризуется низкой степенью заселенности (1,8 балла) по сравнению с люпином узколиственным (3,2 балла) и другими формами.

Ключевые слова: Aphidoidea; Fabaceae; *Lupinus* spp.; инвазивный вид; алкалоиды; сорта люпина; степень заселенности; Беларусь.

THE COLONIZATION OF DIFFERENT LUPINE TAXON (*LUPINUS* SPP.) BY *MACROSIPHUM* *ALBIFRONS* ESSIG, 1911 IN MINSK REGION, BELARUS

D. G. ZHOROV^a, V. S. ANOKHINA^a, I. Y. RAMANCHUK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: D. G. Zhorov (zhorovDG@mail.ru)

The paper presents data about condition of different species and forms of lupine (*Lupinus* spp.) by lupine aphids (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911). The dependence of aphids abundance on the quantitative content of alkaloids in plant leaves are given. It is found that lupine yellow has a low degree of population (1.8 points) as compared to the blue lupine (3.2 points), and other forms.

Key words: Aphidoidea; Fabaceae; *Lupinus* spp.; invasive species; alkaloids; lupine varieties; the degree of colonization; Belarus.

Образец цитирования:

Жоров Д. Г., Анохина В. С., Романчук И. Ю. Заселяемость разных видов и форм люпина (*Lupinus* spp.) люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911) в условиях Минской области // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 82–94.

For citation:

Zhorov D. G., Anokhina V. S., Ramanchuk I. Y. The colonization of different lupine taxon (*Lupinus* spp.) by *Macrosiphum albifrons* Essig, 1911 in Minsk region, Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 82–94 (in Russ.).

Авторы:

Дмитрий Георгиевич Жоров – кандидат биологических наук; доцент кафедры зоологии биологического факультета.
Вера Степановна Анохина – кандидат биологических наук, доцент; заведующий сектором генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.
Ирина Юрьевна Романчук – научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Dmitrii G. Zhorov, PhD (biology); associate professor at the department of zoology, faculty of biology.
zhorovDG@mail.ru
Vera S. Anokhina, PhD (biology), docent; head of the plant genetic sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.
anokhina@tut.by
Irina Y. Ramanchuk, researcher at the plant genetic sector at the laboratory of molecular genetics and biotechnology at the department of genetics, faculty of biology.
anokhina@tut.by

Введение

Одной из важнейших задач современного сельскохозяйственного производства Республики Беларусь является обеспечение активно развивающегося животноводства высокобелковыми и энергетически ценными кормами собственного производства при сохранении и повышении плодородия посевных площадей [1–6]. Успешным решением данного вопроса может стать культивирование зернобобовых культур с высоким количеством и качеством растительного белка [7–11].

Почвенно-климатические условия нашей страны пригодны для культивирования зернобобовых (вика и горох), а также возделывания такой перспективной бобовой культуры, как люпин [12–14]. В зеленой биомассе и семенах люпина содержится от 34 до 48 % растительного белка при сбалансированном аминокислотном составе, а также повышенном содержании сахаров и ненасыщенных жирных кислот [15; 16]. Семена люпина находят практическое применение в кормовой, пищевой и мыловаренной промышленности [17]. Люпин считается лучшей среди всех зернобобовых азотонакопительной сидератной культурой, поскольку обладает отличной способностью в симбиозе с бактериями к фиксации большого количества свободного азота из воздуха и поставлению его в почву [18]. Например, на одном гектаре люпинового поля в среднем накапливается 160–180 кг симбиотического азота, а при инокуляции семян эффективными азотфиксирующими бактериями и наличии благоприятных почвенно-климатических условий накопление азота может достигать 400 кг/га [19].

Люпин широко возделывается по всему земному шару. По производству и посевным площадям в мире, Европе и странах Европейского союза он занимает 8-е место; на Украине и в странах СНГ – 4-е; в Германии и России – 3-е; в Беларуси – 2-е; в Австралии и странах Океании (Новая Зеландия, Гавайи и др.) – 1-е место [20].

Временным рубежом начала возделывания кормового люпина на территории Беларуси считаются XIX–XX вв. [21]. В последнее время в условиях нашей страны реализуется принцип адаптивного земледелия, вследствие чего возросло внимание к возделыванию ряда зернобобовых культур с высоким содержанием растительного белка. В мире активно культивируются однолетние средиземноморские виды – люпины белый (*Lupinus albus* L.) и узколистый, или синий (*Lupinus angustifolius* L.) [13; 22; 23]. Ранее в лесопосадки вводился и в настоящее время повсеместно произрастает в лесах люпин многолистный (*Lupinus polyphyllus* Lindl.). По причине поражения растений люпина желтого (*Lupinus luteus* L.) грибными болезнями его культивирование во многих странах ограничено.

Люпин многолистный – многолетнее травянистое растение североамериканского происхождения, достигающее в высоту до 1 м и характеризующееся продолжительностью жизни от восьми до десяти лет. Урожайность зеленой массы составляет от 21 до 30 т/га и даже более, семян – от 0,4 до 0,6 т/га [24]; зеленой массы люпина белого – от 20 до 30 т/га, семян – 5,1 т/га [23]; зеленой массы люпина узколистного – от 20 до 25 т/га, а иногда – 50 т/га; сбор семян может превышать 2 т/га [21]. Урожайность зеленой массы люпина желтого достигает 80 т/га, семян – 2 т/га [13].

Для получения максимального выхода конечной продукции (зеленой биомассы и семян люпина), помимо соблюдения агротехнических приемов его возделывания, важным является проведение мероприятий по контролю и борьбе с насекомыми-вредителями, поскольку ущерб, который они наносят, может приводить к серьезным экономически значимым потерям урожая [21; 25; 26]. В условиях Беларуси констатировано более 50 видов вредителей люпина [27–29]. Первые исследования вредной энтомофауны люпина приходится на 1950-е гг. [27] и продолжаются в настоящее время [25; 30–32].

В последнее десятилетие число насекомых-вредителей люпина пополнилось еще одним инвазивным для фауны Европы видом – люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911) [33]. Родиной *M. albifrons* считается Северная Америка [34]. В ряде стран Европы она выступает в качестве серьезного вредителя посевов люпина [35–38] и основного переносчика его вирусных и вирусоподобных заболеваний [39].

В условиях Беларуси люпиновая тля принадлежит к числу локально распространенных инвайдеров, которые в ближайшие годы сформируют широкий сплошной ареал на всей территории страны [40]. Данная констатация обосновывается расширением территории возделывания кормового люпина и активным проникновением многолистного люпина в лесные массивы. Не исключены также адаптивная микроэволюция люпиновой тли в изменяющихся климатических условиях и поселение ее на других видах растений.

Селекционные работы по выведению новых сортовых и гибридных форм люпина могут выступать в качестве предпосылки для активного заселения их *M. albifrons*. В связи с этим необходима информация о распространенности тли на разных формах посева люпина.

Цель настоящей работы – изучить степень заселенности различных видов люпина люпиновой тлей (*M. albifrons*) в зависимости от количественного содержания алкалоидов в вегетативных органах

(листьях) растений. Такая информация является необходимым условием для оценки уровня сортовой устойчивости сельскохозяйственных культур к вредителям [41; 42].

Актуальность таких исследований обусловлена сведениями [43–45] о преимущественном посещении тлей горьких алкалоидосодержащих растений, из которых они накапливают алкалоиды, служащие им в качестве защитных средств в борьбе с другими организмами. Для достижения поставленной цели в листьях растений разных форм и видов люпина было определено количество алкалоидов.

Материалы и методы исследований

Количественный учет заселенности люпина *M. albifrons* проводили на опытной площадке, расположенной на территории Ботанического сада Белорусского государственного университета, где сотрудники сектора генетики растений изучают отдельные виды бобовых культур (горох, кормовые бобы, люпин, нут и фасоль). При учете степени заселенности было обследовано 170 коллекционных образцов люпина разного происхождения: 45 образцов – белого, 51 – желтого, 48 – узколистного и 26 – многолистного в естественных популяциях. Количественную оценку степени заселенности растений осуществляли с использованием стандартной 5-балльной шкалы. Количество алкалоидов в листьях люпинов определяли по методике [46; 47]. Обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ *Excel 2007*.

Результаты исследований и их обсуждение

Полученные в результате опыта данные отражены в табл. 1–4, в которых приведены сведения о характеристике формы люпина; месте локализации фитофага; балле, отражающем степень заселенности насекомыми исследуемых растений; количестве алкалоидов в листьях растений люпина.

В целях выявления наиболее устойчивых форм к инвазивному вредителю оценена степень заселенности разных образцов люпинов белого, желтого и узколистного, а также учтена степень заселенности растений люпина тлей в зависимости от содержания алкалоидов в листьях.

Таблица 1

Заселенность люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig) разных форм люпина белого (*L. albus* L.)

Table 1

The colonization of White lupine (*L. albus* L.) by Lupine aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig)

Образец люпина	Место локализации тлей	Степень заселенности, балл	Средняя заселенность, балл	Количество алкалоидов в листьях, % на сухое вещество
Пищевой ХМЗ, 500 Гр, ФМ1	ЛП (молодые), Ц	0,5	0,5	0,096 ± 0,001
Пищевой ХМЗ, 500 Гр, ФМ1	СОЦ	1,8	1,8	0,083 ± 0,003
Гамма, 500 Гр, б/а, ФМ1	ЛП, Ч, СОЦ	3,0	3,0	0,052 ± 0,000
Гамма ХМ4, линия 1	НЛП	1,0	1,0	0,599 ± 0,025
	НЛП, СОЦ	1,0		
Гамма ХМ4, линия 3	НЛП (молодые), СОЦ	3,5	3,5	От менее 0,02 до 0,060 ± 0,000
Гамма ХМ4, линия 4	НЛП (молодые)	3,5	3,5	От менее 0,02 до 0,086 ± 0,007
	НЛП (молодые)	3,5		
Гамма ХМ4, линия 5	НЛП, Ч, СОЦ	4,5	4,5	0,104 ± 0,002
Дега ХМ4, линия 1	НЛП (молодые), Ч, СОЦ	3,0	3,3	От менее 0,02 до 0,244 ± 0,008
	НЛП (молодые), Ч, СОЦ	3,5		
Дега ХМ4, линия 2	НЛП (молодые), ВС	0,5	0,5	От менее 0,02 до 0,040 ± 0,001

Окончание табл. 1
Ending table 1

Образец люпина	Место локализации тлей	Степень заселенности, балл	Средняя заселенность, балл	Количество алкалоидов в листьях, % на сухое вещество
Линия 802-15	НЛП (молодые)	1,0	1,8	0,644 ± 0,001
	НЛП (молодые)	2,5		
Линия 357-2	НЛП (молодые), ВС	1,0	1,0	0,522 ± 0,026
К-682	ВЛП, ВС	4,5	4,3	0,480 ± 0,024
	НЛП, Ч, ВС	4,0		
Осiros 930/3	НЛП (молодые)	0,5	0,5	0,403 ± 0,010
Hindoso de Puros	НЛП (молодые), ВС	1,5	1,3	0,545 ± 0,046
	НЛП (молодые), Ч	1,0		
Диета	НЛП, ВС, СОЦ, Ц	5,0	5,0	0,506 ± 0,019
Алый парус	ЛП	3,5	3,7	Менее 0,02
	НЛП (молодые), СТ	4,0		
	НЛП, СОЦ	3,5		
Старт	ВЧР	4,0	3,7	Менее 0,02
	ВЧР	5,0		
	ВЧР	2,0		
	ВЧР	3,5		
	ВЧР	3,8		
Киевский мутант	НЛП	2,5	3,2	Менее 0,02
	НЛП	1,8		
Деснянский	ЛП, СОЦ, ВС	3,8	2,7	–
	НЛП (молодые)	1,5		
Calabria	НЛП (молодые), СОЦ	1,3	2,7	–
	НЛП	1,5		
	НЛП (молодые), СОЦ	1,8		
	НЛП (молодые), СОЦ, ВС	5,0		
	ЛП, СТ	4,0		
Soldana	Ч	1,5	1,3	0,633 ± 0,044
	НЛП, СТ	1,0		
Синий парус	ЛП, СТ	2,5	2,9	0,606 ± 0,010
	ЛП (молодые), ВС	4,3		
	ЛП, СТ	2,0		
Multolupa	ЛП, СТ, Ц	2,8	2,8	0,524 ± 0,020
Ортам	НЛП (молодые), Ц	1,0	1,0	0,144 ± 0,001

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: ЛП – листовая пластинка; НЛП – нижняя часть листовой пластинки; ВЛП – верхняя часть листовой пластинки; Ч – черешок листа; ВС – вершина стебля; СТ – стебель; СОЦ – соцветие; Ц – цветы; ВЧР – все части растения.

