БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

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

Выходит три раза в год

2 2019

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор — **СИДОРОВ А. В.** – доктор биологических наук, профессор; 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; декан 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), full professor; 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; dean 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.

Клеточная биология и физиология

Cell biology and physiology

УДК 581.192.7

РОЛЬ ЭНДОГЕННЫХ ПЕПТИДНЫХ ЭЛИСИТОРОВ В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К БИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

Г. Г. ФИЛИПЦОВА[1)]

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

Пептидные элиситоры (Peps) представляют собой один из классов веществ-элиситоров, образующихся в клетках растений в ответ на действие различных биотических стрессоров и способствующих формированию неспецифической устойчивости. Они широко распространены у различных представителей покрытосеменных, включая важные сельскохозяйственные культуры, и могут рассматриваться как перспективный класс соединений для создания экологически безопасных препаратов, индуцирующих фитоиммунитет и повышающих устойчивость растительных организмов к стрессовым воздействиям. В работе проведен анализ современных литературных данных о функциональной активности эндогенных пептидных элиситоров растений, механизмах Pep-сигналинга и их роли в устойчивости к биотическим стрессорам.

Ключевые слова: пептидные элиситоры растений; механизмы сигналинга; устойчивость растений; биотический стресс.

Образец цитирования:
Филипцова ГГ. Роль эндогенных пептидных элиситоров в устойчивости растений к биотическим стрессам. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:3–12.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-3-12

For citation:
Filiptsova HG. The role of endogenous elicitor peptides in plant resistance to biotic stress. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:3–12. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-3-12

Автор:
Галина Григорьевна Филипцова – кандидат биологических наук; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Author:
Halina G. Filiptsova, PhD (biology); associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.
filiptsova@bsu.by

THE ROLE OF ENDOGENOUS ELICITOR PEPTIDES IN PLANT RESISTANCE TO BIOTIC STRESS

H. G. FILIPTSOVA[a]

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

Plant elicitor peptides (Peps) are one class of elicitor substances, which are formed in plant cells in response to various biotic stressors and induced of nonspecific plant resistance. They are present and active in angiosperms, including many important agricultural crops, and can be considered as a promising class of compounds for creating environmentally safe drugs that induce phytoimmunity and increase the resistance of plants to stress. In this paper, an analysis of current literature data on the functional activity of endogenous plant elicitor peptides, the mechanisms of Pep-signaling and their role in plant resistance to biotic stresses is carried out.

Keywords: plant elicitor peptides; signaling mechanisms; plant resistance; biotic stress.

Введение

Рост и развитие растения происходят в непрерывной связи с окружающей средой. На него оказывают влияние не только абиотические факторы (свет, температура, влажность), но и биотические, в первую очередь фитопатогены. Длительная эволюция растений вместе с микроорганизмами привела к формированию ряда механизмов узнавания и противодействия внедрению и распространению фитопатогенов в тканях растения-хозяина. При контакте патогенные микроорганизмы выделяют целый набор соединений, обеспечивающих их проникновение в растительную ткань. Вместе с тем растение воспринимает данные сигналы и осуществляет индукцию сигнальных систем, приводящих к запуску защитных механизмов.

Врожденный фитоиммунитет обусловлен генетически детерминированной способностью растительной клетки узнавать молекулы различного химического состава, выделяемые бактериями, грибами, насекомыми-вредителями. Поскольку данные вещества вызывают иммунный ответ, их принято называть элиситорами. В зависимости от происхождения экзогенные элиситоры могут быть подразделены на MAMPs (microbe-associated molecular patterns), другое их название – PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), HAMPs (herbivory-associated molecular patterns) и VAMPs (virus-associated molecular patterns) [1–3]. Растения воспринимают данные соединения с помощью рецепторов, известных как PRRs (pattern recognition receptors), расположенных на внешней поверхности цитоплазматической мембраны растительной клетки и осуществляющих запуск механизмов физиологического ответа [3–5]. Возникающая серия защитных реакций растения на MAMPs известна в научной литературе как PTI (pattern-triggered immunity) [3; 4]. Согласно современным представлениям PTI включает быстрые, а также длительные физиологические реакции, в том числе такие, как продуцирование активных форм кислорода (АФК), изменение ионной проницаемости цитоплазматической мембраны, индукция защитных генов, активация протеолитических ферментов, усиление синтеза вторичных метаболитов, обладающих противомикробным действием, лигнификация клеточных стенок, синтез фитоалексинов и др.

В последние годы стало очевидным, что в ответ на действие стрессовых факторов (повреждение либо внедрение патогена) в растениях образуются эндогенные элиситоры, также способные вызывать PTI. Эти соединения принято называть в научной литературе DAMPs (damage(danger)-associated molecular patterns) [1; 2; 5]. Параллельное использование терминов *damage* (повреждение) и *danger* (опасность) в контексте DAMPs указывает на механистические, а также функциональные различия между соединениями данной группы. Например, к DAMPs относятся фрагменты клеточных стенок растений, такие как олигогалактурониды или мономеры кутина, образующиеся пассивно при механическом повреждении ткани растения [6]. С другой стороны, существует группа пептидных DAMPs, таких как системины или Peps (plant elicitor peptides), образование которых находится под контролем растения-хозяина [1; 7; 8]. Эндогенные пептидные элиситоры образуются из растительных белков-предшественников, затем они распознаются специфическими рецепторами и запускают каскад защитных реакций, приводящих в конечном итоге к увеличению устойчивости растения к действию стрессовых факторов [8; 9]. Установлено, что Pep-зависимая передача сигналов повышает устойчивость к бактериальным, грибковым, вирусным патогенам, защищает от травоядных насекомых, а также действия абиотических стрессоров [10; 11]. В дополнение к их роли в иммунитете появляется все больше доказательств того, что Peps участвуют в регуляции роста и развития растений [12; 13].

Первый представитель эндогенных пептидных элиситоров Peps был выделен в 2006 г. из листьев *Arabidopsis thaliana* и назван AtPep1 [5]. Через год в кукурузе *Zea mays* было обнаружено аналогичное по химическому составу и физиологическим функциям соединение ZmPep1 [10]. Интенсификация исследований в данной области показала, что Peps широко распространены. К настоящему времени эндогенные пептидные элиситоры идентифицированы у более чем 50 видов растений из различных семейств: Brassicaceae (арабидопсис, репа), Solanaceae (картофель, баклажан, перец, томаты), Fabaceae (соя, арахис, люцерна), Poaceae (однодольные: кукуруза, рис, сорго) [9; 14; 15]. Совсем недавно эндогенные пептидные элиситоры идентифицированы у 10 видов растений семейства Rosaceae [16]. Вероятнее всего, образование эндогенных пептидных элиситоров в ответ на механическое повреждение или действие биотических стрессоров широко распространено в мире флоры и характерно для многих видов. Хотя, несмотря на попытки, до сих пор Peps и их предшественники не обнаружены у голосеменных растений.

Образование Peps

Как уже отмечалось, AtPep1 был первым идентифицированным эндогенным пептидным элиситором, участвующим в регуляции антимикробной защиты у растений арабидопсиса. Данный пептид состоит из 23 аминокислотных остатков (ATKVKAKQRGKEKVSSGRPGQHN) и образуется из С-терминального конца более крупного белка-предшественника PROPEP1 [5]. К настоящему времени в арабидопсисе обнаружено 8 гомологов AtPeps и соответственно 8 белков-предшественников PROPEP1 – PROPEP8 [17]. PROPEPs, как правило, содержат около 100 аминокислот и кодируются небольшими семействами генов. У арабидопсиса были идентифицированы 8 генов *PROPEP*, у кукурузы – 7 [9; 12], у других видов покрытосеменных растений их количество ограничено 1–2 генами [15].

Индукция генов *PROPEP* осуществляется при механическом повреждении листьев (например, насекомыми), бактериальными, грибковыми и вирусными патогенами, а также при обработке растений стрессовыми гормонами и некоторыми Peps [9–11; 12; 18]. Причем разные гомологи пептидов индуцируются различными стимулами. Показано, что транскрипция генов *AtPROPEP1* и *ZmPROPEP1* осуществляется при поражении растений грибковыми инфекциями, тогда как транскрипция генов *AtPROPEP3* и *ZmPROPEP3* возрастает при механическом повреждении тканей насекомыми-вредителями [10; 11; 19; 20]. Транскрипция *AtPROPEP2* и *AtPROPEP3* индуцируется при обработке растений AtPeps и некоторыми бактериальными элиситорами [5; 9; 18; 21]. Ранение листа вызывает транскрипцию *AtPROPEP5* и *AtPROPEP8*, тогда как *AtPROPEP4* и *AtPROPEP7* вообще не индуцируются [12]. Более того, установлено, что ни обработка стрессовыми гормонами (жасмоновой и салициловой кислотами), ни воздействие пептидов AtPep1 – AtPep6 не приводит к повышенной транскрипции генов *AtPROPEP4*, *AtPROPEP5* и *AtPROPEP6* [9]. Предполагают, что первые три гена *AtPROPEPs* связаны с иммунитетом растений, их индукция приводит к образованию AtPep1, AtPep2 и AtPep3, являющихся PTI-индуцирующими пептидами, тогда как пептиды AtPep4 – AtPep8 дополнительно могут участвовать в регуляции иных клеточных процессов, не связанных с защитой [12].

Несмотря на очевидную общую роль пептидных элиситоров у разных видов растений, их гомология на основе аминокислотных последовательностей не очень высокая. Ранее указывалось, что среди PROPEPs из *Arabidopsis* общая идентичность аминокислотных последовательностей составляет от 12 до 47 % [22]. В работе М. Лори и др. [15] осуществлен поиск последовательностей PROPEPs в базах данных секвенированных геномов растений и проведена идентификация гомологии PROPEPs как внутри одного вида, так и между разными видами покрытосеменных растений. Показано, что большинство PROPEPs, принадлежащих различным семействам растений, содержат менее 10 % идентичных аминокислотных последовательностей. Однако внутри одного семейства PROPEPs образуют специфические кластеры и подкластеры, например, у представителей семейства Brassicaceae идентичность аминокислотных последовательностей различных гомологов PROPEPs составляет более 50 % [15]. Предполагается, что терминальный конец PROPEP, содержащий функционально активную последовательность Pep, более консервативен [5]. Все же идентичность последовательности Peps внутри кластера не является абсолютной и варьирует от 43,5 до 100,0 % [15].

Относительно PEP-рецепторов на сегодняшний день показано, что большинство видов растений содержат только один такой рецептор, исключение составляет арабидопсис, у которого обнаружено два рецептора: PEPR1 и PEPR2 [17; 23]. Идентичность аминокислотных последовательностей рецепторов внутри кластера составляет до 90 %, общий уровень гомологии между различными кластерами равен примерно 40 % [15].

Представленные данные свидетельствуют о различиях в структуре, а следовательно, и в функциональной активности Peps у представителей разных семейств растений. Возникает вопрос: какова структурная основа восприятия и специфичности Peps? В литературе имеются сведения о том, что растения

не воспринимают Peps, происходящие от представителей других семейств, несмотря на наличие рецепторов. Так, в работе [11] указывается, что баклажаны и соя нечувствительны к обработке пептидными элиситорами, образуемыми видами за пределами семейств Solanaceae и Fabaceae соответственно. Для определения специфики восприятия Peps между различными видами и семействами растений в работе [15] была исследована элиситорная активность различных гомологов Peps у представителей трех семейств: Brassicaceae, Solanaceae и Poaceae. Установлено, что AtPeps воспринимаются только арабидопсисом и его близким родственником *Brassica rapa*. Под действием пептидов усиливается выделение стрессового гормона этилена, отсутствующего у представителей других семейств. Аналогичные результаты получены для пептидов ZmPeps, воспринимаемых только однодольными растениями, а также NbPep и StPep, проявляющих элиситорную активность на растениях *Nicotiana benthamiana* и *Solanum lycopersicum* [15]. Очевидно, что гомологи пептидных элиситоров хорошо воспринимаются растениями разных видов в пределах одного семейства и обычно не распознаются растениями из различных семейств. В связи с этим говорят о межвидовой совместимости в восприятии Peps и несовместимости между различными семействами.

Относительно немного известно об экспрессии *PROPEP* в различных тканях растений. Транскрипционный анализ растений *Arabidopsis* показал, что наиболее высокое содержание всех генов *AtPROPEPs* характерно для клеток корней, при этом *AtPROPEP4* и *AtPROPEP7* ограничены кончиками первичного и боковых корней [12]. Гены *AtPROPEP1*, *AtPROPEP2* и *AtPROPEP3* также имеют наиболее высокий уровень экспрессии в корне, исключая его верхушку. В листьях, напротив, активность этих генов крайне низкая, но механическое ранение листовых пластинок приводит к их индукции в проводящей ткани. Кроме того, в клетках листьев выявлена высокая активность *AtPROPEP5*, а в тканях цветка обнаружены гены *AtPROPEP8* [12]. В зависимости от локализации и условий экспрессии авторы разделяют *AtPROPEPs* на две отдельные группы: первая группа включает гены *PROPEP1*, *PROPEP2*, *PROPEP3*, *PROPEP5* и *PROPEP8*, экспрессирующиеся в корнях и в меньшей степени в проводящих сосудах листьев, их экспрессия индуцируется ранением; вторая группа включает гены *PROPEP4* и *PROPEP7*, их экспрессия ограничена кончиками корней и не индуцируется ранением.

Что касается чувствительности различных зон корня к экзогенной обработке AtPeps, в работе [24] установлено, что наиболее отзывчивыми являются клетки зоны всасывания и зоны дифференцировки. Авторы предполагают, что эти клетки имеют менее жесткую клеточную стенку по сравнению со зрелыми клетками, следовательно, могут иметь повышенную восприимчивость по отношению к потенциальным вредителям или повреждающим факторам.

Флуоресцентная микроскопия меченых предшественников пептидов позволила выявить, что члены семейства PROPEPs присутствуют в двух разных субклеточных компартментах: цитозоле и тонопласте [12]. Например, PROPEP3 является водорастворимым белком и локализуется в цитоплазме, тогда как PROPEP1 и PROPEP6 связаны с внешней поверхностью тонопласта. Для индукции защитных сигналов в растениях PROPEPs должны быть расщеплены с высвобождением функционально активных Peps. Предполагают, что высвобождение Peps в апопласт может происходить пассивно при повреждении целостности клеток либо активно в качестве реакции на сигналы опасности (например, другие элиситоры или стрессовые гормоны). Попадая в апопласт, пептидные элиситоры связываются с рецепторами на мембранах соседних клеток, вызывая клеточный ответ и усиливая иммунитет.

В настоящее время очень мало известно о ферментах, расщепляющих предшественники пептидов. Относительно недавно в растениях арабидопсиса обнаружена метакаспаза (METACASPASE-9), осуществляющая расщепление внеклеточного белка GRIM REAPER [25]. Поскольку METACASPASE-9, как и другие метакаспазы растений, представляет собой лизин и аргининспецифическую протеазу, а AtPROPEP1 содержит аргинин перед последовательностью AtPep1, предполагают, что METACASPASE-9 является одним из возможных ферментов, расщепляющих PROPEPs. Но для этого PROPEPs должны вначале выйти в межклеточное пространство, что возможно при механическом повреждении клетки. Другими вероятными кандидатами на роль расщепляющих PROPEPs ферментов являются внутриклеточные метакаспазы [2].

Восприятие Peps-сигнала

Рецепторы для эндогенных пептидных элиситоров, обозначаемые PEPRs, представляют собой трансмембранные белки, расположенные на цитоплазматической мембране и принадлежащие к большому классу LRR (Leucine-Rich Repeat) богатых лейцином рецепторподобных киназ RLK (Receptor-Like Kinase) [22; 23]. Анализ генов *Arabidopsis AtPEPR* показал, что они конститутивно экспрессируются в корне и в несколько меньшей степени в стебле и проводящих сосудах листовых пластинок [2]. При этом ген *PEPR2* в основном активен в центральном цилиндре корня, тогда как экспрессия *PEPR1*

присутствует в большинстве тканей корня. Экспрессия генов *PEPR1* и *PEPR2* практически отсутствует в цветах. Механическое повреждение вегетативных тканей растения, а также обработка метилжасмонатом приводят к быстрой (от 30 мин до 1 ч), но переходной индукции транскрипции генов *AtPEPR1* и *AtPEPR2* [23].

Структура рецептора, механизм связывания с Peps и пути передачи сигнала изучены на примере арабидопсиса [19–21]. Рецептор имеет два домена: внеклеточный LRR-домен для связывания с AtPeps и внутриклеточный домен, проявляющий киназную активность. LRR-домен характеризуется значительной пластичностью у разных видов растений, тогда как внутриклеточная часть PEPR более консервативна [2]. С ней взаимодействует корецептор BAK1 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE-ASSOCIATED KINASE1) [19].

AtPeps связываются с внеклеточным LRR-доменом рецептора. AtPEPR1 способен взаимодействовать со всеми восьмью AtPeps, тогда как AtPEPR2 обнаруживает только AtPep1 и AtPep2 [12]. Поскольку двойные мутанты *Arabidopsis pepr1 pepr2* оказались нечувствительными ко всем AtPeps, предполагают, что это единственные рецепторы, способные воспринимать Peps [17; 23].

Замещение различных аминокислот в пептидах AtPeps позволило идентифицировать три важнейшие консервативные аминокислоты на С-концевом участке: серин-15, глицин-19 и аспарагин-23, обеспечивающие взаимодействие с рецептором. Замена этих аминокислот приводит к значительному снижению чувствительности клеток к модифицированным пептидам AtPep1 [26]. Важность этих аминокислот была подтверждена при изучении кристаллической структуры комплекса AtPep1/AtPEPR1-LRR. Вместе с тем установлено, что другие аминокислоты также способствуют стабильному взаимодействию Peps с рецептором и запуску путей сигнальной трансдукции. Так, для индукции защитных ответов при восприятии AtPep1 необходимо взаимодействие AtPEPR1 с корецептором BAK1 [27]. Решающее значение в нем играют аминокислоты пролин-19, глутамин-21 и гистидин-22 [28]. Очевидно, С-концевой мотив пептида из 9 аминокислот сохраняется во всех 8 гомологах AtPeps и определяет их взаимодействие с рецептором и функциональную активность.

Данные секвенированных геномов других растений показали, что гомологи AtPEPR присутствуют у большого числа видов покрытосеменных. Подобно ситуации с *Arabidopsis*, большинство видов растений содержат один или два *PEPR*, но очень немногие из них охарактеризованы. Помимо двух AtPEPR из *Arabidopsis*, были исследованы рецепторы ZmPEPR1 из *Zea maise* и SlPEPR1 из *Solanum lycopersicum*, показана их способность воспринимать ZmPep1 и SlPep1 соответственно и активировать PTI-подобный ответ [15]. Эндогенные пептиды этих растений имеют отличную структуру С-концевого мотива, например, SlPep6 в положении 15 вместо серина содержит глицин, а ZmPep1 в положении 23 вместо аспарагина – гистидин. Таким образом, можно заключить, что пептидные элиситоры растений, принадлежащие различным семействам, не имеют общего и строго консервативного Pep-мотива, но каждое семейство приобрело свой собственный довольно чистый Pep-мотив, который определяет способность взаимодействовать с рецептором и запускать защитный ответ.

Запуск путей сигнальной трансдукции

После присоединения AtPeps к рецептору происходит индукция целого ряда сигнальных путей, приводящих в конечном итоге к повышению устойчивости растения к стрессовым факторам. Начальные стадии этого процесса были довольно хорошо изучены на молекулярном уровне. Выявлено, что PEPR используют сигнальные пути, во многом аналогичные тем, которые активируются бактериальными элиситорами флагеллином (flg22) или фактором элонгации (EF-Tu) после их присоединения к соответствующим рецепторам FLS2 (FLAGELLIN SENSING2) и EFR [2]. Подобно флагеллину, при связывании AtPep1 с рецептором AtPEPR1 последний взаимодействует с корецептором BAK1 с последующим фосфорилированием как BAK1, так и AtPEPR1 [29]. Далее AtPEPR1 взаимодействует с BIK1 (BOTRYTIS-INDYCED KINASE1) и осуществляет его фосфорилирование [19]. Фосфорилированный BIK1 может покинуть комплекс аналогично тому, как он покидает рецептор FLS2 при восприятии flg22, и приводить к активации синтеза жасмоновой кислоты [30].

В отличие от FLS2 AtPEPR1 и, возможно, AtPEPR2 содержат цитозольный домен гуанилатциклазы, способной продуцировать циклический ГМФ (цГМФ) [31]. При связывании AtPep1 с рецептором происходит активация гуанилатциклазы, что вызывает локальное увеличение уровня цГМФ, приводящего к активации нуклеотидзависимых катионных каналов CNGC2 (CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CATION CHANNEL2), расположенных на цитоплазматической мембране клетки и обеспечивающих вход внеклеточного Ca^{2+} в цитоплазму. Увеличение цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} активирует целый ряд Ca^{2+}-зависимых путей сигнализации. В частности, под действием ионов кальция происходят процессы трех основных групп процессов: активация НАДФН-оксидазы, функционирование которой приводит

к повышению уровня супероксидных анион-радикалов и перекиси водорода снаружи клетки; активация кальмодулина и кальмодулинподобных белков и синтез NO в клетке; активация кальцийзависимых протеинкиназ [31; 32]. Очевидно, что первая и вторая группы процессов приводят к увеличению уровня АФК, с одной стороны являющихся сигнальными молекулами, с другой стороны способных вызвать локальный окислительный взрыв (реакция сверхчувствительности). Продукция АФК есть ранний ответ растительных клеток на многие MAMPs. Сравнение уровней АФК в ответ на обработку различными элиситорами показывает, что под действием AtPep1 уже через 10 мин содержание АФК в изолированных корнях арабидопсиса увеличивается в 3–4 раза по сравнению с контролем, аналогичные данные наблюдаются при действии flg22, гораздо меньшее влияние на исследуемый параметр оказывает гептомер хитина [24]. Следовательно, Peps индуцируют мощный всплеск АФК, сравнимый с действием флагеллина. В настоящий момент существует ряд убедительных доказательств того, что Ca^{2+}-зависимая генерация АФК играет важную роль в передаче сигналов, индуцирующих фитоиммунитет [32–34].

Параллельно с описанными процессами под действием Peps активируются каскады MAP-киназ. В [12] показано, что в *Arabidopsis* рецепция AtPeps приводит к фосфорилированию по меньшей мере двух типов MAP-киназ: MPK6 и MPK3. Активированные MAP-киназы вызывают синтез защитных гормонов этилена и жасмоновой кислоты. При этом они работают параллельно и синергично с кальцийзависимыми протеинкиназами [32; 35]. Все эти события влияют на активность факторов транскрипции, в том числе WRKY, которые, в свою очередь, индуцируют экспрессию защитных генов, а также транскрипцию *PROPEP* и *PEPR* [12; 24; 31].

Из представленных данных очевидно, что сигнальные пути Peps во многом схожи, но неидентичны таковым для бактериальных элиситоров. Как упоминалось выше, Peps, а также flg22 индуцируют подобные наборы защитных генов через MAP-киназный и кальцийзависимый протеинкиназный сигнальные пути. Одно из различий в сигналинге между flg22 и Peps заключается в их влиянии на синтез защитных гормонов. Оба элиситора инициируют синтез этилена в *Arabidopsis*, но восприятие flg22 приводит к повышению синтеза салициловой кислоты, тогда как AtPeps вызывают существенное увеличение уровня жасмоновой кислоты [20; 35; 36]. Исследование экспрессии генов в растениях *Arabidopsis* показало, что экзогенная обработка AtPep2 приводит к индукции генов ингибиторов протеаз (*LTP*, *TI1*), пероксидаз (*PRX52*), а также ряда генов, вовлеченных в жасмонатный сигнальный путь (*JAZ10*, *LOX3*, *AOC1*) [18]. Восприятие AtPep-сигнала индуцирует транскрипцию генов *PDF1.2* (plant defensin 1.2) и *VSP2* (vegetative storage protein 2), которые являются маркерами жасмоновой кислоты [37]. Схожие группы генов активируются при обработке кукурузы элиситором ZmPep3. В частности, наблюдается значительно повышенное накопление транскриптов, кодирующих биосинтетические ферменты для синтеза этилена и жасмоновой кислоты: 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат оксидазы, алленоксидсинтазы и алленоксидциклазы [11]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют, что PEPR-опосредованная сигнализация особенно тесно связана с жасмонатным сигнальным путем [9; 18; 20; 37].

В работе [24] проведено сравнение уровней экспрессии ряда защитных генов в корнях арабидопсиса под действием элиситоров различной природы – DAMP AtPep1 и двух MAMPs – флагеллина (flg22) и гептамера хитина (chi7). Показано, что количество значимых ответов маркеров было наибольшим для AtPep1 (n = 18), за которым следовали ответы на flg22 (n = 10) и ответы на chi7 (n = 6). При этом маркеры гормонов, связанных с активацией жасмонатного и салицилатного сигнальных путей, активировались только при обработке AtPep1, в то время как после восприятия flg22 и chi7 никаких значительных изменений в их уровне экспрессии не наблюдалось [24]. Данное исследование доказывает, что обработка растений AtPep1 приводит к более сильному ответу изученных защитных генов в корнях по сравнению с бактериальными элиситорами флагеллином и хитином.

Помимо индукции защитных генов, при восприятии AtPeps клеткой происходит изменение экспрессии генов, напрямую не связанных с защитой. Выявлено, что экзогенная обработка растений арабидопсиса пептидом AtPep1 вызывает ингибирование роста корневой системы [24]. Добавление в среду 100 нмоль/л и 1 мкмоль/л AtPep1 приводит к уменьшению длины первичного корня проростков *Arabidopsis* в 2,5 и 8,5 раза соответственно. Этот дозозависимый эффект AtPep1 не наблюдается у двойных мутантных растений *pepr1 pepr2*, у которых отсутствуют рецепторы для AtPeps. Имеются данные, что обработка растений AtPep1 вызывает репрессию генов *GLUTAMINE DUMPER* (*GDUs*), кодирующих транспортеры аминокислот и, следовательно, влияющих на рост и развитие корней [2; 12]. Кроме того, в листьях *Arabidopsis* в условиях темнового стресса под действием AtPep1 происходит быстрая индукция генов *PAO*, ответственных за деградацию хлорофилла, а также *APG7* и *APG8a*, связанных с аутофагией [13]. Показано, что этот ответ зависел от передачи этилена и ингибировался добавлением цитокининов. Поскольку под действием Peps происходит изменение гормонального статуса растений, функциональная активность их пептидных элиситоров может быть гораздо шире, чем предполагалось ранее, и связана не только с индукцией защитных реакций, но и с регуляцией роста и развития.

Ингибирование роста проростков, а также отложение каллозы являются маркерами поздних PTI-ответов. Установлено, что AtPeps, а также flg22 запускают оба эти ответа, хотя существуют некоторые различия [12; 19]. Обработка flg22 влияет на рост и развитие всего проростка, тогда как ингибирующий эффект AtPep проявляется главным образом на корнях [17; 24].

Еще одним поздним ответом Pep-опосредованной сигнализации является индукция синтеза вторичных метаболитов. Накопление ряда соединений вторичной природы, таких как алкалоиды, терпеноиды, фенилпропаноиды, глюкозинолаты и др., представляет собой одну из важнейших систем химической защиты растений в ответ на самые разнообразные стрессовые воздействия. Особенно велика их роль в защите от насекомых-вредителей. Эти метаболиты могут быть токсичными для насекомых, либо обладать антипитательными свойствами, т. е. выступать в качестве пищевых сдерживающих факторов, либо подавлять рост и развитие насекомых посредством имитации их гормонов [38]. В настоящее время влияние Peps на накопление вторичных метаболитов исследовано главным образом на кукурузе. Установлено, что обработка растений кукурузы пептидом ZmPep1 вызывает усиленный синтез антранилата и индола, являющихся предшественниками гликозида 2,4-дигидрокси-7-метокси-1,4-бензоксазин-3-она [39]. Это соединение обладает сильными антибиотическим, фунгицидным и инсектицидным эффектами по отношению к бактериальным, грибковым фитопатогенам и насекомым-вредителям. Накопление гликозида 2,4-дигидрокси-7-метокси-1,4-бензоксазин-3-она кукурузой является важным компонентом защиты от *Diatraea grandiosella*, *Spodoptera littoralis* и *Spodoptera frugiperda* [39–41].

В работе [11] было проанализировано влияние пяти различных ZmPeps на синтез летучих соединений кукурузой. Данная реакция растений считается универсальным ответом растений на повреждающее воздействие травоядными насекомыми путем привлечения их естественных хищников, а также важным инструментом для общения с соседними растениями. Четыре из пяти исследуемых пептидов стимулировали выброс летучих соединений терпеноидной природы, при этом ZmPep3 проявил наиболее сильный элиситорный эффект [11]. Показано, что обработка различных сортов кукурузы пептидом ZmPep3 в пикомолярных концентрациях способствовала выделению летучих веществ, схожих с соединениями, выделяемыми растениями при атаке травоядными насекомыми *Spodoptera exigua*. Эти соединения привлекают естественных врагов многих видов чешуекрылых – энтомопаразитных ос *Cotesia marginiventris* [42]. Таким образом, очевидно, что экзогенная обработка растений пептидными элиситорами воспринимается ими как сигнал опасности и приводит к запуску целого ряда как быстрых, так и длительных защитных реакций, вносящих определенный вклад в иммунитет растений.

Формирование местного и системного иммунитета растений

Исследователи давно задавались вопросом о роли Peps-сигналинга в формировании механизмов устойчивости растений к биотическим стрессорам. Сложность в понимании общей картины обусловлена отсутствием экспериментальных данных, объясняющих механизм высвобождения Peps во внеклеточное пространство, где они могли бы взаимодействовать с PEP-рецепторами. В настоящее время обсуждаются две модели: модель повреждения и модель опасности [2]. Согласно первой модели PROPEP и Peps пассивно выделяются во внеклеточное пространство при повреждении клетки, окружающие клетки обнаруживают Peps и индуцируют PTI-подобный ответ. Для формирования быстрого защитного эффекта эта модель требует конститутивного присутствия PROPEP в большинстве клеток растения. Модель опасности (или усилителя) предполагает, что после атаки фитопатогена и обнаружения MAMPs (например, флагеллина) растительной клеткой запускается PTI, в результате чего во внеклеточное пространство активно выделяется PROPEP и Peps. Как и в предыдущей модели, соседние клетки обнаруживают присутствие PROPEP и Peps во внеклеточном пространстве и индуцируют PTI-подобный отклик, тем самым усиливая исходный сигнал опасности. Какая из моделей более верно отражает реальную картину, пока не доказано. Обе модели могут быть правильными в зависимости от конкретного типа PEPs. Как показано выше, PROPEPs различаются по аминокислотным последовательностям, субклеточной локализации, и, возможно, некоторые из них конститутивно присутствуют в клетке и высвобождаются после повреждения, тогда как образование других индуцируется при обнаружении патогенного организма.

Несмотря на отсутствие четкого понимания механизма функционирования Peps, количество доказательств их участия как в местном, так и в системном иммунитете с каждым годом увеличивается [5; 9–11; 12; 18; 27; 38]. Установлено, что Peps способствуют формированию устойчивости растений к различным биотическим стрессорам, включая бактерии, грибы и травоядных животных.

Первые данные об участии AtPeps в иммунном ответе растений были представлены в 2006 г. [5]. Авторы показали, что трансгенные растения *Arabidopsis* с повышенной экспрессией гена *PROPEP1* проявляли более высокую устойчивость к корневому патогену *Pythium irregulare*. Позже показано

участие системы Pep – PEPR в устойчивости растений арабидопсиса к грибковым патогенам *Botrytis cinerea* [19]. Мутантные растения *pepr1 pepr2* имеют повышенную восприимчивость к *P. syringae*, *Botrytis cinerea* и *Colletotrichum higginsianum*, что свидетельствует о том, что PEPR-опосредованная передача сигналов участвует в иммунитете к разнообразным патогенам [24].

Вклад Peps в резистентность растений к травоядным насекомым-вредителям и фитопатогенным грибам был отмечен на растениях кукурузы [10; 11]. Показано, что предварительная обработка растений кукурузы ZmPep1 приводит к повышенной устойчивости к грибковым патогенам *Cochliobolis heterostrophus* и *Colletotrichum graminicola* [10], тогда как обработка ZmPep3 усиливает устойчивость к травоядным насекомым *Spodoptera exigua* [11]. Защитный ответ растений включал индукцию синтеза жасмоновой кислоты и этилена, экспрессию ряда защитных генов, усиление синтеза вторичных метаболитов.

Защитная роль Peps по отношению к насекомым-вредителям установлена и на мутантных растениях арабидопсиса *pepr1 pepr2*, на которых личинки *Spodoptera littoralis* намного лучше развивались по сравнению с растениями дикого типа [20]. Авторами показано, что обработка листьев арабидопсиса слюнным секретом гусеницы *Spodoptera littoralis* запускает PEPR-опосредованную сигнализацию и уже через 4 ч после обработки приводит к 5-кратному увеличению уровня этилена и жасмоновой кислоты и незначительному повышению содержания салициловой кислоты.

Изучена роль Peps у томатов. Растения с молчащим геном *SlPROPEP1* демонстрировали пониженный уровень экспрессии вирусиндуцируемых защитных генов. Эти растения имели пониженную резистентность к некротрофическому грибу *Pythium dissotocum* [14]. Недавно было проведено исследование, связанное с выявлением роли Peps у фруктовых культур семейства Rosaceae [16]. Подтверждено наличие системы Pep – PEPR в этом семействе и показано, что обработка растений *Prunus spp*. наномолярными концентрациями Peps вызывает индукцию ряда защитных генов и повышение устойчивости к *Xanthomonas arboricola*.

В целом можно заключить, что к настоящему времени проведены многочисленные исследования, подтверждающие вклад системы Pep – PEPR в устойчивость растений к большому количеству разнообразных фитопатогенных организмов и насекомых-вредителей. Показано, что, подобно flg22, локальная обработка отдельных тканей растения пептидами AtPeps является достаточной для индуцирования системного иммунитета [18; 36]. Поскольку PROPEPs и PEPR присутствуют не во всех тканях растительного организма, высказано предположение, что система Pep – PEPR, скорее всего, способствует или усиливает генерацию неизвестного системного сигнала.

Заключение

Эндогенные пептидные элиситоры растений представляют собой важное звено в формировании устойчивости растений к разнообразным биотическим стрессорам. Pep-сигналинг может индуцировать и усиливать защитные отклики растительной клетки в ответ на внедрение фитопатогенов и насекомых-вредителей. При этом развивается серия неспецифических реакций, приводящих к формированию индуцированной устойчивости. Следовательно, экзогенная обработка растений синтетическими аналогами пептидных элиситоров может рассматриваться как своего рода иммунизация, способствующая возникновению неспецифической устойчивости сельскохозяйственных культур к широкому кругу фитопатогенных организмов и травоядных насекомых. С нашей точки зрения, синтетические пептидные элиситоры могут служить основой для разработки экологически безопасных препаратов, индуцирующих как локальный, так и системный иммунитет растений и снижающих потребность в использовании пестицидов.

Библиографические ссылки / References

1. Albert M. Peptides as trigger of plant defence. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64:5269–5279. DOI: 10.1093/jxb/ert275.

2. Bartels S, Boller T. Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66:5183–5193. DOI: 10.1093/jxb/erv180.

3. Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*. 2009;60:379–406. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.

4. Jones JD, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*. 2006;444:323–329. DOI: 10.1038/nature05286.

5. Huffaker A, Pearce G, Ryan CA. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *PNAS USA*. 2006;103(26):10098–10103. DOI: 10.1073/pnas.0603727103.

6. Ferrari S, Savatin DV, Sicilia F, Gramegna G, Cervone F, Lorenzo GD. *Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. Frontiers in Plant Science.* 2013;4:49. DOI: 10.3389/fpls.2013.00049.

7. Ryan CA, Pearce G. Systemins: a functionally defined family of peptide signal that regulate defensive genes in *Solanaceae* species. *PNAS USA*. 2003;100. Supplement 2:14577–14580. DOI: 10.1073/pnas.1934788100.

8. Yamaguchi Y, Huffaker A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 2011;14(4): 351–357. DOI: 10.1016/j.pbi.2011.05.001.

9. Huffaker A, Ryan A. Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *PNAS USA*. 2007;104(25):10732–10736. DOI: 10.1073/pnas.0703343104.

10. Huffaker A, Dafoe NJ, Schmelz EA. ZmPep1, an ortholog of *Arabidopsis* elicitor peptide 1, regulates maize innate immunity and enhances disease resistance. *Plant Physiology*. 2011;155(3):1325–1338. DOI: 10.1104/pp.110.166710.

11. Huffaker A, Pearce G, Veyrat N, Erb M, Turlings TCJ, Sartor R, et al. Plant elicitor peptides are conserved signals regulating direct and indirect antiherbivore defense. *PNAS USA*. 2013;110(14):5707–5712. DOI: 10.1073/pnas.1214668110.

12. Bartels S, Lori M, Mbengue M, van Verk M, Klauser D, Hander T, et al. The family of Peps and their precursors in *Arabidopsis*: differential expression and localization but similar induction of pattern-triggered immune responses. *Journal of Experimental Botany*. 2013;64(17):5309–5321. DOI: 10.1093/jxb/ert330.

13. Gully K, Hander T, Boller T, Bartels S. Perception of *Arabidopsis* AtPep peptides, but not bacterial elicitors, accelerates starvation-induced senescence. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6(14):1–10. DOI: 10.3389/fpls.2015.00014.

14. Trivilin AP, Hartke S, Moraes MG. Components of different signaling pathways regulated by a new orthologue of AtPROPEP1 in tomato following infection by pathogens. *Plant Pathology*. 2014;63(5):1110–1118. DOI: 10.1111/ppa.12190.

15. Lori M, van Verk MC, Hander T, Schatowitz H, Klauser D, Flury P, et al. Evolutionary divergence of the plant elicitor peptides (Peps) and their receptors: interfamily incompatibility of perceptionbut downstream signaling. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(17):5315–5325. DOI: 10.1093/jxb/erv236.

16. Ruiz C, Nadal A, Montesinos E, Pla M. Novel *Rosaceae* plant elicitor peptides as sustainable tools to control *Xanthomonas arboricola pv*. pruni in *Prunus spp. Molecular Plant Pathology*. 2018;19(2):418–431. DOI: 10.1111/mpp.12534.

17. Krol E, Mentzel T, Chinchilla D, Boller T, Felix G, Kemmerling B, et al. Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pettern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(18):13471–13479. DOI: 10.1074/jbc.M109.097394.

18. Ross A, Yamada K, Hiruma K, Yamashita-Yamada M, Lu X, Takano Y, et al. The *Arabidopsis* PEPR pathway couples local and systemic plant immunity. *EMBO Journal.* 2014;33(1):62–75. DOI: 10.1002/embj.201284303.

19. Liu Z, Wu Y, Yang F, Zhang Y, Chen S, Xie Q, et al. BIK1 interacts with PEPRs to mediate ethylene-induced immunity. *PNAS USA*. 2013;110(15):6205–6210. DOI: 10.1073/pnas.1215543110.

20. Klauser D, Desurmont GA, Glauser G, Vallat A, Flury P, Boller T, et al. The *Arabidopsis* Pep – PEPR system is induced herbivore feeding and contributes to JA-mediated plant defense against herbivore. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(17):5327–5336. DOI: 10.1093/jxb/erv250.

21. Tintor N, Ross A, Kanehara K, Yamada K, Fan L, Kemmerling B, et al. Layered pattern receptor signaling via ethylene and endogenous elicitor peptides during *Arabidopsis* immunity to bacterial infection. *PNAS USA*. 2013;110(15):6211–6216. DOI: 10.1073/pnas.1216780110.

22. Yamaguchi Y, Pearce G, Ryan CA. The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *PNAS USA*. 2006;103(15):10104–10109. DOI: 10.1073/pnas.0603729103.

23. Yamaguchi Y, Huffaker A, Bryan AC, Tax FE, Ryan CA. PEPR2 is a second receptor for the Pep1 and Pep2 peptides and contributes to defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2010;22(2):508–522. DOI: 10.1105/tpc.109.068874.

24. Poncini L, Wyrsch I, Dénervaud TV, Vorley T, Boller T, Geldner N, et al. In root of *Arabidopsis* thaliana, the damage-associated molecular pattern AtPep1 is a stronger elicitor of immune signaling than flg22 or the chitin heptamer. *PLOS ONE*. 2017;12(10):e0185808. DOI: 10.1371/journal.pone.0185808.

25. Wrzaczek M, Vainonen JP, Stae S, Tsiatsiani L, Help-Rinta-Rahko H, Gauthier A, et al. GRIM REAPER peptide binds to receptor kinase PRK5 to trigger cell death in *Arabidopsis. EMBO Journal*. 2015;34(1):55–66. DOI: 10.15252/embj.201488582.

26. Pearce G, Yamaguchi Y, Munske G, Ryan CA. Structure-activity studies of *AtPep1*, a plant peptide signal involved in the innate immune response. *Peptides.* 2008;29(12):2083–2089. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.08.019.

27. Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, et al. The *Arabidopsis* leucine-rich reapeat receptor-like kinases *BAK1/SERK3* and *BKK1/SERK4* are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell.* 2011;23(6):2440–2455. DOI: 10.1105/tpc.111.084301.

28. Tang J, Han Z, Sun Y, Zhang H, Gong X, Chai J. Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Research*. 2015;25(1):110–120. DOI: 10.1038/cr.2014.161.

29. Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, et al. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(13): 9444–9451. DOI: 10.1074/jbc.M109.096842.

30. Lal NK, Nagalakshmi U, Hurlburt NK, Flores R, Bak A, Sone P, et al. The receptor-like cytoplasmic kinase BIK1 localizes to the nucleus and regulates defense hormone expression during plant innate immunity. *Cell Host Microbe*. 2018;23(4):485–497. DOI: 10.1016/j.chom.2018.03.010.

31. Ma Y, Walker RK, Zhao Y, Berkowitz GA. Linking ligand perception by PEPR pattern recognition receptors to cytosolic Ca^{2+} elevation and downstream immune signaling in plants. *PNAS USA*. 2012;109(48):19852–19857. DOI: 10.1073/pnas.1205448109.

32. Ma Y, Zhao Y, Walker RK, Berkowitz GA. Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca^{2+}-dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca^{2+} signal. *Plant Physiology*. 2013;163(3):1459–1471. DOI: 10.1104/pp.113.226068.

33. Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM. Identification of a plant nitricoxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science.* 2003;302(5642):100–103. DOI: 10.1126/science.1086770.

34. Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig DF. NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiologia Plantarum*. 2010;138(4):372–383. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x.

35. Flury P, Klauser D, Schulze B, Boller T, Bartels S. The anticipation of danger: microbe-associated molecular pattern perception enhances AtPep-triggered oxidative burst. *Plant Physiology*. 2013;161(4):2023–2035. DOI: 10.1104/pp.113.216077.

36. Mishina TE, Zeier J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 2007;50(3):500–513. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x.

37. Tintor N, Ross A, Kanehara K, Yamada K, Fan L, Kemmerling B, et al. Layered pattern receptor signaling via ethylene and endogenous elicitor peptides during *Arabidopsis* immunity to bacterial infection. *PNAS USA*. 2013;110(15):6211–6216. DOI: 10.1073/pnas.1216780110.

38. Howe GA, Jander G. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology*. 2008;59:41–66. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092825.

39. Huffaker A, Kaplan F, Vaughan MM, Dafoe NJ, Ni X, Rocca JR, et al. Novel acidic sesquiterpenoids constitute a dominant class of pathogen-induced phytoalexins in maize. *Plant Physiology*. 2011;156(4):2082–2097. DOI: 10.1104/pp.111.179457.

40. Oikawa A, Ishihara A, Hasegawa M, Kodama O, Iwamura H. Induced accumulation of 2-hydroxy-4,7-dimethoxy-1,4-benzoxazin-3-one glucoside (HDMBOA-Glc) in maize leaves. *Phytochemistry*. 2001;56(7):669–675.

41. Glauser G, Marti G, Villard N, Doyen GA, Wolfender JL, Turlings TC, et al. Induction and detoxification of maize 1,4-benzoxazin-3-ones by insect herbivores. *Plant Journal.* 2011;68(5):901–911. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04740.x.

42. Turlings TC, Tumlinson JH, Lewis WJ. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*. 1990;250(4985):1251–1253. DOI: 10.1126/science.250.4985.1251.

Статья поступила в редколлегию 11.02.2019.
Received by editorial board 11.02.2019.

УДК 577.33/.34;577.355;577.3.32/.36

КЛЕТОЧНЫЕ ОТВЕТЫ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ДОЗ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И ИХ МОДУЛЯЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПОЛИФЕНОЛАМИ

***А. АЛБУХАЙДАР*[1)], *А. И. ПОТАПОВИЧ*[1)], *В. А. КОСТЮК*[1)], *Л. Г. КОРКИНА*[2)]**

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Центр инновационных биотехнологических исследований «Нанолаб», проезд Одоевского, 3, корп. 7, 117574, г. Москва, Россия*

Исследованы ответы культивируемых клеток человека – кератиноцитов и фибробластов – на воздействие физиологических доз ультрафиолетового излучения без растительных полифенольных соединений и совместно с такими из них, как рутин, кверцетин, таксифолин, силибин и байкалеин. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии синергизма в действии физиологических доз ультрафиолетового излучения и указанных соединений на воспалительные сигнальные пути в кератиноцитах и фибробластах. Сделан вывод, что выявленный синергизм, способствуя адаптации кожи к последующему воздействию ультрафиолета, может быть одним из механизмов фотозащитного действия растительных полифенольных соединений.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение; растительные полифенольные соединения; медиаторы воспаления; кератиноциты; фибробласты.

CELL RESPONSES TO THE IMPACT OF PHYSIOLOGICAL DOSES OF ULTRAVIOLET RADIATION AND THEIR MODULATION BY PLANT POLYPHENOLS

***A. ALBUHAYDAR*[a], *A. I. POTAPOVICH*[a], *V. A. KOSTYUK*[a], *L. G. KORKINA*[b]**

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b]*Centre for Innovative Biotechnological Investigations «Nanolab», 3 Odoevsky Passage, 7 building, Moscow 117574, Russia*
Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

In this study it was investigated the responses of cultured human cells – keratinocytes and fibroblasts to physiological doses of ultraviolet radiation (UVR) applied with or without plant polyphenolic compounds: rutin, quercetin, taxofolin,

Образец цитирования:
Албухайдар А, Потапович АИ, Костюк ВА, Коркина ЛГ. Клеточные ответы на воздействие физиологических доз ультрафиолетового излучения и их модуляция растительными полифенолами. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:13–21.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-13-21

For citation:
Albuhaydar A, Potapovich AI, Kostyuk VA, Korkina LG. Cell responses to the impact of physiological doses of ultraviolet radiation and their modulation by plant polyphenols. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:13–21. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-13-21

Авторы:
Ахмед Албухайдар – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Костюк.
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.
Людмила Георгиевна Коркина – доктор медицинских наук; профессор.

Authors:
Ahmed Albuhaydar, postgraduate student at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
pot-alla@rambler.ru
Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the research laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
kostyuk@bsu.by
Lyudmila G. Korkina, doctor of science (medicine); full professor.
korkina@cibi-nanolab.com

silybin and baikalein. Experimental data obtained in this work indicate the presence of synergism in the action of physiological doses of UVR and plant polyphenolic compounds on inflammatory signaling pathways in keratinocytes and fibroblasts. It is concluded that the identified synergies can contribute to the adaptation of the skin to subsequent exposure to UVR, and thus be one of the photoprotective mechanisms of the plant polyphenolic compounds.

Keywords: ultraviolet radiation; plant polyphenolic compounds; inflammatory mediators; keratinocytes; fibroblasts.

Введение

В зависимости от интенсивности воздействия на кожу солнечный ультрафиолет оказывает как благотворное, так и негативное влияние на организм человека. Общеизвестно, что под действием солнечной УФ-радиации в коже инициируется процесс образования из холестерола холекальциферола (витамина Д3), необходимого для всасывания кальция в кишечнике и обеспечения нормального развития костной ткани. Вместе с тем избыточное воздействие ультрафиолета является основным природным фактором, ответственным за множество патологических нарушений в коже, включая солнечную эритему, преждевременное старение и рак [1–3]. Важную роль в этих процессах играют кератиноциты кожи, которые формируют многослойный эпителий (эпидермис) и в наибольшей степени подвержены воздействию солнечного ультрафиолетового излучения (УФИ). В многочисленных исследованиях установлено, что кератиноциты в ответ на солнечную УФ-радиацию производят воспалительные медиаторы, в том числе простагландины, хемокины, цитокины и молекулы адгезии, которые, в свою очередь, активируют иммунокомпетентные клетки, продуцирующие в области формирующегося воспаления большое количество оксида азота, супероксида, H_2O_2 и гипохлорита [4–7].

В последние годы возрос интерес к исследованиям последствий воздействия солнечного УФИ на фибробласты – клеточный элемент расположенной под эпидермисом соединительно-тканной части кожи, т. е. дермы, в которую проникает 20–30 % УФИ длинноволнового диапазона, или УФА (320–400 нм), и почти 10 % – средневолнового, или УФВ (280–320 нм) [8]. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют, что преждевременное старение кожи под воздействием солнечного света обусловлено уменьшением в дерме количества фибробластов, а также снижением их функциональной активности. В результате резко падает содержание волокон коллагена и эластина, обеспечивающих упругость и эластичность кожи, и гиалуроновой кислоты, удерживающей в ней воду. Кожа становится морщинистой и дряблой [9; 10].

В данной работе исследованы воспалительные и редокс-ответы кератиноцитов и фибробластов на воздействие физиологических доз УФ-излучения совместно с рядом растительных полиферольных соединений (РПС) и без них.

Материалы и методы исследования

Реактивы. Были использованы коммерческие полифенольные соединения: рутин, кверцетин (*Sigma*, США); таксифолин, силибин и байкалеин (*Extrasynthese*, Франция). Во всех экспериментах полифенолы растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Также применялись трипсин, соли и растворители (*Sigma-Aldrich*, Германия), изотонический фосфатный буфер (ИФБ, pH 7,4) (*Lonza*, Бельгия), антибиотики (*Gibco*, США).

Клеточные культуры. Работа выполнена на культивируемых кератиноцитах человека линии HaCaT и нормальных фибробластах человека линии FL (human lung fibroblasts). Непосредственно для экспериментов клетки растили до полного кофлюента в 6-луночных планшетах в среде ДМЕМ (*Sigma-Aldrich*, Германия) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2).

Моделирование УФ-облучения. В качестве источника УФ-излучения использовали облучатель ультрафиолетовый ОУФк-05 (Россия), обеспечивающий в эффективном спектральном диапазоне (280–400 нм) интенсивность облучения на расстоянии 5 см не менее 50,0 Вт/м^2 при соотношении УФА и УФВ 2 : 1. Непосредственно перед облучением среду заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую ДМСО или растворы РПС в ДМСО в дозе 10 или 50 мкмоль/л. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2). Через 6 ч после добавления препаратов образцы среды и адгезивные клетки (на планшетах) замораживали при –80 °C.

Определение цитотоксического действия УФИ. Исследование влияния УФИ на жизнеспособность культивируемых клеток через 24 ч после воздействия проводили в 96-луночных планшетах. Количество клеток определяли с помощью реактива PrestoBlue™ Reagent (*Introvigen*, США) в соответствии с инструкцией. Флуоресценцию образующегося продукта (возбуждение 560 нм, эмиссия 590 нм) измеряли в планшетном флуориметре. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Анализ экспрессии мРНК. Выделение общей РНК проводили с использованием набора GeneElute™ Mammalian Total RNA Kit (*Sigma-Aldrich*, Германия). О ее чистоте судили по отношению поглощения 260/280 нм, которое во всех экспериментах было в пределах 2,0–2,1. Количество РНК определяли по оптической плотности раствора при 260 нм. РНК (2 мкг) переводили в кДНК с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad*, США). Режим обратной транскрипции: 5 мин при 25 °С, 30 мин при 42 °С, 5 мин при 85 °С; объем реакционной смеси 40 мкл. Количественный анализ содержания мРНК интересующих генов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени детектором Real-Time PCR Detector Chromo4 Four-Color (*Bio-Rad*, США), используя набор реагентов IQ SYBR green Supermix (*Bio-Rad*, США). Реакции проводили в объеме 25 мкл, в стандартных 96-луночных оптических планшетах (*Sarstedt AG*, Германия). Температурный профиль реакции: 95 °С – 15 с, 60 °С – 1 мин, 65 °С – 5 с; 36 циклов. Специфичность продуктов ПЦР подтверждалась анализом кривой плавления.

Все коммерческие наборы использовали в соответствии с инструкцией. Результаты ПЦР оценивали с помощью сравнительного Ct-метода (ΔΔCt) [11]. Экспрессию генов-мишеней нормализовали по конститутивным генам (β-актин и 18s rRNA) и представляли как относительное увеличение экспрессии в опытных клетках по сравнению с контрольными.

Использованные в работе праймеры были разработаны при помощи интернет-ресурса Primer-BLAST[1] (NCBI) и синтезированы в *Eurofins MWG Operon* (Германия) и *Праймтех* (Беларусь).

Анализ уровня секреции цитокинов. Уровни цитокинов (пг/мг клеточного белка) в культуральной среде HaCaT определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью коммерческих наборов фирмы *SABiosciences – Qiagen SpA* (Италия) в соответствии с инструкцией. Содержание белка в среде находили методом Бредфорда, используя реактив Bio-Rad (*Bio-Rad*, США).

Определение степени фосфорилирования протеинкиназы B, альфа (Akt1), и внеклеточной сигналрегулируемой киназы 1 и 2 (ERK1/2) в HaCaT. Фосфопротеинкиназы Akt1 (фосфо-Akt1) и ERK1/2 (фосфо-ERK1/2) в HaCaT определяли с помощью модифицированного твердофазного иммуноферментного анализа непосредственно в 96-луночном планшете с использованием набора CASE™ Kit (*SABiosciences*, США) через 20 мин после воздействия УФИ (2,5 Дж/см^2) без кверцетина и совместно с ним (50 мкмоль/л). Перед анализом клетки HaCaT фиксировали 4 % формальдегидом. Результаты были выражены в процентном количестве активированного (фосфорилированного) белка относительно общего белка Akt1 или ERK1/2.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатион-S-трансферазы (GST) и содержания восстановленного глутатиона (GSH) в фибробластах человека. Активность СОД измеряли косвенным спектрофотометрическим методом, основанным на ингибировании автоокисления кверцетина, как описано в [12]. Активность GST находили по методу [13], используя хлор-2,3-динитробензол в качестве субстрата. Содержание внутриклеточного GSH определяли с помощью флуоресцентного реагента ThioGlo-1 (*SABiosciences*, Италия) методом [14]. Флуоресценцию образующегося продукта (возбуждение 355 нм, эмиссия 535 нм) измеряли с использованием планшетного флуориметра.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*. Статистические данные представлялись в виде ($M \pm SD$), где M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение. Для оценки разницы между экспериментальными группами применяли t-критерий Стьюдента, и значения $P < 0,05$ считались достоверными.

Результаты исследования и их обсуждение

Цитотоксическое действие УФИ (6,0 Дж/см^2) на кератиноциты и фибробласты человека. В наших экспериментах интенсивность облучения клеточного монослоя соответствовала интенсивности солнечного УФ-облучения объектов на земной поверхности в полдень летом (50,0 Вт/м^2), и, как свидетельствуют данные табл. 1, такое воздействие не оказывало цитотоксического влияния на клетки.

Таблица 1

Влияние УФИ (6,0 Дж/см^2) на жизнеспособность культивируемых клеток через 24 ч после воздействия, %

Table 1

The effect of UV radiation (6.0 J/cm^2) on the viability of cultured cells 24 h after exposure, %

Условия эксперимента	Кератиноциты	Фибробласты
Контроль	100 ± 6	100 ± 28
УФИ	97 ± 7	111 ± 35

[1]Доступно по: *http://ncbi.nlm.nih.gov*.

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления при воздействии на кератиноциты человека линии HaCaT физиологических доз УФИ без РПС и совместно с ними. В экспериментах исследовали экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов: интерлейкинов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*; циклооксигеназы-2 (*COX-2*) – фермента, синтезирующего инициаторы воспалительного каскада простагландины; матриксной металлопротеиназы-1 (*MMP-1*) – фермента, расщепляющего структурные белки внеклеточного матрикса; фермента супероксиддисмутазы-2 (*СОД-2*) – ключевого элемента антиоксидантной защиты; регулятора транспорта воды и водного баланса аквапорина-3 (*AQP-3*). Эксперимент включал 3 серии:

- кератиноциты, не подвергавшиеся воздействию УФИ (контроль);
- кератиноциты, инкубируемые 6 ч после воздействия физиологических доз УФИ (6,0 Дж/см^2) в среде, не содержащей РПС (серия УФИ);
- кератиноциты, инкубируемые 6 ч после воздействия УФИ в среде, содержащей РПС в концентрации 10 и 50 мкмоль/л (серия УФИ + РПС).

Как следует из табл. 2, воздействие УФИ не оказывает существенного влияния на экспрессию мРНК исследованных медиаторов в кератиноцитах. Выявлено только незначительное увеличение экспрессии *COX-2* и *IL-6*. В то же время в клетках серии УФИ + РПС наблюдался существенный рост экспрессии мРНК медиаторов воспаления. В наибольшей степени увеличивалась экспрессия мРНК цитокинов *IL-6* и *IL-8*, а также фермента *COX-2*. При этом наибольший эффект на экспрессию мРНК УФ-облученных клеток оказывал байкалеин.

Таблица 2

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT УФИ (6,0 Дж/см^2) без РПС и совместно с ними (50 мкмоль/л)

Table 2

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after exposure of human keratinocytes (HaCaT) to UVR (6.0 J/cm^2) applied with or without PPs (50 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФИ	УФИ + Кв	УФИ + Тф	УФИ + Бк
СОД-2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,4^{*a}	1,1 ± 0,1
AQP-3	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,4^{*a}	1,1 ± 0,1
IL-1B	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1
IL-8	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,3^{*a}	1,4 ± 0,4^{*a}	2,5 ± 0,2^{***a}
COX-2	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,23	1,6 ± 0,4^{*a}	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,1^{***a}
IL-6	1,0 ± 0,05	1,2 ± 0,2^{*a}	4,1 ± 0,7^{***a}	6,7 ± 1,7^{***a}	11,2 ± 0,5^{***a}
MMP-1	1,0 ± 0,05	0,8 ± 0,1^{*a}	0,9 ± 0,2	1,5 ± 0,5^{*a}	1,5 ± 0,3^{*a}

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; $^{*a}p < 0,05$, $^{***a}p < 0,001$ относительно контроля.

Таблица 3

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT УФИ (6,0 Дж/см^2) без РПС и совместно с ними (10 мкмоль/л)

Table 3

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after exposure of human keratinocytes (HaCaT) to UVR (6.0 J/cm^2) applied with or without PPs (10 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФИ	УФИ + Кв	УФИ + Тф	УФИ + Бк
IL-8	1,0 ± 0,03	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,6	1,8 ± 1,3^{*a}
COX-2	1,0 ± 0,03	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,4	1,2 ± 0,6	1,1 ± 0,9
IL-6	1,0 ± 0,03	1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,7^{*a}	2,8 ± 1,4^{*a}	3,6 ± 1,8^{*a}

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; $^{*a}p < 0,05$ относительно контроля.

Как следует из табл. 3, синергетический эффект РПС в серии УФИ + РПС был дозозависимый. При снижении концентрации тестируемых соединений в культуральной среде до 10 мкмоль/л наблюдалось и уменьшение экспрессии мРНК *IL-6*, *IL-8* и *COX-2*.

Следует отметить, что в отсутствие предварительного УФ-облучения кератиноцитов РПС в дозе 50 мкмоль/л не оказывали заметного воздействия на экспрессию мРНК медиаторов воспаления, за исключением *IL-8*. Все исследованные РПС достоверно снижали экспрессию этого цитокина в 2 раза и более (табл. 4).

Таблица 4

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT РПС (50 мкмоль/л)

Table 4

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after treatment of human keratinocytes (HaCaT) with PPs (50 μmol/L)

Медиатор	Контроль	Кверцетин	Таксифолин	Байкалеин
AQP-3	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,6	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3
IL-1B	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,8	1,2 ± 0,8	1,2 ± 0,4
IL-8	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,3^{***a}	0,4 ± 0,3^{***a}	0,4 ± 0,1^{***a}
COX-2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,6	0,8 ± 0,3
IL-6	1,0 ± 0,6	1,7 ± 0,9^{*a}	0,8 ± 0,6	0,7 ± 0,1^{*a}
MMP-1	1,0 ± 0,01	1,0 ± 0,6	1,0 ± 0,6	0,9 ± 0,5

$^{*a}p < 0,05$, $^{***a}p < 0,001$ относительно контроля.

Секреция медиаторов воспаления при воздействии на кератиноциты человека линии HaCaT УФИ без кверцетина и совместно с ним. Синергетический эффект на продукцию и секрецию воспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 кератиноцитами при действии УФИ и РПС, в частности кверцетина, был подтвержден методом твердофазного иммуноферментного анализа на белковом уровне (табл. 5).

Таблица 5

Секреция медиаторов воспаления через 24 ч после воздействия на кератиноциты человека линии HaCaT УФИ (2,5 Дж/см^2) без кверцетина и совместно с ним (50 мкмоль/л)

Table 5

Secretion of inflammatory mediators 24 h after exposure of human keratinocytes (HaCaT) to UVR (2.5 J/cm^2) applied with or without quercetin (50 μmol/L)

Цитокин	Уровень цитокинов в ростовой среде, пмоль/мг белка		
	Контроль	УФИ	УФИ + Кв
IL-6	1,1 ± 0,04	1,9 ± 0,6^{*a}	10,1 ± 2,1^{*b}
IL-8	5,7 ± 0,3	8,7 ± 1,5^{*a}	15,9 ± 2,8^{*b}

Примечание. Кв – кверцетин; $^{*a}p < 0,05$ относительно контроля; $^{*b}p < 0,05$ относительно УФИ.

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления при воздействии на фибробласты человека физиологических доз УФИ без РПС и совместно с ними. Исследовали экспрессию мРНК *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*; *COX-2*, *MMP-1*, *СОД-2* и *AQP-3*. Эксперимент включал три серии:

- фибробласты, не подвергавшиеся воздействию УФИ (контроль);
- фибробласты, инкубируемые 6 ч после воздействия УФИ (6,0 Дж/см^2) в среде, не содержащей РПС (серия УФИ);
- фибробласты, инкубируемые 6 ч после воздействия УФИ в среде, содержащей РПС в концентрации 10 или 50 мкмоль/л (серия УФИ + РПС).

Как и в экспериментах с кератиноцитами, УФИ не оказывало существенного влияния на экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов *COX-2* и *СОД-2*. Однако в обработанных УФИ клетках существенно увеличивалась экспрессия мРНК *AQP-3* и особенно (в 3 раза) экспрессия *MMP-1* (табл. 6).

Таблица 6

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на фибробласты человека УФИ (6,0 Дж/см^2) без РПС и совместно с ними (50 мкмоль/л)

Table 6

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after exposure of human fibroblasts to UVR (6.0 J/cm^2) applied with or without PPs (50 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФИ	УФИ + Кв	УФИ + Тф	УФИ + Бк
СОД-2	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	$1,5 \pm 0,4^{*a}$
AQP-3	1,0 ± 0,1	$1,5 \pm 0,3^{*a}$	1,2 ± 0,2	$1,3 \pm 0,2^{*a}$	$2,1 \pm 0,5^{*a,*b}$
IL-1B	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3	$0,7 \pm 0,1^{*a}$	$0,7 \pm 0,1^{*a}$	$0,4 \pm 0,1^{***a}$
IL-8	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2	$1,7 \pm 0,2^{*a}$	1,0 ± 0,1	$2,6 \pm 0,6^{***a}$
COX-2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,2	$3,8 \pm 0,6^{***a}$	$1,6 \pm 0,2^{***a}$	$3,3 \pm 0,93^{***a}$
IL-6	1,0 ± 0,02	1,1 ± 0,3	$2,5 \pm 0,4^{***a}$	1,9 ± 0,3	$3,8 \pm 1,1^{***a}$
MMP-1	1,0 ± 0,1	$3,0 \pm 0,33^{***a}$	$2,8 \pm 1^{***a}$	$4,4 \pm 0,9^{*b}$	$12,1 \pm 2,4^{***a,*b}$

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; $^{*a}p < 0,05$, $^{***a}p < 0,001$ относительно контроля; $^{*b}p < 0,05$ относительно УФИ.

Таким образом, несмотря на отсутствие воспалительной реакции со стороны фибробластов, физиологические дозы УФИ существенно повышают в этих клетках экспрессию *MMP-1* – одной из основных матриксных металлопротеиназ, которые расщепляют дермальный коллаген и эластин и с активацией которых связывают процессы фотостарения кожи [10].

Как следует из табл. 6, внесение сразу после облучения в культуральную среду РПС оказывало существенное влияние на экспрессию мРНК медиаторов воспаления. Аналогично случаю с кератиноцитами в наибольшей степени увеличивалась экспрессия мРНК цитокинов *IL-6*, *IL-8* и *COX-2*, а наибольший эффект на экспрессию мРНК УФ-облученных клеток оказывал байкалеин. В присутствии такового также значительно увеличивалась экспрессия мРНК *MMP-1*, тогда как действие кверцетина и таксифолина было незначительно.

При снижении концентрации тестируемых соединений в культуральной среде до 10 мкмоль/л их синергетический эффект на экспрессию мРНК *IL-6*, *IL-8* и *COX-2* существенно уменьшался (табл. 7).

Таблица 7

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на фибробласты человека УФИ (6,0 Дж/см^2) без РПС и совместно с ними (10 мкмоль/л)

Table 7

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after exposure of human fibroblasts to UVR (6.0 J/cm^2) applied with or without PPs (10 μmol/L)

Медиатор	Контроль	УФИ	УФИ + Кв	УФИ + Тф	УФИ + Бк
IL-8	1,0 ± 0,02	0,9 ± 0,2	$1,3 \pm 0,2^{*a}$	$1,3 \pm 0,2^{*a}$	$2,2 \pm 0,3^{***a}$
COX-2	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,3	$1,9 \pm 0,4^{***a}$	$1,5 \pm 0,2^{*a}$	$1,8 \pm 0,3^{***a}$
IL-6	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,3	$2,0 \pm 0,3^{***a}$	$1,8 \pm 0,2^{***a}$	$2,4 \pm 0,2^{***a}$

Примечание. Кв – кверцетин, Тф – таксифолин, Бк – байкалеин; $^{*a}p < 0,05$, $^{***a}p < 0,001$ относительно контроля.

При исследовании действия РПС в дозе 50 мкмоль/л на фибробласты, не подвергавшиеся УФ-облучению, выявлено некоторое увеличение экспрессии мРНК ряда воспалительных медиаторов. При этом если кверцетин достоверно увеличивал экспрессию мРНК только *COX-2*, то байкалеин увеличивал экспрессию *IL-6*, *IL-8* и *COX-2* (табл. 8). Вместе с тем исследованные РПС понижали экспрессию мРНК *MMP-1*.

Таблица 8

Экспрессия мРНК медиаторов воспаления через 6 ч после воздействия на фибробласты человека РПС (50 мкмоль/л)

Table 8

Expression of mRNA of inflammatory mediators 6 h after treatment of human fibroblasts with PPs (50 μmol/L)

Медиатор	Контроль	Кверцетин	Таксифолин	Байкалеин
AQP-3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,4
IL-1B	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,6
IL-8	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	2,0 ± 0,8^{*a}
COX-2	1,0 ± 0,2	1,7 ± 0,5^{*a}	1,4 ± 0,3^{*a}	1,9 ± 0,6^{*a}
IL-6	1,0 ± 0,1	0,8 ± 0,3	1,6 ± 0,3	2,3 ± 1,0
MMP-1	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,3^{*a}	0,8 ± 0,5	0,4 ± 0,2^{***a}

$^{*a}p < 0,05$, $^{***a}p < 0,001$ относительно контроля.

Активность глутатион-S-трансферазы, содержание СОД и восстановленного глутатиона в фибробластах человека при воздействии УФИ без РПС и совместно с ними. Определяли содержание основного антиоксидантного фермента СОД, активность фермента GST, катализирующего второй этап детоксикации, и содержание GSH в культивируемых фибробластах, не подвергавшихся воздействию УФ-излучения (контроль), в фибробластах, инкубируемых 24 ч после воздействия УФИ (9,0 Дж/см^2) в среде, не содержащей РПС, и фибробластах, инкубируемых 24 ч после воздействия УФИ в среде, содержащей РПС (рутин, кверцетин, таксифолин или силибин) в концентрации 50 мкмоль/л.

Таблица 9

Влияние УФ-излучения (9,0 Дж/см^2) на состояние антиоксидантной системы фибробластов без РПС и в присутствии их через 24 ч после воздействия

Table 9

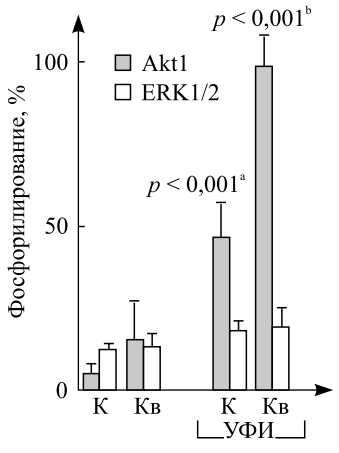
Effect of UV radiation (9.0 J/cm^2) applied with or without PPs (50 μmol/L) on the state of antioxidant system 24 h after exposure

Условия экспериментов	Содержание СОД, нг/мг белка	Активность GST, нмоль/мин/мг	Содержание GSH, нмоль/мг белка
Контроль	2256 ± 711	4,32 ± 0,57	53,7 ± 20,1
УФИ	2444 ± 780	3,98 ± 0,70	50,5 ± 22,8
УФИ + Рт	2220 ± 525	3,17 ± 0,39^{**a}	46,8 ± 20,3
УФИ + Тф	3440 ± 730^{**a}	3,83 ± 0,52	26,2 ± 10,8^{*a}
УФИ + Кв	2420 ± 800	3,39 ± 0,58*	35,5 ± 9,4^{*a}
УФИ + Сл	2715 ± 900^{**a}	3,63 ± 0,58^{*a}	32,9 ± 14,9^{*a}

Примечание. Рт – рутин, Тф – таксифолин, Кв – кверцетин, Сл – силибин; $^{*a}p < 0,05$, $^{**a}p < 0,01$ относительно контроля.

Как следует из данных, приведенных в табл. 9, воздействие УФИ в суммарной дозе 9,0 Дж/см^2 на культивируемые фибробласты не приводит к достоверному изменению активности исследованных ферментов и содержания GSH. В том случае, когда фибробласты инкубировали с РПС после воздействия УФИ, показано, что полифенольные соединения (таксифолин и силибин) достоверно увеличивали в клетках содержание СОД, но снижали активность GST (рутин, кверцетин и силибин). Также установлено, что в этих условиях все исследованные РПС снижают уровень внутриклеточного GSH, и в случае таксифолина, кверцетина и силибина выявленные различия были достоверны. При этом существенного влияния РПС в дозе 50 мкмоль/л на уровень GSH в фибробластах, не подвергнутых УФ-облучению, не выявлено (результаты не приведены).

В последние годы растет интерес к возможному использованию растительных соединений с антиоксидантными свойствами для предотвращения ряда патологических процессов, в том числе каскада негативных реакций в коже, инициируемых воздействием солнечной радиации [15]. Следует отметить,



Степень фосфорилирования Akt1 и ERK1/2 в HaCaT через 20 мин после воздействия УФИ (2,5 Дж/см^2) без кверцетина и совместно с ним (50 мкмоль/л):
К – контрольные клетки; Кв – клетки, инкубируемые с кверцетином;
[а] – относительно контроля, [б] – относительно УФИ

The degree of phosphorylation of Akt1 and ERK1/2 in HaCaT 20 min after exposure to UVR (2.5 J/cm^2) applied with or without quercetin (50 μmol/L):
К – control cells; Кв – cells incubated with quercetin;
[a] – relative to the control; [b] – relative to the UVR

что доказательство важной роли активных форм кислорода в воспалительных сигнальных путях привело к сдвигу парадигмы о функциональной роли антиоксидантов от антиоксидантной защиты к медиации воспаления и апоптоза. Поэтому в данной работе основное внимание было уделено изучению влиянии РПС на воспалительные ответы клеток кожи, обусловленные воздействием УФИ.

В отличие от ряда предыдущих исследований, в которых клетки подвергались воздействию УФ-облучения с интенсивностью, существенно превышающей солнечную [16], нами не было выявлено увеличения экспрессии мРНК ключевых воспалительных медиаторов в кератиноцитах и фибробластах после физиологических доз УФИ. Вместе с тем выявлен синергетический эффект УФИ и изучаемых РПС на экспрессию мРНК *IL-6*, *IL-8* и *COX-2* как в кератиноцитах, так и фибробластах (см. табл. 2 и 6).

Уровень фосфорилирования в HaCaT протеинкиназ Akt1 и ERK1/2 при воздействии УФИ (2,5 Дж/см^2) без кверцетина и совместно с ним. Akt1 и ERK1/2 – важные компоненты в системе МАРК-сигнальных путей, вовлеченные в регуляцию пролиферации, роста и выживания клеток. Изучение сигнальных путей, связанных с клеточным воспалительным ответом на воздействие УФИ, выявило значительное повышение в облученных кератиноцитах степени фосфорилирования митогенактивируемой протеинкиназы Akt1, но не ERK1/2 (см. рисунок), что согласуется с предыдущими исследованиями [17]. Внесение в среду инкубации кверцетина еще больше увеличивало степень фосфорилирования Akt1 (см. рисунок). Сигнальный путь через Akt широко обсуждается как критический путь выживания клеток в случае негативного внешнего воздействия [18]. Результаты данного исследования свидетельствуют, что физиологическое УФ-облучение может активировать передачу сигналов выживания через Akt1, а РПС дополнительно активируют этот путь.

Заключение

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии синергизма в действии физиологических доз УФИ и РПС на воспалительные сигнальные пути в кератиноцитах и фибробластах. Поскольку кратковременное острое воспаление обычно носит адаптивный характер [19], можно допустить, что выявленный синергизм способствует адаптации кожи к последующему воздействию УФИ и тем самым служит одним из механизмов фотозащитного действия РПС.

Библиографические ссылки

1. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;378(11):1247–1257.

2. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337:1419–1428. DOI: 10.1056/NEJM199711133372003.

3. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2005;79:237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.

4. Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128:214–222. DOI: 10.1038/sj.jid.5700960.

5. Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, Pittelkow MR. H_2O_2 is an important mediator of UVB induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;110:966–971. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00210.x.

6. Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO, Sies H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004;3:257–262. DOI: 10.1039/b309067a.

7. Adams DO, Hamilton TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1992. p. 637–662.

8. Bruls WA, van Weelden H, van der Leun JC. Transimission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. *Photochemistry and Photobiology*. 1984;39:63–67.

9. Хэбиф ТП. *Кожные болезни. Диагностика и лечение.* 3-е издание. Кубанова АА, редактор. Москва: МЕДпресс-информ; 2008.

10. Bonamigo RR, Dornelles SIT, editors. *Dermatology in Public Health Environments: A Comprehensive Textbook.* New York: Springer; 2018.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001;25:402–408.
12. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry International*. 1989;19:1117–1124.
13. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249:7130–7139.
14. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *Journal of Neurochemistry*. 2000;75(5):2178–2189.
15. Korkina LG, Pastore S, De Luca C, Kostyuk VA. Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*. 2008;9:710–729.
16. Potapovich AI, Kostyuk VA, Kostyuk TV, De Luca C, Korkina LG. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research.* 2013;62(8):773–780.
17. He YY, Council SE, Feng L, Chignell CF. UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Research*. 2008;68:3752–3758.
18. Meeran SM, Katiyar N, Singh T, Katiyar SK. Loss of endogenous interleukin-12 activates survival signals in ultraviolet-exposed mouse skin and skin tumors. *Neoplasia*. 2009;11:846–855.
19. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today*. 1994;15:74–80.

References

1. Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;378(11):1247–1257.
2. Fisher GJ, Wang Z, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337:1419–1428. DOI: 10.1056/NEJM199711133372003.
3. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2005;79:237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.
4. Valencia A, Kochevar IE. Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128:214–222. DOI: 10.1038/sj.jid.5700960.
5. Peus D, Vasa RA, Meves A, Pott M, Beyerle A, Squillace K, Pittelkow MR. H_2O_2 is an important mediator of UVB induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 1998;110:966–971. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00210.x.
6. Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz LO, Sies H. Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2004;3:257–262. DOI: 10.1039/b309067a.
7. Adams DO, Hamilton TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R, editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* New York: Raven Press; 1992. p. 637–662.
8. Bruls WA, van Weelden H, van der Leun JC. Transimission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. *Photochemistry and Photobiology*. 1984;39:63–67.
9. Hebb TP. *Skin diseases. Diagnosis and treatment*. 3rd edition. New York: Elsevior; 2005.
Russian edition*:* Khebif TP. *Kozhnye bolezni. Diagnostika i lechenie*. Kubanova AA, editor. Moscow: MEDpress inform; 2008.
10. Bonamigo RR, Dornelles SIT, editors. *Dermatology in Public Health Environments: A Comprehensive Textbook.* New York: Springer; 2018.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001;25:402–408.
12. Kostyuk VA, Potapovich AI. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochemistry International*. 1989;19:1117–1124.
13. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1974;249:7130–7139.
14. Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Sokolova TV, Ritov VB, Quinn PJ, et al. Oxidative stress following traumatic brain injury in rats: quantitation of biomarkers and detection of free radical intermediates. *Journal of Neurochemistry*. 2000;75(5):2178–2189.
15. Korkina LG, Pastore S, De Luca C, Kostyuk VA. Metabolism of plant polyphenols in the skin: beneficial versus deleterious effects. *Current Drug Metabolism*. 2008;9:710–729.
16. Potapovich AI, Kostyuk VA, Kostyuk TV, De Luca C, Korkina LG. Effects of pre- and post-treatment with plant polyphenols on human keratinocyte responses to solar UV. *Inflammation Research.* 2013;62(8):773–780.
17. He YY, Council SE, Feng L, Chignell CF. UVA-induced cell cycle progression is mediated by a disintegrin and metalloprotease/epidermal growth factor receptor/AKT/Cyclin D1 pathways in keratinocytes. *Cancer Research*. 2008;68:3752–3758.
18. Meeran SM, Katiyar N, Singh T, Katiyar SK. Loss of endogenous interleukin-12 activates survival signals in ultraviolet-exposed mouse skin and skin tumors. *Neoplasia*. 2009;11:846–855.
19. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunology Today*. 1994;15:74–80.

Статья поступила в редколлегию 15.04.2019.
Received by editorial board 15.04.2019.

УДК 57.084.1:634.73:581.151

АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У АДАПТАНТОВ *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. *EX VITRO* ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ОСВЕЩЕНИЯ

М. П. ФЕДОРЕНКО[1)]***, А. А. ВОЛОТОВИЧ***[2)]***, О. А. КУДРЯШОВА***[3)]

[1)]*Полесский государственный университет, ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, г. Пинск, Беларусь*
[2)]*Крестьянско-фермерское хозяйство «Бокша», ул. Бахарева, 24А, 225133, г. Пружаны, Беларусь*
[3)]*«Беломнимед», пер. 1-й Твердый, 5, 220037, г. Минск, Беларусь*

Представлены результаты сравнительного анализа изменчивости биопродукционных параметров роста растений сортов Блюкроп и Элизабет голубики высокой *ex vitro* в условиях люминесцентного и светодиодного освещения. Обеспечение оптимального спектрального состава излучения, реализуемое с помощью оригинального светодиодного светильника, чаще приводит к достоверному (при $p < 0,01$ и $p < 0,05$) повышению в 1,1–1,6 раза показателей всех анализируемых признаков у адаптантов сортовой голубики высокой.

Ключевые слова: клональное микроразмножение; светодиодное освещение; голубика высокая; адаптация *ex vitro*; Блюкроп; Элизабет.

ANALYSIS OF VARIABILITY OF QUANTITAVE TRAITS OF *VACCINIUM CORYMBOSUM* L. *EX VITRO* UNDER DIFFERENT LIGHTING MODES

M. P. FEDORENKO[a]***, A. A. VOLOTOVICH***[b]***, O. A. KUDRYASHOVA***[c]

[a]*Polessky State University, 23 Dniaproŭskaj Flatylii Street, Pinsk 225710, Belarus*
[b]*Peasant Farm «Boksha», 24A Bacharava Street, Pružany 225133, Belarus*
[c]*«Belomnimed», 5 First Cviordy Side Street, Minsk 220037, Belarus*
Corresponding author: M. P. Fedorenko (marta.vod@yandex.ru)

The article presents the results of studies on the comparative analysis of bioproductional parameters of plant growth of Bluecrop and Elizabeth high-bush blueberry *ex vitro* under the conditions of fluorescent and LED lighting. Ensuring the optimal spectral composition of radiation, realized with the original LED light, led to a significant increase at 1.1–1.6 times in all of the analyzed growth parameters in high-bush blueberry *ex vitro* plants.

Keywords: clonal micropropagation; LED lighting; high-bush blueberry; *ex vitro*; Bluecrop; Elizabeth.

Образец цитирования:
Федоренко МП, Волотович АА, Кудряшова ОА. Анализ изменчивости количественных признаков у адаптантов *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro* при разных условиях освещения. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:22–28.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-22-28

For citation:
Fedorenko MP, Volotovich AA, Kudryashova OA. Analysis of variability of quantitave traits of *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro* under different lighting modes. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:22–28. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-22-28

Авторы:
Марта Петровна Федоренко – аспирантка кафедры биотехнологии биотехнологического факультета. Научный руководитель – А. А. Волотович.
Антон Анатольевич Волотович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией.
Оксана Александровна Кудряшова – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник.

Authors:
Marta P. Fedorenko, postgraduate student at the department of biotechnology, faculty of biotechnology.
marta.vod@yandex.ru
Anthony A. Volotovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory.
volant777@tut.by
Oksana A. Kudryashova, PhD (biology); leading researcher.
pixies@tut.by

Введение

Свет является одним из основных средообразующих факторов для растений [1]. На жизнедеятельность последних определенный спектральный состав света оказывает всестороннее влияние: участвует в процессах фотосинтеза, играет регуляторную роль при прорастании семян, цветении, созревании плодов, фотоморфогенезе, фототропизме и др. Диапазон физиологической радиации, поглощаемой пигментами листьев зеленых растений, составляет 350–750 нм (более половины всего излучения Солнца). В пределах физиологической радиации выделяется область фотосинтетически активной радиации (380–710 нм), имеющая два основных максимума поглощения пигментами листьев зеленых растений: 660–690 и 420–480 нм. Именно эти диапазоны обладают наибольшей эффективностью при искусственном освещении [2; 3].

При постоянно возрастающих ценах на энергоресурсы выращивание растений в условиях лабораторий, оранжерей и закрытого грунта требует выбора современных, энергоэффективных источников освещения, таких как, например, светодиоды. С их помощью можно создавать освещение с определенным спектральным составом под конкретные виды растений и стадии их развития [4; 5]. Основными причинами, тормозящими внедрение светодиодов в тепличное освещение, являются как их стоимость, так и обусловленное заменой источника света изменение (корректировка) всей технологии выращивания, включающей систему питания растений, потребление углекислого газа, поддержание определенного температурного режима [6]. При выращивании растений в условиях лабораторий, в том числе с использованием метода клонального микроразмножения *in vitro*, где традиционным источником света чаще всего являются люминесцентные лампы, сдерживающих факторов на пути внедрения светодиодов меньше. Для таких лабораторий характерны стеллажные конструкции, и использование светодиодов позволяет экономить электроэнергию, умножать полезную площадь за счет уменьшения расстояния между источником света и растительным материалом, увеличивать выход посадочного материала с единицы площади [7; 8]. Обеспечение оптимального спектрального состава и интенсивности освещения – важнейший фактор, влияющий на успешную адаптацию и рост растений в условиях *ex vitro*.

Цель данной работы – сравнительный анализ изменчивости биопродукционных параметров у микроклонально размноженных растений голубики высокой в процессе их адаптации к условиям роста *ex vitro* при использовании светодиодного и люминесцентного освещения.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили на базе научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий в растениеводстве биотехнологического факультета Полесского государственного университета (ПолесГУ). В качестве объекта исследований использовали укорененные в культуре *in vitro* внешне однотипные регенеранты голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. среднеспелого сорта Блюкроп (Bluecrop) и позднеспелого сорта Элизабет (Elizabeth). Укорененные *in vitro* регенеранты в количестве 40 шт. высаживали в прозрачные пластиковые контейнеры объемом 1,5 л, заполненные на 1/3 грунтом, который представляет собой смесь верхового торфа и карьерного песка в соотношении 1 : 1. Контейнер закрывали прозрачной пластиковой крышкой в целях создания условий влажной камеры и культивировали растения на стеллажах адаптационного помещения (изолированные отсеки объемом по 0,45 $м^3$) под источниками светодиодного (мощность 50 Вт; соотношение красного и синего в спектре 1,8 : 1,0; плотность потока фотонов в области ФАР 60–70 мкмоль/($м^2 \cdot с$)) и люминесцентного освещения (OSRAM Natura L36W/76; мощность 74 Вт; ССТ = 3500 К; соотношение красного и синего в спектре 2,2 : 1,0; плотность потока фотонов в области ФАР 50–60 мкмоль/($м^2 \cdot с$)), с фотопериодом 16 ч (день) / 8 ч (ночь) при температуре +25 °С и относительной влажности воздуха 82 %. За регенерантами *ex vitro* осуществляли ежедневный уход: полив (опрыскивание) и проветривание на протяжении 1 ч.

Вышеуказанный светодиодный источник был разработан авторами на базе биотехнологического факультета ПолесГУ для освещения посадочного материала голубики высокой, основываясь на опыте предыдущих разработок и испытаний [4; 5; 7–9]. Замер плотности потока фотонов в области ФАР и спектрального состава излучения проводили на базе испытательной лаборатории Центра светодиодных и оптоэлектронных технологий НАН Беларуси. Превышение значения плотности потока фотонов в области ФАР у светодиодного источника, по сравнению с люминесцентным, является незначительным, в то время как спектральный состав излучения светодиодного источника характеризуется большей долей синей области и другим составом красной области спектра.

Анализировали жизнеспособность растений, изменчивость их высоты, количества листьев и растений с побегами, высоты побегов, числа листьев на побегах, массы растений с корнями, длины корней (для сорта Блюкроп). Замеры анализируемых признаков проводили на 0, 14, 28, 42, 56 и 65-й дни культивирования *ex vitro*. Опыт осуществляли в двукратной биологической повторности.

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [10] с использованием программы статистического анализа данных *Statistica 6.0* [11]. Дисперсионный анализ и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых показателей выполняли с помощью программы статистического анализа *AB-Stat 1.0*, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [12].

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ изменчивости прироста высоты растений сорта Элизабет на 42-й и 56-й дни выявил достоверное при $p < 0{,}01$ превышение этого показателя в 1,10–1,14 раза при светодиодном освещении (рис. 1), у растений сорта Блюкроп также наблюдали достоверное при $p < 0{,}01$ и $p < 0{,}05$ превышение в среднем в 1,2 раза на 28-й и 56-й дни культивирования *ex vitro*. Показатель прироста количества листьев у растений двух сортов также был достоверно (в большинстве случаев при $p < 0{,}01$) выше на 42-й и 56-й дни при светодиодном освещении: для сорта Элизабет – в 1,15–1,23 раза (рис. 1), для сорта Блюкроп – в 1,13–1,17 раза (рис. 2). Аналогичные результаты по данным признакам были получены в наших предыдущих исследованиях с использованием источников освещения меньшей мощности [4; 5; 7–9], а также в исследованиях других авторов [13; 14].

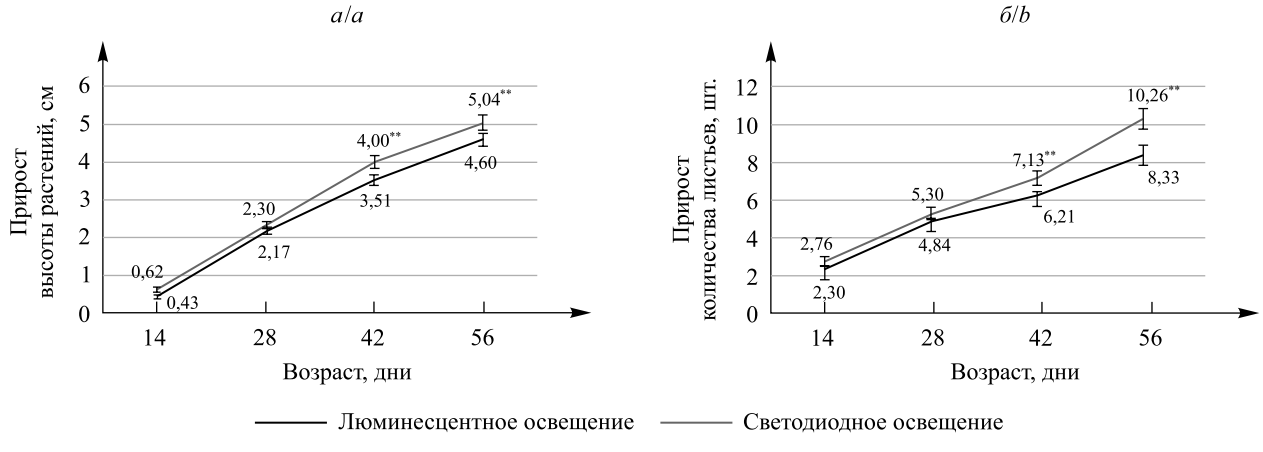


Рис. 1. Изменчивость прироста высоты (*а*) и прироста количества листьев (*б*) у растений *Vaccinium corymbosum* L. сорта Элизабет *ex vitro* (критерий сравнения – тип освещения).
* – достоверно отличается при $p < 0{,}05$; ** – при $p < 0{,}01$

Fig. 1. Variability of height increase (*a*) and increase in the number of leaves (*b*) in plants of Elizabeth *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro* (comparison criterion – type of lighting).
* – significantly different at $p < 0.05$; ** – at $p < 0.01$

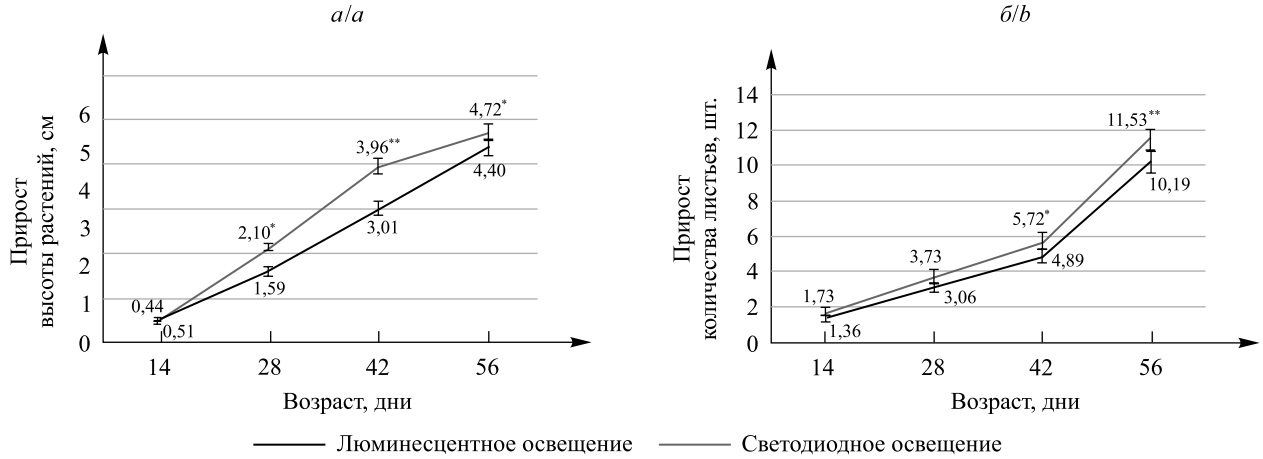


Рис. 2. Изменчивость прироста высоты (*а*) и прироста количества листьев (*б*) у растений *Vaccinium corymbosum* L. сорта Блюкроп *ex vitro* (критерий сравнения – тип освещения).
* – достоверно отличается при $p < 0{,}05$; ** – при $p < 0{,}01$

Fig. 2. Variability of height increase (*a*) and increase in the number of leaves (*b*) in plants of Bluecrop *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro* (comparison criterion – type of lighting).
* – significantly different at $p < 0.05$; ** – at $p < 0.01$

Количество растений с побегами при светодиодном освещении на 56-й день для сорта Элизабет было достоверно ($p < 0,01$) выше в 1,61 раза, для сорта Блюкроп наблюдали тенденцию к повышению в 1,19 раза (табл. 1). Увеличение показателя данного признака говорит о влиянии спектра светодиодного источника на активацию пазушных почек, что выражается в более раннем и, соответственно, более быстром развитии боковых побегов, о чем свидетельствуют также показатели высоты побегов и количества листьев у побегов при светодиодном освещении. Так, показатели высоты побегов и количества листьев у побегов были достоверно (в большинстве случаев при $p < 0,05$) выше под светодиодами. Высота побегов была больше в 1,33 и 1,50 раза, а количество листьев у побегов – в 1,17 и 1,09 раза выше у сортов Блюкроп и Элизабет соответственно (см. табл. 1).