Проанализировано 24 образца люпина белого (см. табл. 1). Исходя из данных таблицы, можно заключить, что у растений сорта Диета отмечен максимальный (5,0) балл степени заселенности данным инвазивным фитофагом при количественном содержании алкалоидов в листьях 0,506 %. Достаточно высокая степень заселенности была отмечена у образцов люпина белого – Гамма ХМ4, линия 5 (4,5 балла при количестве алкалоидов в листьях 0,104 %) и К-682 (4,3 балла; 0,480 % алкалоидов). Среди сортовых форм *L. albus* низкая степень заселенности отмечена у образцов Осірос 930/3 (0,5 балла; 0,403 % алкалоидов), Дега ХМ4, линия 2 (0,5 балла; от менее 0,02 до 0,040 % алкалоидов) и аналогично у образца Пищевой ХМЗ, 500 Гр, ФМ1 (0,5 балла; 0,096 % алкалоидов). Наиболее предпочитаемыми местами локализации *M. albifrons* на образцах люпина белого были соцветия и нижняя часть листовой пластинки.

Таблица 2

**Заселенность люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig)
разных форм люпина желтого (*L. luteus* L.)**

Table 2

**The colonization of yellow lupine (*L. luteus* L.)
by Lupine aphids (*Macrosiphum albifrons* Essig)**

Образец люпина	Место локализации тлей	Степень заселенности, балл	Средняя заселенность, балл	Количество алкалоидов в листьях, % на сухое вещество
11-02-2-4, 60 Кр, семья 1, линия 1 (мутант)	НЛП	1,5	1,5	0,490 ± 0,005
11-02-2-4, 60 Кр, семья 1, линия 3 (мутант)	НЛП, Ч, СТ	3,5	3,5	0,421 ± 0,025
11-02-2-4, 60 Кр, семья 2, линия 1 (мутант)	НЛП	0,5	0,5	0,487 ± 0,002
11-02-2-4, 80 Кр, семья 1, линия 2 (мутант)	СОЦ	2,0	2,0	0,473 ± 0,006
	НЛП, Ч	2,5		
	НЛП, Ч	1,5		
	НЛП, Ч	1,8		
11-02-2-4, 80 Кр, семья 2, линия 2 (мутант)	НЛП	0,8	0,7	0,506 ± 0,002
	НЛП	0,5		
11-02-2-4, 80 Кр, семья 4, линия 1 (мутант)	НЛП, Ч	1,5	1,5	Менее 0,02
	СТ	1,5		
11-02-2-4, 80 Кр, семья 8, линия 1 (мутант)	НЛП, Ч, СТ	3,8	2,2	0,408 ± 0,038
	НЛП	0,5		
Мф 3Д (контроль)	НЛП (молодые), ВС	0,5	2,3	0,285 ± 0,000
	ВС	4,0		
№ 775	Ч	0,5	0,5	Менее 0,02
Tremosilla, 750 Гр (мутант)	Ч	5,0	2,8	–
	Ч, СОЦ	1,5		
Tremosilla, 500 Гр (мутант)	НЛП, Ч	1,8	1,8	0,147 ± 0,000
P: Tremosilla	ЛП, СТ, СОЦ	0,5	3,1	От менее 0,02 до 0,293 ± 0,008
	НЛП, СТ	3,0		
	СТ	5,0		
	СОЦ	2,0		
	СТ, Б	5,0		

Окончание табл. 2
Ending table 2

Образец люпина	Место локализации тлей	Степень заселенности, балл	Средняя заселенность, балл	Количество алкалоидов в листьях, % на сухое вещество
F3: Tremosilla × БСХА-382	ЛП, СТ	3,8	3,0	От менее 0,02 до 0,337 ± 0,024
	ВЧР	3,5		
	НЛП, СТ, Б	1,8		
F3: Tremosilla × БСХА-382	НЛП	1,3	2,6	0,305 ± 0,008
	НЛП	0,5		
	НЛП	0,8		
P: БСХА-13	СОЦ	2,0	1,1	Менее 0,02
	СТ	0,1		
F3: БСХА-13 × Tremosilla	НЛП	0,01	0,1	От менее 0,02 до 0,325 ± 0,004
F3: БСХА-13 × Демидовский	НЛП, Ч	2,0	2,0	От менее 0,02 до 0,363 ± 0,016
P: Престиж	СТ, СОЦ	1,3	2,7	Менее 0,02
	СТ	4,0		
F3: Престиж × БСХА-19	ЛП, СТ, Ц	4,5	2,7	От менее 0,02 до 0,337 ± 0,003
	СТ	0,5		
	ЛП, СТ, СОЦ	3,0		
F3: Престиж × БСХА-19	СОЦ	0,01	0,4	От менее 0,02 до 0,248 ± 0,003
	НЛП	0,8		
F3: Престиж × МЛ	СОЦ	0,5	0,5	Менее 0,02
	СТ	0,5		
P: МЛ	СТ, Б	1,5	1,5	Менее 0,02
F3: МЛ × БСХА-13	НЛП, Ч, СТ	1,0	1,0	Менее 0,02
F3: МЛ × Престиж	НЛП, СТ, СОЦ	1,1	1,1	От менее 0,02 до 0,366 ± 0,001
Надежный, 750 Гр (мутант)	НЛП	0,5	0,5	Менее 0,02
Пионер	ЛП	0,5	0,5	От менее 0,02 до 0,252 ± 0,014
Булат	Ч	1,8	1,4	–
	ЛП (молодые)	1,0		
Факел	Ч	2,0	2,0	–

Примечание. Б – бобы.

Проанализировано 28 образцов люпина желтого (см. табл. 2). Наибольшая степень заселенности *M. albifrons* зарегистрирована для горькой (0,421 % алкалоидов) мутантной формы 11-02-2-4, 60 Кр, семья 1, линия 3 (3,5 балла). Достаточно высокая степень заселенности тлей отмечена на таких формах люпина желтого, как Tremosilla (3,1 балла; от менее 0,02 до 0,293 % алкалоидов) и Tremosilla × БСХА-382 (3,0 балла; от менее 0,02 до 0,337 % алкалоидов). Низкая степень заселенности

люпиновой тлей установлена на гибридных образцах *L. luteus* – БСХА-13 × Tremosilla (0,1 балла; от менее 0,02 до 0,325 % алкалоидов) и Престиж × БСХА-19 (0,4 балла; от менее 0,02 до 0,248 % алкалоидов). Наиболее предпочитаемыми местами локализации *M. albifrons* на образцах люпина желтого были черешки и нижняя часть листовых пластинок, а также сочные недревесневшие стебли. Люпин желтый характеризуется наличием у отдельных генотипов алкалоида грамина, токсичность которого изучена мало. В связи с этим, вероятно, в опыте имелись разные показания по заселению тлей и содержанию алкалоидов.

Проанализирован 21 образец люпина узколистного (см. табл. 3). Исходя из полученных результатов, видно, что образцы Fest и Fest × Миртан характеризовались максимальной степенью заселенности – по 5,0 балла. Эти образцы люпина узколистного принадлежат к числу горьких на основании количественного содержания в их листовых пластинках алкалоидов: в образце Fest – 0,310 %; в образце Fest × Миртан – 0,311 %. Высокая степень заселенности была отмечена у образцов Fest × Миртан (4,5 балла), Fest × Yorrel (4,2 балла) и Frost (4,1 балла), растения которых являются высокоалкалоидными: 0,354; 0,471 и 0,412 % соответственно. Минимальная колонизация *M. albifrons* зарегистрирована на гибридных формах Брянский 1272 × Wonga, что составило 0,1 балла при количестве алкалоидов в листьях менее 0,02 %. Наиболее предпочитаемыми местами локализации люпиновой тли на кормовом растении были вершина сочного стебля и листовые пластинки.

Таблица 3

Заселенность люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig) разных форм люпина узколистного (*L. angustifolius* L.)

Table 3

The colonization of lupine narrow-leaved (*L. angustifolius* L.) by lupine aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig)

Образец люпина	Место локализации тлей	Степень заселенности, балл	Средняя заселенность, балл	Количество алкалоидов в листьях, % на сухое вещество
P: Fest	СТ	5,0	5,0	0,310 ± 0,005
	BC	5,0		
P: Fest	BC, СОЦ	3,8	3,8	0,310 ± 0,005
F3: Fest × Миртан	Ч, СОЦ, BC	4,0	4,5	0,354 ± 0,003
	СТ, Ц, Б	5,0		
	ВЧР	4,5		
F3: Fest × Миртан	СТ	5,0	5,0	0,311 ± 0,009
	BC	5,0		
	BC, Б	5,0		
	ВЧР	5,0		
	ВЧР	5,0		
F3: Fest × Yorrel	BC	2,0	4,2	0,471 ± 0,007
	СТ	3,8		
	ВЧР	5,0		
	ВЧР	5,0		
	ВЧР	5,0		
F3: Fest × Yorrel	ВЧР	4,8	3,9	От менее 0,02 до 0,229 ± 0,008
	ВЧР	3,5		
	ЛП	3,5		
F3: Fest × Yorrel	СТ	1,5	1,5	0,469 ± 0,012

Окончание табл. 3
Ending table 3

Образец люпина	Место локализации тлей	Степень заселенности, балл	Средняя заселенность, балл	Количество алкалоидов в листьях, % на сухое вещество
F3: Fest × Yorrel	BC	1,5	1,7	От менее 0,02 до 0,629 ± 0,031
	ЛП (молодые)	1,5		
	BC, Б	2,0		
P: Yorrel	ЛП, BC	1,8	1,3	Менее 0,02
	ЛП (молодые)	0,8		
P: Брянский 1272	BC, Б	4,5	3,5	0,256 ± 0,019
	НЛП, BC	2,5		
F3: Брянский 1272 × Wonga	Ч	0,1	0,1	Менее 0,02
F3: Ашчадны × Брянский 1121	ЛП, СТ	3,8	3,8	Менее 0,02
F3: Ашчадны × Брянский 1121	ЛП (молодые)	1,5	2,0	Менее 0,02
	ЛП, BC	1,8		
	ЛП, BC	3,3		
	ЛП (молодые)	1,3		
P: Першацвет	ВЧР	5,0	3,7	Менее 0,02
	BC, Б	3,5		
	СТ	2,5		
F3: Першацвет × Frost	BC, Б	2,8	2,8	От менее 0,02 до 0,449 ± 0,005
P: Frost	BC	2,0	4,1	0,412 ± 0,011
	ВЧР	5,0		
	BC	4,5		
	BC	4,8		
F3: Wonga × Ашчадны	BC	2,8	2,3	–
	BC	1,8		
F3: Мирган × Брянский 1272	BC	1,8	1,4	–
	BC	1,0		
F3: Мирган × Брянский 1272	BC	1,0	1,2	Менее 0,02
	BC	1,3		
F3: Ppg 34 × БСХА 505 (3)	ЛП (молодые)	1,3	1,3	От менее 0,02 до 0,161 ± 0,004
F3: Ppg 34 × БСХА 505 (4)	ЛП (молодые)	1,3	1,3	От менее 0,02 до 0,125 ± 0,008

Учет степени заселенности природной популяции люпина многолистного (*L. polyphyllus*) позволил констатировать, что средняя степень заселенности исследуемых образцов *M. albifrons* равнялась 2,3 балла (см. табл. 4) при количественном содержании алкалоидов в листьях 2,89 % [48].

Таблица 4

Заселенность люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig)
 природной популяции люпина многолистного (*L. polyphyllus* Lindl.)

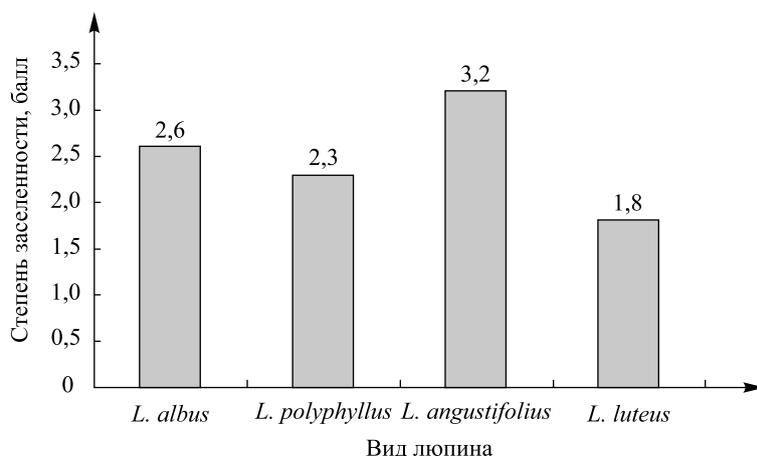
Table 4

The colonization of the natural population of lupine multilayer (*L. polyphyllus* Lindl.)
 by lupine aphid (*Macrosiphum albifrons* Essig)

Образец люпина	Место локализации тлей	Степень заселенности, балл	Средняя заселенность, балл	Количество алкалоидов в листьях, % на сухое вещество
<i>L. polyphyllus</i> (природная популяция)	Ч	0,01	2,3	2,89
	ЛП, СТ	0,1		
	ЛП, СТ	2,8		
	ВС, Б	5,0		
	ВС, Б	5,0		
	ВС, Б	5,0		
	ВС, Б	3,5		
	ВС, Б	4,0		
	Б, Ц	0,5		
	СТ, ПЛ	0,4		
	СТ	0,2		
	ВС, Б	0,2		
	ВС (зрелый), Б	3,8		
	ВС, Б	1,5		
	ВС, Б	1,5		
	ВС	2,5		
	Б	0,2		
	Б	0,01		
	Б	0,01		
	Б	0,01		
	ПЛ	0,1		
ВС, Б	4,0			
СТ, ПЛ	4,5			
ВС	5,0			
ВС, ПЛ, Б	4,5			
СТ, Б	5,0			

Примечание. ПЛ – плодоножка боба.

Полученные результаты количественной оценки степени заселенности различных видов люпина (см. рисунок) свидетельствуют о том, что наименее колонизированными инвазивным вредителем оказались растения люпина желтого (1,8 балла). Люпин белый и многолистный характеризовались практически равной заселенностью – 2,6 и 2,3 балла соответственно, а максимальная заселенность *M. albifrons* была отмечена для растений люпина узколистного – 3,2 балла в среднем по всем изученным образцам этого вида.



Средняя заселенность разных видов люпина (*Lupinus* spp.) люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911)

The degree of colonization of different species of lupine (*Lupinus* spp.) by lupine aphids (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911)

В ходе учетов на опытной площадке в колониях *M. albifrons*, сформированных на различных образцах люпинов, были отмечены единичные особи и даже целые колонии, пораженные энтомопатогенными грибами отдела Zygomycota – *Entomophthora* spp. Высокая паразитическая активность представителей рода *Entomophthora* позволяет рассматривать их в качестве потенциальных объектов биологической борьбы с тлей – вредителем бобовых культур [49; 50].

Заключение

На основе количественной оценки степени заселенности люпиновой тлей (*M. albifrons*) исследуемых видов, сортообразцов и гибридов люпина установлено, что люпин желтый характеризуется низкой степенью заселенности (1,8 балла) по сравнению с люпином узколистным (3,2 балла) и другими формами этого растения.

Сравнительный анализ заселенности растений люпина люпиновой тлей с содержанием алкалоидов в листьях подтверждает данные авторов [43–45] о предпочтительном посещении насекомыми этого вида горьких растений. Кроме того, максимальное наличие тли на растениях люпина узколистного, вероятно, связано с присутствием в алкалоидном комплексе этого вида люпина наиболее токсичного алкалоида – люпанина, который в меньшем количестве содержится в других видах люпина. Полученная информация является оригинальной для выработки новой стратегии в селекции люпина, однако для этого необходимы дальнейшие углубленные исследования.

Библиографические ссылки

1. Лукашевич Н. П., Зенькова Н. Н. Технологии производства и заготовки кормов : практ. рук. Витебск : ВГАВМ, 2009.
2. Гусаков В. Г., Валуев В. В., Святогор А. П. и др. Экономические факторы и пути повышения эффективности использования кормов // Изв. Акад. аграр. наук Респ. Беларусь. Сер.: Экономика и информатика. 1998. № 4. С. 45–50.
3. Голушко В., Голушко А. Горох в рационах свиней // Животноводство России. 2015. № 11. С. 29–30.
4. Голушко В. М., Линкевич С. А., Голушко О. Г. и др. Рапсовый жмых в рационах сельскохозяйственных животных // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. 2012. № 3. С. 80–85.
5. Голушко В. М., Роцин В. А., Линкевич С. А. и др. Использование низкопротеиновых рационов при выращивании и откорме молодняка свиней // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. 2016. № 4. С. 100–107.
6. Об увеличении производства семян бобовых культур в 1997–2000 гг. : приказ Министерства сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь от 13 марта 1997 г. № 61 // Право Беларуси [Электронный ресурс]. URL: <http://www.lawbelarus.com/075492> (дата обращения: 16.09.2017).
7. Гатаулина Г. Г., Медведева Н. В., Штеле А. Л. и др. Рост, развитие, урожайность и кормовая ценность сортов белого люпина (*Lupinus albus* L.) селекции РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева // Изв. ТСХА. 2013. Вып. 6. С. 12–30.
8. Штеле А. Решение проблемы дефицита протеина в комбикормах для птицы // Комбикорма. 2016. № 7–8. С. 62–65.
9. Вильдфлуш И. Р., Саскевич П. А., Лана В. В. и др. Современные технологии возделывания сельскохозяйственных культур. Горки : БГСХА, 2016.
10. Рышкель И. В., Рышкель О. С. Зернобобовые культуры в кормопроизводстве Беларуси // Весн. Палес. дзярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук. 2011. № 1. С. 51–55.

11. Тарануха Г. И., Равков Е. В., Тарануха В. Г. и др. Проблема белка и роль селекции бобовых культур в ее решении // Весті Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. 2015. № 3. С. 79–84.
12. Борис И. И., Гринь В. В., Васько С. В. К проблеме технологии возделывания узколистного люпина // Проблемы и пути повышения эффективности растениеводства в Беларуси : материалы юбил. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию образования Ин-та земледелия (Жодино, 29 июня 2007 г.). Жодино, 2007. С. 247–249.
13. Привалов Ф. И., Шор В. Ч. Перспективы возделывания, селекции и семеноводства люпина в Беларуси // Весті Нац. акад. навук. Сер. аграр. навук. 2015. № 2. С. 47–53.
14. Привалов Ф. И., Шор В. Ч., Купцов Н. С. Состояние и перспективы возделывания люпина в Республике Беларусь // Земледелие и защита растений. 2013. № 3. С. 3–9.
15. Соловьева Е. В., Дроздова Ю. В., Соловьева Ж. П. Семена люпина – ценный источник сбалансированного растительно-го белка для производства комбикормов // Науч. тр. КубГТУ. 2015. № 5. С. 1–7.
16. Артюхов А., Гапонов Н. Люпин – ценный источник белка в комбикормах // Комбикорма. 2010. № 3. С. 65–66.
17. Саломатин А. Д., Теречик Л. Ф. Применение белка люпина в производстве пищевых продуктов // Пищевая промышленность. 1999. № 7. С. 38–39.
18. Посыпанов Г. С. Азотфиксация бобовых культур в зависимости от почвенно-климатических условий // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. М., 1985. С. 75.
19. Васильева Е. А., Ялович Л. И. Симбиотическая и азотфиксирующая способность люпина в зависимости от факторов интенсификации // Вестн. АГАУ. 2010. № 7, вып. 69. С. 29–30.
20. Шпаар Д., Элмер Ф., Постников А. и др. Зернобобовые культуры / под общ. ред. Д. Шпаар. Минск : ФУАИинформ, 2000.
21. Персикова Т. Ф., Цыганов А. Р., Какишинцев А. В. Продуктивность люпина узколистного в условиях Беларуси. Минск : ИВЦ Минфина, 2006.
22. Кадыров М. А. Расширение посевов люпина узколистного – стратегическая цель земледелия Беларуси // Земляробства і ахова раслін. 2004. № 6. С. 5–7.
23. Наумкин В. Н., Куренская О. Ю., Муравьев А. А. и др. Эффективность возделывания люпина белого при разных уровнях минерального питания // Зернобобовые и крупяные культуры. 2015. № 4. С. 61–68.
24. Карпук В. В., Сидорова С. Г. Растениеводство. Минск : БГУ, 2011.
25. Немкевич М. Г. Вредная фауна люпина узколистного в Беларуси // Современные проблемы энтомологии Восточной Европы : материалы I Междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 8–10 сент. 2015 г.). Минск, 2015. С. 207–210.
26. Пимохова Л. И., Слесарева Т. Н., Цараньева Ж. В. Инсектицидный эффект против доминантных вредителей в люпиновом посеве // Зернобобовые и крупяные культуры. 2015. № 1. С. 71–74.
27. Гарбунова Н. Н. Шкоднікі лубіну. Мінск : Выд-ва Акад. навук Беларусі. ССР, 1957.
28. Васильев И. В. Вредители люпина // Защита растений. 1936. № 11. С. 103–108.
29. Довідник із захисту рослин / за ред. М. П. Лісового. Київ : Урожай, 1999.
30. Полякова Т. Е., Якушева А. С. Тли – переносчики вируса желтой мозаики фасоли на люпине в БССР // Вирусные болезни сельскохозяйственных растений и меры борьбы с ними : тез. докл. всесоюз. совещания (сент. 1978 г.). Ереван, 1978. С. 94–95.
31. Полякова Т. Е. Борьба с переносчиками вирусов на семенных посевах люпина // Защита растений. Минск, 1980. Т. 5. С. 41–48.
32. Пleshак М. Г. Видовой состав энтомофауны в посевах люпина узколистного // Интегрированная защита растений: стратегия и тактика : материалы Междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 5–8 июля 2011 г.). Несвиж, 2011. С. 894–896.
33. Жоров Д. Г., Синчук О. В., Буга С. В. Люпиновая тля (*Macrosiphum albifrons*) – новый для Беларуси опасный вредитель и переносчик вирусных заболеваний люпина // Земледелие и защита растений. 2017. № 2. С. 26–28.
34. Essig E. O. Aphididae of Southern California. VII // Pomona Coll. J. Entomol. 1911. Vol. 3. P. 523–557.
35. Cohen M. B., Mackauer M. Lupine aphid, *Macrosiphum albifrons* (Homoptera: Aphididae): distributions and hymenopterous parasites in British Columbia // Environment. Entomol. 1986. Vol. 15, № 3. P. 719–722.
36. Carter C. I., Fourn D. F., Barlett P. W. The Lupin aphid's arrival and consequences // Antenna. 1984. № 8. P. 129–132.
37. Hinz B. Versuche zur Schadensbewertung der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) an Kulturlupinen // J. Appl. Entomol. 1992. Vol. 113, issues 1–5. P. 214–216. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1992.tb00656.x.
38. Eppler A., Hinz U. Die Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* Essig, ein neuer Schaderreger und Virusvektor in Deutschland // J. Appl. Entomol. 1987. Vol. 104, issues 1–5. P. 510–518. DOI: 10.1111/j.1439-0418.1987.tb00553.x.
39. Aphids as Crop Pests / ed. by H. Emden, R. Harrington. London : CABI, 2007.
40. Буга С. В., Жоров Д. Г., Синчук О. В. Современные тренды динамики географического распространения на территории Беларуси инвазивных видов беспозвоночных-фитофагов // Земледелие и защита растений. 2016. № 3. С. 34–37.
41. Шапиро И. Д. Иммуниет полевых культур к насекомым и клещам. Л. : Колос, 1985.
42. Шапиро И. Д., Вилкова Н. А., Слепян Э. И. Иммуниет растений к вредителям и болезням. Л. : Агропромиздат, 1986.
43. Kozłowski J., Strażyński P., Jaskulska M., et al. Relationships between aphids (Insecta: Homoptera: Aphididae) and slugs (Gastropoda: Stylommatophora: Agriolimacidae) pests of Legumes (Fabaceae: *Lupinus*) // J. Insect Sci. 2016. Vol. 16, № 1. P. 1–7. DOI: 10.1093/jisesa/iw033.
44. Wink M. Evolution of toxins and anti-nutritional factors in plants with special reference to Leguminosae // Poisonous plants and related toxins / ed. by T. Acavovic [et al.]. London : CABI, 2004. P. 1–15.
45. Emrich B. N., Wink M. Untersuchungen zum alkaloidgehalt der Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* im Hinblick auf ihre Durch die wirtspflanze Erworbene Toxizität // Lupinen 1991. Forschung, Anbau und Verwertung. 1992. S. 37–52.
46. Яговенко Т. В., Рудометкина М. В., Рудометкин С. В. и др. Усовершенствованный колориметрический метод определения алкалоидов в люпине // Кормопроизводство. 2005. № 3. С. 27–29.
47. Анохина В. С., Дебелый Г. А., Конорев П. М. Люпин: селекция, генетика, эволюция. Минск : БГУ, 2012.
48. Мироненко А. В. Физиология и биохимия люпина. Минск : Наука и техника, 1965.
49. Твердюков А. П., Никонов П. В., Ющенко Н. П. Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями в защищенном грунте. М. : Колос, 1993.
50. Бондаренко Н. В. Биологическая защита растений. М. : Агропромиздат, 1986.