Показатели сырой массы растений с корнями на 65-й день также были достоверно ($p < 0,01$) выше при светодиодном освещении: в 1,5 раза – для сорта Блюкроп и в 1,2 раза – для сорта Элизабет (см. табл. 1). Вероятно, это может быть связано с влиянием спектрального состава светодиодных источников на водный обмен растений. Так, по данным некоторых исследователей, оптимизированный спектральный состав света таких источников приводит к снижению скорости дегидратации и повышению времени сохранения стабильного тургора тканей листа голубики высокой [13; 14], что, в свою очередь, указывает на способность клеток поддерживать водный баланс и стабильность системы в целом.

Таблица 1

Изменчивость количественных показателей у растений сортовой голубики высокой *ex vitro* при разных условиях освещения

Table 1

The variability of quantitative traits of high-bush blueberries plants *ex vitro* under different lighting modes

Параметр	Количество растений с побегами, шт.	Высота побега, см	Количество листьев у побега, шт.	Сырая масса растения с корнями, мг	Длина корней[a], см
Блюкроп					
Тип освещения:					
люминесцентное	27,00 ± 5,00	4,51 ± 0,37	6,26 ± 0,33	227,34 ± 18,00	3,79 ± 0,31
светодиодное	32,00 ± 1,00	**5,99 ± 0,40***	**7,31 ± 0,31****	**331,43 ± 22,37****	**5,28 ± 0,37****
Фактор B:					
$НСР_{0,05}$	8,42	1,35	0,33	15,21	0,11
$НСР_{0,01}$	15,50	2,49	0,61	27,99	0,42
Элизабет					
Тип освещения:					
люминесцентное	18,00 ± 0,00	3,71 ± 0,36	6,25 ± 0,28	315,58 ± 22,83	–
светодиодное	**29,00 ± 2,00***	**5,58 ± 0,41***	**6,84 ± 0,27***	**378,88 ± 27,51****	–
Фактор A:					
$НСР_{0,05}$	8,42	1,35	0,33	15,21	–
$НСР_{0,01}$	15,50	2,49	0,61	27,99	–
Фактор B:					
$НСР_{0,05}$	8,42	1,35	0,33	15,21	–
$НСР_{0,01}$	15,50	2,49	0,61	27,99	–
Частные средние:					
$НСР_{0,05}$	11,91	1,91	0,47	21,50	–
$НСР_{0,01}$	21,93	3,52	0,86	39,58	–

Примечание. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка средней. [a]Только для сорта Блюкроп. Факторы: A – сорт; B – тип освещения. $НСР_{0,05}$ – наименьшая существенная разница при $p < 0,05$; $НСР_{0,01}$ – наименьшая существенная разница при $p < 0,01$. Полужирным шрифтом выделены значения, достоверно различающиеся по фактору B: * – при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$.

У растений *ex vitro* сорта Блюкроп замеряли длину корней. Разница в развитии корневой системы при освещении люминесцентными и светодиодными лампами при визуальном контроле была значительна (рис. 3). Так, показатель длины корней для сорта Блюкроп был достоверно ($p < 0,01$) в 1,4 раза выше при светодиодном освещении (см. табл. 1). Исследования [15–19] указывают на восприятие корневой системой света через фоторецепторы семейства фитохрома, которые, поглощая свет в красном

и дальнем красном диапазонах, активируют сигнальные молекулы, влияющие на рост и развитие корней. Хорошо развитая корневая система является важной составляющей при доращивании растений сортовой голубики высокой после адаптации *ex vitro*, а также на следующем этапе – при пересадке в мультиплаты или небольшие отдельные горшочки. Можно отметить, что за 65 дней культивирования *ex vitro* растения достигли той стадии развития и размеров, которые позволяют осуществить их пересадку в мультиплаты, что и было сделано.

а/*a* *б*/*b*

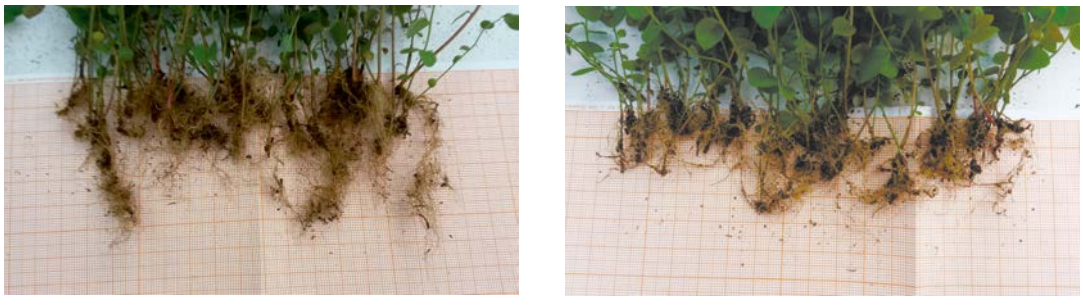


Рис. 3. Корневая система растений голубики высокой сорта Блюкроп после 65 дней культивирования *ex vitro* при светодиодном (*а*) и люминесцентном (*б*) освещении

Fig. 3. Bluecrop high-bush blueberry plant root system after 65 days of *ex vitro* cultivation with LED (*a*) and fluorescent (*b*) lighting

Трехфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное при $p < 0,05$ влияние типа освещения на изменчивость показателей прироста высоты растений и количества листьев, при этом доля такого влияния составила 1,2 и 1,9 % соответственно. Обнаружена также достоверная зависимость изменчивости названных выше признаков от возраста растений (табл. 2). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное при $p < 0,05$ влияние типа освещения на изменчивость показателей высоты побегов и количества листьев у побегов с долей влияния 64,2 и 66,1 % соответственно, а также достоверное при $p < 0,01$ влияние на изменчивость показателя сырой массы растений с корнями и длину корней у сорта Блюкроп с долей влияния фактора 47,6 и 42,8 % соответственно (табл. 3).

Таблица 2

Трехфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных показателей у растений голубики высокой *ex vitro* при разных условиях освещения

Table 2

Three-factor analysis of variance of quantitative traits variability of high-bush blueberry plants *ex vitro* under different lighting modes

Источник варьирования	*df*	Жизнеспособность растений		*df*	Прирост ВР		Прирост КЛ	
		СК	ДВ, %		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %
Общее	39	2,240	–	31	2,763	–	10,173	–
Фактор A	1	1,406	1,610	1	0,392	0,457	3,007	0,954
Фактор B	1	1,406	1,610	1	1,044*	1,219	5,908*	1,873
Фактор A × B	1	3,906	4,472	1	0,022	0,026	0,025	0,008
Фактор C	4	4,844	22,182	3	26,895**	94,215	93,117**	88,580
Фактор A × C	4	0,625	2,862	3	0,044	0,155	4,255**	4,048
Фактор B × C	4	0,625	2,862	3	0,119	0,418	0,595	0,566
Фактор A × B × C	4	2,334	10,733	3	0,048	0,166	0,049	0,047
Повторности	1	0,156	0,179	1	0,987	1,153	1,661	0,527
Случайные отклонения	19	2,459	53,488	15	0,125	2,191	0,714	3,398

Примечание. *df* – число степеней свободы; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; * – значимо при $p < 0,05$; ** – значимо при $p < 0,01$. Показатели: ВР – высота растений, КЛ – количество листьев. Факторы: A – сорт голубики высокой (Элизабет, Блюкроп); B – тип освещения (люминесцентное, светодиодное); C – возраст растений (14, 28, 42, 56 дней адаптации *ex vitro*).

Таблица 3

Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных показателей у растений сортовой голубики высокой *ex vitro* разного возраста при разных условиях освещения

Table 3

Two-factor analysis of variance of the quantitative traits variability in plants of different ages high-bush blueberry *ex vitro* under different lighting modes

Источник варьирования	*df*	Количество растений с побегами		Высота побега		Количество листьев у побега		Сырая масса растения с корнями		Длина корней	
		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %
Общее	7	39,714	–	1,374	–	0,303	–	4159,301	–	1,684	–
Фактор А	1	72,000	25,90	0,714	7,42	0,099	4,66	9405,061**	32,30	2,161**	42,78
Фактор В	1	128,000	46,04	6,178*	64,22	1,403**	66,08	13 869,061**	47,64	–	–
Фактор А × В	1	18,000	6,47	0,033	0,34	0,138	6,49	867,361*	2,98	–	–
Повторности	1	18,000	6,47	1,611	16,75	0,419	19,72	4836,365	16,61	2,890	57,22
Случайные отклонения	3	14,000	15,11	0,362	11,27	0,022	3,05	45,625	0,47	0,000	0,00

Примечание. *df* – число степеней свободы; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; * – значимо при $p < 0,05$; ** – значимо при $p < 0,01$. Факторы: А – сорт (Элизабет, Блюкроп); В – тип освещения (люминесцентное, светодиодное).

Заключение

Применение светодиодного освещения с заданными параметрами приводит к увеличению (в подавляющем большинстве случаев достоверному при $p < 0,01$ и $p < 0,05$) всех анализируемых биопродукционных параметров через 56–65 дней культивирования *ex vitro*. Таким образом, спектральный состав источника светодиодного освещения, энергопотребление которого в 1,4 раза ниже, чем у люминесцентного, обеспечивает: максимальный прирост высоты растений, достоверно ($p < 0,01$) превышающий в 1,1 раза показатели в контроле, без излишнего вытягивания или укорочения междоузлий; развитие достоверно ($p < 0,01$) большего в 1,2 раза количества почек и стимуляцию роста боковых побегов. Число растений с побегами на 56-й день культивирования при светодиодном освещении, по сравнению с люминесцентным, в среднем в 1,4 раза больше.

Библиографические ссылки

1. Конев СВ. *Фотобиология.* Минск: БГУ; 1979. 384 с.
2. Клешнин АФ. *Растение и свет.* Москва: Академия наук СССР; 1954. 456 с.
3. Шульгин ИА. *Растение и солнце.* Ленинград: Гидрометеоиздат; 1973. 252 с.
4. Водчиц МП, Глеб ЕП, Гук ЕС, Кудряшова ОА, Волотович АА. Ускорение роста и развития растений *Rhododendron luteum* Sweet *in vivo* с использованием оригинальной установки освещения на основе светодиодов. В: *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси. Материалы IV Международной молодежной научно-практической конференции; 9 апреля 2010 г.; Пинск, Беларусь. Часть III.* Пинск: ПолесГУ; 2010. с. 256–258.
5. Кудряшова ОА, Волотович АА, Герасимович ТВ, Кудряшов АА, Корнейчик ВЛ. Ускорение роста и развития регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* с использованием установки освещения на основе светодиодов. *Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук.* 2011;2:114–117.
6. Юсупов С, Червинский М, Ильина Е. Создание эффективных светодиодных фитосветильников. *Полупроводниковая светотехника.* 2016;6:56–64.
7. Кудряшова ОА, Герасимович ТВ, Волотович АА, Сеньковец ТА. Сравнительный анализ изменчивости высоты и коэффициента размножения регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* при разных условиях освещения. *Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук.* 2010;2:27–32.
8. Водчиц МП, Беда ИО, Власовец МА, Кудряшова ОА, Волотович АА. Ускорение регенерации голубики высокой *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* с использованием опытного образца нового светодиодного светильника. В: *Научный потенциал молодежи – будущему Беларуси Материалы V Международной молодежной научно-практической конференции; 31 марта 2011 г.; Пинск, Беларусь. Часть III.* Пинск: ПолесГУ; 2011. с. 225–227.
9. Федоренко МП, Волотович АА. Влияние LED-освещения на рост растений *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro.* В: *Биотехнология: достижения и перспективы развития. Сборник материалов II Международной научно-практической конференции; 7–8 декабря 2017 г.; Пинск, Беларусь.* Пинск: ПолесГУ; 2017. с. 43–45.
10. Доспехов БА. *Методика полевого опыта.* Москва: Агропромиздат; 1985. 350 с.
11. Боровиков ВП. *STATISTICA: Искусство анализа данных на компьютере.* Санкт-Петербург: Питер; 2001. 688 с.

12. Аношенко БЮ. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений. В: *Генетика. Материалы 1-го съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров; 20–25 декабря 1994 г.; Саратов, Россия. Том 30 (приложение)*. Москва: Наука; 1994. с. 8–9.

13. Куделина ТН, Мороз ДС, Васина ЕВ. Особенности культивирования эксплантов голубики (*Vaccinium corymbosum*) при светодиодном освещении. В: *Научные стремления – 2012. Сборник материалов III Международной молодежной научно-практической конференции; 6–9 ноября 2012 г.; Минск, Беларусь. Том 1.* Минск: Белорусская наука; 2012. с. 259–263.

14. Зубей ЕС, Куделина ТН, Обуховская Л В. Особенности развитии *in* и *ex vitro* микроклонально размноженных растений голубики *Vaccinium corymbosum* L. при освещении различного спектрального состава. В: *Теория и практика современного ягодоводства: от сорта до продукта. Материалы Международной научной конференции; 16–18 июля 2014 г.; агрогородок Самохваловичи, Беларусь.* Самохваловичи: Институт плодоводства; 2014. с. 143–149.

15. Hyo-Jun Lee, Jun-Ho Ha, Sang-Gyu Kim, Han-Kyu Choi, Zee Hwan Kim, Yun-Jeong Han, et al. Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *Arabidopsis thaliana* roots. *Science Signaling.* 2016;9(452):ra106. DOI: 10.1126/scisignal.aaf6530.

16. Dyachok J, Zhu L, Liao F, He J, Huq E, Blancaflor EB. SCAR mediateslight-induced root elongation in *Arabidopsis* through photoreceptors and proteasomes. *Plant Cell.* 2011;23(10):3610–3626. DOI: 10.1105/tpc.111.088823.

17. Warnasooriya SN, Montgomery BL. Spatial-specific regulation of root development by phytochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behavior.* 2011;6(12):2047–2050. DOI: 10.4161/psb.6.12.18267.

18. Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS, Halliday KJ. Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant Journal*. 2007;50(3):429–438. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03059.x.

19. Correll MJ, Kiss JZ. The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiology*. 2005;46(2): 317–323. DOI: 10.1093/pcp/pci038.

References

1. Konev SV. *Fotobiologiya* [Fotobiology]. Minsk: Belarusian State University; 1979. 384 p. Russian.

2. Kleshnin AF. *Rastenie i svet* [Plant and light]. Moscow: Akademiya nauk SSSR; 1954. 456 p. Russian.

3. Shulgin IA. *Rastenie i solntse* [Plant and sun]. Leningrad: Gidrometeoizdat; 1973. 252 p. Russian.

4. Vodchits MP, Gleb EP, Guk ES, Kudryashova OA, Volotovich AA. [Accelerating the growth and development of plants *Rhododendron luteum* Sweet *in vivo* using the original an LED based installation of lighting]. In: *Nauchnyi potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi. Materialy IV Mezhdunarodnoi molodezhnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 9 aprelya 2010 g.; Pinsk, Belarus'. Chast' III.* Pinsk: PolesGU; 2010. p. 256–258. Russian.

5. Kudryashova OA, Volotovich AA, Gerasimovich TV, Kudryashov AA, Korneychik VL. [Accelerating the growth and development of *Vaccinium corymbosum* L. regenerants *in vitro* using an LED based lighting installation]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series.* 2011;2:114–117. Russian.

6. Yusupov S, Chervinskiy M, Ilina E. [Creating an effective LED phytolamp]. *Poluprovodnikovaya svetotekhnika.* 2016;6:56–64. Russian.

7. Kudryashova OA, Gerasimovich TV, Volotovich AA, Senkovetc TA. Comparative analysis of height and reproduction factor variabilities of *Vaccinium corymbosum* L. shoots *in vitro* under different conditions of illumination. *Bulletin of Palesky State University. Series in natural sciences.* 2010;2:27–32. Russian.

8. Vodchits MP, Beda IO, Vlasovets MA, Kudryashova OA, Volotovich AA. [Acceleration of the regeneration of *Vaccinium corymbosum* L. *in vitro* using a prototype of a new LED lamp]. In: *Nauchnyi potentsial molodezhi – budushchemu Belarusi. Materialy V Mezhdunarodnoi molodezhnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 31 marta 2011 g.; Pinsk, Belarus. Chast' III.* Pinsk: PolesGU; 2011. p. 225–227. Russian.

9. Fedorenko MP, Volotovich AA. [The effect of LED lighting on plant growth *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro*. In: *Biotekhnologiya: dostizheniya i perspektivy razvitiya. Sbornik materialov II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 7–8 dekabrya 2017 g.; Pinsk, Belarus'.* Pinsk: PolesGU; 2017. p. 43–45. Russian.

10. Dospehov BA. *Metodika polevogo opyta* [Field experience]. Moscow: Agropromizdat; 1985. 350 p. Russian.

11. Borovikov VP. *STATISTICA: Iskusstvo analiza dannykh na komp'yutere* [STATISTICA: The art of analyzing data on a computer]. Saint Petersburg: Piter; 2001. 688 p. Russian.

12. Anoshenko BYu. [Program analysis and optimization of the plant breeding process]. In: *Genetika. Materialy 1-ogo s'ezda Vavilovskogo obshchestva genetikov i selektsionerov; 20–25 dekabrya 1994 g.; Saratov, Rossiya. Tom 30 (prilozhenie).* Moscow: Nauka; 1994. p. 8–9. Russian.

13. Kudelina TN, Moroz DS, Vasina EV. [Peculiarities of cultivation of blueberry explants (*Vaccinium corymbosum*) under LED lighting]. In: *Nauchnye stremleniya – 2012. Sbornik materialov III Mezhdunarodnoi molodezhnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 6–9 noyabrya 2012 g.; Minsk, Belarus'. Tom 1.* Minsk: Belorusskaya nauka; 2012. p. 259–263. Russian.

14. Zubey ES, Kudelina TN, Obukhovskaya LV. [Peculiarities of the development of *in vitro* and *ex vitro* microclonally propagated blueberry plants of *Vaccinium corymbosum* L. when illuminated with different spectral composition]. In: *Teoriya i praktika sovremennogo yagodovodstva: ot sorta do produkta. Materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii; 16–18 iyulya 2014 g.; agrogorodok Samokhvalovichi, Belarus'.* Samokhvalovichi: Institut plodovodstva; 2014. p. 143–149. Russian.

15. Hyo-Jun Lee, Jun-Ho Ha, Sang-Gyu Kim, Han-Kyu Choi, Zee Hwan Kim, Yun-Jeong Han, et al. Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *Arabidopsis thaliana* roots. *Science Signaling.* 2016;9(452):ra106. DOI: 10.1126/scisignal.aaf6530.

16. Dyachok J, Zhu L, Liao F, He J, Huq E, Blancaflor EB. SCAR mediateslight-induced root elongation in *Arabidopsis* through photoreceptors and proteasomes. *Plant Cell.* 2011;23(10):3610–3626. DOI: 10.1105/tpc.111.088823.

17. Warnasooriya SN, Montgomery BL. Spatial-specific regulation of root development by phytochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behavior.* 2011;6(12):2047–2050. DOI: 10.4161/psb.6.12.18267.

18. Salisbury FJ, Hall A, Grierson CS, Halliday KJ. Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant Journal*. 2007;50(3):429–438. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03059.x.

19. Correll MJ, Kiss JZ. The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiology*. 2005;46(2): 317–323. DOI: 10.1093/pcp/pci038.

Статья поступила в редколлегию 11.04.2019.
Received by editorial board 11.04.2019.

УДК 577.33/.34;577.355;577.3.32/.36

АКТИВАЦИЯ РЕПАРАЦИИ ДНК И ПОДАВЛЕНИЕ АПОПТОЗА В КЕРАТИНОЦИТАХ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ЦИТОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ

***А. И. ПОТАПОВИЧ*[1)], *Т. О. СУХАН*[1)], *А. АЛБУХАЙДАР*[1)], *Т. В. ШМАН*[2)], *Т. И. ЕРМИЛОВА*[2)], *К. де ЛЮКА*[3)], *В. А. КОСТЮК*[1)]**

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Боровлянский с/с, Минский район, Беларусь*
[3)]*«Медена АГ», ул. Индустриальная, 16, 8910, г. Аффольтерн-на-Альбисе, Швейцария*

Исследованы ответы культивируемых клеток человека – кератиноцитов – на воздействие ультрафиолетового излучения коротковолнового диапазона без растительных полифенольных соединений и совместно с рядом из них. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии цитопротекторного действия указанных соединений, добавленных сразу после воздействия ультрафиолетом. Цитопротекторная активность снижалась в ряду акацетин – силибин – байкалеин – леонтоподиевая кислота – кверцетин – цианидин хлорид – таксифолин – феруловая кислота. Исследовано влияние ультрафиолетового облучения коротковолнового диапазона без акацетина и в его присутствии на реакцию фосфорилирования гистонов H2AX, запускающую процесс репарации однонитевых повреждений ДНК. Установлено, что в ответ на такое облучение в кератиноцитах активируется фосфорилирование гистонов H2AX, и акацетин оказывает существенное влияние на кинетику этой реакции. Сделан вывод, что растительные полифенольные соединения способны уменьшать деструктивное воздействие ультрафиолетового излучения на клетки кожи, активируя процесс репарации генетических повреждений.

Ключевые слова: ультрафиолетовое излучение; УФС; растительные полифенольные соединения; репарация ДНК; апоптоз; кератиноциты; гистон H2AX.

Образец цитирования:
Потапович АИ, Сухан ТО, Албухайдар А, Шман ТВ, Ермилова ТИ, де Люка К, Костюк ВА. Активация репарации ДНК и подавление апоптоза в кератиноцитах как возможный механизм цитопротекторного действия растительных полифенолов при воздействии УФ-излучения. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:29–35.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-29-35

For citation:
Potapovich AI, Suhan TO, Albuhaydar A, Shman TV, Ermilova TI, de Luca C, Kostyuk VA. DNA repair activation and apoptosis suppression in keratinocytes as a possible mechanism of cytoprotective action of plant polyphenols under conditions of UV-irradiation. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:29–35. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-29-35

Авторы:
Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Ахмед Албухайдар – аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Научный руководитель – В. А. Костюк.
Татьяна Викторовна Шман – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией иммунологических исследований.
Татьяна Игоревна Ермилова – младший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований.
Кьяра де Люка – доктор наук (медицина); менеджер по медицинским и нормативным вопросам.
Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:
Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
pot-alla@rambler.ru
Tatyana O. Suhan, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
tanyasuhan@mail.ru
Ahmed Albuhaydar, postgraduate student at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
Tatyana V. Shman, PhD (biology); head of the laboratory of immunological research.
Tatyana I. Ermilova, junior researcher at the laboratory of immunological research.
tatyana.ig21@gmail.com
Chiara de Luca, PhD (medicine); medical and regulatory affairs manager.
deluca@cibi-nanolab.com
Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the research laboratory of physiology, department of human and animal physiology, faculty of biology.
kostyuk@bsu.by

Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;2:29–35
Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019;2:29–35

DNA REPAIR ACTIVATION AND APOPTOSIS SUPPRESSION IN KERATINOCYTES AS A POSSIBLE MECHANISM OF CYTOPROTECTIVE ACTION OF PLANT POLYPHENOLS UNDER CONDITIONS OF UV-IRRADIATION

A. I. POTAPOVICH [a], ***T. O. SUHAN*** [a], ***A. ALBUHAYDAR*** [a], ***T. V. SHMAN*** [b], ***T. I. ERMILOVA*** [b], ***C. de LUCA*** [c], ***V. A. KOSTYUK*** [a]

[a] *Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b] *Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, 43 Frunzenskaja Street, Baraŭliany 223053, Baraŭlianski sielsaviet, Minsk region, Belarus*
[c] *«MEDENA AG», 16 Industriestrasse, Affoltern-am-Albis 8910, Switzerland*

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

The work investigated the responses of cultured human keratinocytes to ultraviolet radiation in the C range (UVC) with and without a number of plant polyphenolic compounds. The experimental data obtained in this work indicate a cytoprotective effect of the PPs added immediately after UVC exposure. The cytoprotective activity of plant polyphenolic compounds was reduced in the series: acacetin, silybin, baikalein, leontopodium acid, quercetin, cyanidine chloride, taxifolin, trans-ferulic acid. The effect of UVC irradiation with and without of acacetin on the process of phosphorylation of histones H2AX, the triggering mechanism for the repair of single-stranded DNA damage, was also investigated in keratinocytes. It has been established that, H2AX phosphorylation is activated in response to UVC radiation and acacetin has a significant effect on the kinetics of this process. It is concluded that the PPs can reduce the destructive effect of UVR on the skin cells, activating the process of repairing genetic damage.

Keywords: ultraviolet radiation in the C range; UVR; plant polyphenolic compounds; inflammatory mediators; keratinocytes; histone H2AX.

Введение

Экспериментальные данные, подтвержденные эпидемиологическими исследованиями, свидетельствуют, что солнечное ультрафиолетовое излучение (УФИ) является наиболее важным канцерогеном окружающей среды, приводящим к развитию рака кожи. Согласно современной классификации Международной комиссии по освещению (CIE), УФИ делится на три диапазона:

- УФА, или длинноволновый (320–400 нм);
- УФВ, или средневолновый (280–320 нм);
- УФС, или коротковолновый (200–280 нм).

УФИ способно воздействовать на клетки кожи, как непосредственно повреждая хроматин [1], так и инициируя сигнальные процессы, ведущие к выбросу провоспалительных цитокинов и протеолитических ферментов, стимулирующих развитие воспаления, хроническая форма которого является причиной значительной части всех онкологических заболеваний [2; 3]. Результаты многочисленных исследований, направленных на выяснение специфических путей передачи сигнала, участвующих в УФ-индуцированном канцерогенезе кожи, свидетельствуют о том, что клеточный сигнальный ответ зависит от длины волны УФИ. Вместе с тем сигнальные каскады митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK), играющих важную роль в развитии множества УФ-индуцированных клеточных ответов, в том числе инициировании апоптоза, активируются при воздействии на клетки кожи УФ-излучения всех диапазонов [4; 5].

Основной мишенью УФ-излучения является ядерная ДНК, в этом случае клеточные ответы инициируются в результате появления одноцепочечных разрывов. Они возникают при воздействии на клетки кожи УФС, но могут быть следствием воздействия УФВ и УФА [1]. Образующаяся при этом ковалентная связь между двумя соседними пиримидиновыми основаниями (тимином или цитозином) приводит к возникновению димеров пиримидина: циклобутановых димеров (CPDs) и пиримидин-(6, 4)-пиримидиновых фотопродуктов (6-4PPs). В основе циклобутанового димера лежит четырехуглеродное кольцо, образующееся на месте разрыва двух двойных связей соседних пиримидиновых оснований [6]. Клеточный ответ на возникновение CPDs и 6-4PPs включает активацию эксцизионной репарации нуклеотидов – одного из механизмов репарации ДНК, который позволяет исправить однонитевые повреждения ДНК, используя в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь [1]. При неполной репарации повреждений ДНК запускается сигнальный каскад, вызывающий приостановку клеточного

цикла и (или) инициирование апоптоза. Одно из наиболее ранних событий репарации ДНК – фосфорилирование белка, называемого гистоном H2AX [7]. Это вариант гистона H2A, являющийся компонентом коровой структуры нуклеосом, вокруг которой обернута ДНК. Фосфорилированный белок, обозначаемый как γH2AX, необходим для привлечения к участию в репарации других белков. Основываясь на приведенных данных литературы, мы полагаем, что УФС-индуцированное повреждение клеток кожи является адекватной моделью, воспроизводящей молекулярно-биологические последствия фотохимических процессов в коже, инициируемых УФИ, и позволяет проводить поиск новых эффективных природных фотопротекторов, способных ингибировать негативные процессы, уменьшая деструктивное воздействие УФИ. В данной работе было исследовано влияние УФС-облучения на жизнеспособность кератиноцитов линии HaCaT и процессы репарации ДНК без растительных полифенольных соединений (РПС) и в их присутствии.

Материалы и методы исследования

Реактивы. В работе использовались коммерческие полифенольные соединения: кверцетин, *транс*-феруловая кислота (*Sigma*, США); таксифолин, силибин, цианидин хлорид, леонтоподиевая кислота, акацетин, байкалеин (*Extrasynthese*, Франция). Во всех экспериментах полифенолы растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Также применялись трипсин, среда ДМЕМ, акридиновый оранжевый, этидиум бромид (*Sigma-Aldrich*, Германия), изотонический фосфатный буфер (ИФБ, pH 7,4) (*Lonza*, Бельгия), антибиотики (*Gibco*, США), эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС) (*Capricorn*, Польша).

Клеточные культуры. В качестве объекта исследования использовали культивируемые кератиноциты человека линии HaCaT, подарок доктора Н. Е. Фузенига (*Deutsches Krebsforschungszentrum*, Гейдельберг, Германия), являющиеся основным клеточным элементом эпидермиса, естественного барьера, защищающего расположенные ниже слои кожи от внешнего воздействия, в том числе и УФИ. Клетки растили в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2) в 96- или 6-луночных планшетах в среде ДМЕМ с 10 % ЭБС до 70–80 % конфлюента.

Моделирование УФС-облучения. В данной работе применяли бактерицидную лампу G30W Sylvania, 95 % излучения которой является УФС с длиной волны 253,7 нм. Лампа располагалась на расстоянии 10 см от планшета с клетками, обеспечивая интенсивность облучения 1,0 мВт/см^2. Исследование влияния УФС на жизнеспособность культивируемых клеток без РПС и в их присутствии проводили в 96-луночных планшетах через 24 ч после воздействия. Использовали два экспериментальных протокола. В соответствии с протоколом 1 за 30 мин до облучения к клеткам добавляли среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую ДМСО или растворы РПС в ДМСО в дозе 50 мкмоль/л. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2). Непосредственно перед облучением культуральную среду заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2). В соответствии с протоколом 2 непосредственно перед облучением среду заменяли на ИФБ. Сразу после облучения ИФБ заменяли на среду ДМЕМ без сыворотки, содержащую ДМСО или растворы РПС в ДМСО в дозе 50 мкмоль/л. Клетки культивировались при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2).

Определение цитотоксического действия УФС без РПС и в их присутствии. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью реактива PrestoBlue™ Reagent (*Introvigen*, США) в соответствии с инструкцией. Флуоресценцию образующегося продукта (возбуждение 560 нм, эмиссия 590 нм) измеряли на планшетном флуориметре. Усредненную интенсивность флуоресценции лунок, содержащих контрольные клетки, принимали за 100 %.

Проточная цитофлуориметрия. Снимали с 6-луночного планшета контрольные и УФС-обработанные кератиноциты HaCaT ($0{,}5 \cdot 10^6$ клеток на образец) через 8 ч после воздействия, окрашивали индикаторами аннексином V-FITC (Ан) и пропидия иодидом (ПИ), используя набор Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (*Sigma*, США) в соответствии с инструкцией производителя, и анализировали с помощью проточного цитометра FACScan (*Becton-Dickinson*, США). Флуоресценцию красителей возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, эмиссию Ан и ПИ измеряли при (530 ± 30) нм и (613 ± 20) нм соответственно.

Тест на живые и мертвые клетки. Через 18 ч после УФС-облучения (0,06 Дж/см^2) без РПС и в их присутствии (50 мкмоль/л) прикрепленные клетки подвергали двойному флуоресцентному окрашиванию акридиновым оранжевым (АО) и этидиум бромидом (ЭБ). Клетки визуализировали и фотографировали, используя инвертированный флуоресцентный микроскоп Axiovert 25 (*Zeiss*, Германия).

Иммунофлуоресценция. Фосфорилированные гистоны H2AX – γH2AX – в культуре кератиноцитов HaCaT оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, используя первичные антитела

к γH2AX (pS139) и вторичные антивидовые антитела, конъюгированные с Alexa Fluor488. Клетки предварительно фиксировали в 10 % формалине (pH 7,0). Доступ антител к мишени обеспечивали за счет пермеабилизации клеточной и ядерной мембран 0,3 % раствором тритона X-100 в ИФБ. Неспецифическое связывание минимизировали инкубацией клеток в блокирующем буфере, содержащем бычий сывороточный альбумин. Для визуализации клетки дополнительно окрашивали пропидия иодидом.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*. Статистические материалы представлялись в виде ($M \pm SD$), где M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение. Для оценки разницы между экспериментальными группами применяли t-критерий Стьюдента, и значения $p < 0,05$ считались достоверными.

Результаты исследования и их обсуждение

Цитотоксическое действие УФС на кератиноциты человека линии HaCaT без РПС и в их присутствии. В предварительных экспериментах было исследовано влияние УФС-излучения на жизнеспособность кератиноцитов человека линии HaCaT через различные интервалы времени после облучения. Как следует из табл. 1, УФС в дозах 0,03 и 0,06 Дж/см^2 не оказывает достоверного влияния на жизнеспособность кератиноцитов через 4 ч после воздействия, при этом через 24 ч количество жизнеспособных кератиноцитов уменьшается более чем на 80 % в сравнении с необлученным контролем.

Таблица 1

Влияние УФС на жизнеспособность культивируемых HaCaT через 4 и 24 ч после воздействия

Table 1

The effect of UV radiation on the viability of cultured HaCaT 4 and 24 h after exposure

Условия эксперимента	Количество клеток, %	
	4 ч после облучения	24 ч после облучения
Контроль	100,0 ± 14,3	100,0 ± 8,3
УФС: 0,03 Дж/см^2 0,06 Дж/см^2	 90,0 ± 12,3 89,7 ± 9,4	 12,8 ± 6,1^{***a} 16,9 ± 3,9^{***a}

$^{***a}p < 0,001$ относительно контроля.

Чтобы оценить роль апоптоза в реализации цитотоксического действия УФС, контрольные и облученные клетки через 8 ч после воздействия окрашивали индикаторами Ан и ПИ и анализировали состав клеточных популяций (Ан и ПИ положительные, Ан и ПИ отрицательные), используя метод проточной цитофлуориметрии. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют, что облучение кератиноцитов УФС приводит к существенному снижению интактных клеток (Ан и ПИ отрицательные) и возрастанию количества поздних апоптотических (Ан и ПИ положительные) и некротических (Ан отрицательные, ПИ положительные) клеток.

В последующих экспериментах исследовали цитопротекторную активность ряда РПС, добавляемых к клеткам в концентрации 50 мкмоль/л как до УФС-воздействия, так и после него. В первом случае клетки преинкубировали с РПС в течение 30 мин, но облучение клеток и последующую инкубацию проводили в среде, не содержащей РПС. Во втором случае РПС добавляли к клеткам сразу после облучения, и они находились в среде при последующей инкубации клеток. Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что РПС, добавленные после облучения, достоверно увеличивают количество жизнеспособных кератиноцитов через 24 ч после воздействия в сравнении с УФС-облученными клетками, инкубируемыми без РПС. Цитопротекторная активность РПС снижалась в ряду акацетин – силибин – байкалеин – леонтоподиевая кислота – кверцетин – цианидин хлорид – таксифолин – *транс*-феруловая кислота. Вместе с тем РПС, добавленные за 30 мин до облучения и удаленные непосредственно перед облучением, были неэффективны.

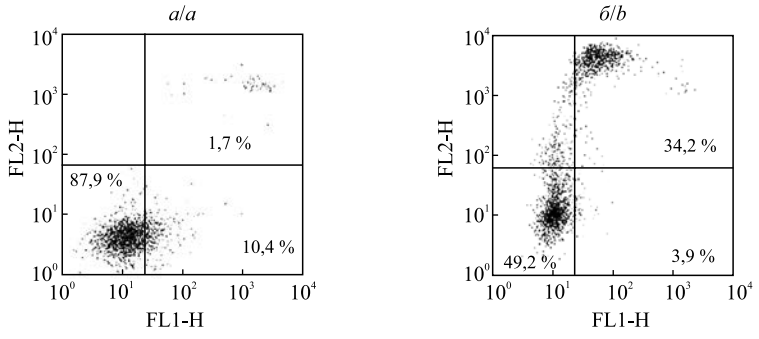


Рис. 1. Результаты проточной цитофлуориметрии контрольных (*а*) и подвергнутых УФС-облучению (0,06 Дж/см^2) (*б*) кератиноцитов HaCaT. Клетки одновременно окрашивали ПИ и Ан, и интенсивность соответствующей флуоресценции была количественно определена для 100 тыс. клеток. Расположенные в нижнем левом квадранте точки соответствуют живым клеткам, в нижнем правом – ранним апоптотическим, в правом верхнем – поздним апоптотическим и в левом верхнем – клеточным фрагментам и некротическим клеткам

Fig. 1. Flow cytometry analysis of control HaCaT cells (*a*) and cells exposed to UVC irradiation (0.06 J/cm^2) (*b*). Cells were simultaneously stained with propidiumiodide and annexin V-FITC. Fluorescence signal intensities of 100 thousand cells were quantified. Bottom left quadrant represents live cells; bottom right quadrant represents early apoptotic cells; top left quadrant represents necrotic cells and top right quadrant represents late apoptotic cells

Таблица 2

Влияние УФС (0,06 Дж/см^2) на жизнеспособность культивируемых HaCaT через 24 ч после воздействия без РПС и в их присутствии (50 мкмоль/л)

Table 2

Effect of UVC radiation (0.06 J/cm^2) on the viability of cultured HaCaT 24 h after exposure without and in the presence of PPs (50 μmol/L)

Условия эксперимента	Количество клеток, %		Эффективность цитопротекторного действия РПС*	
	РПС после УФС	РПС до УФС	РПС после УФС	РПС до УФС
Контроль	100 ± 13,5	100 ± 13,5	–	–
УФС	12,8 ± 6,1^{***a}	12,8 ± 6,1^{***a}	–	–
УФС + Бк	22,9 ± 4,5^{***b}	15,1 ± 6,2	1,8	1,2
УФС + Сл	38,5 ± 7,9^{***b}	14,7 ± 2,7	3,0	1,1
УФС + Кв	21,1 ± 6,7^{**b}	15,8 ± 6,7	1,6	1,2
УФС + Тф	15,9 ± 9,2	16,4 ± 9,2	1,2	1,3
УФС + Ак	39,6 ± 7,6^{***b}	Н/о	3,1	Н/о
УФС + Лк	23,3 ± 5,2^{***b}	Н/о	1,8	Н/о
УФС + Цх	19,3 ± 6,5^{**b}	Н/о	1,5	Н/о
УФС + Фк	13,7 ± 5,0	Н/о	1,1	Н/о

Примечание. *Рассчитывали как отношение количества жизнеспособных клеток в серии УФС + РПС к количеству таковых в серии УФС; $^{***a}p < 0{,}001$ относительно контроля; $^{**b}p < 0{,}01$, $^{***b}p < 0{,}001$ относительно УФС; Бк – байкалеин; Сл – силибин; Кв – кверцетин; Тф – таксифолин; Ак – акацетин; Лк – леонтоподиевая кислота; Цх – цианидин хлорид; Фк – *транс*-феруловая кислота. Н/о – не определялось.

Цитопротекторное действие акацетина (рис. 2, *в*), кверцетина (рис. 2, *г*), леонтоподиевой кислоты (рис. 2, *д*) и силибина (рис. 2, *е*) при УФС-индуцированном повреждении кератиноцитов подтверждено стандартным тестом на живые и мертвые клетки с использованием витальных флуоресцентных красителей – АО и ЭБ. АО окрашивает как живые, так и некротические клетки (зеленое ядро), тогда как ЭБ – только клетки, которые потеряли целостность мембраны (оранжевое или красное ядро). Как следует из приведенных на рис. 2 флуоресцентных микрофотографий, через 18 ч после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см^2 существенно снижается общее количество клеток по сравнению с контрольными образцами, при этом бóльшая часть оставшихся имеет интенсивную красную флуоресценцию за счет окрашивания ядер ЭБ. В присутствии РПС (50 мкмоль/л) остается большой процент клеток, окрашенных только АО (живые клетки).

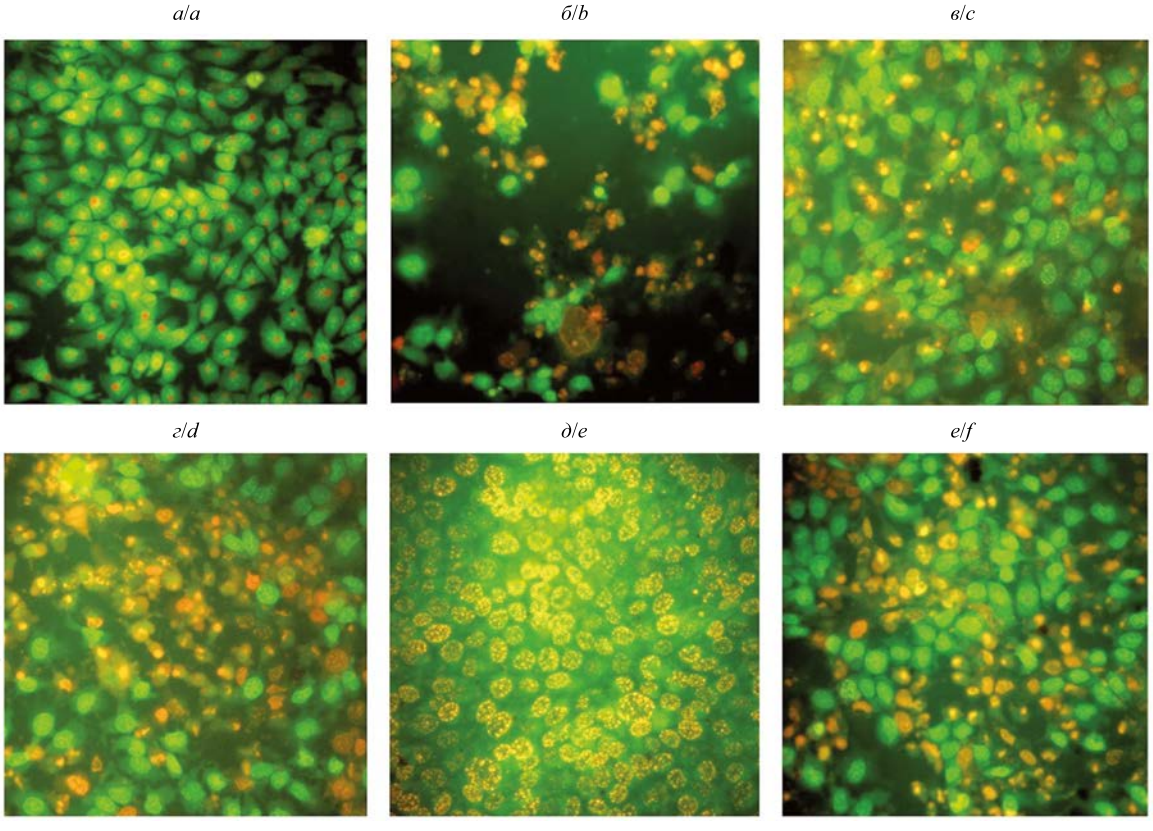


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток HaCaT до (*а*) и через 18 ч (*б*) после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см^2, а также УФС совместно с акацетином (*в*), кверцетином (*г*), леонтоподиевой кислотой (*д*) и силибином (*е*) в концентрации 50 мкмоль/л

Fig. 2. Representative fluorescent micrographs of HaCaT cells before (*a*) and 18 h after exposure to UVC at a dose of 0.06 J/cm^2 (*b*), UVC together with: acacetin (*c*), quercetin (*d*), leontopodievoy acid (*e*) and silybin (*f*) at a concentration of 50 μmol/L

Влияние УФС-облучения без акацетина и в его присутствии на процесс фосфорилирования гистонов H2AX. Известно, что при повреждении ДНК инициируется процесс эксцизионной репарации нуклеотидов, который позволяет исправить однонитевые повреждения ДНК, используя в качестве матрицы неповрежденную комплементарную цепь. В том случае, когда не происходит полной репарации повреждений ДНК, запускается сигнальный каскад, вызывающий гибель клеток путем апоптоза. Как свидетельствуют данные проточной цитофлуориметрии (см. рис. 1), такая ситуация имеет место при воздействии на кератиноциты человека линии HaCaT УФС-излучения в дозе 0,06 Дж/см^2. Поскольку защитный эффект РПС в этом случае может быть обусловлен усилением репарации ДНК, в последующих экспериментах было исследовано влияние УФС-облучения без наиболее эффективного цитопротектора акацетина и в его присутствии на процесс фосфорилирования гистонов H2AX, запускающий механизм репарации однонитевых повреждений ДНК. Кератиноциты HaCaT облучали УФС в дозе 0,06 Дж/см^2 и определяли количество γH2AX через 1 и 4 ч после воздействия с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания, используя первичные антитела к γH2AX (pS139) (рис. 3).