References

1. Lukashovich N. P., Zen'kova N. N. [Production technology of forage : manual]. Vitebsk : VGAVM, 2009 (in Russ.).
2. Gusakov V. G., Valuev V. V., Svyatogor A. P., et al. [Economic factors and ways to improve the efficiency of forage using]. *Izv. Akad. agrar. nauk Resp. Belarus'. Ser.: Ekon. i inform.* 1998. No. 4. P. 45–50 (in Russ.).
3. Golushko V., Golushko A. [Peas as a component of ration of domestic pigs]. *Zhivotnovod. Ross.* 2015. No. 11. P. 29–30 (in Russ.).
4. Golushko V. M., Linkevich S. A., Golushko O. G., et al. Rape cake in the diet of farm animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Agric. ser.* 2012. No. 3. P. 80–85 (in Russ.).
5. Golushko V. M., Roshchin V. A., Linkevich S. A., et al. Use of low-protein diets for young pigs at growing and fattening. *Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Agric. ser.* 2016. No. 4. P. 100–107 (in Russ.).
6. [About increasing the production of seeds of leguminous crops in 1997–2000] : order of the Ministry of Agriculture and Food of the Repub. of Belarus from 13 March 1997 No. 61. *Pravo Belarusi*. URL: <http://www.lawbelarus.com/075492> (date of access: 16.09.2017) (in Russ.).
7. Gataulina G. G., Medvedeva N. V., Shtele A. L., et al. [Growth, development, yield formation and feed quality of *Lupinus albus* cultivars selected in Moscow Agricultural Academy named after K. A. Timiryazev]. *Izv. Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akad.* 2013. Issue 6. P. 12–30 (in Russ.).
8. Shtele A. [The problem of the protein deficiency compound feeds for poultry and its solution]. *Kombikorma.* 2016. No. 7–8. P. 62–65 (in Russ.).
9. Vil'dflush I. R., Saskevich P. A., Lapa V. V., et al. [Modern technologies of cultivation of agricultural crops]. Gorki : Belarus. Agric. Acad., 2016 (in Russ.).
10. Ryshkel' I. V., Ryshkel' O. S. [Leguminous plants in the forage production of Belarus]. *Bull. Polessky State Univ. Ser. in natural sci.* 2011. No. 1. P. 51–55 (in Russ.).
11. Taranukho G. I., Ravkov E. V., Taranukho V. G., et al. The problem of protein and the role of leguminous crops breeding in its solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Agric. ser.* 2015. No. 3. P. 79–84 (in Russ.).
12. Boris I. I., Grin' V. V., Vas'ko S. V. [To the problem of technology of cultivation of narrow-leaved lupine]. *Problemy i puti povysheniya effektivnosti rastenievodstva v Belarusi* : mater. of anniversary Int. sci.-pract. conf. (Zhodino, 29 June, 2007). Zhodino, 2007. P. 247–249 (in Russ.).
13. Privalov Ph., Shor V. Ch. Prospects of cultivation, breeding and seed growing of lupine in Belarus. *Proc. Natl. Acad. Sci. Belarus. Agric. ser.* 2015. No. 2. P. 47–53 (in Russ.).
14. Privalov F. I., Shor V. Ch., Kuptsov N. S. State and lupine cultivation perspectives in the Republic of Belarus. *Agric. plan prot.* 2013. No. 3. P. 3–9 (in Russ.).
15. Solovyova E. V., Drozdova Y. V., Solovyova J. P. Lupine seeds – a valuable source of balanced vegetable protein for feed production. *Sci. works Kuban State Technol. Univ.* 2015. No. 5. P. 1–7 (in Russ.).
16. Artyukhov A., Gaponov N. [Lupine as an valuable protein source of forage]. *Kombikorma.* 2010. No. 3. P. 65–66 (in Russ.).
17. Salomatin A. D., Terechik L. F. [Using of lupine protein in food production]. *Food ind.* 1999. No. 7. P. 38–39 (in Russ.).
18. Posypanov G. S. [Azotfixation of leguminous plant depending on soil-climatic conditions]. *Mineral'nyi i biologicheskii azot v zemledelii SSSR*. Moscow, 1985. P. 75 (in Russ.).
19. Vasil'eva E. A., Yalovik L. I. [Symbiotic and nitrogen-fixing ability of lupine depending on the intensification factors]. *Bull. Altai State Agric. Univ.* 2010. No. 7, issue 69. P. 29–30 (in Russ.).
20. Shpaar D., Ellmer F., Postnikov A., et al. [Leguminous crops]. Minsk : FUAInform, 2000 (in Russ.).
21. Persikova T. F., Tsyganov A. R., Kakshintsev A. V. [Productivity of lupine narrow-leaved in the conditions of Belarus]. Minsk : IVTs Minfina, 2006 (in Russ.).
22. Kadyrov M. A. [Expansion of lupine narrow-leaved: the strategic goal of agriculture in Belarus]. *Agric. plan prot.* 2004. No. 6. P. 5–7 (in Russ.).
23. Naumkin V. N., Kurenskaya O. J., Murawev A. A., et al. White lupine efficiency at different levels of mineral nutrition. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury.* 2015. No. 4. P. 61–68 (in Russ.).
24. Karpuk V. V., Sidorova S. G. [Crop production]. Minsk : BSU, 2011 (in Russ.).
25. Nemkevich M. G. [The harmful fauna of the narrow-leaved lupine in Belarus]. *Sovremennye problemy entomologii Vostochnoi Evropy* : mater. I Int. of sci.-pract. conf. (Minsk, 8–10 Sept., 2015). Minsk, 2015. P. 207–210 (in Russ.).
26. Pimokhova L. I., Slesareva T. N., Tsarapneva Z. V. [Effect of insecticides against dominant pests in lupine crop]. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury.* 2015. No. 1. P. 71–74 (in Russ.).
27. Garbunova N. N. [Pests of lupine]. Minsk : Vydavectva Akademiï navuk Belarus. SSR, 1957 (in Belarus.).
28. Vasil'ev I. V. [Pests of lupine]. *Plan prot.* 1936. No. 11. P. 103–108 (in Russ.).
29. Lisovoj M. P. (ed.). [A guide for plant protection]. Kiiv : Urozhaj, 1999 (in Ukrainian).
30. Polyakova T. E., Yakusheva A. S. [Aphids of vectors of the yellow bean mosaic virus on lupine in the BSSR]. *Virusnye bolezni sel'skokhozyaistvennykh rastenii i mery bor'by s nimi* : abstr. of the All-Union conf. (Sept., 1978). Erevan, 1978. P. 94–95 (in Russ.).
31. Polyakova T. E. [Control of vectors of viruses on seed crops of lupine]. *Plan prot.* Minsk, 1980. Vol. 5. P. 41–48 (in Russ.).
32. Pleshak M. G. [The species composition of the insect fauna in crops of narrow-leaved lupine]. *Integrirovannaya zashchita rastenii: strategiya i taktika* : mater. of Int. sci.-pract. conf. (Minsk, 5–8 July, 2011). Nesvizh, 2011. P. 894–896 (in Russ.).
33. Zhorov D. G., Sinchuk O. V., Buga S. V. [Lupine aphid (*Macrosiphum albifrons*) a new dangerous pest and vector of viral diseases of lupine in Belarus]. *Agric. plan prot.* 2017. No. 2. P. 26–28 (in Russ.).
34. Essig E. O. Aphididae of Southern California. VII. *Pomona Coll. J. Entomol.* 1911. Vol. 3. P. 523–557.
35. Cohen M. B., Mackauer M. Lupine aphid, *Macrosiphum albifrons* (Homoptera: Aphididae): distributions and hymenopterous parasites in British Columbia. *Environment. Entomol.* 1986. Vol. 15, No. 3. P. 719–722.
36. Carter C. I., Fourt D. F., Barlett P. W. The Lupin aphid's arrival and consequences. *Antenna.* 1984. No. 8. P. 129–132.
37. Hinz B. Versuche zur Schadensbewertung der Lupinenblattlaus (*Macrosiphum albifrons* Essig) an Kulturlupinen. *J. Appl. Entomol.* 1992. Vol. 113, issues 1–5. P. 214–216 (in Ger.). DOI: 10.1111/j.1439-0418.1992.tb00656.x.
38. Eppler A., Hinz U. Die Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* Essig, ein neuer Schaderreger und Virusvektor in Deutschland. *J. Appl. Entomol.* 1987. Vol. 104, issues 1–5. P. 510–518 (in Ger.). DOI: 10.1111/j.1439-0418.1987.tb00553.x.

39. Emden H., Harrington R. (eds). *Aphids as Crop Pests*. London : CABI, 2007.
40. Buga S. V., Zhorov D. G., Sinchuk O. V. [Current trends in the dynamics of geographical distribution of invasive phytophagous species in Belarus]. *Agric. plan prot.* 2016. No. 3. P. 34–37 (in Russ.).
41. Shapiro I. D. [Immunity of field crops to insects and mites]. Leningrad : Kolos, 1985 (in Russ.).
42. Shapiro I. D., Vilkovala N. A., Slepian E. I. [Plant immunity to pests and diseases]. Leningrad : Agropromizdat, 1986 (in Russ.).
43. Kozłowski J., Strażyński P., Jaskulska M., et al. Relationships between aphids (Insecta: Homoptera: Aphididae) and slugs (Gastropoda: Stylommatophora: Agriolimacidae) pests of Legumes (Fabaceae: *Lupinus*). *J. Insect Sci.* 2016. Vol. 16, No. 1. P. 1–7. DOI: 10.1093/jisesa/iew033.
44. Wink M. Evolution of toxins and anti-nutritional factors in plants with special reference to Leguminosae. In: T. Acavovic, C. S. Stewart, T. W. Pennycott (eds). *Poisonous plants and related toxins*. London : CABI, 2004. P. 1–15.
45. Emrich B. N., Wink M. Untersuchungen zum alkaloidgehalt der Lupinenblattlaus *Macrosiphum albifrons* im Hinblick auf ihre Durch die wirtspflanze Erworbenene Toxizität. *Lupinen 1991. Forschung, Anbau und Verwertung*. 1992. S. 37–52 (in Ger.).
46. Yagovenko T. V., Rudometkina M. V., Rudometkin S. V., et al. [Advanced colorimetric method for the determination of alkaloids in lupine]. *Kormoproizvodstvo*. 2005. No. 3. P. 27–29 (in Russ.).
47. Anokhina V. S., Debelyi G. A., Konorev P. M. [Lupine: selection, genetic, evolution]. Minsk : BSU, 2012 (in Russ.).
48. Mironenko A. V. [Physiology and biochemistry of lupine]. Minsk : Nauka i tekhnika, 1965 (in Russ.).
49. Tverdyukov A. P., Nikonov P. V., Yushchenko N. P. [Biological methods of pest and disease control in protected ground]. Moscow : Kolos, 1993 (in Russ.).
50. Bondarenko N. V. [Biological protection of plants]. Moscow : Agropromizdat, 1986 (in Russ.).

Статья поступила в редакцию 20.12.2017.
Received by editorial board 20.12.2017.

УДК 598.2

ВИДОВОЕ БОГАТСТВО И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ОРНИТОФАУНЫ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

*В. В. САХВОН*¹⁾

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

По результатам исследований, проведенных в 2009–2017 гг., а также анализа литературных данных приводится видовой состав орнитофауны городов Беларуси, указывается характер пребывания отдельных видов и исследуется экологическая структура ассамблей гнездящихся птиц. Всего на урбанизированных территориях республики зарегистрировано пребывание 205 видов птиц (62,1 % всей орнитофауны Беларуси). Гнездование установлено для 140 видов птиц (68,2 %). Основу ассамблей гнездящихся птиц составляют виды, экологически связанные с лесами различного типа (38,6 %). В сумме 45,7 % всех видов птиц гнездятся в подросте и подлеске, а также на земле. По типу потребляемого корма лидируют представители, питающиеся преимущественно беспозвоночными животными и пищей растительного происхождения либо только беспозвоночными (34,3 и 32,1 % видов соответственно). На основании полученных данных определен видовой состав птиц (27 видов), находящихся под влиянием синурбизации в условиях Беларуси.

Ключевые слова: орнитофауна; экологическая структура; синурбизация; города; урбанизированные территории; Беларусь.

SPECIES RICHNESS AND ECOLOGICAL STRUCTURE OF BIRD ASSEMBLAGES IN URBAN AREAS IN BELARUS

V. V. SAKHVON^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

In this paper was analysed the bird species richness, status some species and ecological structure of breeding bird assemblages in urban areas in Belarus. The data were collected in 2009–2017 in many towns and cities of Belarus. Total 205 species (62.1 % of all avifauna in Belarus) were registered in urban areas. The breeding was confirmed for 140 species (68.2 %), 38.6 % of species of breeding bird assemblages prefers the different type of forests. The almost half of all breeding bird species (45.7 %) nests on young trees and bushes, and on the ground also. Species feeding on invertebrates and seeds or only invertebrates are 34.3 and 32.1 % respectively. The synurbic species (27) in Belarus was determined. Our results indicate that some of them (Mallard, Eurasian magpie, Hooded Crow, Woodpigeon) have been formed the stable synurbic populations in some Belarusian cities.

Key words: avifauna; bird assemblages; species richness; synurbization; urban; Belarus.

Образец цитирования:

Сахвон В. В. Видовое богатство и экологическая структура орнитофауны урбанизированных территорий в условиях Беларуси // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 95–102.

For citation:

Sakhvon V. V. Species richness and ecological structure of bird assemblages in urban areas in Belarus. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 95–102 (in Russ.).

Автор:

Виталий Валерьевич Сахвон – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры зоологии биологического факультета.

Author:

Vital V. Sakhvon, PhD (biology), docent; associate professor at the department of zoology, faculty of biology.
sakhvon@gmail.com

Введение

Одна из главных особенностей XX в. – появление и быстрое разрастание площадей урбанизированных территорий, которые привели к тому, что в настоящее время большая часть человечества проживает в городах. По состоянию на 2016 г. в мире существовало 512 городов с населением свыше 1 млн человек, и ожидается, что к 2030 г. их количество возрастет до 662. Причем, по прогнозным данным, доля городского населения к этому времени составит более 60 % [1].

Увеличение площадей городских территорий неизменно связано с сокращением доли естественных ландшафтов и обеднением биологического разнообразия вплоть до вымирания отдельных видов, в том числе и птиц. Тем не менее, несмотря на очевидную негативную роль процесса урбанизации, для многих видов птиц города стали благоприятными местообитаниями, позволившими им не только увеличить численность, но и освоить за счет расширения ареалов новые в географическом плане территории. К настоящему времени пятая часть всех видов мировой орнитофауны обитают в городах [2]. В условиях урбанизированной среды птицы нашли обилие пищевых ресурсов, доступных в течение всего года, большое количество укрытий и подходящих для гнездования мест, а также смогли минимизировать пресс со стороны естественных хищников [3; 4].

В новых для себя условиях птицы стали доминирующей группой позвоночных животных, играющей одну из ключевых ролей в функционировании сформировавшихся здесь сообществ, а также в жизнедеятельности человека. В связи с этим особое значение приобретает направление орнитологической науки, связанное с изучением орнитофауны урбозкосистем (городская орнитология), которое к настоящему времени является одним из самых популярных и динамично развивающихся, особенно в странах Европы и Америки. В Беларуси также уделялось пристальное внимание данной проблематике и на протяжении второй половины XX – начала XXI в. был накоплен значительный объем сведений, который, к сожалению, остается разрозненным и неравнозначным по отношению к отдельным крупным городам. В частности, на фоне достаточной изученности состава орнитофауны Минска [5], Бреста [6], Гомеля [7] неисследованными остаются многие другие города, в частности Могилёв. В настоящей работе предпринята попытка объединить и систематизировать имеющиеся данные по видовому составу, таксономической и экологической структуре ассамблей птиц городов Беларуси, что будет являться основой для дальнейшего их мониторинга.

Материалы и методы исследований

На основании собственных данных, полученных в ходе исследований в 2009–2017 гг. в различных городах (количественные учеты птиц, сбор данных по гнездованию видов), а также анализа литературных источников обобщены сведения по орнитофауне урбанизированных территорий в условиях Беларуси.

Результаты исследований и их обсуждение

К настоящему времени орнитофауна Беларуси включает 330 видов птиц, из которых 235 являются гнездящимися или предположительно гнездящимися [8–10]. На урбанизированных территориях отмечено пребывание 205 видов птиц (62,1 % всей орнитофауны республики), относящихся к 19 отрядам (86,3 % всех отрядов) и 51 семейству (79,6 % всех семейств) [10–17]. За все время проведения орнитологических исследований гнездование (или предположительное гнездование) было установлено для 140 видов птиц (68,2 %), относящихся к 16 отрядам и 41 семейству. Следует отметить, что к настоящему времени некоторые из видов по тем или иным причинам больше в городах не гнездятся, как, например, сизоворонка (*Coracias garrulus*), либо гнездование их нерегулярное (некоторые представители семейства Чайковых (*Laridae*), например клуша (*Larus fuscus*)). В то же время данный видовой список может расширяться за счет случайно залетевших видов птиц. К примеру, около 20 % всех видов, отмеченных в городах, известны по одной или нескольким регистрациям во внегнездовое время. Это преимущественно виды, экологически связанные с различными водоемами (представители отрядов Гусеобразных (*Anseriformes*) и Ржанкообразных (*Charadriiformes*)), которые используются птицами в качестве мест для отдыха и кормления во время сезонных миграций. Так, из 27 отмеченных в городах видов отряда Гусеобразных лишь 5 регистрируются на гнездовании.

Ниже приводится перечень видов птиц и характер их пребывания на урбанизированных территориях.

Гнездящиеся и предположительно гнездящиеся виды птиц (знаком * отмечены виды, остающиеся зимовать): *Tachybaptus ruficollis**, *Podiceps cristatus**, *P. griseogena*, *P. nigricollis*, *Botaurus stellaris*, *Ixobrychos minutus*, *Ciconia ciconia*, *Cygnus olor**, *Anas platyrhynchos**, *Aythya ferina**, *A. fuligula**, *Mergus serrator*, *Circus aeruginosus*, *Accipiter gentilis**, *A. nisus**, *Falco tinnunculus**, *Perdix perdix**, *Phasianus*

*colchicus**, *Coturnix coturnix*, *Crex crex*, *Fulica atra**, *Gallinula chloropus**, *Rallus aquaticus**, *Porzana porzana*, *P. parva*, *Charadrius dubius*, *C. hiaticula*, *Vanellus vanellus*, *Calidris pugnax*, *Actitis hypoleucos*, *Gallinago gallinago**, *Limosa limosa*, *Tringa totanus*, *T. stagnatilis*, *Chroicocephalus ridibundus**, *Larus canus**, *L. argentatus**, *L. cachinnans**, *L. melanocephalus*, *L. fuscus*, *L. minutus*, *Sterna hirundo*, *S. albifrons*, *Chlidonias niger*, *C. leucoptera*, *Columba livia**, *C. palumbus*, *Streptopelia decaocto**, *Athene noctua*, *Strix aluco**, *Asio otus**, *Apus apus*, *Alcedo atthis**, *Coracias garrulus*, *Upupa epops*, *Jynx torquilla*, *Picus viridis*, *Dryocopus martius**, *Dendrocopos major**, *D. medius*, *D. minor*, *D. syriacus**, *Galerida cristata**, *Alauda arvensis*, *Hirundo rustica*, *Delichon urbica*, *Riparia riparia*, *Motacilla alba*, *M. flava*, *Anthus pratensis**, *Troglodytes troglodytes**, *Prunella modularis*, *Erithacus rubecula**, *Luscinia luscinia*, *L. svecica*, *Phoenicurus phoenicurus*, *P. ochruros**, *Saxicola rubetra*, *S. torquata*, *Oenanthe oenanthe*, *Muscicapa striata*, *Ficedula albicollis*, *F. hypoleuca*, *F. parva*, *Turdus merula**, *T. philomelos*, *T. pilaris**, *T. viscivorus**, *T. iliacus**, *Acrocephalus arundinaceus*, *A. dumetorum*, *A. palustris*, *A. schoenobaenus*, *Hippolais icterina*, *Sylvia atricapilla*, *S. borin*, *S. communis*, *S. curruca*, *S. nisoria*, *Phylloscopus collybita*, *P. sibilatrix*, *P. trochilus*, *P. trochiloides*, *Regulus regulus**, *Locustella fluviatilis*, *L. luscinoides*, *L. naevia*, *Aegithalos caudatus**, *Panurus biarmicus**, *Parus palustris**, *P. montanus**, *P. major**, *P. ater**, *Cyanistes caeruleus**, *Remiz pendulinus**, *Sitta europaea**, *Certhia familiaris**, *Lanius collurio*, *L. excubitor**, *Oriolus oriolus*, *Garrulus glandarius**, *Pica pica**, *Corvus cornix**, *C. corax**, *C. frugilegus**, *C. monedula**, *Sturnus vulgaris**, *Passer domesticus**, *P. montanus**, *Fringilla coelebs*, *Serinus serinus*, *Chloris chloris**, *Carduelis carduelis**, *Linaria cannabina**, *Pyrrhula pyrrhula**, *Coccothraustes coccothraustes**, *Carpodacus erythrinus*, *Emberiza citrinella*, *E. hortulana*, *E. schoeniclus*.