В этих экспериментах установлено, что в ответ на УФС-облучение в кератиноцитах уже через 1 ч после воздействия активируется фосфорилирование H2AX и возрастает количество γH2AX, которое достигает максимума через 4 ч (см. рис. 3), что полностью совпадает с данными, полученными ранее Т. Марти с соавторами [8]. Совершенно другой вид имеет кинетика фосфорилирования H2AX в ответ на воздействие УФС-излучения в присутствии акацетина. В этом случае максимум фосфорилирования H2AX наблюдается уже через 1 ч после воздействия УФС на кератиноциты, а через 4 ч интенсивность фофорилирования возвращается к исходному уровню. С. Ханасоге и М. Юнгман показано [9], что фосфорилирование H2AX после УФ-облучения запускается интермедиатами процесса репарации ДНК и увеличение количества таких интермедиатов в результате ингибирования ДНК репаративного синтеза приводит к заметному усилению фосфорилирования. В присутствии акацетина процесс фосфорилирования H2AX существенно ускорялся и содержание γH2AX в облученных кератиноцитах через 4 ч не отличалось от его содержания в контрольных клетках, что можно рассматривать как доказательство способности акацетина активировать и ускорять процесс репаративного синтеза ДНК после воздействия УФС.

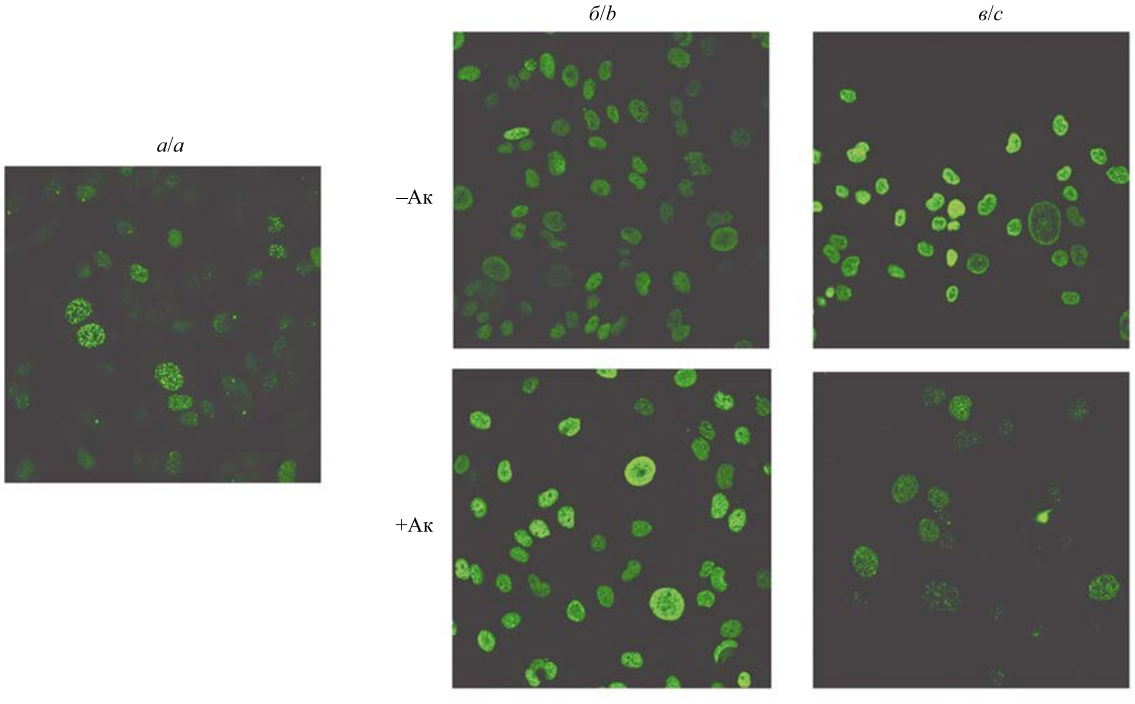


Рис. 3. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток HaCaT до (*а*), через 1 ч (*б*) и 4 ч (*в*) после воздействия УФС в дозе 0,06 Дж/см^2 без акацетина (–Ак) и совместно с ним (+Ак) в концентрации 50 мкмоль/л. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили, используя первичные антитела к γH2AX (pS139) и вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor488

Fig. 3. Representative fluorescent micrographs of HaCaT cells before (*a*), after 1 h (*b*) and 4 h (*c*) after exposure to UVC at a dose of 0.06 J/cm^2 without (–Ак) and with acacetin (+Ак) at a concentration of 50 μmol/L. Immunofluorescent staining was performed using primary antibodies to γH2AX (pS139) and secondary anti-antibodies conjugated with Alexa Fluor488

Заключение

В результате исследования молекулярно-биологических процессов, инициируемых УФС-излучением в кератиноцитах без потенциальных УФ-протекторов и в их присутствии, можно сделать вывод, что среди РПС есть ряд соединений, способных уменьшать негативные последствия воздействия УФИ на клетки кожи, активируя репарацию генетических повреждений и тормозя механизмы апоптоза.

Библиографические ссылки / References

1. Farrell AW, Halliday GM, Lyons JG. Chromatin structure following UV-induced DNA damage – Repair or death? *International Journal of Molecular Sciences.* 2011;12:8063–8085. DOI: 10.3390/ijms12118063.

2. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2005;79:237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.

3. Adams DO, Hamilton TA. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin JI, Goldstein IM, Synderman R, chief editors. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1992. p. 637–662.

4. Bode AM, Dong Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Science's STKE*. 2003;167:RE2. DOI: 10.1126/stke.2003.167.re2.

5. Bode AM, Dong Z. Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 2005;79:237–297. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)79005-4.

6. Setlow RB. Cyclobutane-Type Pyrimidine Dimers in Polynucleotide. *Science*. 1966;153(3734):379–386. DOI: 10.1126/science.153.3734.379.

7. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(10):5858–5868. DOI: 10.1074/jbc.273.10.5858.

8. Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2006;103(26): 9891–9896. DOI: 10.1073/pnas.0603779103.

9. Hanasoge S, Ljungman M. H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*. 2007;28(11):2298–2304.

Статья поступила в редколлегию 24.04.2019.
Received by editorial board 24.04.2019.

УДК 772.962;612.821

ТЕРМОГРАФИЯ КАК СПОСОБ ОЦЕНКИ ВЕГЕТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ЧЕЛОВЕКА

С. А. РУТКЕВИЧ [1)]***, К. М. ЛЮЗИНА*** [1)]***, Р. Ю. МИКУЛИЧ*** [2)]***, Д. М. КАБАНОВ*** [2)]***, Е. В. ЛЕБЕДОК*** [2)]

[1)]*Белорусский государственный университет,*
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь
[2)]*Государственное научно-производственное объединение*
«Оптика, оптоэлектроника и лазерная техника»,
пр. Независимости, 68, 220072, г. Минск, Беларусь

Изучена возможность применения тепловизионного метода для оценки уровня кровотока в ходе построения термограмм поверхности кистей рук здоровых добровольцев до и после нагрузки на мышцы. Полученные с помощью указанного метода результаты дают оперативную информацию о степени кровоснабжения тканей, что открывает новые перспективы для динамической оценки кожного кровотока. Методика абсолютно безопасна, неинвазивна, универсальна и проста в выполнении.

Ключевые слова: тепловизионный метод; температура поверхности кожи; кровоток; мышечное сокращение.

THERMOGRAPHY AS A METHOD FOR EVALUATING HUMAN VEGETATIVE REACTIONS

S. A. RUTKEVICH [a]***, K. M. LIUZINA*** [a]***, R. Yu. MIKULICH*** [b]***, D. M. KABANAU*** [b]***, Ya. V. LEBIADOK*** [b]

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b]*«Optics, Optoelectronics and Laser Technology», 68 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220072, Belarus*
Corresponding author: K. M. Liuzina (liuzina@bsu.by)

Образец цитирования:
Руткевич СА, Люзина КМ, Микулич РЮ, Кабанов ДМ, Лебедок ЕВ. Термография как способ оценки вегетативных реакций человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:36–44.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-36-44

For citation:
Rutkevich SA, Liuzina KM, Mikulich RYu, Kabanau DM, Lebiadok YaV. Thermography as a method for evaluating human vegetative reactions. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:36–44. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-36-44

Авторы:
Светлана Александровна Руткевич – кандидат биологических наук; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Ксения Михайловна Люзина – кандидат биологических наук; доцент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Роман Юрьевич Микулич – младший научный сотрудник лаборатории оптико-электронного приборостроения.
Дмитрий Михайлович Кабанов – кандидат физико-математических наук; заместитель заведующего лабораторией оптико-электронного приборостроения.
Егор Викторович Лебедок – кандидат физико-математических наук; заведующий лабораторией оптико-электронного приборостроения.

Authors:
Svetlana A. Rutkevich, PhD (biology); associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
rutkevitch@inbox.ru
https://orcid.org/0000-0002-1840-4025
Kseniya M. Liuzina, PhD (biology); associate professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
liuzina@bsu.by
https://orcid.org/0000-0002-7565-2252
Raman Yu. Mikulich, junior researcher at the optoelectronic engineering laboratory.
raman.mikulich@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-1186-0722
Dzmitry M. Kabanau, PhD (physics and mathematics); deputy head of the optoelectronic engineering laboratory.
d.kabanau@ifanbel.bas-net.by
https://orcid.org/0000-0003-2926-0335
Yahor V. Lebiadok, PhD (physics and mathematics); head of the optoelectronic engineering laboratory.
y.lebiadok@ifanbel.bas-net.by
https://orcid.org/0000-0002-8653-6134

The possibility of using the thermal imaging method to assess the level of blood flow in the course of building thermograms of the surface of the hands of healthy volunteers before and after the load on the muscles was studied in this paper. The results obtained using the thermal imaging method provide objective information about the degree of blood supply to the tissues, which opens up new perspectives for evaluating skin blood flow in the dynamics. The technique is absolutely safe, non-invasive, versatile and easy to perform.

Keywords: thermal imaging method; temperature of skin surface; blood flow; muscle contraction.

Введение

Жизнедеятельность организма как целого происходит под влиянием многих факторов окружающего пространства и событий в его внутренней среде, связанных с регуляцией разнообразных функций. Существует ряд физиологических теорий и принципов, в соответствии с которыми системы организма формируются и действуют для достижения полезного приспособительного результата, а всякая рефлекторная реакция, соматическая или даже возникающая при решении когнитивных задач, включает обязательным элементом вегетативный компонент [1]. Не является исключением и система регуляции температуры тела [2–4], в процессы которой могут вовлекаться многие отделы головного и спинного мозга [5]. Указанные обобщения сделаны преимущественно после анализа результатов экспериментов на животных. Следует отметить, что в литературе приводятся сведения о развитии функциональной активности мышечной системы на фоне активации нейронных сетей моторных областей коры мозга, предшествующей реальному мышечному сокращению [6]. Другими словами, эти данные могут выступать подтверждением представлений школы Анохина – Судакова о формировании акцептора результата действия на этапах афферентного синтеза и принятия решения о будущей деятельности [7; 8]. Вопрос о вегетативном или сосудистом «сопровождении» этого важнейшего этапа в формировании функциональной системы остается открытым.

Методические неинвазивные подходы и приемы для оценки вовлечения нейромоторного аппарата обычно сводятся к использованию электрофизиологических методов исследования. Согласно идеомоторному принципу в ходе образного представления о совершении определенного движения в сознании человека возникает реальная локализованная мышечная активность, более слабая по величине, но идентичная по характеру мышечной деятельности при выполнении движения [9]. Применение идеомоторной теории на практике является актуальной задачей [10; 11]. Также с практической точки зрения важно расширять набор методик, позволяющих быстро, объективно и с возможно большей точностью оценить вегетативный компонент в деятельности нервной системы при организации и регуляции мышечных движений. Одним из процессов, поддающихся объективному контролю и отражающих активацию вегетативных механизмов, может выступать кровоток в поверхностных слоях кожи, влияющий на ее температуру. Цель работы – анализ динамики колебаний температуры кожи ладонной поверхности кистей и пальцев рук у здоровых добровольцев в условиях реализации разнообразных рефлекторных и произвольных команд, адресованных мышечной системе, с использованием тепловизора.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены с привлечением 6 здоровых испытуемых мужчин 22–46 лет, не страдающих хроническими заболеваниями. Экспериментальный протокол включал: 1) измерение температуры аксиально в подмышечной впадине (термометр производства *PIC Solution*, Италия) с левой и правой стороны; 2) регистрацию термограммы до (4 мин в состоянии покоя), во время (4 мин) и после как реальной нагрузки кистей рук, так и психомоторного представления сжатия кисти в кулак (проба). Для получения электрофизиологических коррелят произвольных движений записывали миограмму. Состояние вегетативной регуляции тонуса сосудов оценивалось по вариабельности сердечного ритма. Активная проба заключалась либо в воображении сжатия кисти руки в кулак с частотой, близкой к 1 разу в секунду, либо в реальной физической активности мышц кисти. Воображаемое и реальное действия испытуемые совершали сидя, руки были расположены на столе чуть ниже уровня груди. С помощью тепловизора фиксировались тепловые поля ладонных поверхностей кистей рук. Значения температуры на проксимальных фалангах пальцев, а также расчет среднего значения температуры в ладонной области и максимальной температуры кисти получены и обработаны с использованием программного обеспечения.

Для регистрации инфракрасного излучения исследуемых объектов использовалась тепловизионная камера (*Flir*, США) на базе неохлаждаемой микроболометрической матрицы на основе оксида ванадия с разрешением 640 × 480 пк, шагом фоточувствительных элементов 17 мкм, параметром разницы температур, эквивалентной шуму не хуже 50 мК. Спектральная чувствительность используемой тепловизионной камеры 7,5–14,0 мкм. Частота кадров тепловизора 50 Гц (временной интервал записи следующего

кадра 20 мс). Динамический диапазон 14 бит (16 384 уровней серого). В эксперименте использовался трехлинзовый асферический объектив с относительным отверстием *f*/1,0, фокусным расстоянием 24,6 мм при угловом поле зрения 25° × 19° (диагональное – 31°), с пространственным разрешением 0,6 мм и фиксированным расстоянием (значение которого использовалось при построении термограмм) от тепловизора до объекта 850–950 мм (угловое пространственное разрешение 0,7 мрад). Фокусировка тепловизора производилась в автоматическом режиме перемещением матричного фотоприемника. Регистрация термограмм выполнялась в одинаковых условиях (перед проведением каждого измерения прибор калибруется равномерно нагретым автоматическим затвором тепловизора) с фиксированными положением объекта исследования и расстоянием до него. Обработка результатов измерений производилась с помощью специализированного программного обеспечения *FLIR R&D Software*, которое при построении термограммы учитывает параметры объекта (коэффициент излучения, видимая отраженная температура), окружающей среды (влажность, относительное спектральное пропускание, температура и расстояние до объекта) и объектива (относительное спектральное пропускание, температура объектива).

На каждой видеозаписи, полученной с помощью тепловизора, на изображении рук фиксировались маркеры в области проксимальных фаланг пальцев (Sp1 – Sp5 – на правой руке, Sp6 – Sp10 – на левой) и обозначались области на ладонях, на которых автоматически отображалась самая холодная и самая горячая точки. Значение средней температуры ладоней определялось как среднее арифметическое температур всех точек (попиксельно) в области эллипса, указанного на рис. 1 как El1 или El2. При этом площадь эллипса попиксельно для всех испытуемых была одинаковой. Значение максимальной температуры ладоней определялось для квадратных областей, указанных на рис. 1 как Ar1 и Ar2, до и во время проб с нагрузкой.

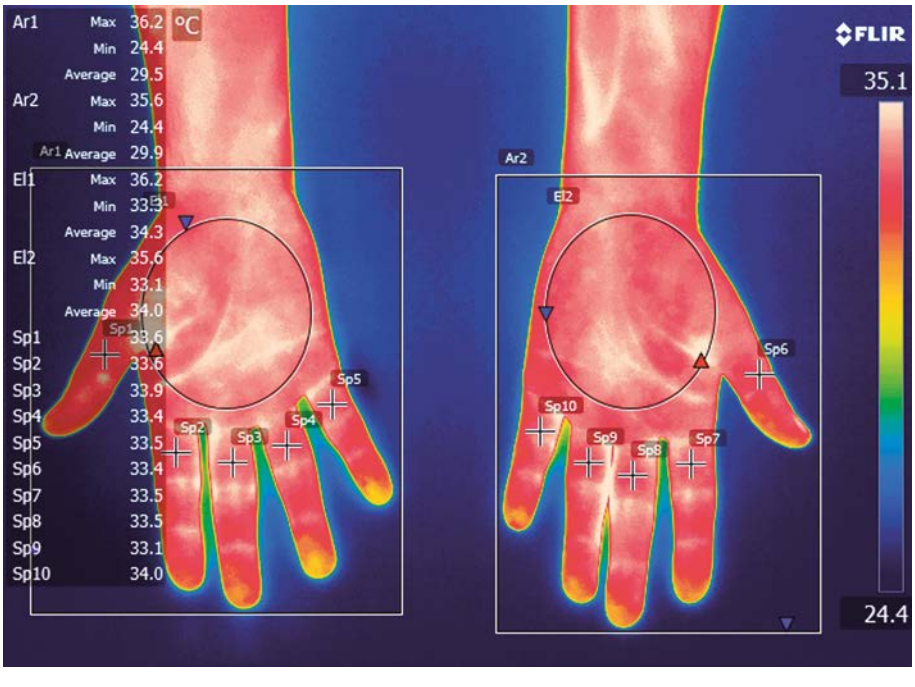


Рис. 1. Схема расположения маркеров на пальцах (Sp1 – Sp10) и областей анализа на ладонях (Ar1, Ar2, El1, El2). Слева на рисунке – правая рука, справа – левая

Fig. 1. The layout of the markers on the fingers (Sp1 – Sp10) and designation of areas of analysis on the palms (Ar1, Ar2, El1, El2). On the left in the picture is the right hand, on the right – the left

На основе распределения температуры строились зависимости ее изменения в самой горячей точке, средней температуры по области ладони и температуры пальцев от времени.

Для иллюстрации изменений, происходящих в организме при воображаемой нагрузке (сокращении мышц предплечья и кисти), использовались миография и ЭКГ. Для доказательства наличия отклика мышцы на мысленное сокращение использовался электромиограф «Нейро-МВП-4» («Нейрософт», Россия). Методом суммарной электромиографии (ЭМГ) выполнено исследование электрической активности *m. flexor digitorum profundus* (глубокий сгибатель пальцев). Электромиограммы регистрировались монолатерально на правой конечности в течение 4 мин при отсутствии напряжения (так называемый покой) и в процессе виртуального максимального напряжения. Регистрация 4-минутных фрагментов ЭКГ проводилась в состоянии покоя (испытуемым предварительно не предъявлялись физические или

психоэмоциональные нагрузки) с использованием программы *НС-Психотест.NET*, при этом записывались 3 стандартных и 3 усиленных однополюсных отведения от конечностей. Оценка параметров вариабельности сердечного ритма осуществлялась на основе геометрического, временного, спектрального и автокорреляционного методов анализа.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью программного комплекса *Microsoft Excel*. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Чтобы выявить достоверность различий между группами, использовали *t*-критерий Стьюдента (различия считали достоверными при $p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Аксиальная температура добровольцев была в норме, асимметрия в двух подмышечных впадинах составила меньше 0,5 °С у 5 из 6 испытуемых. Температура помещения комфортная (23–24 °С). С помощью тепловизора визуализировались колебания поверхностной температуры ладоней, обусловленные изменениями кровотока, который определяется тонусом сосудодвигательных волокон симпатической нервной системы. Температура в подмышечной впадине, измеренная с помощью контактного термометра, и средняя температура поверхности ладони приведены в табл. 1.

Таблица 1

Значения аксиальной температуры и поверхностной температуры ладонной области в покое, °С

Table 1

Values of axial temperature and surface palmar temperature at rest, °C

Доброволец	Температура в подмышечной впадине		Поверхностная средняя температура ладонной области (за 4 мин до записи)		Асимметрия*	
	D	S	D	S	в подмышечной впадине	на ладони
Рм	36,9	36,6	35,0 ± 0,4	34,9 ± 0,3	0,3	0,1
И	36,5	36,1	33,9 ± 0,6	33,7 ± 0,4	0,4	0,2
С	36,7	36,3	34,5 ± 0,5	34,4 ± 0,4	0,4	0,1
Е	35,5	36,2	33,4 ± 0,4	33,6 ± 0,4	−0,7	−0,2
Рб	36,6	36,5	32,7 ± 0,6	33,2 ± 0,7	0,1	−0,5
Де	33,7	33,4	34,5 ± 0,5	34,4 ± 0,4	0,3	0,1

Примечание. D – правая сторона (dexter); S – левая сторона (sinister); * – разница между правой и левой стороной.

Электрофизиологические доказательства мышечной активности, представленные на рис. 2, зарегистрированы с применением компьютерной ЭМГ для нервно-мышечной функции верхних конечностей в условиях выполнения реального сокращения мышц, а также идеомоторного акта (воображаемого сокращения).

Электрическая активность мышцы ($n = 6$) в покое по амплитуде не превышала уровень шума (10 мкВ) и соответствовала электромиограмме «биоэлектрического молчания» (см. рис. 2, *а*). Максимальная амплитуда покоя (11,5 ± 1,3) мкВ. В процессе развития минимального произвольного напряжения возникали низкоамплитудные осцилляции, максимальная амплитуда которых соответствовала (66,2 ± 9,4) мкВ, а частота равнялась (110 ± 27) имп./с (см. рис. 2, *б*), что свидетельствует о достоверном отличии от фона. Реализация воображаемого движения позволила зарегистрировать единичные осцилляции (1–3 имп./с), амплитуда которых находилась в пределах (31,0 ± 7,3) мкВ ($p < 0,05$).

Графики зависимости изменения максимальной температуры кисти во время и после реального и виртуального сокращения мышц правой кисти испытуемого И приведены на рис. 3.

Обнаружено также, что во время ритмических сокращений кисти кровоток каждый раз снижался в первые минуты проведения пробы, вероятно из-за сдавливания кровеносных сосудов сокращающимися скелетными мышцами, что и отражено на рис. 3. После выполнения упражнения кровоток оставался на очень высоком уровне и только через несколько минут постепенно возвращался к исходному уровню. Явление рабочей гиперемии, обнаруженное в исследовании, регистрировалось постоянно во всех испытаниях. По данным [12], в покое в значительной части мышечных капилляров кровоток находится на очень низком уровне или даже отсутствует. Однако во время интенсивных сокращений проис-

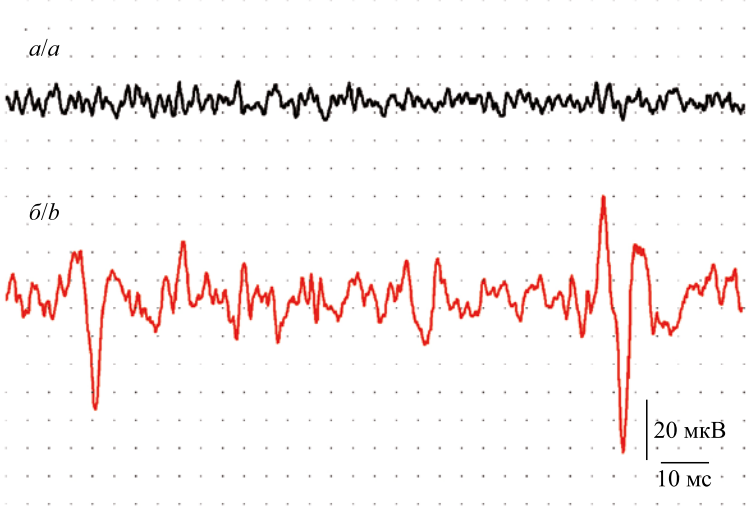


Рис. 2. Примеры суммарной электромиограммы глубокого сгибателя пальцев у испытуемого И:
а – покой; *б* – воображение ситуации с мысленной имитацией сжатия кисти в кулак

Fig. 2. Examples of the total electromyogram of the deep flexor of the fingers of the subject I:
a – rest; *b* – the imagination of a situation in which the compression of the hand into a fist is mentally simulated

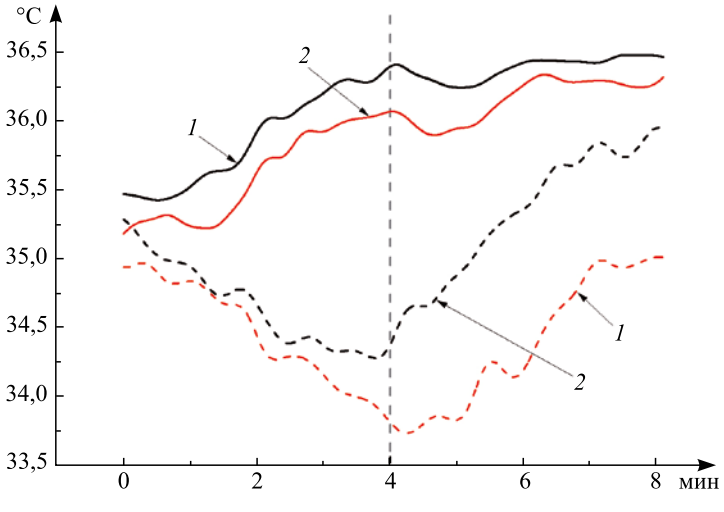


Рис. 3. Изменение максимальной температуры кожи кисти во время (0–4 мин)
и после (4–8 мин) реального (штриховые линии) и ментального (сплошные линии)
сокращения мышц кисти правой (*1*) и левой (*2*) рук (доброволец И)

Fig. 3. Change of the maximum temperature of the skin of the hand during (0–4 min) and after (4–8 min)
real (dashed lines) and mental (solid lines) contraction of the muscles of the hand (*1*) and left (*2*) hands (volunteer I)

ходит усиление обменного кровотока. Следует отметить, что во время реального и воображаемого мышечного сокращения при сжатии кисти в кулак обнаружен разогрев кожи руки не только работающей правой кисти, но и неактивной левой.

Как следует из графика, представленного на рис. 3 (ментальная нагрузка), и табл. 2, воображаемая нагрузка изменяла поверхностную температуру кожи кисти, что можно рассматривать в качестве подтверждения изменения уровня кровотока.

Аналогичные по направленности колебания температуры наблюдались и при анализе изменения температуры кожи пальцев (рис. 4). Для отображения общей закономерности приведены данные только для большого и указательного пальцев правой и левой рук соответственно.

В случае реального мышечного усилия у всех испытуемых больше всего разогревались пальцы правой (рабочей) руки с разницей между состоянием покоя и нагрузкой до 3 °С. Левая (нерабочая) рука максимально разогревалась на 0,8 °С. Воображаемая нагрузка также приводила к росту температуры пальцев на 1,5 °С в правой руке и на 1,3 °С – в левой.

Таблица 2

Изменение средней температуры ладонной области во время и после ментальной нагрузки, °С

Table 2

Change in the average temperature of the palmar area during and after mental load, °C

Доброволец	До нагрузки (за минуту до начала пробы)		Во время ментальной нагрузки		После нагрузки	
	D	S	D	S	D	S
Рм	36,0 ± 0,2	35,8 ± 0,2	37,0 ± 0,1*	36,9 ± 0,1*	36,2 ± 0,2	36,1 ± 0,2
И	35,2 ± 0,4	35,2 ± 0,3	36,6 ± 0,1*	36,7 ± 0,1*	35,6 ± 0,3	35,7 ± 0,5
С	35,7 ± 0,1	35,6 ± 0,3	36,9 ± 0,1*	36,9 ± 0,1*	35,8 ± 0,2	35,8 ± 0,2
Е	34,6 ± 0,4	35,1 ± 0,3	36,0 ± 0,1*	36,2 ± 0,3*	35,4 ± 0,1	35,3 ± 0,5
Рб	34,4 ± 0,2	34,3 ± 0,1	35,8 ± 0,1*	35,5 ± 0,1*	34,9 ± 0,1	34,7 ± 0,2
Де	34,1 ± 0,3	33,9 ± 0,2	35,2 ± 0,1*	35,4 ± 0,2*	35,0 ± 0,3	34,7 ± 0,3

Примечание. D – правая ладонь; S – левая ладонь; $^*p < 0,05$.

Разогрев поверхности кисти продолжался и после прекращения движения, что видно на графиках рис. 4, отражающих усредненные сдвиги поверхностной температуры (разница между температурой в состоянии покоя и во время (после) пробы) по всем добровольцам. Это может быть связано с компенсаторными процессами, происходящими при восстановлении организма после физической нагрузки. На рис. 4 подписи Sp1, Sp2, Sp6, Sp7 соответствуют областям, указанным на рис. 1.

Увеличению кровотока в скелетных мышцах во время физической нагрузки могут способствовать три основных взаимосвязанных процесса: возбуждение симпатической нервной системы, вызывающее общие изменения в системе кровообращения; повышение артериального давления; увеличение сердечного выброса. Изменение ритма сердца – универсальная реакция всего организма в ответ на любое воздействие. Оно характеризует баланс между тонусом симпатической и парасимпатической нервной системы. У 71,43 % добровольцев в ответ на 4-минутное мысленное сокращение мышц кисти частота сердечных сокращений увеличилась на (4 ± 2) уд/мин, у оставшихся осталась на уровне фона.

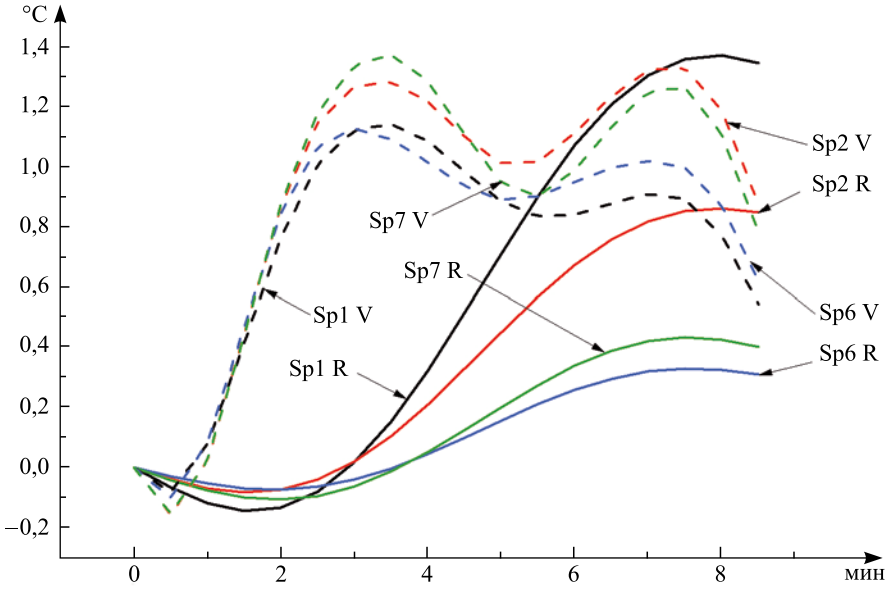


Рис. 4. Изменение поверхностной температуры на проксимальных фалангах больших (Sp1, Sp6) и указательных (Sp2, Sp7) пальцев правой (Sp1, Sp2) и левой (Sp6, Sp7) рук. V – воображаемое сокращение мышц кисти правой руки, R – реальное

Fig. 4. Changes in surface temperature in the proximal phalanges. Sp1, Sp6 – thumbs, Sp2, Sp7 – index fingers of the right and left hands, respectively. V is an imaginary contraction of the muscles of the right hand, R is real

Результаты исследования показали, что вегетативный тонус нервной системы в состоянии покоя и в процессе ментальной нагрузки мышц кисти различается. По направлению изменений показателей вариабельности сердечного ритма (ВСР) можно судить о преобладании тонуса либо симпатического, либо парасимпатического отдела вегетативной нервной системы на каждом этапе эксперимента. В состоянии покоя только у двух из шести добровольцев преобладал тонус парасимпатического отдела. В процессе ментальной нагрузки у всех испытуемых отмечалась активация симпатической нервной системы по разным показателям ВСР (табл. 3). Поскольку последние у всех индивидуальные, то для расчета показателя ВСР был использован показатель нормы из [13; 14], при этом норму приняли за 100 %. В табл. 4 приведены отклонения от нормы в процентах.

Таблица 3

Результаты измерения ВСР испытуемых при ментальной нагрузке, %

Table 3

The results of measuring the heart rate variability of subjects under mental load, %

Показатели ВСР	Доброволец					
	Рб	Рм	Де	Е	С	И
RRNN	2,3	–1,5	–1,9	–4,7	–6,6	0,5
SDNN	–2,9	–4,3	–30,0	0,0	13,3	–25,0
RMSSD	–12,0	6,0	–25,7	–5,7	–8,6	–30,0
pNN50	–3,4	7,1	–26,2	–3,8	–37,7	0,0
CV	–4,8	–4,8	–40,7	5,0	26,8	–29,3
Amo	–1,1	–6,0	73,0	–6,8	–14,9	102,1
BP	8,9	–3,7	–19,0	10,7	6,9	–32,7
TP	–17,2	–6,1	–39,4	7,2	24,0	–23,7
HF	–82,5	4,4	–44,0	8,7	–10,2	–8,7
LF	6,8	–9,5	–50,9	13,8	43,0	–15,5
VLF	17,1	–18,4	–43,9	0,1	55,3	–110,4
HFnorm	–35,8	30,4	–5,3	14,2	–35,0	–37,0
LFnorm	35,0	–29,6	5,1	–13,8	34,2	35,9
%HF	–43,3	18,4	–3,6	14,2	–36,3	–20,9
%LF	19,0	–14,3	9,2	9,5	21,7	83,6
%VLF	31,8	–6,3	–6,3	–29,0	20,2	–93,6

Примечание. Розовым цветом обозначено повышение тонуса симпатической нервной системы, голубым – его снижение. RRNN – средняя длительность всех интервалов R – R в выборке; SDNN (standard deviation of the NN interval) – стандартное отклонение величин нормальных интервалов R – R (NN); RMSSD (the square root of the mean squared differences of successive NN interval) – квадратный корень из среднего квадратов разностей величин последовательных пар интервалов NN; pNN50 – доля последовательных интервалов NN, различие между которыми превышает 50 мс; CV (SDNN/RRNN · 100 %) – коэффициент вариации; Amo – амплитуда моды; BP – вариационный размах; TP (total power) – общая мощность спектра; HF (high frequency) – мощность волн высокой частоты; LF (low frequency) – мощность волн низкой частоты; VLF (very low frequency) – мощность очень низкочастотных волн; HFnorm – относительное значение мощности в диапазоне высоких частот (в нормализованных единицах); LFnorm – относительное значение мощности волн низкой частоты (в нормализованных единицах); %HF, %LF, %VLF – относительное значение мощности волн высокой, низкой и очень низкой частоты соответственно.

С использованием метода спектрального анализа обнаружено, что показатель LF низкочастотных колебаний, характеризующих мощность волн в диапазоне от 0,04 до 0,15 Гц, повышается при физических нагрузках, различных функциональных органических изменениях в сердечно-сосудистой системе. Перераспределение преобладающего тонуса с симпатического на парасимпатический не произошло ни у одного из испытуемых. Таким образом, установлено совпадение колебаний температуры кожи (ее кровоснабжения) и процессов нервной регуляции тонуса сосудов.

По литературным данным известно, что в ходе образного представления определенного движения возникают такие же, но меньшие по амплитуде суммарные потенциалы действия в мышцах, как при реальном усилии, что и было подтверждено с помощью миографии. Результаты также подтверждают представление о том, что форпостное регулирование [15] процессов регуляции кровотока в кисти формируется на этапе еще только складывающейся мозаики возбуждений в мозге и предшествует реальному мышечному усилию. При этом вовлекается и активность сосудодвигательных симпатических нервных волокон в соответствии с представлениями [2; 5]. Незначительные индивидуальные различия в реакции на воображаемую нагрузку можно объяснить тем, что для возникновения идеомоторной реакции недостаточно просто концентрации внимания на представлении о движении. Необходимо наличие интереса или целевой установки на воображаемое действие, особенно на его эмоциональную окрашенность. А это связано с личностными особенностями испытуемых [16].

Совокупность полученных в работе результатов на основе комплекса методов (миография, измерение вариабельности сердечного ритма, построение термограмм кожных поверхностей верхних конечностей) подтверждает эффективность компьютерной термографии при оценке кожного кровотока в верхних конечностях. Возможность использования термографии для получения оперативной и объективной информации о регуляции тонуса сосудов [17], а также об активности автономной нервной системы [18; 19] широко обсуждается в научной литературе и продолжает вызывать дискуссии в научных кругах.

Библиографические ссылки

1. Булыгин ИА. Афферентное звено интероцептивных рефлексов. В: Баклаваджян ОГ, редактор. *Руководство по физиологии. Физиология вегетативной нервной системы*. Ленинград: Наука; 1981. с. 187–211.

2. Flavahan NA. Thermoregulation: The Normal Structure and Function of the Cutaneous Vascular System. In: Wigley FM, Herrick AL, Flavahan NA, editors. *Raynaud's Phenomenon*. New York: Springer; 2014. p. 37–55. DOI: 10.1007/978-1-4939-1526-2_4.

3. Гурин ВН. *Терморегуляция и симпатическая нервная система*. Минск: Наука и техника; 1989. 231 с.

4. Tansey EA, Roe SM, Johnson CD. The sympathetic release test: a test used to assess thermoregulation and autonomic control of blood flow. *Advances in physiology education*. 2014;38(1):87–92. DOI: 10.1152/advan.00095.2013.

5. Кульчицкий ВА, Поленов СА, Пашкевич СГ, Нетукова НИ, Тропникова ГК, Песоцкая ЯА и др. *Регуляция функций при активации мозга*. Минск: Белпринт; 2004. 112 с.

6. Vassiliadis P, Grandjean J, Derosiere G, de Wilde Y, Quemener L, Duque J. Using a Double-Coil TMS Protocol to Assess Preparatory Inhibition Bilaterally. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12:139. DOI: 10.3389/fnins.2018.00139.

7. Анохин ПК. Системные механизмы высшей нервной деятельности. В: *Избранные труды АН СССР. Отделение физиологии*. Москва: Наука; 1979. 454 с.

8. Анохин КВ. Когнитом: гиперсетевая теория мозга. В: *Нейроинформатика-2015. XVII Всероссийская научно-техническая конференция с международным участием. Часть 1.* Трофимов АГ, ответственный редактор. Москва: НИЯУ МИФИ; 2015. с. 14–16.

9. Pfister R, Melcher T, Kiesel A, Dechent P, Gruber O. Neural correlates of ideomotor effect anticipations. *Neuroscience*. 2014;259:164–171. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.061.

10. Yoxon E, Tremblay L, Welsh TN. Effect of task-specific execution on accuracy of imagined aiming movements. *Neuroscience Letters*. 2015;585:72–76. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.11.021.

11. Colton J, Bach P, Whalley B, Mitchell C. Intention insertion: Activating an action's perceptual consequences is sufficient to induce non-willed motor behavior. *Journal of Experimental Psychology: General*. 2018;147(8):1256–1263. DOI: 10.1037/xge0000435.

12. Joyner MJ, Darren PC. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. *Physiological reviews*. 2015;95(2):549–601. DOI: 10.1152/physrev.00035.2013.

13. Бабунц ИВ, Мириджанян ЭМ, Машаех ЮА. *Азбука вариабельности сердечного ритма*. Ставрополь: Принт-Мастер; 2002. 152 с.

14. Михайлов ВМ. *Вариабельность ритма сердца (новый взгляд на старую парадигму)*. Иваново: Нейрософт; 2017. 516 с.

15. Бигдай ЕВ, Вихров СП, Гривенная НВ, Редькин ВМ, Самойлов ВО, Чигирев БИ. *Биофизика для инженеров. Том 2*. Вихрова СП, Самойлова ВО, редакторы. Москва: ГЛТ; 2017. 456 с.

16. Веракса АН, Горовая АЕ, Грушко АИ, Леонов СВ. *Мысленная тренировка в психологической подготовке спортсмена*. Москва: Спорт; 2016. 208 с.

17. Крупаткин АИ. Влияние симпатической иннервации на тонус микрососудов и колебания кровотока кожи. *Физиология человека*. 2006;32(5):95–104.

18. Huggins J, Rakobowchuk M. Utility of lacrimal caruncle infrared thermography when monitoring alterations in autonomic activity in healthy humans. *European Journal of Applied Physiology*. 2019;119(2):531–538. DOI: 10.1007/s00421-018-4041-6.

19. Seixas A, Ammer K. Utility of infrared thermography when monitoring autonomic activity. *European Journal of Applied Physiology*. 2019;119(6):1455–1457. DOI: 10.1007/s00421-019-04120-x.

References

1. Bulygin IA. Afferent link of interoceptive reflexes. In: Baklavajyan OG, editor. *A Guide to Physiology*. *Physiology of the autonomic nervous system.* Leningrad: Science; 1981. p. 187–211. Russian.

2. Flavahan NA. Thermoregulation: The Normal Structure and Function of the Cutaneous Vascular System. In: Wigley FM, Herrick AL, Flavahan NA, editors. *Raynaud's Phenomenon*. New York: Springer; 2014. p. 37–55. DOI: 10.1007/978-1-4939-1526-2_4. Russian.

3. Gurin VN. *Termoregulyatsiya i simpaticheskaya nervnaya sistema* [Thermoregulation and the sympathetic nervous system]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1989. 231 p. Russian.

4. Tansey EA, Roe SM, Johnson CD. The sympathetic release test: a test used to assess thermoregulation and autonomic control of blood flow. *Advances in Physiology Education*. 2014;38(1):87–92. DOI: 10.1152/advan.00095.2013.

5. Kulchitsky VA, Polenov SA, Pashkevich SG, Netukova NI, Tropnikova GK, Pesotskaya YaA, et al. *Regulyatsiya funktsii pri aktivatsii mozga* [Regulation of functions during brain activation]. Minsk: Belprint; 2004. 112 p. Russian.

6. Vassiliadis P, Grandjean J, Derosiere G, de Wilde Y, Quemener L, Duque J. Using a Double-Coil TMS Protocol to Assess Preparatory Inhibition Bilaterally. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12:139. DOI: 10.3389/fnins.2018.00139.

7. Anokhin PK. [System mechanisms of higher nervous activity]. In: *Izbrannye trudy AN SSSR. Otdelenie fiziologii* [Selected Works Academy of Sciences of the USSR, Separation of physiology]. Moscow: Nauka; 1979. 454 p. Russian.

8. Anokhin KV. Cognit: Hypernetory Theory of the Brain. In: *Neiroinformatika-2015. XVII vserossiiskaya nauchno-tekhnicheskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiem. Part 1* [Neuroinformatics-2015. XVII All-Russian Scientific and Technical Conference with the participation of RSMM. Part 1]. Trofimov AG, editor. Moscow: NRNU MEPhI; 2015. p. 14–16. Russian.

9. Pfister R, Melcher T, Kiesel A, Dechent P, Gruber O. Neural correlates of ideomotor effect anticipations. *Neuroscience*. 2014;259:164–171. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.061.

10. Yoxon E, Tremblay L, Welsh TN. Effect of task-specific execution on accuracy of imagined aiming movements. *Neuroscience Letters*. 2015;585:72–76. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.11.021.

11. Colton J, Bach P, Whalley B, Mitchell C. Intention insertion: Activating an action's perceptual consequences is sufficient to induce non-willed motor behavior. *Journal of Experimental Psychology: General*. 2018;147(8):1256–1263. DOI: 10.1037/xge0000435.

12. Joyner MJ, Darren PC. Regulation of increased blood flow (hyperemia) to muscles during exercise: a hierarchy of competing physiological needs. *Physiological reviews*. 2015;95(2):549–601. DOI: 10.1152/physrev.00035.2013.

13. Babunts IV, Mirizhanyan EM, Mashahah YuA. *Azbuka variabel'nosti serdechnogo ritma* [Alphabet of heart rate variability]. Stavropol: Print-Master; 2002. 152 p. Russian.

14. Mikhailov VM. *Variabel'nost' ritma serdtsa (novyi vzglyad na staruyu paradigmu)* [Heart rate variability (new look at the old paradigm)]. Ivanovo: Neurosoft; 2017. 516 p. Russian.

15. Bigday EV, Vikhrov SP, Hryvna NV, Redkin VM, Samoilov VO, Chigirev BI. *Biofizika dlya inzhenerov. Tom 2* [Biophysics for engineers. Tom 2]. Vikhrova SP, Samoilova VO, editors. Moscow: GLT; 2017. 456 p. Russian.

16. Veraksa AN, Gorovaya AE, Grushko AI, Leonov SV. *Myslennaya trenirovka v psikhologicheskoi podgotovke sportsmena* [Mental training in the psychological preparation of an athlete]. Moscow: Sport; 2016. 208 p. Russian.

17. Krupatkin AI. Influence of sympathetic innervation on the tone of microvessels and fluctuations in the blood flow of the skin. *Fiziologiya cheloveka*. 2006;32(5):95–104. Russian.

18. Huggins J, Rakobowchuk M. Utility of lacrimal caruncle infrared thermography when monitoring alterations in autonomic activity in healthy humans. *European Journal of Applied Physiology*. 2019;119(2):531–538. DOI: 10.1007/s00421-018-4041-6.