Регулярно регистрирующиеся во время сезонных миграций или на зимовках виды птиц: *Gavia arctica*, *Phalacrocorax carbo*, *Ardea cinerea*, *Anas crecca*, *A. penelope*, *A. acuta*, *Aythya nyroca*, *A. marila*, *Melanitta nigra*, *Bucephala clangula*, *Mergellus albellus*, *Mergus merganser*, *Tringa ochropus*, *Falco peregrinus*, *Cuculus canorus*, *Glaucidium passerinum*, *Aegolius funereus*, *Picus canus*, *Bombycilla garrulus*, *Regulus ignicapillus*, *Parus cristatus*, *Spinus spinus*, *Acanthis flammea*, *Loxia curvirostra*.

Спорадически регистрирующиеся или известные по единичным встречам виды птиц: *Gavia stellata*, *Egretta garzetta*, *Ardea alba*, *Cygnus cygnus*, *Anser anser*, *A. fabalis*, *A. albifrons*, *Branta canadensis*, *Anas strepera*, *Somateria mollissima*, *Tadorna tadorna*, *T. ferruginea*, *Aix galericulata*, *Netta rufina*, *Clangula hyemalis*, *Melanitta fusca*, *Charadrius morinellus*, *Calidris minuta*, *Phalaropus lobatus*, *Lymnocyptes minimus*, *Scolopax rusticola*, *Stercorarius parasiticus*, *Hydropogone caspia*, *Tyto alba*, *Bubo bubo*, *Surnia ulula*, *Strix uralensis*, *Caprimulgus europaeus*, *Apus melba*, *Eremophila alpestris*, *Motacilla cinerea*, *Cinclus cinclus*, *Certhia brachydactyla*, *Lanius senator*, *Nucifraga caryocatactes*, *Fringilla montifringilla*, *Linaria flavirostris*, *Loxia leucoptera*, *L. pytyopsittacus*, *Pinicola enucleator*, *Plectrophenax nivalis*.

Наибольшая часть зарегистрированных на гнездовании видов (78 видов; 55,7 %) относятся к отряду Воробьинообразных (Passeriformes) и составляют ядро городской орнитофауны (см. таблицу). Широко представлен также отряд Ржанкообразных (20 видов; 14,2 %). Численно доминируют представители семейств Мухоловковых (Muscicapidae) (12 видов), Чайковых (11), Вьюрковых (Fringillidae) (8) и Дятловых (Picidae) (7). В сумме 23 семейства из числа зарегистрированных в городах представлены абсолютным числом видов на гнездовании. Не менее интересным является и тот факт, что видовое богатство птиц в зимний период остается сравнительно высоким (в сумме более 53 %). Помимо оседлых видов, гнездящихся на урбанизированных территориях, население птиц увеличивается за счет смещения некоторых из них в города из естественных биотопов.

Видовое богатство птиц, гнездящихся в городах Беларуси
Breeding bird species richness in Belarusian cities

Отряд	Семейство	Орнитофауна Беларуси			Орнитофауна городов		
		Всего видов	Гнездящиеся виды	%	Всего видов	Гнездящиеся виды	%
Anseriformes	Anatidae	36	18	50,0	27	5	18,5
Galliformes	Phasianidae	7	7	100	3	3	100
Podicipediformes	Podicipedidae	5	5	100	4	4	100
Pelecaniformes	Ardeidae	9	5	55,6	5	2	40,0
Ciconiiformes	Ciconiidae	2	2	100	1	1	100
Accipitriformes	Accipitridae	22	17	77,3	3	3	100

Окончание таблицы
 Ending table

Отряд	Семейство	Орнитофауна Беларуси			Орнитофауна городов		
		Всего видов	Гнездящиеся виды	%	Всего видов	Гнездящиеся виды	%
Falconiformes	Falconidae	6	5	83,3	2	1	50,0
Gruiformes	Rallidae	7	6	85,7	6	6	100
Charadriiformes	Charadriidae	7	4	57,1	4	3	75,0
	Laridae	24	12	50,0	12	11	91,6
	Scolopacidae	28	16	57,1	10	6	60,0
Columbiformes	Columbidae	5	5	100	3	3	100
Strigiformes	Strigidae	12	10	83,3	7	3	42,8
Apodiformes	Apodidae	2	1	50,0	2	1	50,0
Coraciiformes	Alcedinidae	1	1	100	1	1	100
	Coraciidae	1	1	100	1	1	100
Bucerotiformes	Upupidae	1	1	100	1	1	100
Piciformes	Picidae	10	10	100	8	7	87,5
Passeriformes	Acrocephalidae	8	8	100	5	5	100
	Aegithalidae	1	1	100	1	1	100
	Alaudidae	4	3	75,0	3	2	66,6
	Hirundinidae	3	3	100	3	3	100
	Motacillidae	9	6	66,7	4	3	75,0
	Troglodytidae	1	1	100	1	1	100
	Prunellidae	2	1	50,0	1	1	100
	Turdidae	6	5	83,3	5	5	100
	Muscicapidae	12	12	100	12	12	100
	Sylviidae	5	5	100	5	5	100
	Phylloscopidae	5	4	80,0	4	4	100
	Locustellidae	3	3	100	3	3	100
	Regulidae	2	2	100	2	1	50,0
	Panuridae	1	1	100	1	1	100
	Paridae	7	7	100	6	5	83,3
	Remizidae	1	1	100	1	1	100
	Sittidae	1	1	100	1	1	100
	Certhiidae	2	2	100	2	1	50,0
	Laniidae	4	3	75,0	3	2	66,6
	Oriolidae	1	1	100	1	1	100
	Corvidae	7	7	100	7	6	85,7
	Sturnidae	2	1	50,0	1	1	100
Passeridae	2	2	100	2	2	100	
Fringillidae	17	11	64,3	16	8	50,0	
Emberizidae	8	4	50,0	4	3	75,0	
Всего 16 (из 22 отмеченных)	41 (из 64 отмеченных)	299 (из 330 отмеченных)	221 (из 235 отмеченных)	71,2	194 (из 205 отмеченных)	140	67,9

Большинство гнездящихся видов птиц (38,6 %) представлены группой, экологически связанной с лесами различного типа, причем многие из них выбирают для гнездования экотонные участки (рис. 1). Это можно объяснить как в целом доминирующим положением дендрофильных видов в орнитофауне Беларуси, так и широкой экологической пластичностью многих из них. К тому же древесные насаждения хорошо представлены в городах и являются своего рода коридорами, по которым дендрофилы могут внедряться в урбанизированные ландшафты (даже в центральные районы) из естественных местообитаний. Вторая по количеству видов в населении – группа водно-болотных и околотоводных птиц (32,1 %), в большинстве своем она также представлена обычными и широко распространенными по территории Беларуси видами.

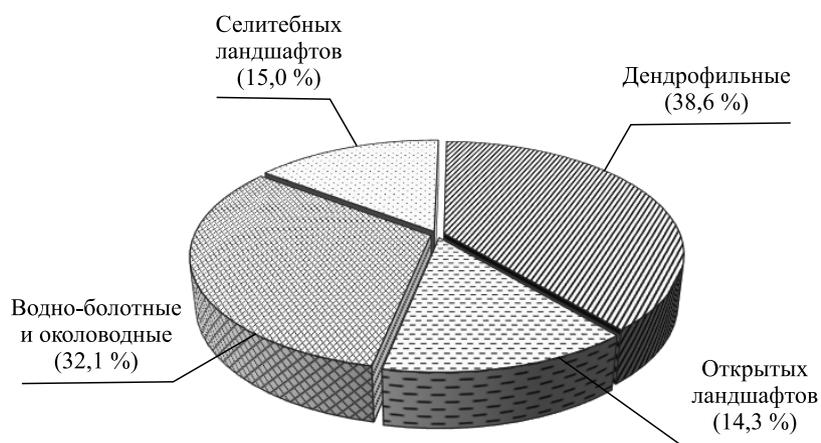


Рис. 1. Разнообразие экологических групп по сходству местообитаний гнездящихся видов птиц ($n = 140$) городов

Fig. 1. Diversity of ecological groups in habitat preferences of breeding birds ($n = 140$) in cities

Всего 9 экологических групп по предпочитаемому месторасположению гнезд представлено в ас-самблеях гнездящихся птиц городов (рис. 2). Практически половина всех видов птиц (45,7 %) гнездятся в подросте и подлеске, а также на земле. Одинаково представлены виды, которые могут гнездиться в самых разнообразных местах, в том числе и на зданиях, а также устраивать гнезда на воде или над ее поверхностью (по 12,9 % соответственно). В целом же 38,6 % всех видов птиц связаны своим гнездованием с деревьями и кустарниками. Только на зданиях устраивают свои гнезда 8,6 % видов. В условиях городов птицы питаются преимущественно беспозвоночными животными и пищей растительного происхождения либо только беспозвоночными (34,3 и 32,1 % соответственно). Пища антропогенного происхождения встречается в рационе 10,7 % гнездящихся видов (рис. 3).



Рис. 2. Разнообразие экологических групп по предпочитаемому месторасположению гнезд гнездящихся видов птиц ($n = 140$) городов

Fig. 2. Diversity of ecological groups in nests location preferences of breeding birds ($n = 140$) in cities

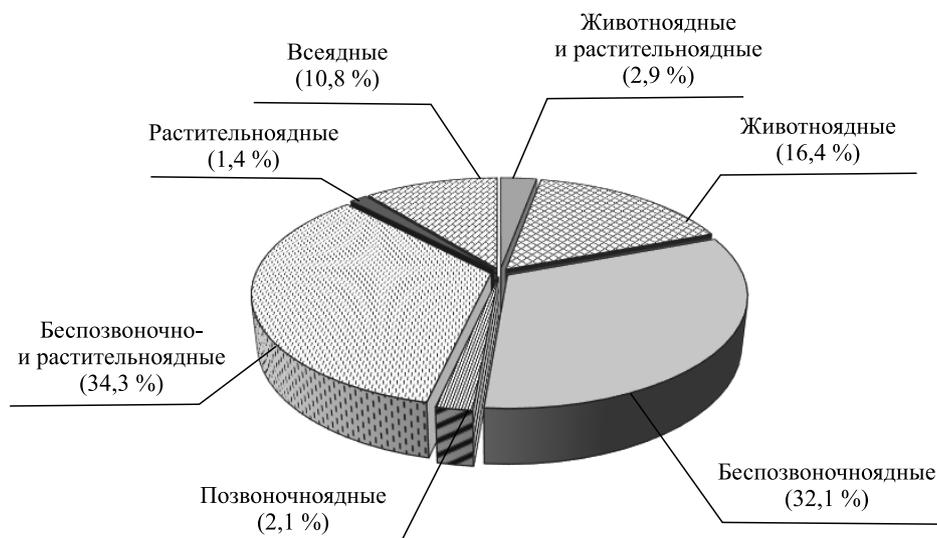


Рис. 3. Разнообразие экологических групп по типу потребляемого корма гнездящихся видов птиц ($n = 140$) городов
Fig. 3. Diversity of ecological groups in trophic preferences of breeding ($n = 140$) birds in cities

Отношение птиц к городской среде различно и сводится в основном к трем типам [18]. Самую большую группу составляют виды, связанные своим гнездованием с «островками» естественных (или близких к естественным) биотопов с различной степенью нарушенности, сохранившихся в административных границах городов. Их доля составляет 69,3 % (97 видов) от общего количества гнездящихся видов птиц урбозкосистем Беларуси. Как правило, почти все они немногочисленны, часто известны всего по единичным регистрациям и являются непостоянным компонентом гнездовой орнитофауны урбанизированных территорий, так как весьма чувствительны к различным факторам антропогенного происхождения, в том числе и беспокойству со стороны человека.

Синантропы составляют вторую группу, своей биологией тесно связаны с деятельностью человека и в естественных биотопах встречаются крайне редко либо вообще не встречаются. Ввиду этого преобладающая часть или даже все их популяции сконцентрированы на территориях населенных пунктов. Доля синантропов в структуре ассамблей гнездящихся птиц составляет всего 11,4 %, однако их количество на сильно преобразованных урбанизированных территориях сравнительно высокое, что является особенностью птиц данной группы [19].

Промежуточное положение между «дикими» видами и синантропами занимают виды, широко распространенные на урбанизированных территориях, однако не способные поддерживать на стабильном уровне свои городские популяции без постоянной подпитки особями из популяций естественных местообитаний. Обладая широкими адаптационными возможностями, такие виды могут заселять самые разнообразные биотопы в условиях городов, проявлять в значительной степени толерантность по отношению к человеку (в сравнении со своими же видами из естественных популяций) и использовать в качестве необходимых ресурсов компоненты антропогенного происхождения (например, здания для гнездования, материал искусственного происхождения для строительства гнезд и т. д.). Проникнув на городские территории, эти виды с течением времени в ходе синурбизации способны формировать городские популяции, отличные по многим своим характеристикам от таковых естественных биотопов. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что к настоящему времени в условиях Беларуси не менее 27 видов птиц активно осваивают городскую среду и находятся на разных стадиях синурбизации. Среди них следует выделить крякву (*Anas platyrhynchos*), вяхиря (*Columba palumbus*), серую ворону (*Corvus cornix*) и сороку (*Pica pica*), которые смогли сформировать устойчивые городские популяции с присущими им характерными особенностями, проявляющимися в смене гнездового, кормового и поведенческого стереотипов.

Заключение

Таким образом, можно констатировать, что города в условиях Беларуси включают в себя ряд самых разнообразных местообитаний, благоприятных для гнездования птиц, их постоянного или временного пребывания здесь. Согласно полученным данным более 62 % (205 видов) от общего количества всех видов орнитофауны Беларуси встречаются на урбанизированных территориях, причем для 140 видов птиц установлено гнездование.

Библиографические ссылки

1. McIntyre N. E., Knowles-Yáñez K., Hope D. Urban ecology as an interdisciplinary field: differences in the use of «urban» between the social and natural sciences // *Urban ecology: an international perspective on the interaction between humans and nature* / ed. by J. M. Marzluff, E. Shulenberg. New York : Springer-Verlag, 2008. P. 49–65. DOI: 10.1023/A:100954001.
2. Aronson M. F. J., La Sorte F. A., Nilon C. H., et al. A global analysis of the impacts of urbanization on bird and plant diversity reveals key anthropogenic drivers // *Proc. R. Soc. B : Biol. Sci.* 2014. Vol. 281, issue 1780. DOI: 10.1098/rspb.2013.3330.
3. Shochat E. Credit or debit? Resource input changes population dynamics of city-slicker birds // *Oikos*. 2004. Vol. 106, issue 3. P. 622–626. DOI: 10.1111/j.0030-1299.2004.13159.x.
4. Shochat E., Warren P. S., Faeth S. H., et al. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology // *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 21, issue 4. P. 186–191. DOI: 10.1016/j.tree.2005.11.019.
5. Ульянова В. В. Арнітафауна горада Мінска і асаблівасці яе біятапічнага размеркавання // *Весці АН БССР*. 1979. № 4. С. 110–114.
6. Гайдук В. Е., Абрамова И. В. Сезонная и годовичная динамика орнитофауны г. Бреста // *Вестн. Брест. гос. ун-та им. А. С. Пушкина*. 1999. № 2. С. 66–76.
7. Кусенков А. Н. Сезонные изменения плотности населения птиц г. Гомеля // *Весці АН БССР*. 1990. № 6. С. 103–105.
8. Никифоров М. Е., Козулин А. В., Гричик В. В. и др. Птицы Беларуси на рубеже XXI века: статус, численность, распространение. Минск : Н. А. Королев, 1997.
9. Гричик В. В., Бурко Л. Д. Животный мир Беларуси. Минск : БГУ, 2013.
10. Сакхон В. В. Синурбизация птиц в Беларуси: Какие виды заселяют города? // *Актуальные проблемы зоологической науки : сб. ст. XI Междунар. зоол. конф. (Минск, 1–3 нояб. 2017 г.)*. Минск, 2017. С. 373–381.
11. Юрко В. В., Гричик В. В. Поручейник (*Tringa stagnatilis*) как гнездящийся вид орнитофауны Беларуси // *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 1999. Т. 2, вып. 1. С. 39–41.
12. Никифоров М. Е. Белорусская орнитофаунистическая комиссия: обзор сообщений о наиболее редких находках за 1990–1999 г. // *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2001. Т. 4, вып. 1. С. 25–40.
13. Никифоров М. Е., Самусенко И. Е. Сообщение орнитофаунистической комиссии // *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2002. Т. 5, вып. 1. С. 57–62.
14. Никифоров М. Е., Самусенко И. Е. Сообщение орнитофаунистической комиссии // *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2003. Т. 6. С. 51–61.
15. Brogger-Jensen S., Фенчук В. А. Регистрация короткопалой пищухи (*Certhia brachydactyla*) в г. Бресте, Беларусь // *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2004. Т. 7. С. 45–46.
16. Гайдук В. В., Абрамова И. В. Экология птиц юго-запада Беларуси. Неворобьинообразные. Брест : Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина, 2009.
17. Гайдук В. В., Абрамова И. В. Экология птиц юго-запада Беларуси. Воробьинообразные. Брест : Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина, 2013.
18. Fischer J. D., Schneider S. C., Ahlers A. A., et al. Categorizing wildlife responses to urbanization and conservation implications of terminology // *Conserv. Biol.* 2015. Vol. 29, issue 4. P. 1246–1248. DOI: 10.1111/cobi.12451.
19. Melles S., Glenn S., Martin K. Urban bird diversity and landscape complexity: species-environment associations along a multi-scale gradient // *Conserv. Ecol.* 2003. Vol. 7, issue 1. DOI: 10.5751/ES-00478-070105.

References

1. McIntyre N. E., Knowles-Yáñez K., Hope D. Urban ecology as an interdisciplinary field: differences in the use of «urban» between the social and natural sciences. In: *Urban ecology: an international perspective on the interaction between humans and nature*. New York : Springer-Verlag, 2008. P. 49–65. DOI: 10.1023/A:100954001.
2. Aronson M. F. J., La Sorte F. A., Nilon C. H., et al. A global analysis of the impacts of urbanization on bird and plant diversity reveals key anthropogenic drivers. *Proc. R. Soc. B : Biol. Sci.* 2014. Vol. 281, issue 1780. DOI: 10.1098/rspb.2013.3330.
3. Shochat E. Credit or debit? Resource input changes population dynamics of city-slicker birds. *Oikos*. 2004. Vol. 106, issue 3. P. 622–626. DOI: 10.1111/j.0030-1299.2004.13159.x.
4. Shochat E., Warren P. S., Faeth S. H., et al. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. *Trends Ecol. Evol.* 2006. Vol. 21, issue 4. P. 186–191. DOI: 10.1016/j.tree.2005.11.019.
5. Ul'yanova V. V. [Avifauna of Minsk and its distribution]. *Vesti Acad. Nauk BSSR*. 1979. No. 4. P. 110–114 (in Russ.).
6. Haiduk V. E., Abramova I. V. [Seasonal and annual dynamics of avifauna in Brest]. *Vestnik Brest. State Univ. named after A. S. Pushkin*. 1999. No. 2. P. 66–76 (in Russ.).
7. Kusenkov A. N. [Seasonal variations of bird densities in Gomel]. *Vesti Acad. Nauk BSSR*. 1990. No. 6. P. 103–105 (in Russ.).
8. Nikiforov M. E., Kozulin A. V., Gritchik V. V., et al. [Birds of Belarus on the line of XXI century: status, number, distribution]. Minsk : N. A. Korolev, 1997 (in Russ.).
9. Gritchik V. V., Burko L. D. [Animals of Belarus]. Minsk : BSU, 2013 (in Russ.).
10. Sakhvon V. V. [Birds synurbization in Belarus: Which species settle urban areas?]. Aktual'nye problemy zoologicheskoi nauki : collect. pap. of the XI Int. zool. conf. (Minsk, 1–3 Novemb., 2017). Minsk, 2017. P. 373–381 (in Russ.).
11. Yurko V. V., Gritchik V. V. Marsh Sandpiper (*Tringa stagnatilis*) as new breeding species in Belarus. *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 1999. Vol. 2, issue 1. P. 39–41 (in Russ.).
12. Nikiforov M. E. Belarusian ornito-faunistic commission: new bird species records in 1990–1999. *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2001. Vol. 4, issue 1. P. 25–40 (in Russ.).
13. Nikiforov M. E., Samusenko I. E. Belarusian ornito-faunistic commission: new bird species records. *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2002. Vol. 5, issue 1. P. 57–62 (in Russ.).
14. Nikiforov M. E., Samusenko I. E. Belarusian ornito-faunistic commission: new bird species records. *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2003. Vol. 6. P. 51–61 (in Russ.).

15. Brogger-Jensen S., Fenchuk V. A. Registration of the Short-toed treecreeper (*Certhia brachydactyla*) in Brest, Belarus. *Subbuteo. The Belarus. ornithol. bull.* 2004. Vol. 7. P. 45–46 (in Russ.).
16. Haiduk V. V., Abramova I. V. [Ecology of birds in south-western Belarus. Non-Passeriformes]. Brest : Brest. State Univ. named after A. S. Pushkin, 2009 (in Russ.).
17. Haiduk V. V., Abramova I. V. [Ecology of birds in south-western Belarus. Passeriformes]. Brest : Brest. State Univ. named after A. S. Pushkin, 2013 (in Russ.).
18. Fischer J. D., Schneider S. C., Ahlers A. A., et al. Categorizing wildlife responses to urbanization and conservation implications of terminology. *Conserv. Biol.* 2015. Vol. 29, issue 4. P. 1246–1248. DOI: 10.1111/cobi.12451.
19. Melles S., Glenn S., Martin K. Urban bird diversity and landscape complexity: species-environment associations along a multi-scale gradient. *Conserv. Ecol.* 2003. Vol. 7, issue 1. DOI: 10.5751/ES-00478-070105.

Статья поступила в редколлегию 30.01.2018.
Received by editorial board 30.01.2018.

ЮБИЛЕИ

JUBILEES

— — — — —

**Владимир Михайлович
ЮРИН**

**Vladimir Mikhaylovich
YURIN**

— — — — —



Исполнилось 80 лет выдающемуся белорусскому физиологу растений и биофизику, доктору биологических наук профессору кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета Владимиру Михайловичу Юрину.

В. М. Юрин родился 7 февраля 1938 г. в Минске. После окончания средней школы поступил в Белорусский лесотехнический институт на лесохозяйственный факультет, который с отличием окончил в 1959 г. Затем работал на Белорусском лесостроительном предприятии помощником таксатора, начальником лесостроительной партии и главным геодезистом.