19. Seixas A, Ammer K. Utility of infrared thermography when monitoring autonomic activity. *European Journal of Applied Physiology*. 2019;119(6):1455–1457. DOI: 10.1007/s00421-019-04120-x.

Статья поступила в редколлегию 17.05.2019.
Received by editorial board 17.05.2019.

Генетика и молекулярная биология

Genetics and molecular biology

УДК 577.214.5

ВКЛАД РАЗЛИЧНЫХ МЕХАНИЗМОВ ГЕНЕРАЦИИ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТРАНСКРИПТОВ В РАЗНООБРАЗИЕ мРНК ГИБРИДНОГО ОНКОГЕНА *RUNX1-RUNX1T1* ЧЕЛОВЕКА

И. Н. ИЛЬЮШЁНОК [1)]***, А. А. МИГАС*** [2)]***, А. Ю. СУХАРЕВСКИЙ*** [3)]***,***
О. Д. ШНАЙДЕР [4)]***, В. В. ГРИНЕВ*** [1)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Боровлянский с/с, Минский район, Беларусь*
[3)]*Институт клеточной биологии, Эдинбургский университет, Роджер-ленд-билдингс, Александр-Крам-Браун-роуд, EH9 3FF, г. Эдинбург, Великобритания*
[4)]*Университетский госпиталь Карла Густава Каруса, Дрезденский технический университет, Моммзенштрассе, 9, 01069, г. Дрезден, Германия*

Образец цитирования:
Ильюшёнок ИН, Мигас АА, Сухаревский АЮ, Шнайдер ОД, Гринев ВВ. Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразие мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:45–59.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-45-59

For citation:
Ilyushonak IM, Migas AA, Sukhareuski AY, Schneider AD, Grinev VV. The contribution of various mechanisms to mRNA diversity of human fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:45–59. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-45-59

Авторы:
Илья Николаевич Ильюшёнок – ассистент кафедры генетики биологического факультета.
Александр Александрович Мигас – старший научный сотрудник лаборатории иммунологических исследований.
Андрей Юрьевич Сухаревский – аспирант. Научный руководитель – кандидат биологических наук С. В. Маковец.
Оксана Дмитриевна Шнайдер – кандидат биологических наук; научный сотрудник подразделения медицинской и системной биологии медицинского факультета.
Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:
Ilya M. Ilyushonak, assistant at the department of genetics, faculty of biology.
nov.ilyushonok@gmai.com
http://orcid.org/0000-0002-5377-366X
Aleksandr A. Migas, senior researcher at the laboratory of immunological research.
alexandr.migas@gmail.com
Andrei Y. Sukhareuski, postgraduate student.
andrey_suh@tut.by
Aksana D. Schneider, PhD (biology); researcher at the section of medical systems biology, medical faculty.
aksana.schneider@tu-dresden.de
Vasily V. Grinev, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
grinev_vv@bsu.by

На большой выборке экзонов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, полученных из различных источников, исследованы закономерности генерации его альтернативных транскриптов. Показано, что альтернативные экзоны в абсолютном большинстве случаев образуются путем модификации канонических экзонов; транскрипты, включающие такие экзонные варианты, имеют очень низкий уровень экспрессии. Установлено, что около 80 % альтернативных экзонных вариантов генерируются «горячими областями», к которым относятся экзоны 4a, 6, 8b, 9, 11 и 12. Обнаружена новая точка инициации транскрипции, лежащая в области предсказанного биоинформатически промотора. Также установлено, что в лейкозных клетках коэкспрессируются транскрипты гибридного онкогена как с полноразмерными, так и с укороченными 3′-нетранслируемыми областями.

Ключевые слова: гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1*; альтернативный сплайсинг РНК; высокопроизводительное секвенирование; биологический шум.

Благодарность. Работа выполнена в рамках подпрограммы «Объединение» государственной программы научных исследований «Конвергенция-2020» (задание 3.08.03 (№ 469/54)).

THE CONTRIBUTION OF VARIOUS MECHANISMS TO mRNA DIVERSITY OF HUMAN FUSION ONCOGENE *RUNX1-RUNX1T1*

I. M. ILYUSHONAK [a], ***A. A. MIGAS*** [b], ***A. Y. SUKHAREUSKI*** [c], ***A. D. SCHNEIDER*** [d], ***V. V. GRINEV*** [a]

[a] *Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b] *Belarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, 43 Frunzenskaja Street, Baraŭliany 223053, Baraŭlianski sielśaviet, Minsk region, Belarus*
[c] *Institute of Cell Biology, University of Edinburgh, Roger Land Building, Alexander Crum Brown Road, EH9 3FF, Edinburgh, United Kingdom*
[d] *University Hospital Carl Gustav Carus, Dresden University of Technology, 9 Mommsenstrasse, Dresden 01069, Germany*

Corresponding author: I. M. Ilyushonak (nov.ilyushonok@gmai.com)

In this work, we used a comprehensive set of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* alternative exons to analyze the patterns of its mRNA generation. We found that the waste majority of alternative exons are modified variants of canonical exons, and the transcripts, including such exons, have a very low expression level. The «hot regions», including exons 4a, 6, 8b, 9, 11 and 12, produces about 80 % of such variants. Also we described a new transcription start region of *RUNX1-RUNX1T1* and provide the evidences of co-expression of the fusion RNAs with normal and shortened 3′-UTRs in leukemic cells.

Keywords: fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*; alternative RNA splicing; high throughput sequencing; biological noise.

Acknowledgements. This work is a part of sub-programme «Union» of the State Program on Scientific Research «Convergence-2020» (grant 3.08.03 (No. 469/54)).

Введение

Транслокация t(8; 21)(q22; q22) (далее по тексту – t(8; 21)), в процессе которой хромосомы 8 и 21 человека обмениваются участками, приводит к образованию двух деривативных хромосом – der8 и der21. Этот процесс сопряжен с объединением двух неродственных геномных локусов, кодирующих белки RUNX1 (хромосома 21) и RUNX1T1 (хромосома 8). Два гибридных гена, образующихся путем такого объединения, называются *RUNX1-RUNX1T1* и *RUNX1T1-RUNX1*. Последний локализован на der21 и является молчащим [1]. Белок RUNX1-RUNX1T1 есть транскрипционный фактор, вовлеченный в развитие острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), однако его роль в этом процессе, несмотря на почти 25-летнюю историю изучения, не до конца ясна.

Гибридный онкоген *RUNX1-RUNX1T1* служит источником большого количества альтернативных транскриптов [2; 3], однако общие закономерности и глобальные правила, управляющие их образованием, неочевидны. Настоящее исследование является продолжением наших предыдущих работ [3; 4]. Его цель – максимально полное описание возможных альтернативных вариантов мРНК гибридного онкогена и оценка вклада в их разнообразие трех основных механизмов: 1) использования альтернативных промоторов; 2) альтернативного сплайсинга; 3) применения альтернативных точек полиаденилирования.

Материалы и методы

Клеточные линии и биоматериал пациентов. Клетки модельной линии ОМЛ Kasumi-1 инкубировали при температуре +37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO_2 в среде RPMI-1640 (*Sigma-Aldrich Co.*,

США) по стандартной методике. Мононуклеары костного мозга 12 пациентов с t(8;21)-положительной формой ОМЛ, проходящих лечение в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии, гематологии и иммунологии, были получены при помощи Histopaque (*Sigma-Aldrich*, США). Манипуляции с материалом пациентов выполнялись в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и были одобрены этическими комиссиями организаций-участников.

Выделение тотальной РНК, синтез комплементарной ДНК (кДНК), ПЦР с обратной транскрипцией и количественная ПЦР. Выделение тотальной РНК осуществлялось с использованием TRI Reagent™ (*Sigma-Aldrich*, США) в соответствии с рекомендациями производителя; кДНК для секвенирования по Сэнгеру и протоколу прицельного RNA-Seq синтезировалась при помощи обратной транскриптазы M-MLV (*Thermo Fisher*, США); для верификации экзонных стыков и количественной ПЦР использовалась кДНК, синтезированная при помощи обратной транскриптазы RevAid (*Thermo Fisher*, США). В качестве затравок применялись рандомные гексамеры (группа данных ***кДНК***, количественная ПЦР) либо sp-oligo(dT)-праймер (группа данных ***прицельный RNA-Seq***). ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводилась по стандартной методике в амплификаторе BioRad C1000 при помощи ДНК-полимеразы DreamTaq (*Thermo Fisher*, США). Количественная ПЦР проводилась в амплификаторе BioRad CFX96 с использованием Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (*Thermo Fisher*, США). Нормализация экспрессии осуществлялась по отношению к экспрессии гена *TBP* [4], расчет производился по формуле Пфаффла [5], для вычисления эффективности амплификации применялась программа *LinReg PCR* [6; 7].

Создание библиотеки кДНК. ПЦР-продукты, синтезированные на матрице кДНК лейкозных клеток, лигировались в вектор pTZ57R/T, который использовался для трансформации клеток *E. coli* XL-1 Blue. Рекомбинантная ДНК выделялась из клеток при помощи GeneJET Plasmid Miniprep Kit (*Thermo Fisher*, США) и секвенировалась.

Прицельный RNA-Seq. Массовое секвенирование фрагментов кДНК выполняли по технологии парного прицельного (направленного) RNA-Seq. Фрагменты РНК в кДНК-форме готовились на основе ПЦР-ампликонов кДНК гибридного онкогена. Создание библиотеки кДНК осуществлялось при помощи Nextera DNA Library Preparation Kit (*Illumina*, США), секвенирование проводилось с использованием Illumina MiSeq (*Illumina*, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для каждого образца генерировалось по два файла формата FASTQ: по одному файлу на прямое и обратное прочтение. Удаление последовательностей адаптеров осуществлялось при помощи программы *Trimmomatic v.0.32* [8].

Быстрая амплификация 3′-концов кДНК (англ. *rapid amplification of cDNA 3′-ends*, 3′-RACE). При синтезе кДНК в качестве затравки использовался особый праймер sp-oligo(dT), содержащий поли-Т-участок с двумя вырожденными нуклеотидами на 3′-конце и олигонуклеотидную навеску на 5′-конце. В дальнейшем эта кДНК подвергалась амплификации с применением обратного праймера, соответствующего олигонуклеотидной навеске sp-oligo(dT)-праймера. Полученные ампликоны секвенировались по протоколу ***прицельного RNA-Seq***, после чего адаптерные последовательности удалялись и данные анализировались при помощи программы *KLEAT-2.0* [9].

Гель-электрофорез ДНК. ПЦР-ампликоны разделялись в 1–2 % агарозном геле и очищались при помощи QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*, Германия).

Картирование сиквенсов РНК. Сиквенс точки рекомбинации между хромосомами 8 и 21, описанный для Kasumi-1 в [10; 11], был картирован на сборку генома человека GRCh38/hg38 с помощью программного инструмента *BLAT* [12]. Это позволило определить координаты областей хромосом 8 и 21, входящих в состав der8, после чего соответствующие фрагменты хромосом были объединены в единый сиквенс, сохраненный в формате FASTA. Нуклеотидные последовательности РНК картировались на der8 с применением установленной локально версии *BLAT*. Полученные файлы формата PSL конвертировались в формат GTF геномным браузером UCSC [13].

Секвенирование по методу Сэнгера осуществлялось при помощи *BigDye v.3.1 Terminator Cycle sequencing Kit* (*Applied Biosystems*, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Реконструкция мРНК из библиотеки чтений RNA-Seq. Для реконструкции полноразмерных мРНК использовались библиотеки чтений – коротких фрагментов РНК, нуклеотидная последовательность которых была определена с помощью высокопроизводительного секвенирования. Предобработанные чтения в формате FASTQ, загруженные из репозитория European Nucleotide Archive (исследование PRJNA236604), включали три независимых экспериментальных повтора для клеток, обработанных либо неактивными, либо *анти-RUNX1-RUNX1T1* специфичными короткими интерферирующими РНК. Методика реконструкции полноразмерных мРНК описана нами ранее в [14]. Данные ***прицельного RNA-Seq*** обрабатывались аналогичным образом, но без установки порогов минимального покрытия экзон-экзонных стыков чтениями.

Биоинформатическая оценка уровня экспрессии. Прямой подсчет чтений, покрывающих экзонные стыки, осуществлялся при помощи Sashimi-плотов, построенных в программе *IGV* [15]. Для оценки с помощью *Salmon* [16] сиквенсы полноразмерных транскриптов экстрагировались из GTF-файлов при помощи утилиты *gffread*, после чего передавались локально установленной версии *Salmon* вместе с исходными файлами FASTQ. Анализ трех экспериментальных повторов RNA-Seq осуществлялся одним проходом программы. Полученные значения, выраженные в транскриптах на миллион молекул мРНК (англ. *transcripts per million*, TPM), трансформировались в проценты от общей доли пула гибридной мРНК.

Биоинформатическая идентификация артефактов обратной транскрипции. Оценка идентичности потенциальных сайтов микрогомологии проводилась при помощи программных пакетов *Biostrings* [17], *Rsamtools* [18] и *GenomicFeatures* [19]. Анализ вторичных структур и свободной энергии Гиббса осуществлялся при помощи *ViennaRNA Package* [20].

Биоинформатическая идентификация мод альтернативного сплайсинга. Алгоритм классификации сплайсинговых событий был описан нами ранее [21].

Общая характеристика набора данных

В рамках данного исследования использовались 3 набора данных. Первый набор объединяет РНК, секвенированные по методу Сэнгера. Он включает 135 полноразмерных транскриптов гибридного онкогена [3], 55 коротких экспрессированных последовательностей (англ. *expressed sequence tag*, EST) из образцов костного мозга пациентов с t(8; 21)-положительной формой ОМЛ и 14 коротких EST, обнаруженных в транскриптоме клеточной линии Kasumi-1. В дальнейшем будем обозначать эту группу данных как ***кДНК***. Второй набор включает транскрипты гибридного онкогена, собранные из данных полного прочтения транскриптома клеток модельной линии ОМЛ Kasumi-1, описанные в [14] (***полный RNA-Seq***), а третий – ПЦР-продукты (включая результаты 3′-RACE), полученные на кДНК клеток линии Kasumi-1 и прочитанные при помощи RNA-Seq (***прицельный RNA-Seq***).

Указанные РНК включают 316 уникальных экзон-экзонных стыков (англ. *exon-exon junction*, EEJs). Как можно видеть на рис. 1, перекрывание между EEJs в группах ***кДНК*** и ***RNA-Seq*** незначительно. При этом 70 % всех сайтов сплайсинга локализовано внутри канонических экзонов гибридного онкогена,

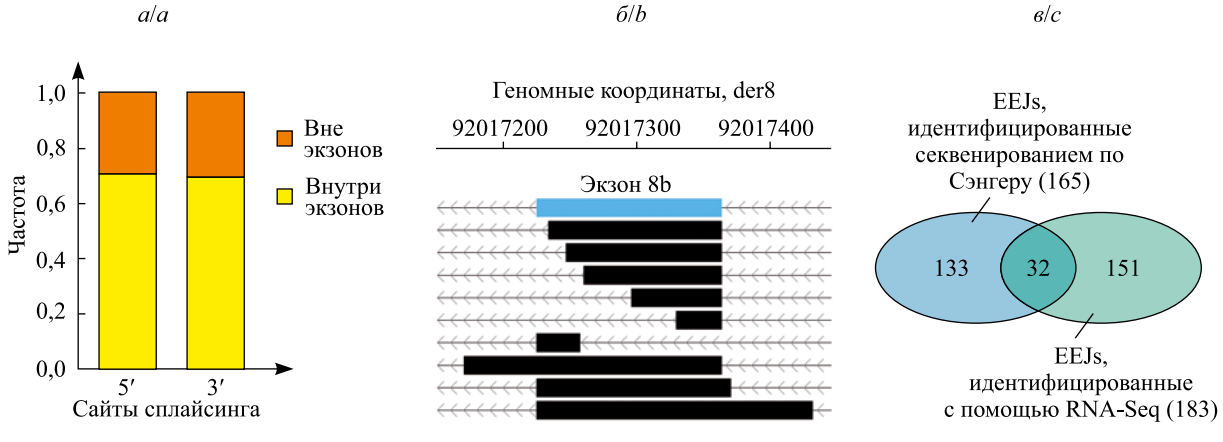


Рис. 1. Набор первичных данных по экспериментальным EEJs гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* может содержать технические артефакты:
а – около 70 % сайтов сплайсинга экспериментальных EEJs локализуется внутри канонических экзонов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*;
б – канонический экзон 8b (выделен голубым цветом) гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* является классическим примером экзона, с которым ассоциировано множество альтернативных 5′- и 3′- сайтов сплайсинга, причем большая часть таких сайтов имеет внутриэкзонную локализацию. Альтернативные экзоны показаны черными прямоугольниками, фланкирующие интронные области изображены горизонтальными линиями, а направление транскрипции указано с помощью стрелок;
в – два разных подхода в идентификации EEJs (секвенирование по Сэнгеру и RNA-Seq) дают только частично перекрывающиеся результаты

Fig. 1. Dataset on the experimental EEJs of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* may contain technical artifacts:
a – about 70 % of the splice sites of experimental EEJs are localized within the canonical exons of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*;
b – the canonical exon 8b (sky blue rectangle) of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* is a classic example of an exon with which many alternative 5′ and 3′ splice sites are associated. Herewith, the most of these sites demonstrate intraexon localization. On this picture, alternative exons are shown in black rectangles, flanking intron regions are depicted by horizontal lines, and the direction of transcription is indicated by arrows;
c – two different approaches to identifying EEJs (Sanger sequencing and RNA-Seq) give only partially overlapping results

они практически не попадают в интронные участки. Такой паттерн сплайсинга может свидетельствовать о загрязнении данных техническими артефактами обратной транскрипции, образующимися на основе зрелой, сплайсированной мРНК в результате внутримолекулярной смены матрицы (англ. *intramolecular template switching*, ITS). При ITS обратная транскриптаза отсоединяется от РНК-матрицы и повторно садится на нее же в нижележащем участке, пропустив часть нуклеотидной последовательности. Синтез кДНК при этом не останавливается, из-за чего конечная молекула будет содержать ложные EEJs, не существующие в реальной клетке (англ. *false EEJs*, fEEJs) [22]. Таким образом, для последующей корректной интерпретации наших данных необходимо предварительно оценить, насколько велика в них доля технического шума и артефактов обратной транскрипции.

Оценка технического шума в экспериментальных данных

Генерация fEEJs за счет ITS осуществляется либо случайным образом, либо закономерно. Первый вариант предполагает, что ITS происходит на произвольном участке РНК в силу стохастических процессов, что подразумевает невозможность воспроизведения fEEJs в повторных экспериментах. Однако наши данные опровергают это предположение. Как видно на рис. 2, *а* и *б*, большинство ПЦР-продуктов, которые секвенировались в ходе подготовки группы ***кДНК***, устойчиво воспроизводятся даже в условиях ПЦР с повышенной температурой отжига, а также в независимых повторах при клонировании EST в вектор. Тем не менее именно такую картину мы должны наблюдать при ITS, закономерно происходящей на определенных участках РНК.

Единственная экспериментально подтвержденная на сегодняшний день модель, описывающая механизм ITS такого типа, представлена на рис. 2, *в*, согласно которой признаками потенциальных fEEJs могут служить участки микрогомологии длиной 6–8 нуклеотидов в непосредственной близости от сайтов сплайсинга, а также укладка сегмента РНК между ними в устойчивую вторичную структуру [23]. Эти предположения мы проверили с помощью биоинформатического анализа.

Для каждого из первичных EEJs экстрагировались потенциальные области микрогомологии, примыкающие к сайтам сплайсинга, и для них рассчитывались попарные расстояния Левенштейна (т. е. минимальные количества нуклеотидных замен, позволяющих превратить одну последовательность в другую), распределение которых представлено на рис. 2, *г*. Для части 6- и 7-нуклеотидных последовательностей расстояние равно нулю, что указывает на их полную идентичность. Однако доля таких последовательностей невелика и уменьшается с ростом длины анализируемых сайтов. Более того, как показано на рис. 2, *д* и *е*, парные расстояния Левенштейна и процент идентичности для сайтов первичных EEJs суммарной выборки демонстрируют паттерны распределения, схожие с паттернами у канонических EEJs гибридного онкогена и случайно сгенерированных последовательностей, а также почти полностью совпадают с паттерном распределения у EEJs из базы данных NCBI RefSeq.

Укладка области, находящейся между сайтами микрогомологии, в термодинамически устойчивую структуру типа *ствол – петля* позволяет сайтам микрогомологии приблизиться друг к другу, что значительно облегчает ITS. Мы построили профиль свободной энергии Гиббса вдоль полноразмерной РНК гибридного онкогена, начинающейся с внешнего промотора (включает экзоны 1-4b), и наложили на него распределение 5′- и 3′-сайтов сплайсинга. Результаты представлены на рис. 3, *б*, из которого видно, что мРНК гибридного онкогена имеет три протяженных участка с низкими значениями энергии Гиббса, потенциально способными формировать стабильные вторичные структуры. Теоретически, если эти участки вовлекаются в ITS, то по их краям должны находиться четкие пики локализации 5′- и 3′-сайтов сплайсинга, однако подобной однозначной картины в наших данных не наблюдается. К тому же множество сайтов сплайсинга локализованы внутри вторичных структур гибридной РНК, для остальных же медиана расстояния до шпильки составляет более 100 нуклеотидов (рис. 3, *а* и *в*). На наш взгляд, беспрепятственное протекание ITS на таких больших дистанциях является маловероятным событием.

Кроме того, для группы ***полного RNA-Seq*** мы оценили покрытие EEJs гибридного онкогена чтениями и сравнили их с покрытием EEJs других генов, а также проанализировали распределение длин интронов (рис. 4, *а* и *б*). Подавляющее большинство сплайсируемых интронов, которые депонированы в базе данных RefSeq, имеют длину больше 50 нуклеотидов, а покрытие экзонных стыков выше, чем одно чтение из миллиона (англ. *count per million*, CPM). При фильтрации по указанным критериям в выборке ***полного RNA-Seq*** сохраняются неканонические EEJs, которые успешно идентифицируются другими средствами. Так, при образовании EEJs 12del из центральной части экзона 12 удаляется экзитрон, соединяя два сегмента на его 5′- и 3′-концах. Помимо ***полного RNA-Seq***, этот стык обнаруживается в группе ***прицельного RNA-Seq***, а также успешно верифицируется при помощи ОТ-ПЦР (рис. 4, *в*). Отметим, что для верификации использовалась обратная транскриптаза, устойчивая к ITS [22].

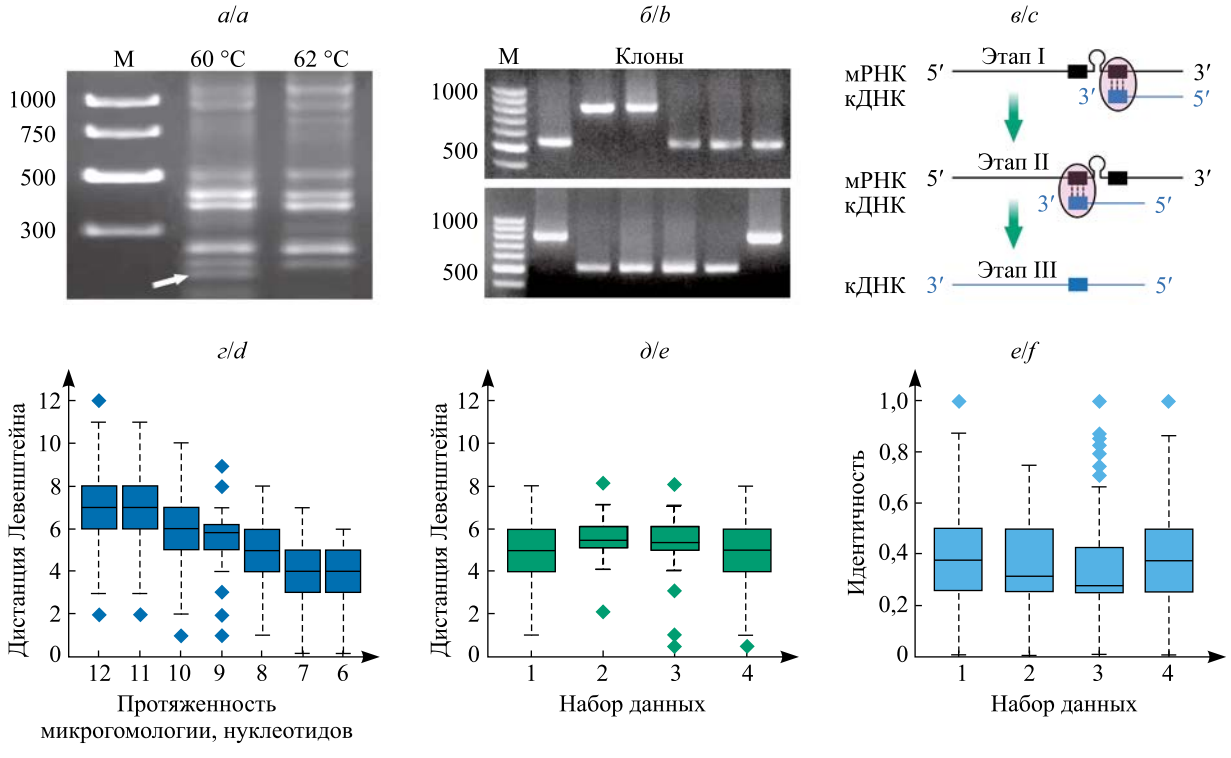


Рис. 2. Идентификация технических артефактов в первичном наборе EEJs гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* по сайтам микрогомологии:
а – репрезентативный ДНК гель-электрофорез ампликонов кДНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, полученных при разных температурах гибридизации прямого и обратного праймеров к экзону 1 гена *RUNX1* и экзону 12а гена *RUNX1T1* соответственно. М – маркеры *Thermo Scientific*^{TM} *GeneRuler*^{TM} *Express DNA Ladder*, стрелкой отмечен нестабильный ампликон;
б – репрезентативные ДНК гель-электрофорезы результатов скрининга бактериальных клонов-трансформантов из двух независимых серий экспериментов по амплификации и клонированию фрагментов кДНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*. Ампликоны для клонирования были получены при использовании прямого праймера к экзону 4а гена *RUNX1* и обратного праймера к экзону 12а гена *RUNX1T1*, М – маркеры *Thermo Scientific*^{TM} *GeneRuler*^{TM} *50 bp DNA Ladder*;
в – модель внутримолекулярной смены матрицы обратной транскриптазой. Прямоугольниками обозначены области микрогомологии, фланкирующие стабильную вторичную структуру типа *ствол – петля* в мРНК, полупрозрачными овалами показана локализация обратной транскриптазы;
г – статистическая характеристика попарных дистанций Левенштейна между последовательностями длиной от 6 до 12 нуклеотидов, фланкирующими 5′- и 3′-сайты сплайсинга всех первичных EEJs;
д – статистическая характеристика попарных дистанций Левенштейна для 8-нуклеотидных последовательностей из разных наборов данных: последовательностей, фланкирующих 5′- и 3′-сайты сплайсинга всех первичных EEJs (1), канонических EEJs (2) и NCBI RefSeq EEJs (4), а также случайно сгенерированных 8-нуклеотидных последовательностей (3);
е – статистическая характеристика попарной идентичности 8-нуклеотидных последовательностей из наборов данных, описанных в части *д* этого рисунка. Для графиков *г* – *е* горизонтальная линия отражает значение медианы, «усы» – 1,5 межквартильного расстояния

Fig. 2. Microhomology-based identification of technical artifacts in primary set of EEJs of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*:
a – representative DNA electrophoregram of amplicons of the cDNA of fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. These amplicons were generated at different annealing temperature using forward and reverse primers specific to *RUNX1* exon 1 and *RUNX1T1* exon 12a, respectively. M – markers *Thermo Scientific*^{TM} *GeneRuler*^{TM} *Express DNA Ladder*, arrow indicates location of unstable amplicon;
b – representative DNA electrophoregrams of the screening results on bacterial transformants with cloned cDNA fragments of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. Amplicons for cloning were generated in two independent series of experiments using forward and reverse primers specific to *RUNX1* exon 4a and *RUNX1T1* exon 12a, respectively, M – markers *Thermo Scientific*^{TM} *GeneRuler*^{TM} *50 bp DNA Ladder*;
c – model of reverse transcriptase intramolecular template switching. Rectangles depict the microhomology sites flanking stable *stem – loop* secondary structure of mRNA, and translucent ovals show the localization of reverse transcriptase;
d – statistical summary on pair-wise Levenshtein distances for 6- to 12-mer oligonucleotides flanking 5′ and 3′ splice sites of all primary EEJs;
e – statistical summary on pair-wise Levenshtein distances for 8-mer oligonucleotides flanking 5′ and 3′ splice sites of all primary EEJs (1), canonical EEJs (2), NCBI RefSeq EEJs (4), or randomly generated 8-mer oligonucleotides (3);
f – statistical summary on identity of 8-mer oligonucleotides from datasets described in *e* panel. For plots *d*–*f* median is shown by horizontal line, 1.5 IQR is shown by whiskers

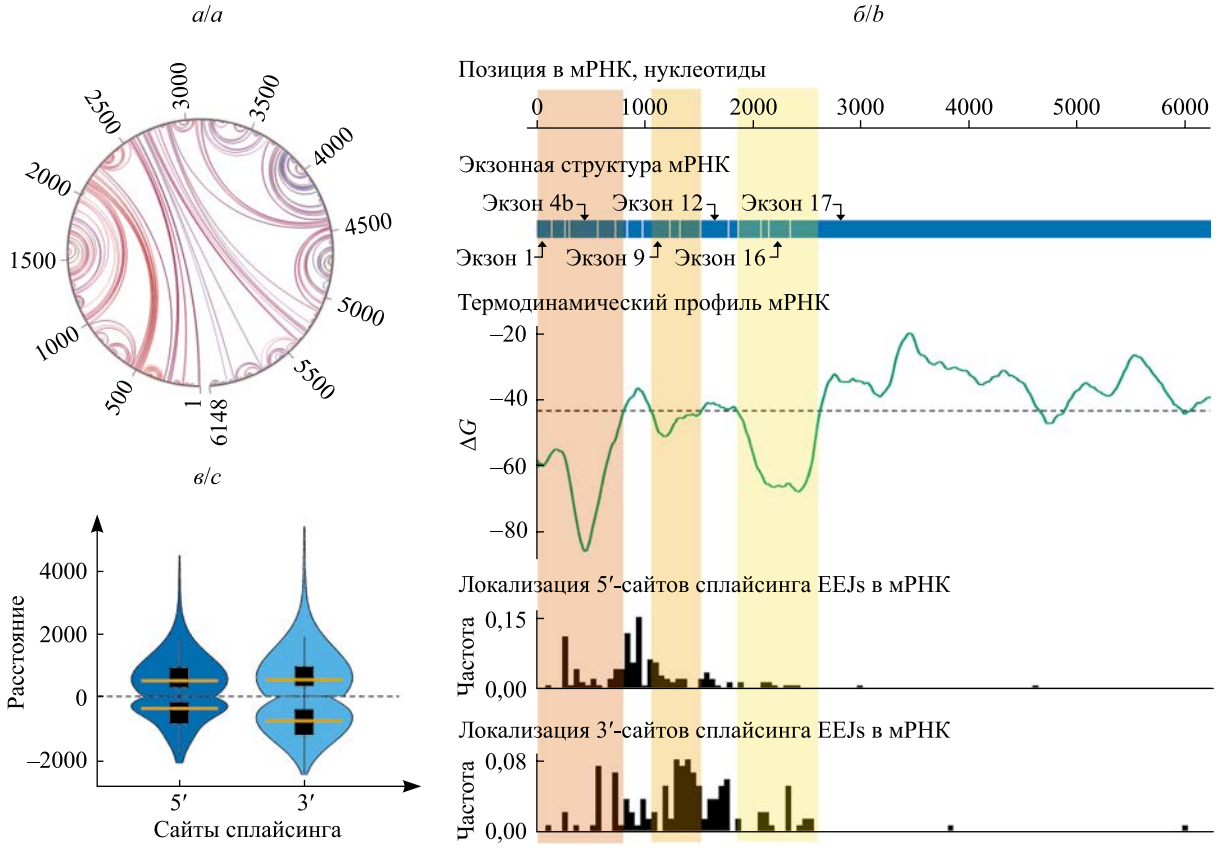


Рис. 3. Термодинамические особенности мажорной изоформы мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, начинающейся с экзона 1:
а – круговая диаграмма вторичной структуры мРНК. Вторичная структура молекулы РНК была рассчитана с помощью приложения Mfold, нуклеотиды пронумерованы по часовой стрелке, красные дуги объединяют нуклеотиды *G* и *C*, синие дуги указывают на пары *A*–*U*, зеленые дуги – на пары *G*–*U*;
б – соотношение между термодинамическим профилем мРНК и локализацией в ней экзонов, а также сайтов сплайсинга из первичного набора EEJs. На диаграмме экзонной структуры мРНК позиции маркерных экзонов отмечены стрелками, вертикальными широкими полосами выделены три наиболее структурированные области мРНК, для которых значения Δ*G* всегда получаются ниже усредненного значения (горизонтальная линия) по всей молекуле мРНК;
в – статистическая характеристика близости (выраженной в количестве нуклеотидов) 5′- и 3′-сайтов сплайсинга всех первичных EEJs, картированных по мРНК, от границ наиболее устойчивых вторичных структур в этой же молекуле РНК. Для всех 5′-сайтов сплайсинга рассчитывалась их близость к началу наиболее устойчивых вторичных структур, а для 3′-сайтов сплайсинга – к окончанию таких структур. Дальнейший статистический анализ полученных распределений проводился отдельно для 5′- и 3′-сайтов сплайсинга, а также отдельно для тех случаев, когда сайт располагался перед соответствующей координатой вторичной структуры (расстояние со знаком «минус») или после нее (расстояние со знаком «плюс»). Горизонтальная линия отображает значение медианы, «усы» – 1,5 межквартильного расстояния

Fig. 3. Thermodynamic properties of exon 1 started major mRNA isoform of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*:
a – circular diagram of the secondary structure of mRNA. The secondary structure of RNA molecule was calculated using Mfold application, nucleotides are numbered clockwise, *G*–*C* arcs are drawn in red, *A*–*U* arcs are shown in blue, and *G*–*U* arcs are depicted in green;
b – the relationship between the thermodynamic profile of mRNA and the localization of exons and splice sites from the primary EEJs in this RNA isoform. On the diagram of the exon structure of mRNA, the positions of some exons are marked by arrows. Three the most structured regions of the mRNA are shaded using vertical wide bands. For these regions, Δ*G* values are always lower than the average value (horizontal line) over the entire mRNA molecule;
c – statistical summary on proximity (as number of nucleotides) of 5′ and 3′ splice sites of all primary EEJs mapped against mRNA to boundaries of the most stable secondary structures in this RNA isoform. For all 5′ and 3′ splice sites, their proximity to the beginning and the end of the most stable secondary structures was calculated, respectively. Further statistical analysis of the distance distributions was carried out separately for the 5′ and 3′ splice sites, and also separately for those cases where the site was located upstream (the distance with a minus sign) or downstream (the distance with a plus sign) the corresponding coordinate of the secondary structure. Median is shown by horizontal line, 1.5 IQR is shown by whiskers

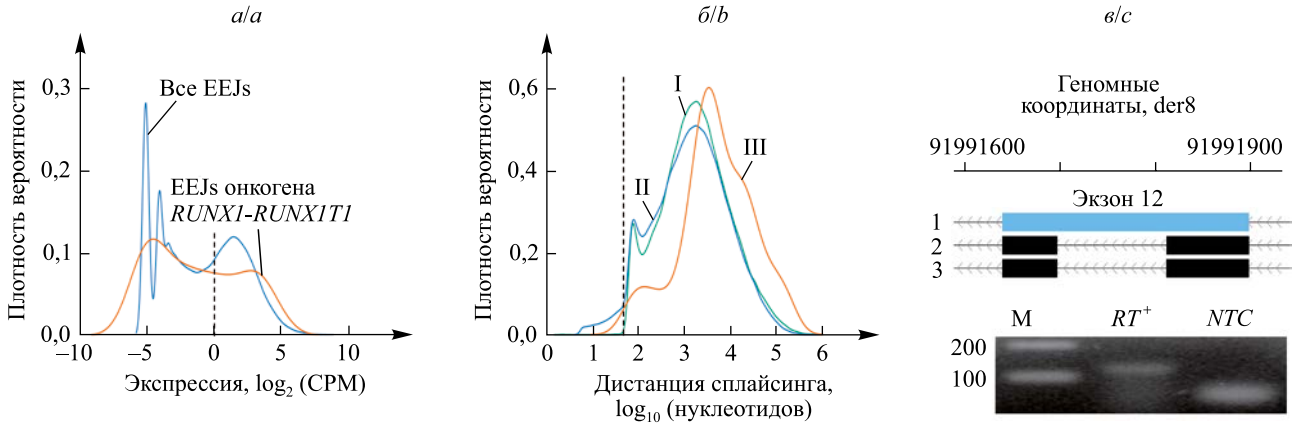


Рис. 4. Поиск технических артефактов в наборе EEJs гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, идентифицированных с помощью RNA-Seq:
а – существенная часть EEJs, идентифицированных с помощью технологии RNA-Seq в транскриптоме клеток линии Kasumi-1 как для гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T*, так и для других генов, характеризуются очень низким уровнем экспрессии. Для снижения шума в экспериментальных данных такие плохо подтверждаемые EEJs могут быть устранены на этапе разведочного анализа данных;
б – распределение EEJs по дистанциям сплайсинга (длине интронов).
На графике представлены результаты анализа трех наборов данных:
EEJs, идентифицированных в тех молекулах РНК человека, которые депонированы в базе данных NCBI RefSeq (I);
всех EEJs, идентифицированных с помощью технологии RNA-Seq в транскриптоме клеток линии Kasumi-1 (II);
EEJs гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, идентифицированных с помощью технологии RNA-Seq в транскриптоме клеток линии Kasumi-1 (III);
в – EEJs гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, идентифицированные по технологии RNA-Seq, могут быть успешно валидированы методом обратной транскрипции и последующей амплификации с помощью полимеразной цепной реакции. В качестве примера представлена валидация экзитрона, обнаруженного в каноническом экзоне 12 (трек 1, выделен голубым цветом) гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* методом тотальной (трек 2) или направленной (трек 3) RNA-Seq. На электрофореграмме показан результат контрольной (без кДНК-матрицы, *NTC*) и специфической (после обратной транскрипции, RT^+) амплификации.
М – маркеры *Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix*

Fig. 4. Identification of technical artifacts among EEJs of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* detected by RNA-Seq:
a – substantial part of EEJs detected by RNA-Seq in the transcriptome of Kasumi-1 cells demonstrates very low level of expression. This remains true for both fusion oncogene EEJs and EEJs of other genes expressed in leukemia cells. To reduce the noise in the experimental data, such poorly supported EEJs can be eliminated during the exploratory data analysis phase;
b – distribution of EEJs on splicing distances (or introns length).
This plot shows the results of the analysis of three data sets: EEJs retrieved from human NCBI RefSeq RNAs (I);
all EEJs identified by RNA-Seq in the transcriptome of Kasumi-1 cells (II);
EEJs of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* detected by RNA-Seq in the transcriptome of Kasumi-1 cells (III);
c – RNA-Seq detected EEJs of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* can be succesfully validated by reverse transcription and polymerase chain reaction.
Validation of exitron located in canonical exon 12 (track 1, sky blue rectangle) of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* is presented as example. Exitron was detected by RNA-Seq on total RNA (track 2) or only RNA of the fusion oncogene (track 3). Electrophoregram demonstrates the results of control (without cDNA template, *NTC*) and specific (after reverse transcription, RT^+) amplification. M – markers *Thermo Scientific™ GeneRuler™ DNA Ladder Mix*

Таким образом, абсолютное большинство EEJs не демонстрируют признаков вовлеченности в ITS, что позволяет рассматривать их как истинные. Тем не менее для повышения надежности дальнейшего анализа мы провели фильтрацию потенциальных fEEJs по следующим параметрам: 1) дистанция сплайсинга – не менее 50 нуклеотидов; 2) EEJs картируются по минус-цепи; 3) сайты сплайсинга не фланкированы участками микрогомологии (для последовательностей длиной 6–8 или 9–12 нуклеотидов расстояние Левенштейна больше 0 или 1 соответственно); 4) расстояние от 3′-сайта сплайсинга до 3′-конца термодинамически устойчивой структуры в канонической мРНК не превышает 12 нуклеотидов; 5) для EEJs ***полного RNA-Seq*** покрытие чтениями – не ниже 1 CPM. Такая фильтрация исключает из первоначального списка 36,4 % EEJs и сокращает их количество до 201. Именно эти EEJs, а также образуемые ими экзоны анализировались нами в дальнейшем.

Идентификация основных мод альтернативного сплайсинга пре-мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*

Мы классифицировали сплайсинговые события, которые обнаруживаются внутри мРНК *RUNX1-RUNX1T1*, по нескольким модам, или типам, альтернативного сплайсинга (рис. 5). Как можно видеть,

и для группы ***кДНК***, и для группы ***полного RNA-Seq*** паттерн распределения типов альтернативного сплайсинга оказывается схожим. Примерно в 80 % случаев EEJs участвуют в одном из трех типов сплайсинга (использование альтернативного 5′- или 3′-сайта сплайсинга либо пропуск нескольких кассетных экзонов подряд). Однако картина значительно меняется, если для EEJs ***полного RNA-Seq*** проанализировать количество подтверждающих их чтений. Так, хотя EEJs, использующие альтернативный вариант 5′-сайта сплайсинга, составляют 30,6 % уникальных сплайсинговых событий, количественно на них приходится лишь 3,7 % чтений. Максимальным же уровнем покрытия обладают пропуски одиночных кассетных экзонов и альтернативные 5′-концевые экзоны – суммарно на них приходится более 80 % подтверждающих чтений (рис. 5, *в*).

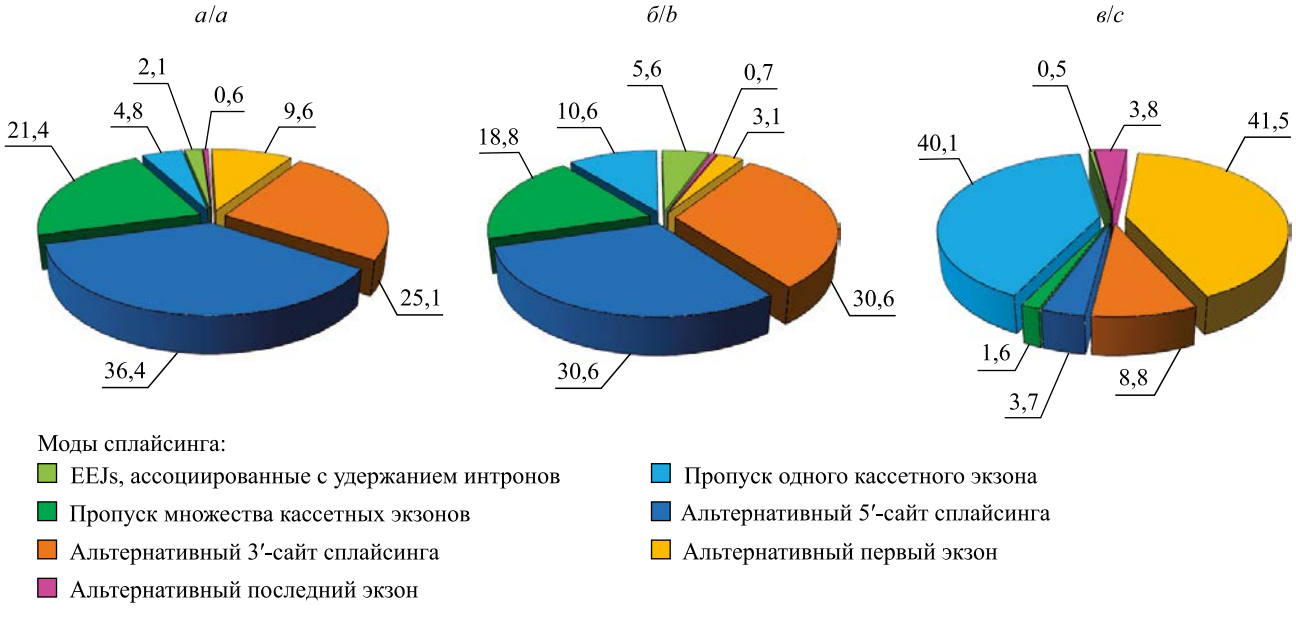


Рис. 5. Классификация EEJs гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* по модам альтернативного сплайсинга. Представлены частоты встречаемости (в процентах) семи основных мод сплайсинга среди EEJs, идентифицированных секвенированием по Сэнгеру (*а*), а также обнаруженных методом RNA-Seq без учета (*б*) или с учетом (*в*) уровня экспрессии

Fig. 5. Classification of EEJs of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* according to modes, or types, of alternative splicing. The figure shows the frequency (in percent) of the seven main splicing modes among EEJs identified by Sanger sequencing (*a*) and by RNA-Seq without (*b*) or with tacking into account the abundance of junctions (*c*)

Такое распределение соотносится с нашей оценкой экспрессии полноразмерных мРНК *RUNX1-RUNX1T1* при помощи *Salmon* [14]. При этом основная часть транскриптов гибридного онкогена – кодирующие полноразмерный либо же усеченный по С-концу белок транскрипты, состоящие из стандартных экзонов гибридного онкогена, а также канонических кассетных экзонов 12a, 15a и 17a. Эти транскрипты нарабатываются с использованием различных промоторных областей [24]. Доля же мРНК с неканоническими вариантами экзонов не превышает нескольких процентов от общего пула транскриптов *RUNX1-RUNX1T1*. Именно эти варианты РНК являются источниками альтернативных 5′- и 3′-сайтов сплайсинга.

Для EEJs 12a12, 15a15, 17a17 и 12del, которые присутствуют в сборке ***полного RNA-Seq***, мы оценили уровни экспрессии по отношению к стыку между экзонами 6 и 8b гибридного онкогена. Судя по всему, данный стык присутствует в большинстве гибридных транскриптов, служит надежным маркером РНК *RUNX1-RUNX1T1* в клетке и может использоваться для определения примерной доли того или иного сплайсингового события в общем пуле транскриптов гибридного онкогена. При оценке использовались три разных способа: 1) определение доли включающих данный вариант сплайсинга мРНК по результатам *Salmon*; 2) вычисление отношения числа чтений, подтверждающих экспериментальный стык, к числу чтений, подтверждающих стык 6-8b; 3) применение количественной ПЦР с использованием устойчивой к ITS обратной транскриптазы. Результаты представлены на рис. 6.

Как можно видеть, результаты прямого подсчета чтений и количественной ПЦР хорошо соотносятся друг с другом. Несмотря на то что оценка *Salmon* имеет тенденцию к завышению долей отдельных

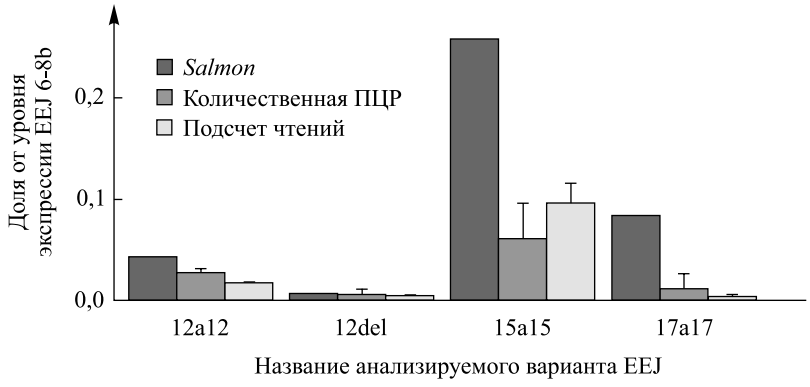


Рис. 6. Кросс-валидация уровней экспрессии EEJs разными методами.
Показаны средние значения уровня экспрессии EEJs
по отношению к EEJ 6-8b и их стандартные отклонения
Fig. 6. Cross-validation of EEJs expression using different approaches.
This plot shows the results from three independent experiments
(as arithmetic mean plus/minus standard deviation).
The expression of each EEJ of interest was normalized relative to EEJ 6-8b abundance

сплайсинговых событий, в целом все три метода оценивают соотношение уровней экспрессии EEJs схожим образом. Это позволяет нам выделить три категории сплайсинговых событий в мРНК гибридного онкогена:

- мажорные события. К ним можно отнести все канонические EEJs, входящие в состав полноразмерных транскриптов, в том числе стык 16-17a и EEJs, генерируемые при транскрипции с внешнего промотора;
- умеренные события, к которым относится в первую очередь использование канонических кассетных экзонов 12a и 15a, а также некоторые неканонические события: удлинение экзона 1, использование стыка RUNX1/PR07-4b (см. ниже). Такие EEJs встречаются в 1–10 % транскриптов гибридного онкогена (при оценке количественной ПЦР или подсчете чтений);
- минорные события. Их доля колеблется около 1 % и ниже либо имеет стандартное отклонение, близкое к значению средней доли. В эту группу попадают EEJs 17a17, 12del, а также абсолютное большинство EEJs на основе альтернативных вариантов экзонов из групп ***кДНК*** и ***прицельного RNA-Seq***. Именно экстремально низкий уровень экспрессии объясняет отсутствие большинства таких EEJs в сборке мРНК из полноразмерной библиотеки чтений.

Идентификация «горячих областей» альтернативного сплайсинга пре-мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*

EEJs из нашего набора данных образуют 332 уникальных экзона, имеющих длину не менее 25 нуклеотидов и лежащих на минус-цепи ДНК. Их фильтрация по описанным ранее критериям сокращает количество экзонов до 228, из которых 179 перекрываются с каноническими экзонными областями. Из оставшихся 49 экзонов большая часть лежит в области гибридного интрона между экзонами 6 и 8b. Подавляющее их большинство описано в работе [2]. Это единственный участок гибридного онкогена, на котором наблюдается экзонизация множества внутренних областей интрона. Помимо них, данная подгруппа областей включает кассетные экзоны 12a, 15a и 17a (экзон 12a имеет два экзонных варианта, 15a – один, 17a – три), а также 91-нуклеотидную вставку интрона между экзонами 10 и 11. Отметим, что уровни фильтрации, выбранные нами, оказались достаточно строгими и отсекли небольшое количество верифицированных экспериментально EEJs, к примеру канонический стык 16-17.

Картирование экзонов гибридного онкогена на искусственную мета-мРНК, содержащую все канонические экзоны, позволяет заключить, что примерно 80 % альтернативных экзонных вариантов генерируются в «горячей области», включающей экзоны 4a/b, 6, 8b, 9, 11 и 12. Экзоны 4a и 12 демонстрируют высокую частоту экзитроноподобного сплайсинга, в результате чего теряется центральная часть канонической области, а 5′- и 3′-сегменты становятся самостоятельными экзонами. Другие экзоны генерируют варианты преимущественно за счет усечения по 5′- и 3′-концам, а также экзонизации прилегающих участков. Все эти экзонные варианты относятся к минорной фракции. Как видно из рис. 7, схожее распределение числа экзонных вариантов наблюдается внутри всех независимых групп. Хотя в группах ***кДНК*** и ***прицельного RNA-Seq*** присутствует незначительное количество экзонных вариан-

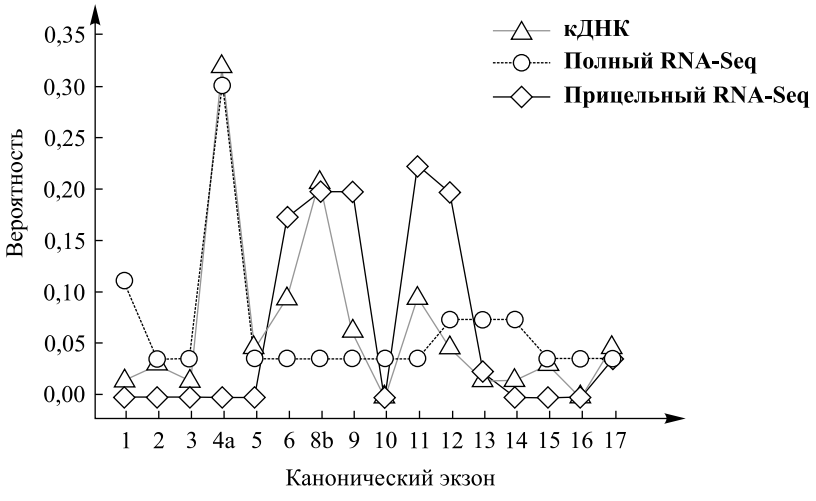


Рис. 7. Разнообразие альтернативных вариантов экзонов, генерируемых на основе канонических экзонов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*. Представлено распределение частот встречаемости генерируемых вариантов среди всех вариантов экзонов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*, обнаруживаемых с помощью указанного метода

Fig. 7. A diversity of alternative exons generated on the basis of the canonical exons of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*. This plot shows the frequency distribution of the occurrence of variants generated on the basis of given canonical exon among all variants of exons of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* detected by indicated method

тов, образующихся искусственно, через отсечку фрагмента экзона ПЦР-праймером, это не приводит к исчезновению «горячих областей» (данные не показаны). Указанные наблюдения подтверждают правильность наших выводов.

Вклад альтернативных промоторов и сайтов полиаденилирования в разнообразие альтернативных транскриптов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*

Известно, что транскрипция гибридного онкогена обеспечивается главным образом благодаря двум каноническим промоторам. РНК, синтезированные с внешнего промотора, могут включать экзоны 1 и 2, а также 3, который сплайсируется с укороченным вариантом экзона 4-4b. GC-богатый внутренний промотор является источником транскриптов, имеющих экзон 4a в качестве 5′-концевого. Также есть свидетельства наличия внутренних промоторных областей вблизи экзона 8b. Однако анализ данных ***полного RNA-Seq*** обнаруживает промоторную активность в еще одной области – на участке ранее предсказанного нами седьмого промоторного региона [4]. Ее использование приводит к образованию 5′-концевого экзона с координатами der8:92068127–92068487, сплайсирующегося с областью 4b (рис. 8, *а*).

Указанный экзон отстоит от канонической точки начала транскрипции примерно на 1 т. п. о. и также лежит в GC-богатой области. Прямой подсчет чтений оценивает долю включающих его транскриптов на уровне 2,7 ± 1,5 % от стыка 6-8b. Его присутствие подтверждается ОТ-ПЦР [14], а также предсказаниями NCBI-Gnomon (XM_005261068.3). Стоит отметить, что транскрипты, содержащие экзон PR07, лишены канонических точек инициации трансляции, локализованных внутри экзонов 3 и 4a.

База данных GENCODE v.27 содержит координаты лишь одного сайта полиаденилирования для интактного гена *RUNX1T1*. Эта точка с хромосомной координатой der8:91956502 располагается в ассоциированной с экзоном 17 3′-нетранслируемой области (3′-НТО) и генерирует концевой экзон длиной около 4 т. п. о. Координаты сайта полиаденилирования экзона 17a в базах данных отсутствуют, однако можно опереться на результаты авторов [25], впервые описавших указанный экзон. Согласно этим данным, сайт полиаденилирования находится в положении der8:91964725, что дает концевой участок длиной 1650 нуклеотидов. Для того чтобы подтвердить использование этих сайтов полиаденилирования и выявить новые, мы проанализировали библиотеку чтений ***прицельного RNA-Seq*** при помощи программы *KLEAT-2.0* [9]. С ее помощью удалось идентифицировать два сайта полиаденилирования внутри экзонов 17 и 17a (рис. 8, *б*).

Оба сайта находятся значительно ближе к 5′-концу экзона, чем канонические сайты, что приводит к образованию укороченных 3′-НТО. Для экзона 17 координата точки полиаденилирования der8:91959537, длина 3′-НТО – порядка 850 нуклеотидов. Для экзона 17a полиаденилирование происходит в точке

der8:91966220, длина 3′-НТО составляет всего лишь 100 нуклеотидов. При этом реконструированные с помощью *Cufflinks* транскрипты содержат несколько вариантов объединенного с 3′-НТО экзона 17, самый длинный из которых включает 5473 нуклеотида и захватывает канонический сайт полиаденилирования. Как можно видеть, большая часть этого сегмента мРНК имеет высокое покрытие чтениями, которое, однако, в области канонического сайта полиаденилирования *RUNX1T1* резко падает. В отношении сайта, предложенного в [25], для экзона 17a такого падения не наблюдается, однако для этой области *Cufflinks* также реконструирует длинные, хорошо покрытые 3′-НТО.

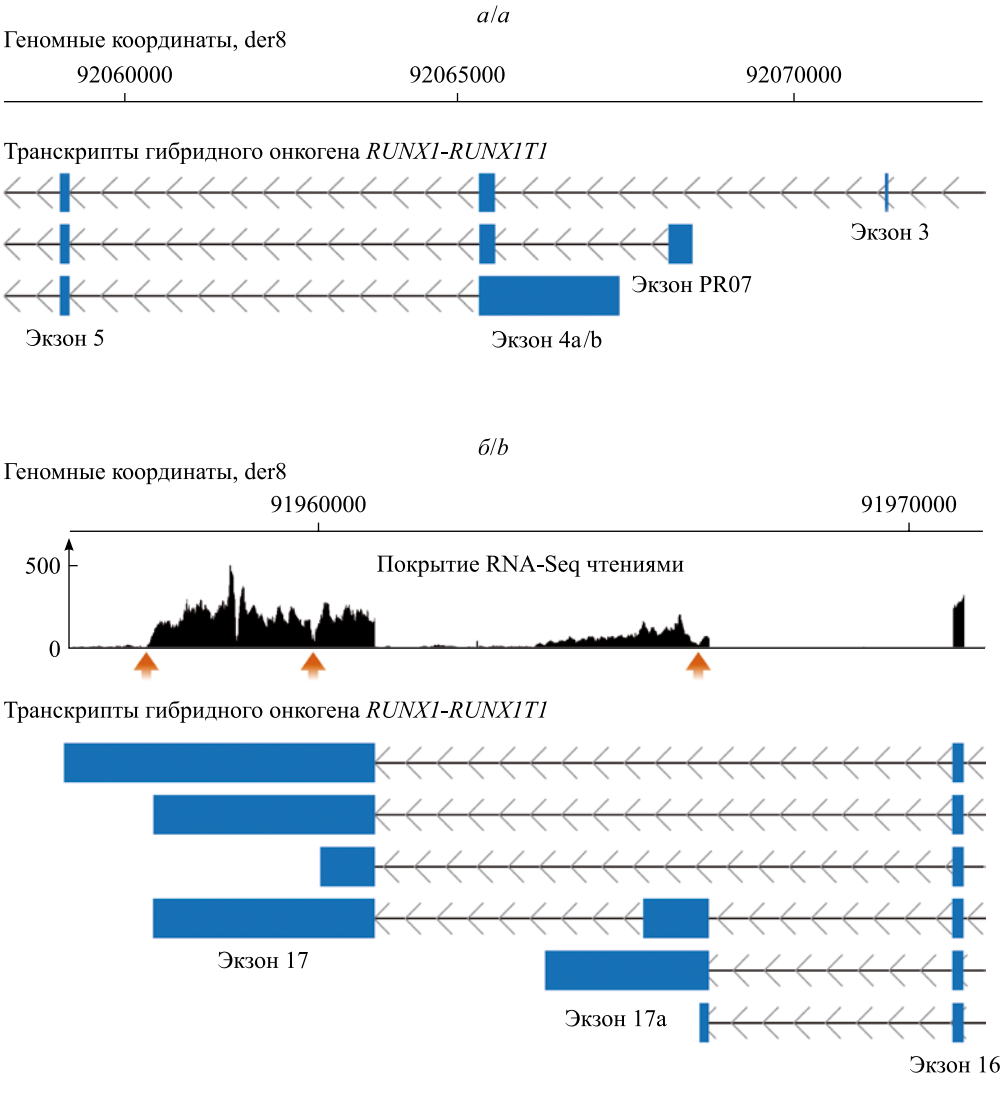


Рис. 8. Вклад альтернативных промоторных областей *RUNX1*-локуса и сайтов альтернативного полиаденилирования в разнообразие мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*:
а – вклад внешнего, внутреннего промоторов и промотора RUNX1/PR07 в формирование 5′-конца мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*;
б – вклад точек альтернативного полиаденилирования в формирование 3′-конца мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*.
Локализация идентифицированных с применением алгоритма *KLEAT-2.0* и анализа покрытия сайтов полиаденилирования показана с помощью вертикальных стрелок. Экзоны обозначены прямоугольниками, интроны – горизонтальными линиями, направление транскрипции – стрелками в «теле» транскриптов

Fig. 8. The contribution of alternative promoter regions of the *RUNX1* locus and alternative polyadenylation sites to the mRNA diversity of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1*:
a – the contribution of the external, internal promoters and the RUNX1/PR07 promoter to the formation of the 5′-end of the fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* mRNA;
b – the contribution of alternative polyadenylation sites to the formation of the 3′-terminus of fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* mRNA. Localization of the polyadenylation sites identified by the algorithm *KLEAT-2.0* and analyzing the coverage is shown using the vertical arrows. The exons are indicated by rectangles, the introns are indicated by horizontal lines, the direction of transcription is indicated by arrows in the «body» of the transcripts

Вышесказанное свидетельствует о том, что для мРНК, заканчивающихся экзоном 17 (а может быть, и экзоном 17a), функционируют несколько сайтов полиаденилирования, за счет чего в клетке коэкспрессируются изоформы мРНК как с полноразмерными, так и укороченными 3′-НТО.

Заключение

Огромное разнообразие вариантов мРНК *RUNX1-RUNX1T1* ставит вопрос о причинах такого разнообразия, а также о закономерностях, которым подчиняется генерация транскриптов этого гена. В ходе исследования мы получили большой массив данных из различных источников, опираясь на который оценили пул альтернативных экзонов гибридного онкогена как с количественной, так и с качественной стороны. Это дало возможность сформулировать некоторые общие принципы, на основе которых генерируется пул мРНК гибридного онкогена.

Количественный анализ позволяет разделить сплайсинговые события в мРНК *RUNX1-RUNX1T1* на три категории. К фракциям мажорных и умеренных событий относятся преимущественно канонические экзоны и EEJs, в то время как большинство альтернативных экзонных вариантов попадает в минорную фракцию. Абсолютное большинство альтернативных экзонных вариантов образуется на основе какого-либо канонического экзона и сохраняет неизменной хотя бы одну из его внешних границ. Этим объясняется тот факт, что приблизительно для 45 % 5′- и 3′-сайтов сплайсинг происходит по каноническим нуклеотидным парам GC-AG и GT-AG. Для остальных сайтов ярко выраженные предпочтения в составе динуклеотидов отсутствуют. Из этих наблюдений можно заключить, что распознавание неканонических сайтов сплайсинга происходит в результате стохастических процессов, сопровождающих сборку сплайсосомы. Поскольку для образования экзонов с модификацией сразу по двум концам должны произойти два независимых друг от друга случайных события, их количество в выборке невелико. Таким образом, минорная фракция экзонов является результатом биологического шума [26]. Однако при этом минорные экзонные варианты устойчиво воспроизводятся от эксперимента к эксперименту, что не позволяет рассматривать их как полностью случайные события. Вероятно, их распознавание определяется локальными особенностями структуры пре-мРНК, которые также определяют и существование «горячих областей» альтернативного сплайсинга.

Суммарную долю транскриптов, включающих экзоны минорной фракции, сложно оценить. Во-первых, их максимальное число ограничено лишь количеством потенциальных сайтов сплайсинга в первичной мРНК. Во-вторых, точные оценки долей затруднены ограничениями существующих количественных методик, а также нестабильной экспрессией экзонных вариантов. В-третьих, одна мРНК может включать несколько минорных сплайсинговых событий. Однако, основываясь на кросс-валидированных RNA-Seq данных и оценках путем количественной ПЦР, можно предположить, что верхняя граница доли транскриптов минорной фракции в общем пуле не превышает нескольких процентов. Наиболее эффективными из опробованных нами методов изучения их структуры стоит признать секвенирование по Сэнгеру и прицельный RNA-Seq.

На основании результатов 3′-RACE и ***полного RNA-Seq*** мы предполагаем коэкспрессию в пуле мРНК *RUNX1-RUNX1T1* 3′-НТО различной длины. Поддержание определенного соотношения между ними может иметь важное физиологическое значение. Известно, что варьирование длины 3′-НТО мРНК является распространенным регуляторным механизмом. В частности, активированные Т-лимфоциты в ходе пролиферации экспрессируют мРНК с укороченными 3′-НТО, что способствует синтезу большого количества белка [27]. Уровень экспрессии транскриптов гибридного онкогена в t(8;21)-положительных лейкозных бластах значительно выше, чем в дифференцированных моноцитах и гранулоцитах с этой мутацией [28]. Данное увеличение коррелирует с экспрессией укороченных вариантов 3′-НТО, а синтез белка на таких транскриптах повышается до 5 раз [28]. Также мРНК с длинными 3′-концевыми участками могут выступать в качестве ловушек миРНК, опосредованно регулируя экспрессию других генов [29].

Использование неканонических промоторов может вносить вклад в разнообразие белков, которые синтезируются с гибридного локуса. Помимо промоторных областей, локализованных в области гибридного интрона, область RUNX1/PR07 также может генерировать транскрипты. Биоинформатический анализ показывает, что такие мРНК лишены канонических точек начала трансляции в экзонах 3 и 4a. Если трансляция на них может инициироваться в других областях, к примеру на участке 8a/b, это приведет к наработке интактных вариантов белка RUNX1T1, лишенного RUNX1-части. Примечательно, что именно такие, укороченные, изоформы белка можно обнаружить при помощи вестерн-блота в t(8;21)-положительных клетках [4].

Таким образом, все три основных механизма генерации альтернативных мРНК – альтернативные промоторы, альтернативный сплайсинг и альтернативные сайты полиаденилирования – вносят существенный вклад в разнообразие альтернативных транскриптов гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1*. Вероятно, они играют важную роль в поддержании жизнеспособности раковой клетки и лейкозогенеза; в то же время особенности минорной фракции экзонов позволяют наблюдать общие принципы

функционирования систем сплайсинга. Более глубокое изучение этих принципов, их реализации в клетках других типов, а также функциональных ролей 3′-НТО и неканонических промоторов является предметом будущих исследований в этой области.

Библиографические ссылки

1. Peterson LF, Boyapati A, Ahn E, Biggs JR, Okumura AJ, Lo M-C, et al. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*. 2007;110(3):799–805. DOI: 10.1182/blood-2006-11-019265.

2. LaFiura KM, Edwards H, Taub JW, Matherly LH, Fontana JA, Mohamed AN, et al. Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Oncogene*. 2008;27(36):4933–4942. DOI: 10.1038/onc.2008.134.

3. Grinev VV, Migas AA, Kirsanava AD, Mishkova OA, Siomava N, Ramanouskaya TV, et al. Decoding of exon splicing patterns in the human *RUNX1-RUNX1T1* fusion gene. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2015;68:48–58. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.08.017.

4. Migas AA, Mishkova OA, Ramanouskaya TV, Ilyushonak IM, Aleinikova OV, Grinev VV. RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*. 2014;38(9):1102–1110. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.06.002.

5. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.

6. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. 2003;339(1):62–66. DOI: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4.

7. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(6):e45. DOI: 10.1093/nar/gkp045.

8. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

9. Birol I, Raymond A, Chiu R, Nip KM, Jackman SD, Kreitzman M, et al. Kleat: cleavage site analysis of transcriptomes. In: Altman RB, Dunker AK, Hunter L, Ritchie MD, Murray TA, Klein TE, editors. *Biocomputing-2015. Pacific Symposium on Biocomputing; 2015 January 4–8; Fairmont Orchid, Hawaii*. [S. l.]: [s. n.]; 2015. p. 347–358. DOI: 10.1142/9789814644730_0034.

10. Xiao Z, Greaves MF, Buffler P, Smith M. Molecular characterization of genomic AML1-ETO fusions in childhood leukemia. *Leukemia*. 2001;15(12):1906–1913. DOI: 10.1038/sj.leu.2402318.

11. Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Le Beau MM, et al. Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(5):3070–3075. DOI: 10.1073/pnas.042702899.

12. Kent WJ. BLAT – the BLAST-like alignment tool. *Genome Research*. 2002;12(4):656–664. DOI: 10.1101/gr.229202.

13. Speir ML, Zweig AS, Rosenbloom KR, Raney BJ, Paten B, Nejad P, et al. The UCSC Genome Browser database: 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D717–725. DOI: 10.1093/nar/gkv1275.

14. Ильюшёнок ИН, Гунько ЕП, Антонович МЛ, Яцков НН, Кустанович АМ, Сухаревский АЮ и др. Изучение закономерностей сплайсинга РНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* человека с помощью методов интеллектуального анализа данных и высокопроизводительного секвенирования. В: Кильчевский АВ, главный редактор. *Молекулярная и прикладная генетика. Сборник научных трудов. Том 23*. Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; 2017. с. 92–101.

15. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011;29(1):24–26. DOI: 10.1038/nbt.1754.

16. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*. 2017;14(4):417–419. DOI: 10.1038/nmeth.4197.

17. Pages H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S. Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. R package version 2.30.1. 2014. DOI: 10.18129/B9.bioc.Biostrings.

18. Morgan M, Pages H, Obenchain V, Hayden N. Rsamtools: Binary alignment (BAM), FASTA, variant call (BCF), and tabix file import. R package version 1.34.1. 2019. DOI: 10.18129/B9.bioc.Rsamtools.

19. Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al. Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLOS Computational Biology*. 2013;9(8):e1003118. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003118.

20. Lorenz R, Bernhart SH, Höner zu Siederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*. 2011;6:26. DOI: 10.1186/1748-7188-6-26.

21. Grinev VV, Ilyushonak IM, Clough R, Nakjang S, Smink J, Martinez-Soria N, et al. RUNX1/RUNX1T1 controls alternative splicing in the t(8;21)-positive acute myeloid leukemia cells. *BioRxiv*. 2019. p. 628040. DOI: 10.1101/628040.

22. Cocquet J, Chong A, Zhang G, Veitia RA. Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts. *Genomics*. 2006;88(1):127–131. DOI: 10.1016/j.ygeno.2005.12.013.

23. Houseley J, Tollervey D. Apparent Non-Canonical Trans-Splicing is generated by reverse transcriptase *in vitro*. PLOS ONE. 2010;5(8):e12271. DOI: 10.1371/journal.pone.0012271.

24. Markova EN, Kantidze OL, Razin SV. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line. *Gene*. 2012;510(2):142–146. DOI: 10.1016/j.gene.2012.09.028.

25. Kozu T, Fukuyama T, Yamami T, Akagi K, Kaneko Ya. MYND-less splice variants of AML1-MTG8 (RUNX1-CBFA2T1) are expressed in leukemia with t(8;21). *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;43(1):45–53. DOI: 10.1002/gcc.20165.

26. Wan Y, Larson DR. Splicing heterogeneity: separating signal from noise. *Genome Biology*. 2018;19(1):86. DOI: 10.1186/s13059-018-1467-4.

27. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3′ UTRs and fewer microRNA target sites. *Science*. 2008;320(5883):1643–1647. DOI: 10.1126/science.1155390.

28. Johnson DT, Shima T, Davis AG, Zhang D-E. Characterization of the Post-Transcriptional Regulation of AML1-ETO Expression in t(8;21) Leukemia Cells. *Blood*. 2017;130(1):3790. URL: http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/3790.

29. Junge A, Zandi R, Havgaard JH, Gorodkin J, Cowland JB. Assessing the miRNA sponge potential of RUNX1T1 in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Gene*. 2017;615(C):35–40. DOI: 10.1016/j.gene.2017.03.015.

References

1. Peterson LF, Boyapati A, Ahn E, Biggs JR, Okumura AJ, Lo M-C, et al. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. *Blood*. 2007;110(3):799–805. DOI: 10.1182/blood-2006-11-019265.

2. LaFiura KM, Edwards H, Taub JW, Matherly LH, Fontana JA, Mohamed AN, et al. Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Oncogene*. 2008;27(36):4933–4942. DOI: 10.1038/onc.2008.134.

3. Grinev VV, Migas AA, Kirsanava AD, Mishkova OA, Siomava N, Ramanouskaya TV, et al. Decoding of exon splicing patterns in the human *RUNX1-RUNX1T1* fusion gene. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2015;68:48–58. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.08.017.

4. Migas AA, Mishkova OA, Ramanouskaya TV, Ilyushonak IM, Aleinikova OV, Grinev VV. RUNX1T1/MTG8/ETO gene expression status in human t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells. *Leukemia Research*. 2014;38(9):1102–1110. DOI: 10.1016/j.leukres.2014.06.002.

5. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(9):e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.

6. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*. 2003;339(1):62–66. DOI: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4.

7. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*. 2009;37(6):e45. DOI: 10.1093/nar/gkp045.

8. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

9. Birol I, Raymond A, Chiu R, Nip KM, Jackman SD, Kreitzman M, et al. Kleat: cleavage site analysis of transcriptomes. In: Altman RB, Dunker AK, Hunter L, Ritchie MD, Murray TA, Klein TE, editors. *Biocomputing-2015. Pacific Symposium on Biocomputing; 2015 January 4–8; Fairmont Orchid, Hawaii*. [S. l.]: [s. n.]; 2015. p. 347–358. DOI: 10.1142/9789814644730_0034.

10. Xiao Z, Greaves MF, Buffler P, Smith M. Molecular characterization of genomic AML1-ETO fusions in childhood leukemia. *Leukemia*. 2001;15(12):1906–1913. DOI: 10.1038/sj.leu.2402318.

11. Zhang Y, Strissel P, Strick R, Chen J, Nucifora G, Le Beau MM, et al. Genomic DNA breakpoints in AML1/RUNX1 and ETO cluster with topoisomerase II DNA cleavage and DNase I hypersensitive sites in t(8;21) leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(5):3070–3075. DOI: 10.1073/pnas.042702899.

12. Kent WJ. BLAT – the BLAST-like alignment tool. *Genome Research*. 2002;12(4):656–664. DOI: 10.1101/gr.229202.

13. Speir ML, Zweig AS, Rosenbloom KR, Raney BJ, Paten B, Nejad P, et al. The UCSC Genome Browser database: 2016 update. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D717–725. DOI: 10.1093/nar/gkv1275.

14. Ilyushonak IM, Gunko EP, Antonovich ML, Yatskou MM, Kustanovich AM, Sukhareuski AYu, et al. Study of RNA splicing patterns of the human *RUNX1-RUNX1T1* fusion oncogene by the methods of data mining and high-throughput DNA sequencing. In: Kil'chevskii AV, chief editor. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika. Sbornik nauchnykh trudov. Tom 23*. Minsk: Institut genetiki i tsitologii NAN Belarusi; 2017. p. 92–101. Russian.

15. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*. 2011;29(1):24–26. DOI: 10.1038/nbt.1754.

16. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*. 2017;14(4):417–419. DOI: 10.1038/nmeth.4197.

17. Pages H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S. Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. R package version 2.30.1. 2014. DOI: 10.18129/B9.bioc.Biostrings.

18. Morgan M, Pages H, Obenchain V, Hayden N. Rsamtools: Binary alignment (BAM), FASTA, variant call (BCF), and tabix file import. R package version 1.34.1. 2019. DOI: 10.18129/B9.bioc.Rsamtools.

19. Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al. Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLOS Computational Biology*. 2013;9(8):e1003118. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003118.

20. Lorenz R, Bernhart SH, Höner zu Siederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*. 2011;6:26. DOI: 10.1186/1748-7188-6-26.

21. Grinev VV, Ilyushonak IM, Clough R, Nakjang S, Smink J, Martinez-Soria N, et al. RUNX1/RUNX1T1 controls alternative splicing in the t(8;21)-positive acute myeloid leukemia cells. *BioRxiv*. 2019. p. 628040. DOI: 10.1101/628040.

22. Cocquet J, Chong A, Zhang G, Veitia RA. Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts. *Genomics*. 2006;88(1):127–131. DOI: 10.1016/j.ygeno.2005.12.013.

23. Houseley J, Tollervey D. Apparent Non-Canonical Trans-Splicing is generated by reverse transcriptase *in vitro*. PLOS ONE. 2010;5(8):e12271. DOI: 10.1371/journal.pone.0012271.

24. Markova EN, Kantidze OL, Razin SV. Transcription of the AML1/ETO chimera is guided by the P2 promoter of the AML1 gene in the Kasumi-1 cell line. *Gene*. 2012;510(2):142–146. DOI: 10.1016/j.gene.2012.09.028.

25. Kozu T, Fukuyama T, Yamami T, Akagi K, Kaneko Ya. MYND-less splice variants of AML1-MTG8 (RUNX1-CBFA2T1) are expressed in leukemia with t(8;21). *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;43(1):45–53. DOI: 10.1002/gcc.20165.

26. Wan Y, Larson DR. Splicing heterogeneity: separating signal from noise. *Genome Biology*. 2018;19(1):86. DOI: 10.1186/s13059-018-1467-4.

27. Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3′ UTRs and fewer microRNA target sites. *Science*. 2008;320(5883):1643–1647. DOI: 10.1126/science.1155390.

28. Johnson DT, Shima T, Davis AG, Zhang D-E. Characterization of the Post-Transcriptional Regulation of AML1-ETO Expression in t(8;21) Leukemia Cells. *Blood*. 2017;130(1):3790. URL: http://www.bloodjournal.org/content/130/Suppl_1/3790.

29. Junge A, Zandi R, Havgaard JH, Gorodkin J, Cowland JB. Assessing the miRNA sponge potential of RUNX1T1 in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Gene*. 2017;615(C):35–40. DOI: 10.1016/j.gene.2017.03.015.

Статья поступила в редколлегию 25.04.2019.
Received by editorial board 25.04.2019.

УДК 581.19:575:224.2:635:631.52

ИЗУЧЕНИЕ РАЗНЫХ ФОРМ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТРАКНОЗУ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОРОСТКОВ СЕМЯН И ДНК-МАРКЕРОВ

Ю. СЯО [1)]***, В. С. АНОХИНА*** [1)]***, В. А. КАРПИЕВИЧ*** [1)]***, И. Б. САУК*** [1)]***, И. Ю. РОМАНЧУК*** [1)]

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

Приведены результаты изучения устойчивости к антракнозу разных форм фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) с использованием проростков и молекулярного тестирования по генам *Co-1*^{4} и *Phg-1*. Выявлена разная реакция образцов на воздействие патогена. Выделены мутантные линии, содержащие в геноме гены *Co-1*^{4} и *Phg-1*.

Ключевые слова: антракноз; генотип; проросток; ДНК-маркер; фасоль обыкновенная.

Благодарность. Исследования проведены при поддержке проекта по государственной программе научных исследований «Качество и эффективность агропромышленного производства» (подпрограмма 9.6 «Земледелие и селекция»).

THE STUDY DIFFERENT FORMS OF COMMON BEAN TO ANTHRACNOSE RESISTANCE USING SEEDLINGS AND DNA MARKERS

Yu. XIAO [a]***, V. S. ANOKHINA*** [a]***, V. A. KARPIEVICH*** [a]***, I. B. SAUK*** [a]***, I. Yu. ROMANCHUK*** [a]

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
Corresponding author: V. S. Anokhina (anokhina@tut.by)

The results of study of various forms of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to anthracnose resistance using seedlings and molecular testing for the *Co-1*^{4} and *Phg-1* genes were presented. The different responses of the samples

Образец цитирования:
Сяо Ю, Анохина ВС, Карпиевич ВА, Саук ИБ, Романчук ИЮ. Изучение разных форм фасоли обыкновенной по устойчивости к антракнозу с использованием проростков семян и ДНК-маркеров. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:60–69.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-60-69

For citation:
Xiao Yu, Anokhina VS, Karpievich VA, Sauk IB, Romanchuk IYu. The study different forms of common bean to anthracnose resistance using seedlings and DNA markers. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:60–69. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-60-69

Авторы:
Юйтин Сяо – аспирантка кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – В. С. Анохина.
Вера Степановна Анохина – кандидат биологических наук, доцент; заведующий сектором генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.
Вадим Александрович Карпиевич – стажер младшего научного сотрудника сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.
Ирина Борисовна Саук – старший научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.
Ирина Юрьевна Романчук – старший научный сотрудник сектора генетики растений научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Authors:
Yutin Xiao, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.
Vera S. Anokhina, PhD (biology), docent; head of the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.
anokhina@tut.by
Vadim A. Karpievich, probationer of junior researcher at the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.
Irina B. Sauk, senior researcher at the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.
Irina Yu. Romanchuk, senior researcher at the plant genetics sector, research laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

to the influence of the pathogen were revealed. The lines from mutant forms that had the *Co-1*^{4} and *Phg-1* genes in their genomes were selected.

Keywords: anthracnose; genotype; seedling; DNA marker; common bean.

Acknowledgements. The studies were carried out with the support of the project under the Industrial scientefic and technical programs «Quality and efficiency of agroindustrial production», 9.6 «Agriculture and selection».

Введение

Фасоль обыкновенная широко распространена в мировом земледелии, ее возделывают более чем в 70 странах в различных почвенно-климатических зонах. В мире общая площадь посевов культуры составляет около 27 млн га, из них 4,8 тыс. га находится в России. В [1] приведены данные о площадях возделывания фасоли на семена и на бобы технической спелости на территории Европейского союза в 2005–2007 гг. Максимальные площади под этой культурой заняты (соответственно направлению использования) в Румынии (более 60 тыс. га) и Италии (25 тыс. га). Снижение посевных площадей в ряде стран связано с отсутствием в генофонде зернобобовых культур генотипов, устойчивых к болезням и вредителям, а также форм с высоким адаптивным потенциалом. В связи с этим актуальность расширения генофонда фасоли и поиска доноров и источников устойчивости к стрессорам вполне закономерна, ибо прекращение возделывания бобовых культур может привести к серьезному дефициту растительного белка во многих странах мира [2].

Широкому распространению фасоли овощной препятствуют различные болезни и абиотические стрессоры, существенно снижающие (до 40 % и более) продуктивность растений и качество зерна. Наличием доноров и источников устойчивости определяется успех селекции. В повышении эффективности последней существенными являются подходы, при которых используются генетические маркеры в качестве критериев для отбора ценных генотипов. Поэтому для теоретического обоснования выделения генотипов с генами устойчивости к болезням и разработки новой стратегии селекции необходимо молекулярно-генетическое тестирование геномов.

Для фасоли характерны многие заболевания, в том числе связанные с действием разных патогенных грибов. Антракноз фасоли – широко распространенное вредоносное заболевание, вызываемое грибом *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Br. & Cav. Он повреждает все надземные части гороха, фасоли, чечевицы. При инфекции на листьях появляются пятна неправильной формы, желто-бурые, с темно-коричневой каймой. На бобах пятна темно-бурые, на стеблях – удлиненные, опоясывающие. В центре пятен образуется конидиальное спороношение гриба в виде оранжево-розовых или красноватых подушечек с многочисленными щетинками. Конидии – бесцветные, одноклеточные, прямые или слегка изогнутые (рис. 1).

Рис. 1. Растение фасоли овощной, пораженное антракнозом (оригинальное фото)
Fig. 1. The plant of common beans affected by anthracnose (original photo)

Распространение патогена осуществляется конидиями в дождливую ветреную погоду. Оптимальная температура для развития заболевания 14–16 °С. Повышенная влажность воздуха и частые обильные осадки обусловливают сильное поражение растений антракнозом. Его развитию способствуют кислые почвы и загущенные посевы. При антракнозе у растений снижается урожайность и всхожесть семян, ухудшаются качественные характеристики зеленой массы и зерна [3].

У возбудителя антракноза фасоли известно 8 рас. Образцов, которые обладают устойчивостью ко всем расам, не обнаружено, но среди коммерческих сортов зарубежной селекции есть сорта, иммунные к 2–5 расам одновременно [4]. Установлено наличие около 40 генов устойчивости к антракнозу у культуры фасоли [5]. Первоначально было идентифицировано 19 доминантных генов устойчивости к антракнозу среди генофонда мезоамериканской фасоли и фасоли Анд. К мезоамериканским генам устойчивости отнесены *Co-2*, *Co-3* (и его аллели *Co-3*^{2}, *Co-3*^{4}, *Co-3*^{5}), *Co-4* (и его аллели *Co-4*^{2}, *Co-4*^{3}), *Co-5* (и его аллель *Co-5*^{2}), *Co-6*, *Co-11*, *Co-16*, *Co-17*, *Co-u*, *Co-V*, к генам устойчивости Анд – *Co-1* (и его аллели *Co-1*^{2}, *Co-1*^{3}, *Co-1*^{4}, *Co-1*^{5}), *Co-12*, *Co-13*, *Co-14*, *Co-15*, *Co-x*, *Co-w*, *Co-y*, и *Co-z*. Гены устойчивости к антракнозу картированы в 7 из 11 хромосом фасоли. Некоторые из этих генов сцеплены в группы Pv01, Pv04, Pv11, которые содержат гены устойчивости не только

к антракнозу, но и к другим болезням. Так, группа сцепления Pv01 содержит кластер генов устойчивости к антракнозу (*Co-1*, *Co-14*, *Co-x* и *Co-w*), ржавчине (*Ur-9*) и угловатой пятнистости (*Phg-1*) [6].

Киргизские сортотипы фасоли изучены на наличие генов устойчивости к антракнозу (*Co-2*) и к вирусу обыкновенной мозаики (BCMV). Их восприимчивость была проверена при инфицировании спорами рас 23 и 102 *C. lindemuthianum* и подтверждена отсутствием локуса *Co-2* при использовании молекулярных маркеров. Поскольку ген *Co-2* является основным ресурсом устойчивости к антракнозу как в Северной Америке, так и в Европе, авторами предпринята попытка переноса этого гена в киргизские сортотипы фасоли путем скрещивания с устойчивыми сортами Вайллант и Флаграно [7].

Молекулярно-генетическое тестирование коллекционных и селекционных образцов, культивируемых в Республике Беларусь, по указанным генам отсутствует. Ограничена информация по оценке генотипов фасоли на устойчивость к антракнозу в лабораторных условиях, прежде всего вновь созданных мутантов и интродуцируемых образцов. Наибольший интерес представляет изучение образцов фасоли на наличие гена устойчивости к антракнозу *Co-1*^{4}, сцепленного с геном устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1* [8], а также генов устойчивости к антракнозу *Co-2* [9], *Co-4* [10], *Co-6* [11].

Эффективность выделения устойчивых к болезням образцов фасоли овощной зависит от разнообразия генофонда опытного материала, а также от надежных экспресс-методов диагностики перспективности генотипа у селекционных образцов. Генофонд фасоли увеличивается за счет как гибридизации, так и спонтанного и индуцированного мутагенеза. Увеличивается и полиморфизм возбудителя антракноза. Поэтому актуальны комплексные исследования коллекционных образцов на разных этапах онтогенеза растений в полевых и лабораторных условиях.

Цель работы – комплексная оценка по устойчивости к антракнозу различных по происхождению образцов фасоли обыкновенной с использованием проростков и молекулярно-генетического маркирования генотипов и выделение для селекции перспективного исходного материала.

Материалы и методы исследований

В эксперименте изучали проростки 3 сортов фасоли овощной (Паланачка ранняя, Секунда, Триумф сахарный) и 13 образцов, ранее отобранных из мутантных популяций разных поколений, полученных с использованием предпосевного γ-облучения семян ^{60}Co (мощность 0,36 Гр/с, экспозиция 9 мин, облучение в 2011 г.) указанных выше сортов (табл. 1).

Таблица 1

Образцы, использованные в исследовании

Table 1

List of samples used in the study

Название	Происхождение
Пр	Паланачка ранняя, исходный сорт сербской селекции
ПрМ3Л2	Паланачка ранняя, мутантное поколение 3, линия 2
ПрМ3Л3	Паланачка ранняя, мутантное поколение 3, линия 3
ПрМ3Л4	Паланачка ранняя, мутантное поколение 3, линия 4
С	Секунда, исходный сорт российской селекции
СМ2Л1	Секунда, мутантное поколение 2, линия 1
СМ2Л2	Секунда, мутантное поколение 2, линия 2
СМ2Л3	Секунда, мутантное поколение 2, линия 3
СМ3Л1	Секунда, мутантное поколение 3, линия 1
СМ3Л2	Секунда, мутантное поколение 3, линия 2
Тс	Триумф сахарный, исходный сорт российской селекции
ТсМ1Л1	Триумф сахарный, мутантное поколение 1, линия 1
ТсМ3Л3	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 3
ТсМ3Л4	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 4
ТсМ3Л5	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 5
ТсМ3Л6	Триумф сахарный, мутантное поколение 3, линия 6

Для определения устойчивости к антракнозу использовали лабораторный метод оценки по проросткам [12]. Семена перед закладкой эксперимента дезинфицировали 70 % этиловым спиртом, промывали дистиллированной водой. В опытных вариантах семена инокулировали в течение 60 мин суспензией спор гриба *C. lindemuthianum*, споровая нагрузка которого составила $1{,}8 \cdot 10^5$ спор в 1 мл суспензии, затем промывали дистиллированной водой и закладывали в бумажно-полиэтиленовые рулоны, как и контрольные варианты (без воздействия патогена). Рулоны помещали в стерильные сосуды (растильни) с дистиллированной водой слоем 2–3 см, а сосуды – в термостат с температурой 23 °С на 4 сут. Затем их переносили на стеллажи и выдерживали еще 5 сут. Анализ проростков проведен на 9-е сутки. Определены длины корешка и гипокотиля и процент поражения проростков. Данная методика разработана для культуры люпина. Нами модифицированы температурный режим и условия стерилизации семян для культуры фасоли. Выборка составила по 20 семян в контроле и опыте. Результаты эксперимента обработаны с использованием пакета программ *Excel*. Для различных независимых пар данных рассчитывали значение *t*-критерия Стьюдента. Проростки ранжированы по шкале устойчивости, представленной в табл. 2 [13].

Таблица 2

Шкала устойчивости

Table 2

Sustainability scale

Устойчивость	Поражение проростков, %
1 (очень низкая)	Более 50 (очень сильное)
3 (низкая)	26–50 (сильное)
5 (средняя)	11–25 (среднее)
7 (высокая)	2,5–10,0 (слабое)
9 (очень высокая)	Менее 2,5 (отсутствует или очень слабое)

Выделение ДНК проведено с помощью набора Plant DNA Preparation Kit (*Bioscience*, Германия). ПЦР выполняли с использованием праймеров CV542014 и TGA (табл. 3), синтезированных ОДО «Праймтех» (Беларусь). Продукты амплификации разделяли в 2 % агарозе при одновременном окрашивании бромистым этидием. Гели визуализировали в УФ-трансиллюминаторе. В работе применяли DNA-маркер молекулярного веса Ladder (*Fermentas*, Литва) и ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp ОДО «Праймтех».

Таблица 3

Характеристика праймеров для исследования

Table 3

Characterization of primers for research

Ген	Праймер	Последовательность нуклеотидов 5′ → 3′
Co-1^4	CV542014	F: cactttccactgacggatttgaacc R: gcacaaggacaagtggatttgg
Phg-1	TGA	F: cagaggatgcttctcacggt R: aagccatggatcccatttg

Результаты и их обсуждение

Из мутантных популяций сортов Паланачка ранняя, Секунда, Триумф сахарный были отобраны перспективные по продуктивности и морфотипу растений формы для оценки их устойчивости к антракнозу в лабораторных условиях по проросткам. Контролем служили проростки семян исходных сортов (Паланачка ранняя, Секунда и Триумф сахарный) и их отобранные мутантные линии разных поколений без обработки патогеном. Данные учтенных параметров представлены на рис. 2, 3 и в табл. 4, 5. На рис. 2 изображена неустойчивая форма ПрМ3Л4, на рис. 3 – устойчивая форма ТсМ3Л4.