Научная деятельность В. М. Юрина и формирование его как крупного ученого, руководителя

и организатора связаны с Институтом экспериментальной ботаники (ИЭБ) имени В. Ф. Купревича АН БССР, где он прошел путь от аспиранта до старшего научного сотрудника и заведующего лабораторией. В 1966 г. В. М. Юрин поступил в аспирантуру при ИЭБ АН БССР. Его научным руководителем был выдающийся ученый-физиолог – член-корреспондент АН БССР директор ИЭБ имени В. Ф. Купревича АН БССР Михаил Николаевич Гончарик. Благодаря быстро проявившемуся таланту биолога-экспериментатора, интересу к рассмотрению физиологии на клеточном уровне, трудолюбию и умелому руководству М. Н. Гончарика в конце 1960-х гг. В. М. Юриным были проведены одни из первых в мире исследований по регистрации электрофизиологических параметров растительной клетки. Работы В. М. Юрина этого

периода положили начало новому научному направлению в советской биологии растений – электрофизиологии растительной клетки. В 1970 г. им была защищена кандидатская диссертация по теме «Влияние ионов кальция и некоторых анионов на биоэлектрические потенциалы клеток *Nitella flexilis* при покое».

В 1970-х гг. В. М. Юрин создал одну из крупнейших в СССР научную группу, занимавшуюся исследованием механизмов ионного транспорта через мембрану растительной клетки. В результате интенсивной работы В. М. Юриным и его коллегами в ИЭБ имени В. Ф. Купревича АН БССР успешно охарактеризованы основные системы ионного транспорта плазматической мембраны клеток растений: внутри- и наружувыврямляющие K^+ -каналы, хлорные и Ca^{2+}/Na^+ -каналы, электрогенная H^+ -АТФаза, транспортеры аммония и неселективная ионная утечка. Проведенные исследования получили широкое признание за рубежом.

В 1981 г. В. М. Юрин защитил докторскую диссертацию по теме «Электрофизиологический анализ основных закономерностей взаимодействия органических соединений с мембранами растительной клетки», которая во многом определила одно из основных направлений дальнейшей деятельности В. М. Юрина – ксенобиологию растений. В 1986 г. в ИЭБ имени В. Ф. Купревича АН БССР В. М. Юрин возглавил лабораторию белка и регуляции обмена веществ в растениях, в 1988 г. ему было присвоено звание профессора.

С 1991 по 2011 г. Владимир Михайлович Юрин – заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений биологического факультета БГУ, в настоящее время – профессор кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений. В. М. Юриным разработаны новые учебные дисциплины: «Ксенобиология», «Биомедиаторы в растениях», «Иммобилизованные клетки и ферменты», которые преподаются студентам биологического факультета, а также «Биоэлектрогенез растений» и «Регуляторы роста и новые классы гормоноподобных веществ» для магистрантов. Курс «Ксенобиология» был введен в программу ряда учреждений высшего образования Республики Беларусь. В. М. Юрин является автором и соавтором 15 учебных пособий и курсов лекций, 9 учебно-методических указаний, им подготовлены и изданы 3 учебника с грифом Министерства образования Республики Беларусь.

Деятельность В. М. Юрина была направлена на интегрирование учебного процесса и научных исследований, с этой целью на кафедре была организована лаборатория физиологии растительной клетки, началась интенсивная научно-исследовательская кропотливая работа по подготовке кадров. Под руководством профессора В. М. Юрина

защищено 25 кандидатских и 2 докторские диссертации. Одна из докторских диссертаций в 2012 г. была признана ВАК Республики Беларусь диссертацией года.

Основные достижения В. М. Юрина связаны с получением принципиально новых научных результатов и ранее неизвестных закономерностей функционирования ионтранспортных систем плазматической мембраны и тонопласта растительных клеток, разработкой научных теорий и концепций в области тестирования биологической активности ксенобиотиков и средств экологического мониторинга, физиолого-биохимических приемов повышения биосинтеза физиологически активных соединений в культуре клеток и тканей лекарственных растений.

Созданная республиканская научная школа в области электрофизиологии и ксенобиологии растений признана специалистами как у нас в республике, так и в ближнем и дальнем зарубежье. Характерной чертой данной школы является сочетание фундаментальных исследований по физиологии растений и прикладным направлениям, связанным с использованием полученных результатов для оптимизации минерального питания и продуктивности растений, поиска средств химической защиты растений в системах экологического мониторинга и скрининга физиологически активных веществ, в биотехнологических процессах (технологические схемы получения культуры клеток и тканей растений и из них – лекарственных субстанций).

В. М. Юриным опубликовано около 600 работ, среди которых – более 400 научных статей, 7 авторских свидетельств на изобретения, 5 монографий, 8 учебных пособий и др. Ряд работ В. М. Юрина и сотрудников созданной им научной школы опубликованы в международных изданиях.

Профессор В. М. Юрин выполнял и выполняет большую общественную и организаторскую работу: был членом ученого совета БГУ, аттестационной комиссии БГУ, ученого совета биологического факультета, специализированных советов по защите докторских и кандидатских диссертаций (ИЭБ имени В. Ф. Купревича, Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси), являлся главным редактором научного журнала «Труды БГУ», редактором журнала «Algology», членом редакционных коллегий других журналов. Владимир Михайлович в течение длительного времени был вице-президентом Белорусского ботанического общества и активно участвовал в его работе, являлся председателем координационного совета БГУ «Биологические науки», членом секции биологических наук совета по координации фундаментальных исследований Государственного комитета по науке и технике, членом научно-

методического совета «Экология» и экспертного совета «Биология» Министерства образования Республики Беларусь.

За значительный вклад в науку и активную педагогическую деятельность В. М. Юрин неоднократно награждался грамотами Президиума НАН Беларуси, Министерства образования Республики Беларусь, ректора БГУ, дипломами и медалями (серебряные медали ВДНХ в 1980 и 1989 гг., знак «Изобретатель СССР» в 1983 г.). В 2006 г. В. М. Юрин награжден нагрудным знаком «Отличник образования Республики Беларусь». В 2013 г.

ему вручена Почетная грамота Совета Министров Республики Беларусь, дважды (2009, 2013 гг.) он получал персональные надбавки Президента Республики Беларусь за выдающийся вклад в социально-экономическое развитие государства, является заслуженным работником БГУ (2018).

Коллектив кафедры клеточной биологии и биотехнологии растений, сотрудники биологического факультета сердечно поздравляют Владимира Михайловича с юбилеем и желают успехов в научной и педагогической деятельности, крепкого здоровья, счастья и благополучия.

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ И КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

- Сидоров А. В.* Регуляция проводимости электрических синапсов в условиях действия неспецифических экстраинаптических факторов 3
- Сухан Т. О., Шутова Т. Г., Ушенкина А. М., Потапович А. И., Костюк В. А.* Получение желатиновых наночастиц и исследование их взаимодействия с культивируемыми клетками 13
- Люзина К. М., Аль-Тавил Н., Чумак А. Г.* Вариабельность речевого дыхания и сердечного ритма арабговорящих студентов при пользовании русским языком 20
- Сидоров А. В.* Временные и амплитудные характеристики потенциала действия идентифицированных нейронов *Lymnaea stagnalis* при действии пероксида водорода 31

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

- Евдокимова О. В., Мямин В. Е., Валентович Л. Н.* Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси ... 38

БИОХИМИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

- Головач Т. Н., Тарун Е. И., Дудчик Н. В., Романович Р. В., Бубра И. А., Курченко В. П.* Антирадикальная активность, антимуtagenные и антигенные свойства ферментативных гидролизатов коровьего молозива 50
- Губич О. И., Пучкова К. В., Залеская Н. А., Крючкова Н. В.* Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii* Rehder.) на экспериментальных моделях *in vivo* 60
- Бережная А. В.* Разработка препаративной формы биопестицида «Бетапротектин» 69

ЗООЛОГИЯ И БОТАНИКА

- Храмцов А. К.* *Peronospora stigmaticola* Raunk. – новый вид грибоподобных организмов в микобиоте Беларуси 76
- Жоров Д. Г., Анохина В. С., Романчук И. Ю.* Заселяемость разных видов и форм люпина (*Lupinus* spp.) люпиновой тлей (*Macrosiphum albifrons* Essig, 1911) в условиях Минской области 82
- Сахвон В. В.* Видовое богатство и экологическая структура орнитофауны урбанизированных территорий в условиях Беларуси 95

ЮБИЛЕИ

- Владимир Михайлович Юрин 103

CONTENTS

PHYSIOLOGY AND CELL BIOLOGY

<i>Sidorov A. V.</i> Control of conductance through electrical synapses by non-specific extrasynaptic agents	3
<i>Suhan T. O., Shutava T. G., Ushenkina A. M., Potapovich A. I., Kostyuk V. A.</i> Preparation of gelatinum nanoparticles and investigation of their interaction with cultivated cells.....	13
<i>Liuzina K. M., Al-Tawil N., Chumak A. G.</i> Breathing and heart rate of Arab-speaking students using the Russian language	20
<i>Sidorov A. V.</i> Time-course and amplitude characteristics of action potentials of identified <i>Lymnaea stagnalis</i> neurons under the hydrogen peroxide impact.....	31

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Evdokimova O. V., Miamin V. E., Valentovich L. N.</i> Biochemical and molecular genetic characteristics of <i>Bacillus pumilus</i> bacteria isolated in Belarus.....	38
---	----

BIOCHEMISTRY, BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Halavach T. M., Tarun E. I., Dudchik N. V., Romanovich R. V., Bubra I. A., Kurchenko V. P.</i> Antiradical activity, antimutagenic and antigenic properties of enzymatic bovine colostrum hydrolysates.....	50
<i>Hubich A. I., Puchkova K. V., Zalesskaya N. A., Kryuchkova N. V.</i> The investigation of the adaptogenic properties of <i>Rhododendron adamsii</i> Rehder. on experimental models <i>in vivo</i>	60
<i>Berezhnaya A. V.</i> Development of formulation of biopesticide «Betaprotectin»	69

ZOOLOGY AND BOTANY

<i>Khramtsov A. K.</i> <i>Peronospora stigmaticola</i> Raunk. – new species of pseudofungi in mycobiota of Belarus	76
<i>Zhorov D. G., Anokhina V. S., Ramanchuk I. Y.</i> The colonization of different lupine taxon (<i>Lupinus</i> spp.) by <i>Macrosiphum albifrons</i> Essig, 1911 in Minsk region, Belarus	82
<i>Sakhvon V. V.</i> Species richness and ecological structure of bird assemblages in urban areas in Belarus	95

JUBILEES

Vladimir Mikhaylovich Yurin	103
-----------------------------------	-----

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.
№ 1. 2018**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.

Почтовый адрес: ул. Кальварийская, 9, каб. 636, 637,
220004, г. Минск.

Тел. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.

E-mail: jbiol@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).

Редакторы *Е. В. Павлова, О. Л. Диброва*
Технический редактор *В. В. Кильдишева*
Корректоры *Л. А. Меркуль, А. С. Люкевич*

Подписано в печать 28.02.2018.

Тираж 105 экз. Заказ 91.

Республиканское унитарное предприятие
«Издательский центр Белорусского
государственного университета».
ЛП № 02330/117 от 14.04.2014.
Ул. Красноармейская, 6, 220030, г. Минск.

© БГУ, 2018

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 1. 2018**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.

Correspondence address: 9 Kal'varyjskaja Str., office 636, 637,
Minsk 220004.

Tel. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.

E-mail: jbiol@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).

Editors *E. V. Pavlova, O. L. Dibrova*
Technical editor *V. V. Kildisheva*
Proofreaders *L. A. Merkul', A. S. Lukevich*

Signed print 28.02.2018.

Edition 105 copies. Order number 91.

Publishing Center of BSU.
License for publishing No. 02330/117, 14 April, 2014.
6 Ćyrvonaarmiejskaja Str., Minsk 220030.

© BSU, 2018