а/*a* *б*/*b*

Рис. 2. Проростки семян мутантной линии ПрМ3Л4 без воздействия патогена (*а*) и после воздействия суспензии спор *C. lindemuthianum* (*б*)

Fig. 2. Seedlings of the mutant line PrM3L4 without (*a*) and after (*b*) influence of spore suspension of *C. lindemuthianum*

а/*a* *б*/*b*

Рис. 3. Проростки семян мутантной линии ТсМ3Л4 без патогена (*а*) и после воздействия суспензии спор *C. lindemuthianum* (*б*)

Fig. 3. Seedlings of the mutant line TsM3L4 without (*a*) and after (*b*) influence of spore suspension of *C. lindemuthianum*

Таблица 4

Прорастание семян экспериментальных образцов фасоли

Table 4

Characteristics of the experimental samples of beans for germination of seeds

Наименование образца	Количество проросших семян, шт.		Прорастание, %	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
ПрМ3Л4	15	14	75	70
ПрМ3Л2	14	14	70	70
ПрМ3Л3	12	20	60	100
С	19	14	95	70
СМ2Л1	17	12	85	60
СМ2Л2	17	19	85	95

Окончание табл. 4
Ending table 4

Наименование образца	Количество проросших семян, шт.		Прорастание, %	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
СМ2Л3	19	18	95	90
СМ3Л1	18	20	90	100
СМ3Л2	20	14	100	70
Тссорт	17	19	85	95
ТсМ1Л1	15	15	75	75
ТсМ3Л3	14	20	70	100
ТсМ3Л4	18	20	90	100
ТсМ3Л5	6	10	30	50
ТсМ3Л6	3	7	15	35

Примечание. Контроль – без воздействия патогена, опыт – с воздействием патогена. Для прорастания взяты по 20 семян в контроле и опыте.

Используемые в опыте сорта и мутантные формы обладали хорошей всхожестью семян (от 30 до 100 %), за исключением линии ТсМ3Л6, у которой всхожесть была всего 15 %. В опытном варианте проявилась разная реакция семян на воздействие патогена среди изученных форм (от снижения всхожести в сравнении с контролем до 100 % прорастания). Причина такой разной реакции на обработку патогеном пока не выяснена. Дальнейший анализ полученных проростков по их поражаемости антракнозом выявил, что образцы опытных вариантов с 100 % всхожестью семян имели самый высокий балл устойчивости и, соответственно, самый низкий процент их поражаемости. Сорт Паланачка ранняя в табл. 4 не приведен, так как не дал репрезентативных результатов ни в контроле, ни в опыте.

Таблица 5

Устойчивость к антракнозу экспериментальных образцов фасоли

Table 5

Characteristics of the experimental samples of beans for resistance to anthracnose

Наименование образца	Длина ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$), см				Поражаемость, %	Балл устойчивости
	Корешок		Гипокотиль			
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт		
ПрМ3Л4	3,25 ± 0,59	2,81 ± 0,43	2,91 ± 0,24	3,35 ± 0,20	57,14	1
ПрМ3Л2	2,51 ± 0,39	3,52 ± 0,74	3,19 ± 0,31	3,04 ± 0,37	35,71	3
ПрМ3Л3	3,95 ± 0,75	4,97 ± 0,66	3,49 ± 0,45	4,63 ± 0,37	20,00	5
С	3,80 ± 0,72	3,99 ± 0,61	2,91 ± 0,34	3,06 ± 0,33	50,00	3
СМ2Л1	2,51 ± 0,41	2,49 ± 0,56	2,30 ± 0,10	2,85 ± 0,44	33,33	3
СМ2Л2	1,20 ± 0,24	5,26 ± 0,42*	1,78 ± 0,17	5,13 ± 0,42*	47,37	3
СМ2Л3	4,75 ± 0,62	3,94 ± 0,65	3,22 ± 0,29	2,89 ± 0,28	72,22	1
СМ3Л1	2,02 ± 0,31	4,12 ± 0,70*	2,08 ± 0,09	3,00 ± 0,28*	10,00	7
СМ3Л2	1,94 ± 0,20	3,21 ± 0,45	2,09 ± 0,10	3,55 ± 0,46	50,0	3
Тс	2,06 ± 0,35	3,44 ± 0,68	2,01 ± 0,16	2,64 ± 0,21	42,11	3
ТсМ1Л1	3,27 ± 0,71	2,78 ± 0,51	2,75 ± 0,18	2,74 ± 0,35	40,00	3
ТсМ3Л3	3,30 ± 0,55	6,75 ± 0,64*	4,03 ± 0,63	5,16 ± 0,56*	0	9
ТсМ3Л4	4,35 ± 0,74	6,52 ± 0,43*	3,89 ± 0,49	6,60 ± 0,45*	0	9
ТсМ3Л5	0,88 ± 0,24	5,12 ± 0,73*	1,43 ± 0,29	2,74 ± 0,32*	70,00	1
ТсМ3Л6	0,43 ± 0,13	1,94 ± 0,49	2,20 ± 0,29	2,64 ± 0,42	100,00	1

Примечание. Контроль – без воздействия патогена, опыт – с воздействием патогена. * – разница с контролем достоверна при $p \geq 0,01$.

Наибольшие баллы устойчивости к антракнозу среди изученных образцов фасоли овощной отмечены у ТсМ3Л3, ТсМ3Л4 и СМ3Л1, длина корешка и длина гипокотиля у которых в опыте достоверно превосходили контроль. О меньшей устойчивости проростков свидетельствует как снижение длины одного из показателей (либо длины корешка, либо длины гипокотиля) в опытных вариантах по отношению к контролю, так и равенство этих показателей в контроле и опыте. В двух вариантах: СМ2Л2 и ТсМ3Л5 – получены ложноположительные результаты, что, возможно, связано с внутренней инфекцией семян и подтверждается как процентом прорастания семян в контроле (табл. 4), так и замедлением ростовых процессов корешков мутантных образцов по отношению к исходному сорту (табл. 5).

Опытные образцы изучали на наличие гена устойчивости к антракнозу *Co-1*^{4} и сцепленного с ним гена устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1*. Результаты исследований представлены на рис. 4, 5 и в табл. 6.

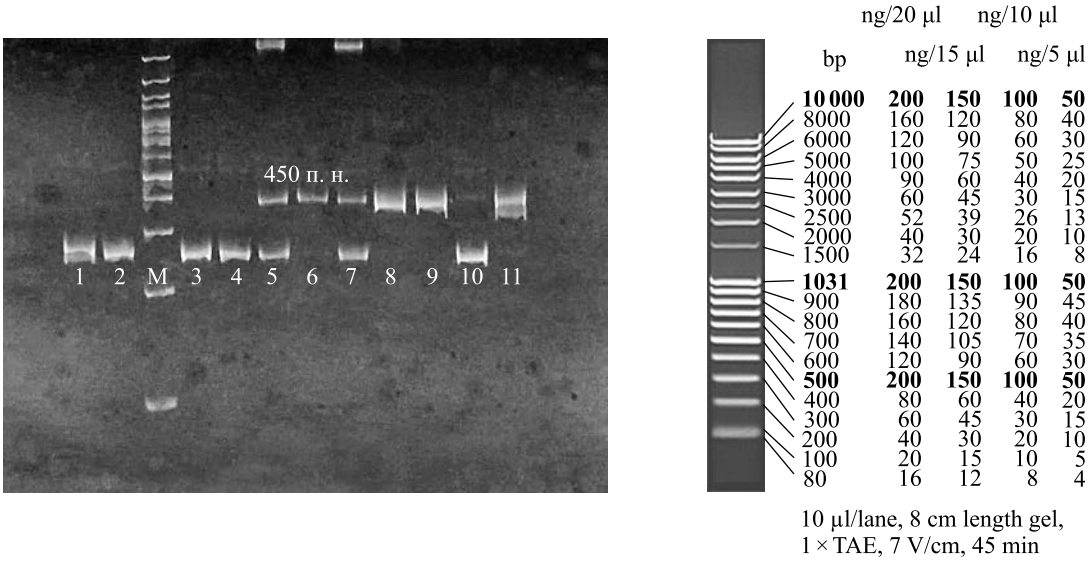


Рис. 4. Результаты типирования отдельных образцов фасоли обыкновенной с праймером CV542014:
М – ДНК-маркер молекулярного веса Ladder *Fermentas*; 1 – ТсМ3Л6; 2 – Тс; 3 – С; 4 – СМ3Л2; 5 – Пр; 6 – ПрМ3Л4; 7 – ПрМ3Л2; 8 – ТсМ3Л3; 9 – ТсМ3Л4; 10 – ТсМ3Л5; 11 – ПрМ3Л3

Fig. 4. Results of typing individual samples of common bean with primer CV542014:
M – DNA molecular weight marker Ladder *Fermentas*; 1 – TcM3Л6; 2 – Tc; 3 – C; 4 – CM3Л2; 5 – Пр; 6 – ПрМ3Л4; 7 – ПрМ3Л2; 8 – TcM3Л3; 9 – TcM3Л4; 10 – TcM3Л5; 11 – ПрМ3Л3

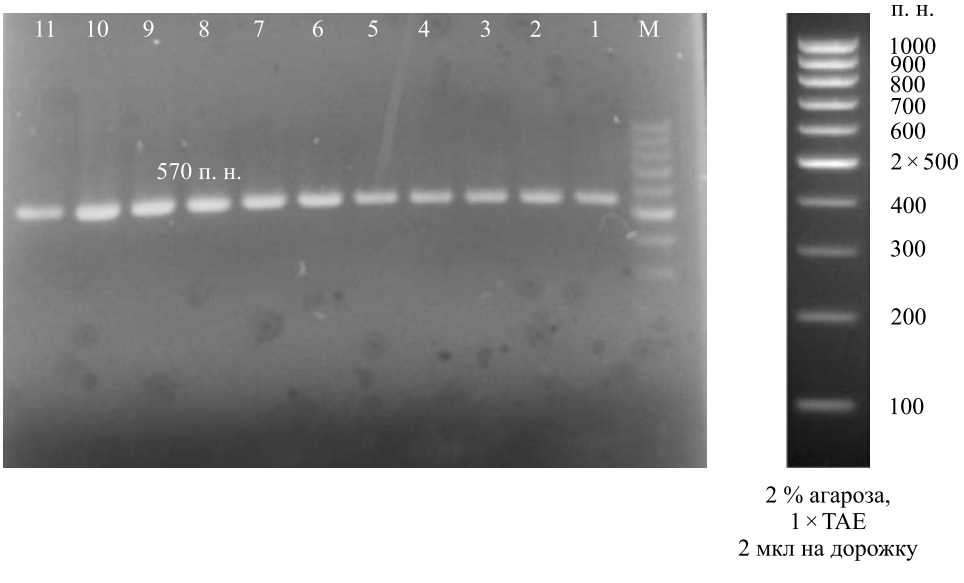


Рис. 5. Результаты типирования отдельных образцов фасоли обыкновенной с праймером TGA:
М – ДНК-маркер молекулярного веса 100 bp; 1 – Пр; 2 – ПрМ3Л4; 3 – ПрМ3Л3; 4 – ПрМ3Л2; 5 – С; 6 – СМ3Л2; 7 – Тс; 8 – ТсМ3Л3; 9 – ТсМ3Л4; 10 – ТсМ3Л5; 11 – ТсМ3Л6

Fig. 5. Results of typing individual samples of common bean with primer TGA:
M – DNA molecular weight marker 100 bp; 1 – Пр; 2 – ПрМ3Л4; 3 – ПрМ3Л3; 4 – ПрМ3Л2; 5 – С; 6 – СМ3Л2; 7 – Тс; 8 – ТсМ3Л3; 9 – ТсМ3Л4; 10 – ТсМ3Л5; 11 – ТсМ3Л6

Таблица 6

Результаты изучения образцов фасоли обыкновенной по устойчивости к антракнозу с использованием проростков и ДНК-маркеров

Table 6

Results of study of common bean samples for resistance to anthracnose using seedlings and DNA markers

Наименование образца	Балл устойчивости к антракнозу	Результаты маркирования	
		Ген *Co-1*^{4}	Ген *Phg-1*
Пр	–	+	+
ПрМ3Л4	1	+	+
ПрМ3Л2	3	+	+
ПрМ3Л3	5	+	+
С	3	–	+
СМ2Л1	3	–	+
СМ2Л2	3	–	+
СМ2Л3	1	–	+
СМ3Л1	7	–	+
СМ3Л2	3	–	+
Тс	3	–	+
ТсМ1Л1	3	–	+
ТсМ3Л3	9	+	+
ТсМ3Л4	9	+	+
ТсМ3Л5	1	–	+
ТсМ3Л6	1	–	+

По данным молекулярного тестирования с праймером CV542014 к гену устойчивости к антракнозу *Co-1*^{4}, аллель устойчивого генотипа (450 п. н.) выявлен у мутантных линий, полученных на основе сорта Паланачка ранняя. У сорта Секунда, как и у его мутантов, такого бэнда устойчивости к антракнозу не выявлено. У сорта Триумф сахарный и у трех мутантных линий (ТсМ1Л1,ТсМ3Л5 и ТсМ3Л6) данного бэнда устойчивости к антракнозу не выявлено, тогда как у двух линий (ТсМ3Л3 и ТсМ3Л6) отмечено его наличие. Это может быть связано как с гибридной родословной сорта Триумф сахарный, так и с возможным переопылением растений; не исключено и проявление обратных мутаций.

По данным молекулярного тестирования с праймером TGA к гену устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1*, аллель устойчивого генотипа (570 п. н.) выявлен у всех мутантных линий и исходных сортов фасоли (рис. 5).

Среди изученных мутантных линий, полученных от сорта Секунда, по результатам молекулярного маркирования установлено наличие гена *Phg-1* и не установлено наличие *Co-1*^{4}. По величине оценки проростков отмечена форма СМ3Л1, у которой устойчивость составила 7 баллов. Это свидетельствует о возможности присутствия в геноме данной формы других генов устойчивости к антракнозу и требует маркирования еще и по генам *Co-2*, *Co-4*, *Co-6.*

Для сорта Триумф сахарный отмечены очень неустойчивые мутантные линии (1 балл): ТсМ3Л5 и ТсМ3Л6. У первой формы искомые гены (*Co-1*^{4} и *Phg-1*) не выявлены, у второй есть эти гены, но их недостаточно для полной устойчивости. Очень высокая устойчивость (9 баллов) отмечена у двух линий: ТсМ3Л3 и ТсМ3Л4, у которых зафиксированы вышеупомянутые гены. Столь высокая устойчивость, определенная по проросткам, свидетельствует, по-видимому, о наличии и других генов устойчивости к антракнозу.

Среди изученных образцов присутствие обоих генов (*Co-1*^{4} и *Phg-1*) установлено у всех мутантных популяций, полученных от сорта Паланачка ранняя, и у двух мутантных линий (ТсМ3Л3 и ТсМ3Л4) от сорта Триумф сахарный.

Совпадение показателей оценки по проросткам и молекулярного тестирования геномов форм ТсМ3Л3 и ТсМ3Л4 позволяет выделить их как перспективный исходный материал для селекции фасоли на антракнозоустойчивость в качестве источников этой устойчивости. Формы, определенные как

неустойчивые по проросткам, но имеющие ген *Co-1*^{4}, могут служить источником для гибридизации в целях получения полигенных генотипов по комплексу генов устойчивости.

Заключение

Комплексная оценка (оценка устойчивости по проросткам и молекулярное тестирование генотипов) образцов фасоли и их мутантных линий разных поколений позволила выделить перспективные для селекции генотипы ТсМ3Л3 и ТсМ3Л4 по устойчивости к антракнозу.

В случае несовпадения результатов оценки устойчивости к антракнозу (по проросткам) с данными типирования генотипов фасоли на наличие гена *Co-1*^{4} возникает необходимость оценки этих образцов на присутствие других генов, детерминирующих устойчивость к антракнозу, и учета устойчивости растений этих образцов в полевых условиях.

Библиографические ссылки

1. Prusinski J. Rosliny straczkowe w Unii Europejskiey. *Zeszyty problemone postepow nauk rolniczych.* 2010;550:11–19.

2. Чайковский АН, Аутко АА, Янковская ГП, Досина ЕС, Пироговская ГВ, Прищепа ИА и др. *Фасоль спаржевая в Беларуси*. Минск: Институт овощеводства; 2009. 168 с.

3. Болезни зернобобовых культур [Интернет]. 2010 [процитировано 29 марта 2012 г.]. Доступно по: http://www.syngenta.com/country/kz/ru/products/legumes/diseases/Pages/home2.aspx.

4. Чекалин НМ. *Генетические основы селекции зернобобовых культур на устойчивость к патогенам.* Полтава: Інтерграфіка; 2003. 186 с.

5. Gonzalez AM, Yuste-Lisbona FJ, Fernandez-Lozano A, Lozano R, Santalla M. Genetic mapping and QTL analysis in common bean. In: Perez de la Vega M, Santalla M, Marsolais F, editors. *The Common Bean Genome.* Cham: Springer; 2017. p. 69–107. DOI: 10.1007/978-3-319-63526-2_4.

6. de Lima Castro SA, Gonçalves-Vidigal MC, Gilio TAS, Lacanallo GF, Valentini G, da Silva Ramos Martins V, et al. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. *BMC Genomics.* 2017;18:306–317. DOI: 10.1186/s12864-017-3685-7.

7. Асаналиев АЖ, Хегай СВ. Идентификация и введение генов устойчивости в культивируемые сорта фасоли в Кыргызстане. *Вестник Кыргызского национального аграрного университета.* 2014;2(31):131–141.

8. Goncalves-Vidigal MC, Cruz AS, Garcia A, Kami J, Vidigal Filho PS, Sousa LL, et al. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1*^{4} genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND_{277}. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;122(5):893–903. DOI: 10.1007/s00122-010-1496-1.

9. Geffroy V, Creusot F, Falquet J, Sévignac M, Adam-Blondon A-F, Bannerot H, et al. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics.* 1998;96(3–4):494–502. DOI: 10.1007/s001220050766.

10. Burt AJ, William HM, Perry G, Khanal R, Pauls KP, Kelly JD, et al. Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0139450. DOI: 10.1371/journal.pone.0139450.

11. Alzate-Marin AL, Menarim H, Chagas JM, Gonçalves de Barros E, Moreira MA. Identification of RAPD markers linked to *Co-6* anthracnose resistance gene in common bean cultivar AB 136. *Genetics and Molecular Biology.* 2000;23(3):633–637. DOI: 10.1590/s1415-47572000000300023.

12. Якушева АС, Соловьянова НН. *Оценка люпина на устойчивость к антракнозу. Методические рекомендации.* Брянск: ВНИИ люпина; 2001. 18 с.

13. *Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ культурных видов рода Phaseolus* L. Ленинград: ВИР; 1984. 37 с.

References

1. Prusinski J. Rosliny straczkowe w Unii Europejskiey. *Zeszyty problemone postepow nauk rolniczych*. 2010;550:11–19.

2. Chaikovskii AN, Autko AA, Yankovskaya GP, Dosina ES, Pirogovskaya GV, Prishchepa IA, et al. *Fasol' sparzhevaya v Belarusi* [Asparagus beans in Belarus]. Minsk: Institut ovoshchevodstva; 2009. 168 p. Russian.

3. Diseases of leguminous crops [Internet]. 2010 [cited 2012 March 29]. Available from: http://www.syngenta.com/country/kz/ru/products/legumes/diseases/Pages/home2.aspx. Russian.

4. Chekalin NM. *Geneticheskie osnovy selektsii zernobobovykh kul'tur na ustoichivost' k patogenam* [Genetic basis of breeding leguminous crops for resistance to pathogens]. Poltava: Intergrafika; 2003. 186 p. Russian.

5. Gonzalez AM, Yuste-Lisbona FJ, Fernandez-Lozano A, Lozano R, Santalla M. Genetic mapping and QTL analysis in common bean. In: Perez de la Vega M, Santalla M, Marsolais F, editors. *The Common Bean Genome.* Cham: Springer; 2017. p. 69–107. DOI: 10.1007/978-3-319-63526-2_4.

6. de Lima Castro SA, Gonçalves-Vidigal MC, Santana Gilio TA, Lacanallo GF, Valentini G, da Silva Ramos Martins V, et al. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. *BMC Genomics.* 2017;18:306–317. DOI: 10.1186/s12864-017-3685-7.

7. Asanaliev AZh, Khegai SV. [Identification and introduction of resistance genes to cultivated varieties of beans in Kyrgyzstan]. *Vestnik Kyrgyzskogo natsional'nogo agrarnogo universiteta*. 2014;2(31):131–141. Russian.

8. Goncalves-Vidigal MC, Cruz AS, Garcia A, Kami J, Vidigal Filho PS, Sousa LL, et al. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1*^{4} genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND$_{277}$. *Theoretical and Applied Genetics*. 2011;122(5):893–903. DOI: 10.1007/s00122-010-1496-1.

9. Geffroy V, Creusot F, Falquet J, Sévignac M, Adam-Blondon A-F, Bannerot H, et al. A family of LRR sequences in the vicinity of the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics.* 1998;96(3–4):494–502. DOI: 10.1007/s001220050766.

10. Burt AJ, William HM, Perry G, Khanal R, Pauls KP, Kelly JD, et al. Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0139450. DOI: 10.1371/journal.pone.0139450.

11. Alzate-Marin AL, Menarim H, Chagas JM, Gonçalves de Barros E, Moreira MA. Identification of RAPD markers linked to *Co-6* anthracnose resistance gene in common bean cultivar AB 136. *Genetics and Molecular Biology*. 2000;23(3):633–637. DOI: 10.1590/s1415-47572000000300023.

12. Yakusheva AS, Solov'yanova NN. *Otsenka lyupina na ustoichivost' k antraknozu. Metodicheskie rekomendatsii* [Evaluation of Lupine for resistance to anthracnose. Methodical recommendations]. Bryansk: Vserossiiskii nauchno-issledovatel'skii institut lyupina; 2001. 18 p. Russian.

13. *Shirokii unifitsirovannyi klassifikator SEV i mezhdunarodnyi klassifikator SEV kul'turnykh vidov roda Phaseolus* L. [The wide unified descriptor of the CMEA and the international descriptor of the CMEA of cultural species of the genus *Phaseolus* L.]. Leningrad: VIR; 1984. 37 p. Russian.

Статья поступила в редколлегию 14.05.2019.
Received by editorial board 14.05.2019.

УДК 577.218:616.155.392

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ХРОМАТИНА АССОЦИИРОВАНЫ СО СПЛАЙСИНГОМ РНК В ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Т. В. РОМАНОВСКАЯ [1)]***, А. В. КВЕТКО*** [1)]***, В. В. ГРИНЕВ*** [1)]

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

Изучена ассоциация между паттерном распределения различных эпигенетических маркеров и событиями сплайсинга на уровне полного генома и транскриптома в двух лейкозных клеточных линиях человека Kasumi-1 и SEM с двумя разными типами реципрокных хромосомных транслокаций. Показано, что многие эпигенетические маркеры, определяющие более открытое или закрытое состояние хроматина, распределены неодинаково в областях донорных и акцепторных, а также канонических и альтернативных сайтов сплайсинга экспрессирующихся генов. Маркеры открытого хроматина значимо чаще присутствуют в области участков с альтернативными событиями сплайсинга, чем в участках с каноническим сплайсингом, в то время как для маркера триметилирования гистона 3 по лизину в позиции 36 наблюдается противоположная тенденция. Полученные результаты вскрывают наличие дополнительного, пока еще очень плохо изученного слоя в регуляции альтернативного сплайсинга в клетках человека.

Ключевые слова: эпигенетические маркеры; альтернативный сплайсинг; лейкоз.

Благодарность. Работа выполнена в рамках подпрограммы «Объединение» государственной программы научных исследований «Конвергенция-2020» (задание 3.08.03).

EPIGENETIC MARKS ON THE CHROMATIN ARE ASSOCIATED WITH RNA SPLICING IN HUMAN LEUKEMIA CELLS

T. V. RAMANOUSKAYA [a]***, A. V. KVIATKO*** [a]***, V. V. GRINEV*** [a]

[a]*Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
Corresponding author: V. V. Grinev (grinev_vv@bsu.by)

In this work we estimated associations between distribution patterns of several epigenetic marks and splicing events on the level of full genome and transcriptome in the cells of two leukemic cell lines containing two different reciprocal chromosome translocations. Significant difference in distribution of epigenetic marks was found, contributing to more opened or more closed chromatin in loci of donor *vs* acceptor and canonical *vs* alternative splice sites in expressing genes. Marks of the opened chromatin are significantly more often present in the genomic regions with alternative splicing events than in regions with canonical splicing, while for the mark of the histone 3 trimethylation at lysine 36, the opposite trend is observed. The obtained results reveal the presence of an additional, still very poorly studied layer in the regulation of alternative splicing in human cells.

Keywords: epigenetic marks; alternative splicing; leukemia.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the sub-program «Convergence» of the State program of scientific research «Convergence-2020» (3.08.03).

Образец цитирования:
Романовская ТВ, Кветко АВ, Гринев ВВ. Эпигенетические маркеры хроматина ассоциированы со сплайсингом РНК в лейкозных клетках человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:70–81.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-70-81

For citation:
Ramanouskaya TV, Kviatko AV, Grinev VV. Epigenetic marks on the chromatin are associated with RNA splicing in human leukemia cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:70–81. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-70-81

Авторы:
Татьяна Владимировна Романовская – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.
Анастасия Викторовна Кветко – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Т. В. Романовская.
Василий Викторович Гринев – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:
Tatyana V. Ramanouskaya, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
https://orcid.org/0000-0001-5519-4891
ramanouskaya_tv@bsu.by
Anastasiya V. Kviatko, student at the faculty of biology.
anastasiya.kvetko@mail.ru
Vasily V. Grinev, PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
grinev_vv@bsu.by

Введение

Большинство генов человека имеют мозаичное строение, т. е. образуются чередованием экзонов и интронов. Сплайсинг – процесс вырезания интронов из первичных РНК – является необходимой частью реализации наследственной информации. Как сегодня известно, РНК-продукты большинства генов подвергаются альтернативному сплайсингу, что приводит к появлению серии молекул зрелых РНК, различающихся по структуре и функции [1–3]. Спектр продуктов экспрессии гена неодинаков в разных тканях и клеточных типах и в разных условиях. Значительные изменения в наборе продуктов сплайсинга отмечаются для различных типов злокачественных опухолей: многие авторы указывают на увеличение разнообразия вариантов альтернативного сплайсинга, появление изоформ РНК, которые не встречаются в здоровых тканях. Вопрос о функциональной роли альтернативного сплайсинга дискутируется, но по крайней мере для некоторых генов имеются достаточно однозначные свидетельства участия этого процесса в формировании функционально различающихся белковых изоформ или в регуляции экспрессии генов (благодаря взаимодействию с системой NMD – деградации изоформ с преждевременным стоп-кодоном) [2].

В связи с вышесказанным существует обоснованный интерес в отношении молекулярных механизмов, которые определяют паттерн сплайсинга для каждого транскрибируемого гена в клетках. Известно, что в молекулах РНК присутствуют специфические мотивы, узнаваемые сплайсосомой – специализированным белковым комплексом, который непосредственно обеспечивает реализацию этого процесса. Каждый интрон ограничен такими мотивами с двух сторон: проксимально по отношению к сайту начала транскрипции располагается донорный (5′), дистально – акцепторный (3′) сайт сплайсинга. Сродство сплайсосомы к соответствующему участку РНК зависит от силы сайта сплайсинга, т. е. степени сходства нуклеотидной последовательности с консенсусной (оптимальной) последовательностью, которая обеспечивает наиболее энергетически стабильное связывание сплайсосомы. Кроме того, в регуляции сплайсинга участвуют РНК-связывающие белки (трансрегуляторные факторы сплайсинга), мотивы узнавания для которых могут располагаться в экзонах или интронах, как правило, на расстоянии до нескольких сотен нуклеотидов от сайта сплайсинга [4].

В последнее десятилетие появились работы, указывающие на то, что в регуляции сплайсинга, по-видимому, задействованы также и эпигенетические факторы, которые работают на уровне ДНК и белков хроматина [4]. Такие выводы сделаны отчасти на основании биоинформатических исследований, показывающих, что различные эпигенетические маркеры, включая модификации гистонов, чувствительность к ДНКазе, метилирование ДНК, распределены по-разному в области интронов и экзонов. Также выполнялись и прямые эксперименты, в которых манипуляции с системой эпигенетической регуляции приводили к изменению частоты событий сплайсинга в тех или иных его сайтах.

Рассматриваются преимущественно два механизма влияния маркеров хроматина на сплайсинг. Оба опираются на тот факт, что сплайсинг происходит преимущественно котранскрипционно, т. е. взаимодействие регуляторных белков сплайсинга с РНК и сборка сплайсосомных комплексов осуществляются прежде, чем новосинтезированная молекула РНК отделяется от ДНК-матрицы [4]. Первый механизм – влияние эпигенетического состояния хроматина на скорость продвижения РНК-полимеразы [5]. Быстрый синтез цепочки РНК приводит к тому, что в ней одновременно присутствует несколько конкурирующих друг с другом мотивов для взаимодействия с белками-регуляторами. При быстром синтезе цепочки РНК, вероятнее всего, используется более сильный из них, в то время как при медленном синтезе с большей вероятностью используется ближайший (проксимальный) сайт сплайсинга, даже если он окажется слабее, чем дистальный. Второй механизм – опосредованное модифицированными гистонами рекрутирование к локусу трансфакторов. Хорошим примером является функционирование белка MRG15, который, с одной стороны, взаимодействует с гистоном H3K36me3, локализованным в основном в интронах активных генов, а с другой стороны, связывает и рекрутирует факторы сплайсинга PTBP1 и PTBP2 к синтезируемому транскрипту [6; 7].

Особенности протекания сплайсинга в клетках со злокачественной трансформацией могут быть обусловлены тремя основными причинами: 1) изменением уровня экспрессии трансфакторов регуляции сплайсинга; 2) изменением уровня экспрессии белков системы контроля качества РНК, которые отбраковывают и уничтожают некоторые изоформы мРНК; 3) изменением эпигенетического состояния хроматина в участках активно экспрессирующихся генов.

В данной работе мы изучили взаимосвязь между паттерном распределения нескольких эпигенетических маркеров и реализуемым сплайсингом в двух клеточных линиях: Kasumi-1 (острый миелоидный лейкоз) и SEM (острый лимфобластный лейкоз). Следует заметить, что каждая из клеточных линий содержит транслокацию, в результате которой возникает новый онкоген, причем в обоих случаях белковый продукт гена участвует в эпигенетической регуляции хроматина. В линии Kasumi-1 это ген *RUNX1-RUNX1T1*

(репрессор транскрипции, обеспечивает локальное деацетилирование хроматина в области промотора) [8], а в линии SEM – *KMT2A-AFF1* (активатор транскрипции, обеспечивает метилирование лизина 4 в гистоне H3 в области промотора, а также изменяет распределение других эпигенетических маркеров в теле гена) [9].

Материалы и методы исследования

Исходные данные RNA-Seq для лейкозных клеточных линий человека. Использованы данные для клеточных линий Kasumi-1 и SEM. Kasumi-1 (ATCC® CRL-2724TM) является модельной клеточной линией положительной по транслокации t(8;21)(q22;q22) формы острого миелоидного лейкоза человека, а линия SEM (DSMZ № ACC 546) – положительной по транслокации t(4;11)(q21;q23) формы острого лимфобластного лейкоза.

Представленное исследование основано на результатах полнотранскриптомного секвенирования полиаденилированной клеточной РНК, проведенного по методу парно-концевого RNA-Seq, описанных ранее [3; 10; 11]. Материалы для линии Kasumi-1 представлены в базе GEO с кодами доступа GSM1316401, GSM1316402, GSM1316403; для линии SEM – GSM1828405, GSM1828406, GSM1828407.

Файлы FASTQ, полученные при секвенировании транскриптома целевых клеток, подвергались стандартной процедуре предпроцессинга, после чего чтения (короткие секвенированные фрагменты РНК) картировались по эталонной сборке GRCh38.p7 генома человека с помощью пакета *Rsubread v.1.22.3* [12]. В дальнейшем количественные данные подвергались многоступенчатой фильтрации, нормализации и трансформации [13].

Эпигенетические маркеры и CpG-островки. Координаты пиков эпигенетических маркеров получены на основе данных ChIP-Seq, DNase-Seq и ATAC-Seq, опубликованных ранее [9; 11; 14]. В базе GEO материалы представлены в сериях с кодами доступа GSE29222 для клеток линии Kasumi-1, GSE74812 и GSE83671 – для клеток линии SEM.

Координаты CpG-островков в геноме человека получены из геномного браузера UCSC.

Идентификация экзон-экзонных стыков. Экзон-экзонные стыки идентифицированы с использованием пакета *Rsubread v.1.22.3* [12]. Полученные BAM-файлы были преобразованы в таблицы для дальнейшего анализа при помощи кода R собственной разработки. Эти матрицы представляют собой полный список всех экзон-экзонных стыков с геномными координатами и указанным числом подтверждающих чтений в каждом образце.

Статистические тесты выполнялись в соответствии с общепринятыми стандартами. Вся аналитическая работа проведена в среде программирования R с использованием как уже готовых решений, доступных через репозиторий Bioconductor или хранилище CRAN, так и оригинальных программ, написанных авторами исследования.

Результаты и их обсуждение

Классификация экзон-экзонных стыков в соответствии с типами альтернативного сплайсинга. Как указывалось выше, для анализа использовались данные RNA-Seq из двух клеточных линий, на основе которых в результате ряда процедур биоинформатической обработки были получены файлы, содержащие полный список событий сплайсинга. Каждое такое событие отображается в отдельной строке в виде пары координат, соответствующих границам соединяемых при сплайсинге экзонов. Комбинации этих координат мы будем далее обозначать как экзон-экзонные стыки в сокращенном виде: EEJs (англ. *exon-exon junctions*).

В качестве модельной основы для классификации типов альтернативного сплайсинга мы использовали идею гипотетической неальтернативной, или канонической, РНК. Это условная молекула, которая могла бы быть получена в случае, если бы ген имел единственный сайт начала транскрипции, не имел бы альтернативных сайтов сплайсинга и имел единственный сайт терминации транскрипции. Для каждого гена структура модельной канонической РНК была рассчитана с использованием моделей генов человека, аннотированных в базе Ensembl. Мы формировали кластеры из всех перекрывающихся экзонов каждого гена (не учитывая на этом этапе удерживаемые интроны – они рассматривались как отдельный тип событий альтернативного сплайсинга. Также при этом не учитывались аннотированные альтернативные первые и последние экзоны генов). Внешние границы полученных кластеров определялись как границы экзонов модельной неальтернативной РНК. Таким образом, был составлен список координат экзонов, к которому далее был добавлен список координат удерживаемых интронов, альтернативных первых и альтернативных последних экзонов.

При помощи пакета *GenomicRanges v.1.32.3* [15] найденные координаты экспериментально детектированных EEJs сопоставлялись с координатами экзон-экзонных стыков в модельных РНК, и разрабо-

танный алгоритм определял каждый стык как относящийся или не относящийся к одному из следующих типов:

1) каноническое событие (canonical EEJ, CanEEJ), если координаты EEJs полностью соответствуют границам экзонов в модельной РНК;

2) альтернативный 5′-сайт сплайсинга (alternative 5′ splice site, Alt5′ss), если сплайсинг осуществляется с использованием донорного сайта (5′-границы интрона), не совпадающего с каким-либо донорным сайтом из описанной в модели канонической молекулы РНК;

3) альтернативный 3′-сайт сплайсинга (alternative 3′ splice site, Alt3′ss), если сплайсинг осуществляется с использованием акцепторного сайта (3′-границы интрона), не совпадающего с каким-либо акцепторным сайтом из описанной в модели канонической молекулы РНК;

4) пропуск кассетного экзона (cassette exon, CE), если в область экспериментально идентифицированного интрона попадают один или несколько пропущенных экзонов, имеющихся в модельной РНК;

5) альтернативный первый экзон (alternative first exon, AltFE), если 5′-сайт сплайсинга экспериментально идентифицированного экзон-экзонного стыка точно соответствует дистальной границе экзона из модельной РНК, аннотированного как альтернативный первый экзон, и при этом соответствующая граница не попадает в область, разделяющую границы каких-либо внутренних экзонов в модельных РНК;

6) альтернативный последний экзон (alternative last exon, AltLE), если 3′-сайт сплайсинга экспериментально идентифицированного экзон-экзонного стыка точно соответствует проксимальной границе экзона из модельной РНК, аннотированного как альтернативный последний экзон, и при этом соответствующая граница не попадает в область, разделяющую границы каких-либо внутренних экзонов в модельных РНК;

7) сохраняемый интрон (retained intron, RI), если в данных RNA-Seq сохраняются последовательности, которые являются интронами, т. е. должны вырезаться при сплайсинге для образования функционального продукта. Мы классифицировали событие как RI только в случае полного совпадения границ такого экзон-экзонного стыка с аннотированными сохраняемыми интронами согласно геномному браузеру Ensemble [13].

Альтернативные сплайсинговые события могут оказываться комплексными, сочетая в себе признаки одновременно нескольких типов альтернативного сплайсинга. Так, все события с вовлечением альтернативного первого экзона по определению имеют альтернативный донорный сайт. Аналогично вовлечение альтернативного последнего экзона подразумевает использование альтернативного акцепторного сайта. Также с использованием альтернативных донорных или акцепторных сайтов может сочетаться пропуск кассетного экзона; наконец, присутствуют и случаи сочетания в одном событии альтернативного донорного и акцепторного сайтов. На рис. 1 показаны распределения соответственно описанным типам событий сплайсинга, детектированных в двух клеточных линиях. Ввиду того что часть альтернативных EEJs являются комплексными по типу, общее число детектированных альтернативных событий меньше суммы числа событий каждого отдельного типа.

Результаты для обеих клеточных линий оказались существенно схожими: на долю альтернативных пришлось около 17 % всех EEJs, а наиболее часто встречающимся типом альтернативного сплайсинга оказался пропуск кассетного экзона, хотя и доля других типов событий альтернативного сплайсинга достаточно велика.

Следует отметить, что, хотя доля канонических событий заметно выше доли альтернативных событий в этих наборах данных, анализ числа чтений, подтверждающих каждый экзон-экзонный стык в данных RNA-Seq, отнюдь не показывает, что альтернативные варианты сплайсинга представлены существенно более редкими событиями, чем канонические. Сравнение распределения вероятностей по уровню экспрессии демонстрирует лишь небольшой (хотя и статистически достоверный согласно примененному тесту Манна – Уитни) сдвиг влево для альтернативных событий сплайсинга по сравнению с каноническими в обеих клеточных линиях (рис. 2). Медианы по количеству чтений для альтернативных и канонических EEJs в линии Kasumi-1 составили 89,7 и 101,7 соответственно, а в линии SEM – 95,7 и 120,3. Этот факт может служить подкрепляющим аргументом в пользу того, что альтернативный сплайсинг выполняет в клетках жизненно важные функции и подчинен механизмам автономной регуляции.

Анализ эпигенетических маркеров в клетках линий Kasumi-1 и SEM. Первичные данные с описанием эпигенетических маркеров в хроматине двух клеточных линий были собраны из открытых баз данных (см. раздел «Материалы и методы») (рис. 3). Наборы проанализированных маркеров оказались не слишком обширными, но разными, что позволило извлечь больше полезной информации при обработке данных. Единственным общим показателем здесь стало описание распределения CpG-островков – таковыми считают участки ДНК, обогащенные динуклеотидами ЦГ (цитозин-гуанозин). Мы решили включить CpG-островки в анализ, поскольку известна достаточно устойчивая тенденция

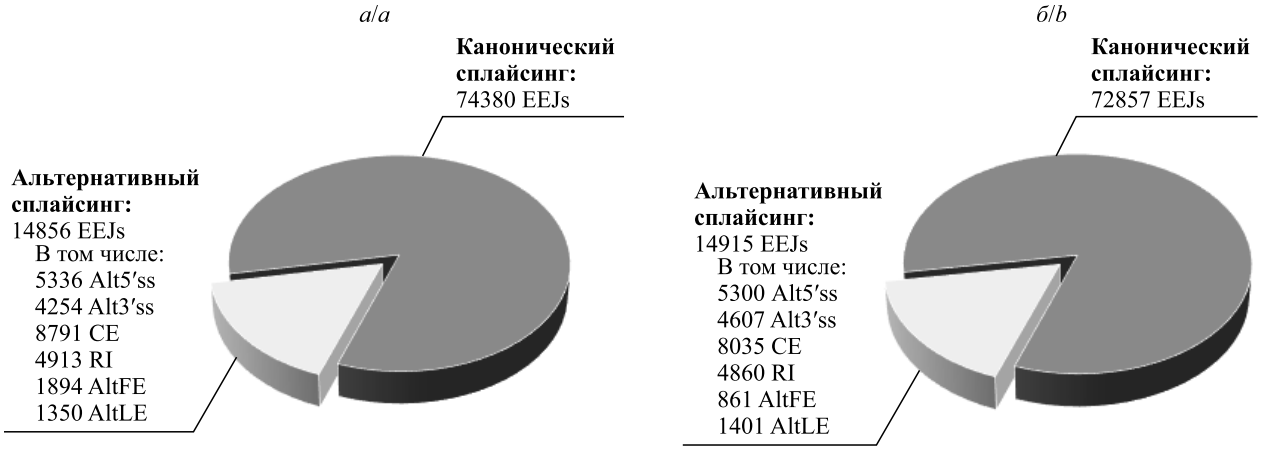


Рис. 1. Количественное распределение детектированных сплайсинговых событий по типам альтернативного сплайсинга для линий Kasumi-1 (*а*) и SEM (*б*):
EEJs – экзон-экзонные стыки; Alt5′ss – альтернативный 5′-сайт сплайсинга;
Alt3′ss – альтернативный 3′-сайт сплайсинга; CE – пропуск кассетного экзона; RI – сохраняемый интрон;
AltFE – альтернативный первый экзон; AltLE – альтернативный последний экзон

Fig. 1. Distribution of the detected splicing events according to types of alternative splicing for Kasumi-1 cell line (*a*) and for SEM cell line (*b*);
EEJs – exon-exon junctions; Alt5′ss – alternative 5′ splice site;
Alt3′ss – alternative 3′ splice site; CE – skipped cassette exon; RI – retained intron;
AltFE – alternative first exon; AltLE – alternative last exon

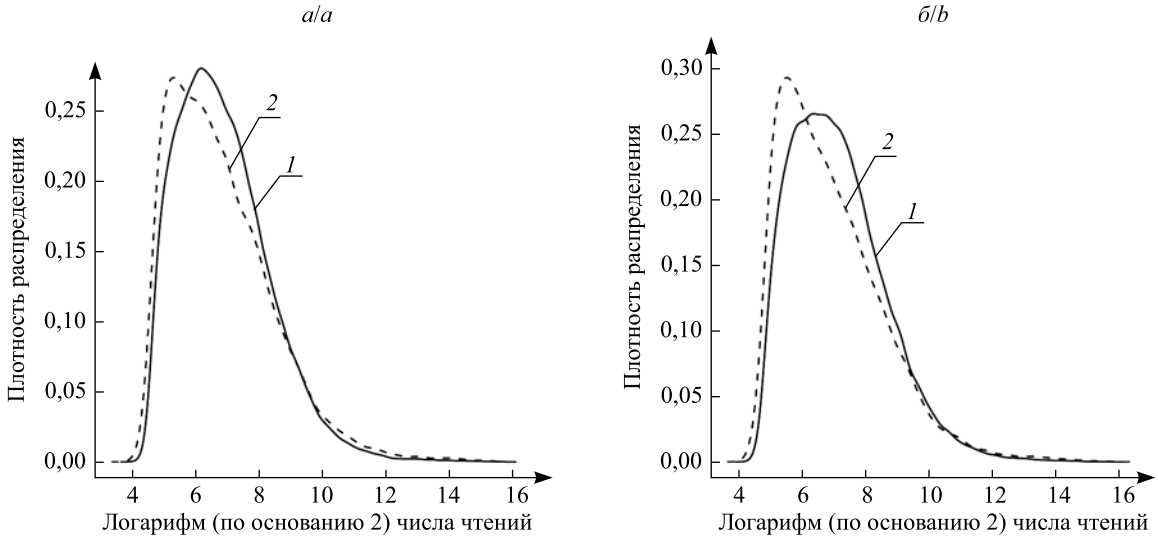


Рис. 2. Распределение канонических и альтернативных событий сплайсинга по уровню экспрессии в клетках линий Kasumi-1 (*а*) и SEM (*б*):
1 – канонические экзон-экзонные стыки; *2* – альтернативные экзон-экзонные стыки

Fig. 2. Distribution of canonical and alternative splicing events by expression level in the cell lines Kasumi-1 (*a*) and SEM (*b*):
1 – canonical exon-exon junctions; *2* – alternative exon-exon junctions

к поддержанию слабокомпактизованного состояния хроматина и пониженного метилирования ДНК в большинстве таких участков.

Остальные данные – это преимущественно пики, выявляемые методом иммунопреципитации хроматина (ChIP-Seq) с антителами, связывающими те или иные белки хроматина. В частности, метилированные или ацетилированные формы гистонов или белки, имеющие сродство к неметилированным CpG-островкам (этот анализ называется BioCAP). Также, исходя из особенностей конкретных клеточных линий, были использованы антитела к продуктам гибридных онкогенов, образующихся вследствие специфических хромосомных транслокаций. Эти белки, как было сказано выше, функционируют как транскрипционные факторы, способствуя ацетилированию (в случае белка KMT2A-AFF1 в линии SEM) или деацетилированию (в случае белка RUNX1-RUNX1T1 в линии Kasumi-1) гистонов.

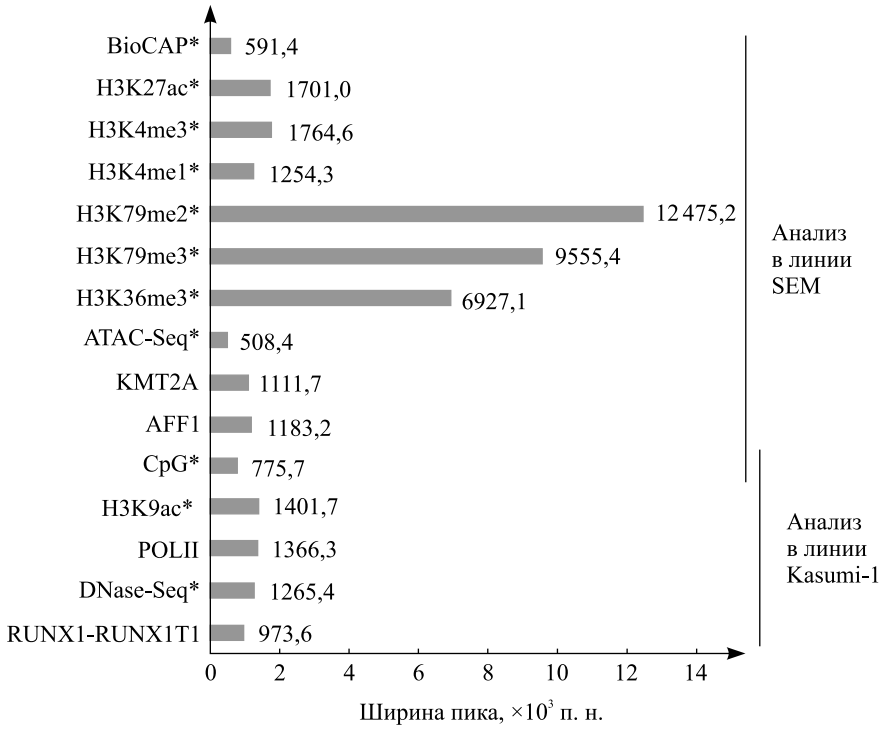


Рис. 3. Эпигенетические маркеры, проанализированные в клетках линий Kasumi-1 и SEM.
Слева указаны обозначения проанализированных маркеров.
Знаком * отмечены маркеры, которые ассоциируются с открытым хроматином

Fig. 3. Epigenetic markers studied in the Kasumi-1 and SEM cell lines.
Marks names are indicated on the left.
Asterisks indicate the marks associated with opened chromatin

Для линии Kasumi также использованы данные по пикам РНК полимеразы II – ее присутствие указывает на наличие в соответствующем участке активной транскрипции. В то же время пики РНК полимеразы II в транскрибируемом гене располагаются дискретно вследствие того, что фермент движется вдоль гена с разной скоростью. Пик выявляется с большей вероятностью в тех участках, где фермент движется медленнее. Это важный момент, поскольку, как уже было сказано выше, скорость транскрипции оказывает влияние на характер сплайсинга. Еще две использованные при исследовании группы данных – результаты анализа на чувствительность к ДНКазе (DNase-Seq) или транспозазе (англ. *assay for transposase-accessible chromatin*, ATAC-Seq), пики в таких анализах соответствуют участкам наиболее открытого (декомпактизованного) хроматина, доступного для взаимодействия с различными белками нуклеоплазмы. Отмечается также, что открытость хроматина облегчает продвижение РНК полимеразы II и повышает локальную скорость транскрипции.

На рис. 3 показана ширина пиков учтенных маркеров, и можно заметить, что этот показатель значительно варьирует. Особенно высокими значениями выделяются пики маркеров H3K79me2, H3K79me3 и H3K36me3. Согласно литературным данным, эти маркеры имеют тенденцию к распределению вдоль тела экспрессирующихся генов, при этом их функция разнопланова, включая контроль скорости транскрипции и регуляцию сплайсинга [5–7; 16].

Анализ распределения эпигенетических маркеров относительно интронов и сайтов сплайсинга. Перекрывание пиков маркеров с интронами и сайтами сплайсинга определялось с использованием пакета *GenomicRanges v.1.32.3* [15]. При этом следовало выяснить, будут ли обнаруживаться какие-либо корреляции в распределении эпигенетических маркеров относительно реализуемых канонических и альтернативных событий сплайсинга.

На первом этапе было проверено, как распределены пики в области интронов, ограниченных детектированными EEJs. Проведенная классификация EEJs позволила дифференциально оценить и сравнить частоту присутствия каждого типа маркера в канонических и альтернативных интронах (рис. 4). Как можно заметить, наиболее стабильным для всех интронов маркером является гистон 3 с триметилированием по лизину 36 – H3K36me3. Остальные маркеры присутствуют лишь в половине интронов или менее. Однако разница между частотой маркирования канонических интронов и альтернативных очевидна и статистически достоверна. В целом можно отметить, что маркеры, свойственные открытому хроматину, лишь очень редко присутствуют в канонических интронах, несколько чаще – в сохраняемых

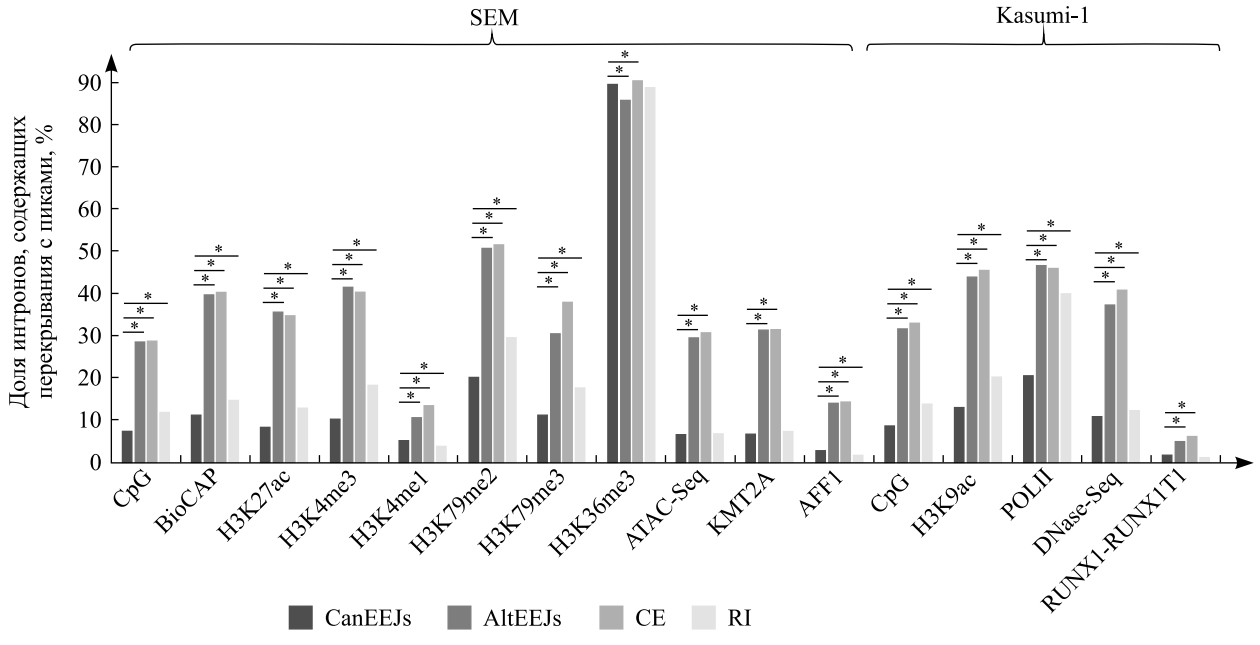


Рис. 4. Распределение эпигенетических маркеров в интронах экспрессирующихся генов: CanEEJs – интроны, образующиеся при канонических событиях сплайсинга; AltEEJs – интроны, образующиеся при различных вариантах альтернативного сплайсинга; CE – интроны, образующиеся при сплайсинге с пропуском кассетного экзона; RI – сохраняемые интроны; * – различия в значениях по указанному маркеру достоверны при $p < 0{,}001$

Fig. 4. Distribution of epigenetic marks in introns of expressed genes: CanEEJs – introns formed during the canonical events of splicing; AltEEJs – introns forming with different alternative splicing variants; CE – introns formed during splicing with a cassette exon skip; RI – retained introns; * – difference in value for the specified mark is significant at $p < 0.001$

интронах и значительно чаще (в 2–3 раза) – в интронах, образующихся при иных типах альтернативного сплайсинга, в частности включая случаи сплайсинга с пропуском кассетного экзона.

Нужно заметить, что между интронами, образованными каноническим и альтернативным сплайсингом некоторых типов, есть существенная разница в размерах: например, если средний размер канонических интронов составляет около 3,4 т. п. н., то для интронов с пропущенным кассетным экзоном средний размер примерно в 3,5 раза превышает эту величину, а сохраняемые интроны в основном очень короткие (до нескольких сот нуклеотидов), в среднем в 8 раз короче по сравнению со средними каноническими. Это может отчасти объяснять те различия в частоте обнаружения пиков в таких интронах (см. рис. 4).

Дополнительно был проведен анализ средней плотности пиков в интроне – под плотностью здесь понимается суммарная ширина областей (пиков), несущих тот или иной маркер, попадающая в интрон, деленная на ширину соответствующего интрона. Итоговую плотность выражали в виде процентных величин (доля ширины интрона, несущая маркер) (рис. 5). Можно заметить, что многие маркеры открытого хроматина (BioCAP, H3K27ac и H3K9ac, H3K4me3, области повышенной чувствительности к ДНКазе и транспозазе) дают более высокие значения плотности в интронах, образованных при альтернативном сплайсинге, чем при каноническом. Однако в случае интронов с пропуском кассетных экзонов по некоторым маркерам значения схожи с таковыми для канонического сплайсинга. Сохраняемые интроны также в основном характеризуются более высокой плотностью маркеров, что может отчасти объясняться их небольшим размером. Значительно более высокая плотность пиков РНК полимеразы в сохраняемых интронах, по сравнению с каноническими, может иметь несколько потенциальных объяснений, которые еще предстоит проверить, в частности: 1) повышенная экспрессия генов, в которых присутствует сплайсинг такого типа; 2) замедление движения РНК полимеразы в соответствующих участках.

Как и следовало ожидать (исходя из литературных данных), наиболее высоко представлены в интронах всех типов такие маркеры, как H3K79me2, H3K79me3 и H3K36me3. При этом маркирование по H3K79me2 и H3K79me3 оказывается повышенным, а по H3K36me3 – пониженным в случае альтернативного сплайсинга, за исключением сохраняемых интронов, для которых плотность маркера H3K36me3 не отличается от таковой для канонических интронов.

В дальнейшем анализировалось маркирование тех участков ДНК, которые непосредственно формируют сайты сплайсинга. Сопоставляли маркирование донорных и акцепторных сайтов сплайсинга (рис. 6). Результаты получали в виде доли сайтов, обнаруживших перекрывание с пиками каждого типа маркера.

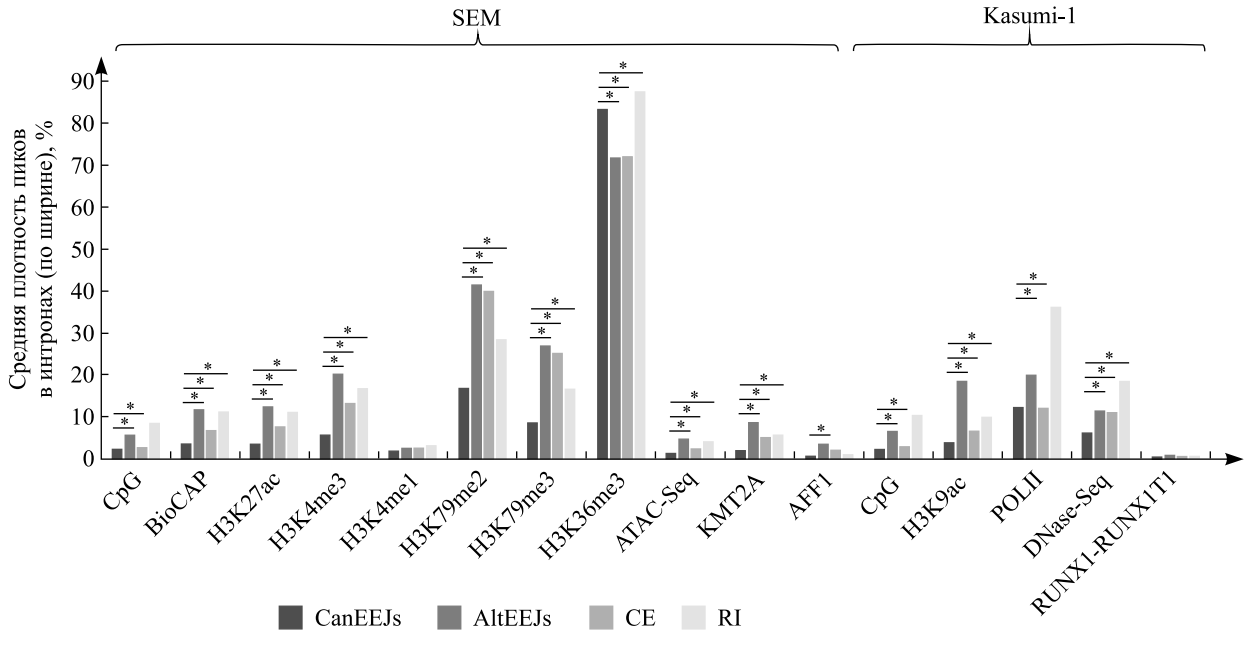


Рис. 5. Плотность пиков маркеров в интронах экспрессирующихся генов:
CanEEJs – интроны, образующиеся при канонических событиях сплайсинга;
AltEEJs – интроны, образующиеся при различных вариантах альтернативного сплайсинга;
CE – интроны, образующиеся при сплайсинге с пропуском кассетного экзона; RI – сохраняемые интроны;
* – различия в значениях по указанному маркеру достоверны при $p < 0{,}001$

Fig. 5. Density of the epigenetic marks in introns of expressed genes:
CanEEJs – introns formed during the canonical events of splicing;
AltEEJs – introns forming with different alternative splicing variants;
CE – introns formed during splicing with a cassette exon skip;
RI – retained introns; * – difference in value for the specified mark is significant at $p < 0.001$

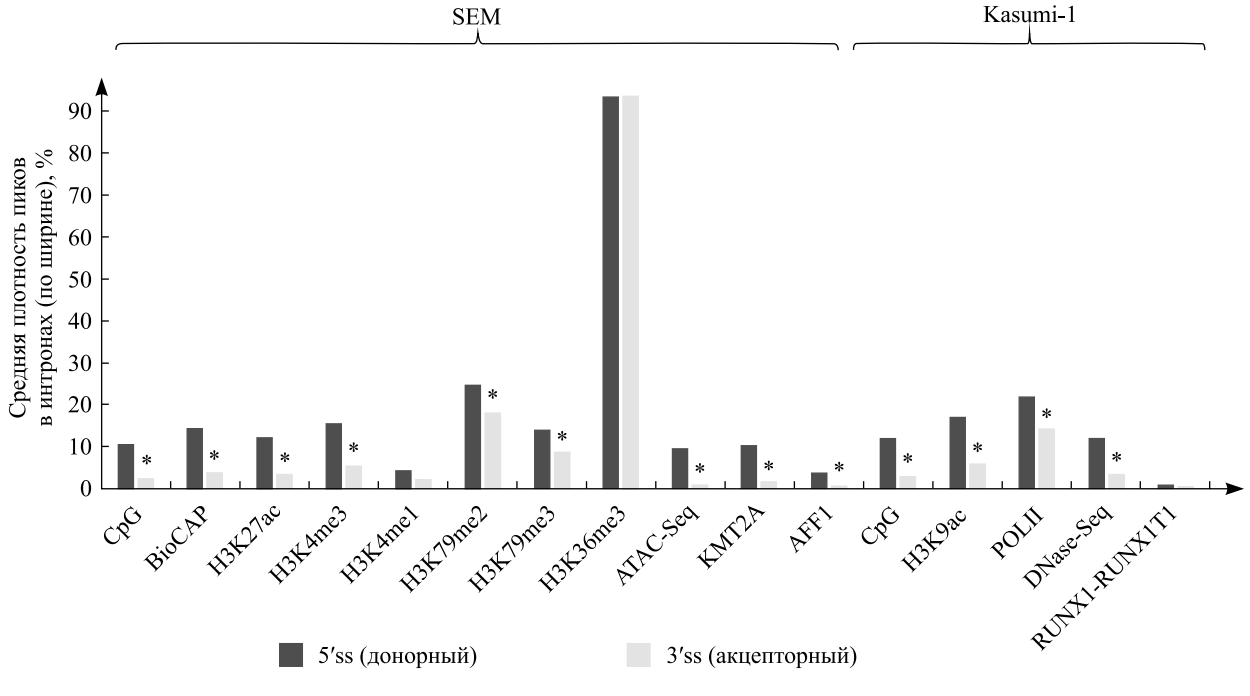


Рис. 6. Распределение эпигенетических маркеров
на донорных и акцепторных сайтах сплайсинга.
* – различия в значениях по указанному маркеру достоверны при $p < 0{,}001$

Fig. 6. Distribution of epigenetic markers at donor and acceptor splice sites.
* – difference in value for the specified mark is significant at $p < 0.001$

Единственным маркером, который был представлен на преобладающем количестве сайтов сплайсинга (как донорных, так и акцепторных), оказался H3K36me3. Остальные маркеры присутствуют не более чем на 22 % донорных и не более чем на 17 % акцепторных сайтов. Вместе с тем вероятность присутствия маркеров на донорных сайтах для всех маркеров, свойственных открытому хроматину, заметно и достоверно выше, чем для акцепторных сайтов. Эта закономерность показана здесь впервые и заслуживает особого внимания с точки зрения потенциально новых механизмов детерминации сайтов сплайсинга.

Также проведен отдельный анализ для донорных сайтов сплайсинга в области соединения первого и второго экзонов для всех генов, т. е. первого экзон-экзонного стыка. При этом сопоставлялось маркирование сайтов сплайсинга для канонических первых экзонов и альтернативных первых экзонов (рис. 7). Оказалось, что эти участки принципиально отличаются от общей выборки сайтов сплайсинга: здесь частота присутствия маркеров открытого хроматина оказывается гораздо более высокой (свыше 70 %), а маркер H3K36me3, наоборот, встречается значительно реже (примерно в 50 % сайтов). Это согласуется с литературными данными о том, что хроматин в начальных участках гена, как правило, находится в более открытом состоянии, чем в большей части своей длины.

Можно также обратить внимание на высокую частоту обнаружения в области первого EEJ белкового продукта гена KMT2A-AFF4 – эпигенетического активатора в линии SEM – и в то же время очень низкую частоту присутствия в таких участках гибридного белка RUNX1-RUNX1T1 (репрессора транскрипции) в Kasumi-1. Уровень маркера H3K4me1 также низкий – этот маркер несвойствен для хроматина в области экспрессионно активных генов.

Сравнивая данные по каноническим и альтернативным первым экзонам между собой, можно отметить достоверное снижение частоты маркеров активного хроматина и одновременно повышение частоты маркера H3K36me3 в случае вовлечения альтернативных первых экзонов. По-видимому, это соответствует преимущественно более высокой экспрессионной активности канонических первых экзонов.

Последние два графика (рис. 8 и 9) отражают сравнительный анализ маркирования донорных и акцепторных сайтов сплайсинга соответственно. В каждом случае сравнивали маркирование вовлеченных канонических и альтернативных сайтов сплайсинга, и в обоих случаях обнаружился достоверный перевес по частоте присутствия маркеров открытого хроматина в альтернативных сайтах по сравнению с каноническими, но разница гораздо более выражена для донорных сайтов (см. рис. 8), чем для акцепторных (см. рис. 9). Маркер H3K36me3 преобладал в канонических донорных сайтах по сравнению с альтернативными донорными сайтами сплайсинга, а для акцепторных разница по этому маркеру практически отсутствует.

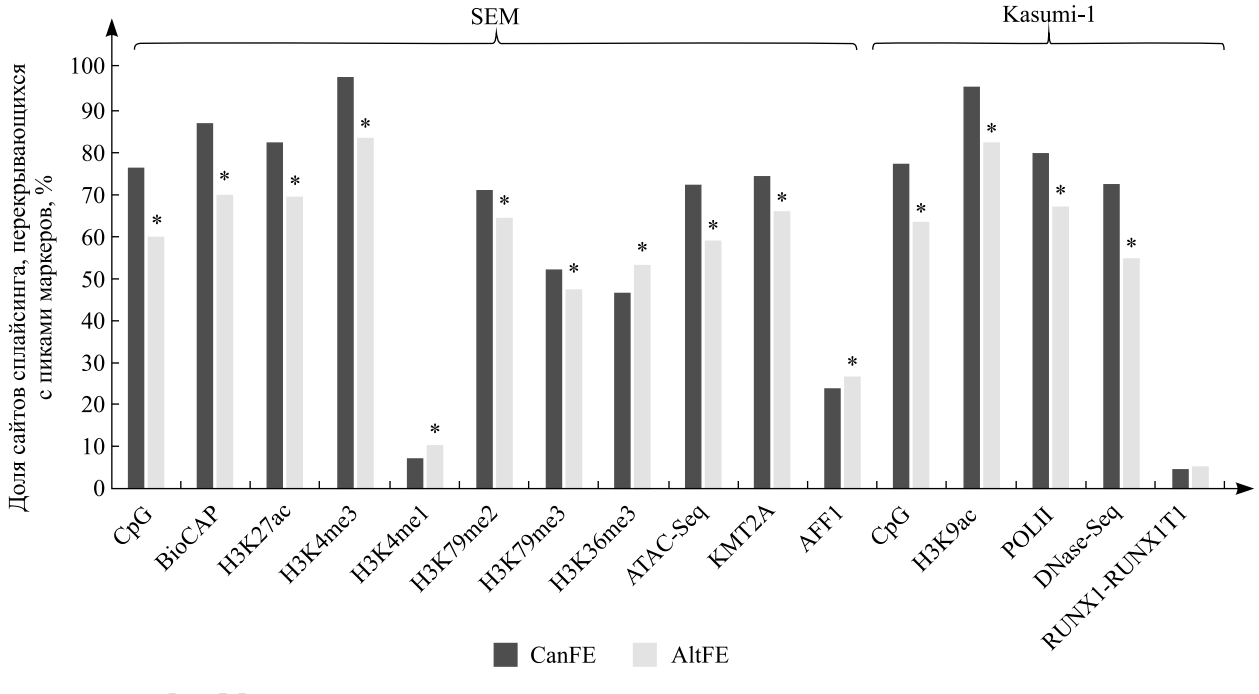


Рис. 7. Распределение эпигенетических маркеров на дистальных границах первых экзонов:
CanFE – канонический первый экзон; AltFE – альтернативный первый экзон;
* – различия в значениях по указанному маркеру достоверны при $p < 0{,}001$

Fig. 7. Distribution of epigenetic markers at the distal boundaries of the first exons:
CanFE – canonical first exon; AltFE – alternative first splicing exon;
* – difference in value for the specified mark is significant at $p < 0.001$

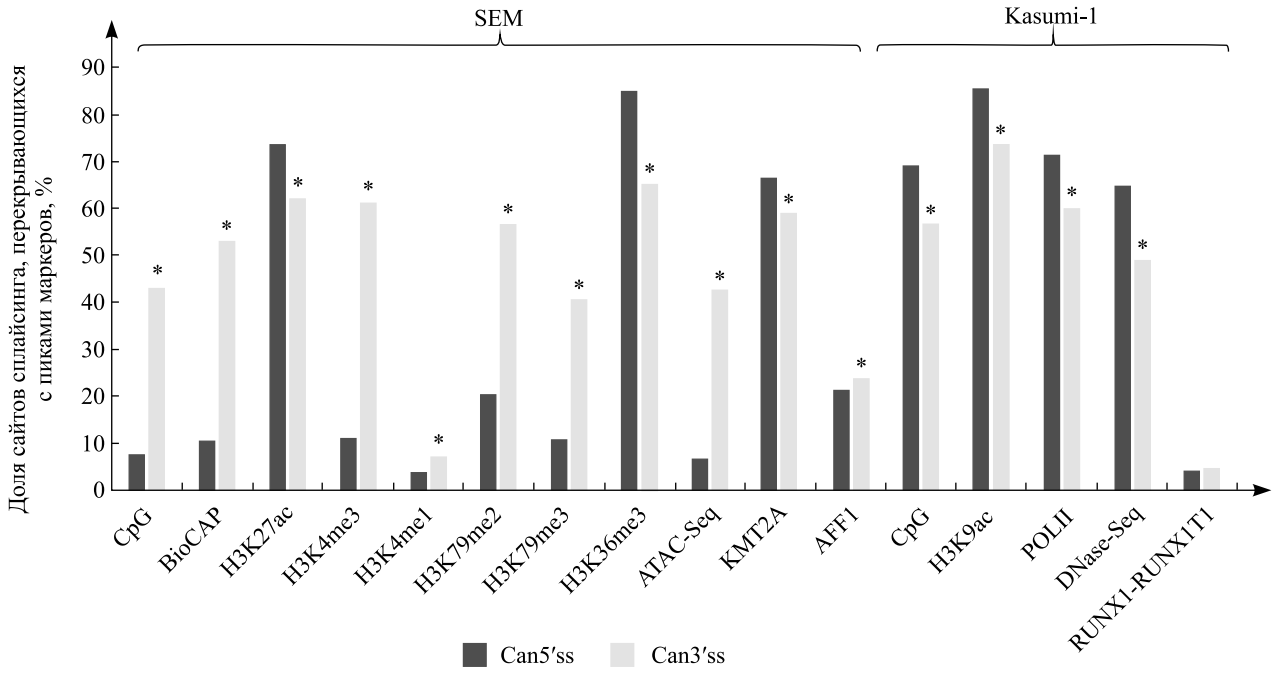


Рис. 8. Распределение эпигенетических маркеров в области донорных сайтов сплайсинга:
Can3′ss – канонический акцепторный сайт сплайсинга;
Alt3′ss – альтернативный акцепторный сайт сплайсинга;
* – различия в значениях по указанному маркеру достоверны при $p < 0{,}001$

Fig. 8. Distribution of epigenetic markers in the field of splice donor sites:
Can3′ss is the canonical acceptor splice site; Alt3′ss is the alternative acceptor site splicing;
* – difference in value for the specified mark is significant at $p < 0.001$

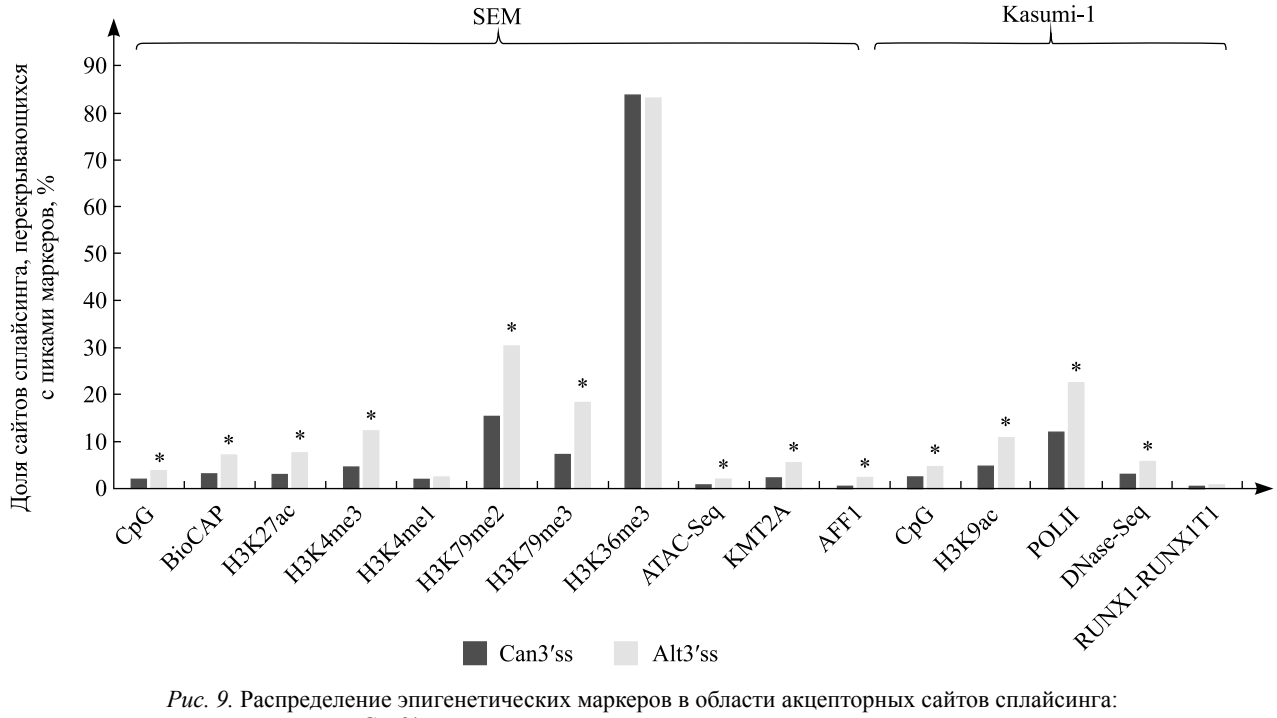


Рис. 9. Распределение эпигенетических маркеров в области акцепторных сайтов сплайсинга:
Can3′ss – канонический акцепторный сайт сплайсинга;
Alt3′ss – альтернативный акцепторный сайт сплайсинга;
* – различия в значениях по указанному маркеру достоверны при $p < 0{,}001$

Fig. 9. Distribution of epigenetic markers in the area of splicing acceptor sites:
Can3′ss is the canonical acceptor splice site;
Alt3′ss is the alternative acceptor site splicing;
* – difference in value for the specified mark is significant at $p < 0.001$

Заключение

Из результатов проведенных анализов можно вывести некоторые общие закономерности, связывающие между собой эпигенетические процессы и паттерны распределения событий сплайсинга.

1. Канонические и разные типы альтернативных событий сплайсинга количественно распределяются очень схожим образом в двух проанализированных клеточных типах, хотя они относятся к разным формам онкологических заболеваний крови и связываются с разными генетическими причинами: в линии SEM острого лимфобластного лейкоза транслокация формирует ген, работающий в качестве эпигенетического активатора, а в линии Kasumi-1 острого миелоидного лейкоза другая транслокация создает гибридный ген для белка с функцией эпигенетического репрессора.

2. Маркирование хроматина в области сайтов сплайсинга также демонстрирует схожие паттерны в двух анализируемых клеточных линиях. В частности, это касается особенностей распределения в области интронов и сайтов сплайсинга проанализированных маркеров открытого хроматина, таких как ацетилирование гистона 3 (анализировался маркер H3K27ac в линии SEM и H3K9ac в линии Kasumi-1), которое благоприятствует, как известно, переходу хроматина в более открытое состояние, а также тесты на чувствительность к транспозазе (ATAC-Seq) или ДНКазе (DNase-Seq) в линиях SEM и Kasumi-1 соответственно, которые являются двумя взаимозаменяемыми вариантами детекции открытого хроматина.

3. Выявлены следующие закономерности в распределении эпигенетических маркеров:

• присутствие маркеров открытого хроматина в целом нехарактерно для сайтов сплайсинга на границах внутренних экзонов, при этом донорные сайты сплайсинга содержат такие маркеры заметно чаще, чем акцепторные;

• маркеры открытого хроматина с существенно более высокой частотой присутствуют на альтернативных сайтах сплайсинга, чем на канонических;

• границы первых альтернативных экзонов, напротив, реже несут маркеры активного хроматина по сравнению с каноническими первыми экзонами;

• маркеры H3K36me3, H3K79me2 и H3K79me3 отличаются от остальных очень широкими пиками, покрывая собой значительную часть тела экспрессирующихся генов. Маркер H3K36me3 в большинстве случаев демонстрирует противоположную направленность изменения по сравнению с маркерами открытого хроматина в проведенных анализах. Это указывает на его возможное значение в качестве фактора, поддерживающего не слишком развернутое состояние хроматина в области тела гена и замедляющего процесс транскрипции. В то же время маркеры H3K79me2 и H3K79me3 изменяются в положительной корреляции с маркерами открытого хроматина. Их функция в качестве регуляторов транскрипции и сплайсинга пока недостаточно ясна и представляет большой интерес для будущих исследований.

Библиографические ссылки

1. Hyung D, Kim J, Cho SY, Park C. ASpedia: a comprehensive encyclopedia of human alternative splicing. *Nucleic Acids Research*. 2018 January 4;46(D1):D58–D63. DOI: 10.1093/nar/gkx1014.

2. Ramanouskaya TV, Grinev VV. The determinants of alternative RNA splicing in human cells. *Molecular Genetics and Genomics*. 2017 December;292(6):1175–1195. DOI: 10.1007/s00438-017-1350-0.

3. Grinev V, Ilyushonak I, Clough R, Nakjang S, Smink J, Martinez-Soria N, et al. RUNX1/RUNX1T1 controls alternative splicing in the t(8;21)-positive acute myeloid leukemia cells. *BioRxiv 628040* [Preprint]. 2019 [cited 2019 February 1]: [36 p.]. Available from: https://doi.org/10.1101/628040.

4. Listerman I, Sapra AK, Neugebauer KM. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2006 October;13(9):815–822. DOI: 10.1038/nsmb1135.

5. Veloso A, Kirkconnell KS, Magnuson B, Biewen B, Paulsen MT, Wilson TE, et al. Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Research*. 2014;24:896–905. DOI: 10.1101/gr.171405.113.

6. Iwamori N, Tominaga K, Sato T, Riehle K, Iwamori T, Ohkawa Ya, et al. MRG15 is required for pre-mRNA splicing and spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016 September 13;113(37):E5408–E5415. DOI: 10.1073/pnas.1611995113.

7. Sanidas I, Polytarchou C, Hatziapostolou M, Ezell SA, Kottakis F, Hu L, et al. Phosphoproteomics screen reveals akt isoform-specific signals linking RNA processing to lung cancer. *Molecular Cell*. 2014 February 20;53(4):577–590. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.12.018.

8. Kouwe E, Staber PhB. RUNX1-ETO: attacking the epigenome for genomic instable leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2):350. DOI: 10.3390/ijms20020350.

9. Kerry J, Godfrey L, Repapi E, Tapia M, Blackledge NP, Ma H, et al. MLL-AF4 spreading identifies binding sites that are distinct from super-enhancers and that govern sensitivity to DOT1L inhibition in leukemia. *Cell Reports*. 2017 January 10;18(2):482–495. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.054.

10. Гринев ВВ, Хайденрайх О. Нокдаун гибридного онкогена *KMT2A-AFF1* ассоциирован с дифференциальным сплайсингом РНК в клетках острого лимфобластного лейкоза человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2017;3:21–27.

11. Ptasinska A, Assi SA, Mannari D, James SR, Williamson D, Dunne J, et al. Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia*. 2012;26(8):1829–1841. DOI: 10.1038/leu.2012.49.

12. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*. 2013 May 1;41(10):e108. DOI: 10.1093/nar/gkt214.

13. Гринев ВВ. Сохранение интронов в транскриптоме лейкозных и нормальных клеток крови человека. *Молекулярная и прикладная генетика.* 2018;25:44–55.

14. Benito JM, Godfrey L, Kojima K, Hogda L, Wunderlich M, Geng H, et al. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias Activate BCL-2 through H3K79 Methylation and Are Sensitive to the BCL-2-Specific Antagonist ABT-199. *Cell Reports*. 2015 December 29;13(12):2715–2727. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.003.

15. Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al. Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLOS Computational Biology*. 2013;9(8):e1003118. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003118.

16. Li T, Liu Q, Garza N, Kornblau S, Jin VX. Integrative analysis reveals functional and regulatory roles of H3K79me2 in mediating alternative splicing. *Genome Medicine*. 2018;10:30. DOI: 10.1186/s13073-018-0538-1.

References

1. Hyung D, Kim J, Cho SY, Park C. ASpedia: a comprehensive encyclopedia of human alternative splicing. *Nucleic Acids Research*. 2018 January 4;46(D1):D58–D63. DOI: 10.1093/nar/gkx1014.

2. Ramanouskaya TV, Grinev VV. The determinants of alternative RNA splicing in human cells. *Molecular Genetics and Genomics*. 2017 December;292(6):1175–1195. DOI: 10.1007/s00438-017-1350-0.

3. Grinev V, Ilyushonak I, Clough R, Nakjang S, Smink J, Martinez-Soria N, et al. RUNX1/RUNX1T1 controls alternative splicing in the t(8;21)-positive acute myeloid leukemia cells. *BioRxiv 628040* [Preprint]. 2019 [cited 2019 February 1]: [36 p.]. Available from: https://doi.org/10.1101/628040.

4. Listerman I, Sapra AK, Neugebauer KM. Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2006 October;13(9):815–822. DOI: 10.1038/nsmb1135.

5. Veloso A, Kirkconnell KS, Magnuson B, Biewen B, Paulsen MT, Wilson TE, et al. Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Research*. 2014;24:896–905. DOI: 10.1101/gr.171405.113.

6. Iwamori N, Tominaga K, Sato T, Riehle K, Iwamori T, Ohkawa Ya, et al. MRG15 is required for pre-mRNA splicing and spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016 September 13;113(37):E5408–E5415. DOI: 10.1073/pnas.1611995113.

7. Sanidas I, Polytarchou C, Hatziapostolou M, Ezell SA, Kottakis F, Hu L, et al. Phosphoproteomics screen reveals akt isoform-specific signals linking RNA processing to lung cancer. *Molecular Cell*. 2014 February 20;53(4):577–590. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.12.018.

8. Kouwe E, Staber PhB. RUNX1-ETO: attacking the epigenome for genomic instable leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(2):350. DOI: 10.3390/ijms20020350.

9. Kerry J, Godfrey L, Repapi E, Tapia M, Blackledge NP, Ma H, et al. MLL-AF4 spreading identifies binding sites that are distinct from super-enhancers and that govern sensitivity to DOT1L inhibition in leukemia. *Cell Reports*. 2017 January 10;18(2):482–495. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.054.

10. Grinev VV, Heidenreich O. The knockdown of the fusion oncogene *KMT2A-AFF1* is associated with differential RNA splicing in human acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2017;3:21–27. Russian.

11. Ptasinska A, Assi SA, Mannari D, James SR, Williamson D, Dunne J, et al. Depletion of RUNX1/ETO in t(8;21) AML cells leads to genome-wide changes in chromatin structure and transcription factor binding. *Leukemia*. 2012;26(8):1829–1841. DOI: 10.1038/leu.2012.49.

12. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*. 2013 May 1;41(10):e108. DOI: 10.1093/nar/gkt214.

13. Grinev VV. Intron retention in the transcriptome of leukemic and normal human blood cells. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*. 2018;25:44–55. Russian.

14. Benito JM, Godfrey L, Kojima K, Hogda L, Wunderlich M, Geng H, et al. MLL-Rearranged Acute Lymphoblastic Leukemias Activate BCL-2 through H3K79 Methylation and Are Sensitive to the BCL-2-Specific Antagonist ABT-199. *Cell Reports*. 2015 December 29;13(12):2715–2727. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.003.

15. Lawrence M, Huber W, Pagès H, Aboyoun P, Carlson M, Gentleman R, et al. Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLOS Computational Biology*. 2013;9(8):e1003118. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003118.

16. Li T, Liu Q, Garza N, Kornblau S, Jin VX. Integrative analysis reveals functional and regulatory roles of H3K79me2 in mediating alternative splicing. *Genome Medicine*. 2018;10:30. DOI: 10.1186/s13073-018-0538-1.

Статья поступила в редколлегию 25.05.2019.
Received by editorial board 25.05.2019.

Биоразнообразие

Biodiversity

УДК 581.95:582.683.2(476)

CARDAMINE OCCULTA HORNEM. – НОВЫЙ ДЛЯ ФЛОРЫ БЕЛАРУСИ АДВЕНТИВНЫЙ ВИД МЕЛКОЦВЕТКОВЫХ СЕРДЕЧНИКОВ (*CARDAMINE* L., BRASSICACEAE)

М. А. ДЖУС[1)]

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

Проведена ревизия видового состава мелкоцветковых растений рода *Cardamine* L. (Brassicaceae) во флоре Беларуси. По гербарным данным составлены карты распространения на территории республики видов данной группы (*Cardamine parviflora* L., *C. hirsuta* L., *C. flexuosa* With., *C. impatiens* L.). Новый чужеродный, восточноазиатский по происхождению сорный вид *C. occulta* Hornem. впервые указывается для Турции (г. Сиде) и Беларуси, где он был собран в 2010 г. на территории Березинского биосферного заповедника и в г. Минске. Ранее вид обычно ошибочно определялся как *C. hirsuta.* Отмечены основные диагностические признаки *C. occulta* и его отличия от морфологически сходных мелкоцветковых видов сердечников. Весьма вероятно дальнейшее распространение по всей территории Беларуси *C. occulta* и *C. hirsuta* с посадочным материалом декоративных растений.

Ключевые слова: *Cardamine occulta*; мелкоцветковые сердечники; флора Беларуси; распространение; чужеродные виды.

CARDAMINE OCCULTA HORNEM. – A NEW ALIEN SMALL FLOWERED BITTERCRESS (*CARDAMINE* L., BRASSICACEAE) OF THE BELARUSIAN FLORA

M. A. DZHUS[a]

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

Образец цитирования:
Джус МА. *Cardamine occulta* Hornem. – новый для флоры Беларуси адвентивный вид мелкоцветковых сердечников (*Cardamine* L., Brassicaceae). *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:82–88.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-82-88

For citation:
Dzhus MA. *Cardamine occulta* Hornem. – a new alien small flowered bittercress (*Cardamine* L., Brassicaceae) of the Belarusian flora. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:82–88. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-82-88

Автор:
Максим Анатольевич Джус – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры ботаники биологического факультета.

Author:
Maxim A. Dzhus, PhD (biology), docent; associate professor at the department of botany, faculty of biology.
dzhus_maxim@mail.ru

Brief revision of small flowered bittercresses (*Cardamine* L., Brassicaceae) in Belarusian flora is carried out. Distribution maps of all species from this group in Belarus (*Cardamine parviflora* L., *C. hirsuta* L., *C. flexuosa* With., *C. impatiens* L.) based from the herbarium material are presented. Alien East Asian weedy species *C. occulta* Hornem. (Brassicaceae) is mentioned for the flora of Turkey (Side village) and Belarus for the first time. The species was collected in Belarus in 2010 in Minsk city and on the territory of the Berezinsky biosphere reserve. Previously, *C. occulta* was often wrongly identified as *C. hirsuta*. The main diagnostic features of *C. occulta* and its differences from morphologically similar species of small flowered bittercresses are noted. Further expansion of *C. occulta* and *C. hirsuta* as a weeds with the container ornamental plants is very likely in future all over the territory of Belarus.

Keywords: *Cardamine occulta*; small flowered bittercresses; flora of Belarus; distribution; alien species.

Введение

Сердечник (*Cardamine* L.) – наиболее крупный род в семействе Brassicaceae, который насчитывает около 200 видов однолетних и многолетних травянистых растений, широко распространенных почти по всему земному шару, но главным образом в Евразии [1]. Некоторые виды рода, в том числе относящиеся к группе так называемых мелкоцветковых сердечников, являются сложными для диагностики, в связи с чем их состав и распространение во многих регионах остаются недостаточно изученными. Отдельные из них приводятся для флоры Беларуси лишь по старым или сомнительным гербарным сборам или литературным указаниям (*C. glanduligera* O. Schwarz, *C. quinquefolia* (M. Bieb.) Schmalh., *C. uliginosa* M. Bieb. и др.). На территории республики или вблизи нее проходят границы распространения видов *C. parviflora* L., *C. flexuosa* With., *C. hirsuta* L. и др. В последние годы в Беларуси, как и во многих других европейских странах, наблюдается активное расселение, преимущественно с посадочным материалом, декоративных растений, некоторых мелкоцветковых видов рода *Cardamine*. При изучении экземпляров, определяемых ранее как *C. hirsuta*, был выявлен прежде не указываемый для флоры Беларуси сердечник скрытый (*C. occulta* Hornem.).

Цель работы – ревизия видового состава мелкоцветковых растений рода *Cardamine* во флоре Беларуси. Задачи – установить видовой состав группы в республике, изучить особенности распространения, уточнить статус отдельных таксонов, динамику и способы их дальнейшего расселения на территории Беларуси, определить диагностические признаки, позволяющие надежно выявлять мелкоцветковые виды рода.

Материалы и методы исследований

Полевые флористические исследования видового состава рода *Cardamine* проводятся нами маршрутным методом с 1997 г. Собранный материал определялся с помощью диагностических ключей и рисунков, имеющихся в литературе [2–5]. При изучении адвентивных мелкоцветковых представителей рода обследовались питомники, садовые и дачные участки, ботанические сады и уличные насаждения, где выращивается посадочный материал древесных и травянистых плодово-ягодных и декоративных растений, привозимых из стран Центральной и Западной Европы. Собранный гербарный материал хранится в Гербарии кафедры ботаники БГУ (MSKU). В связи с тем что диагностика некоторых видов рода *Cardamine* ранее нередко проводилась с ошибками, нами при картировании распространения видов на территории республики использованы в основном гербарные материалы, хранящиеся в гербариях БГУ, Ботанического института имени В. Л. Комарова (LE), Московского государственного университета (MW), Института ботаники имени Н. Г. Холодного (KW), Гомельского государственного университета.

Результаты исследований и их обсуждение

Для Беларуси (с учетом литературных данных) указывается около 15 видов сердечников, из которых гербарными данными подтверждено 12 [2; 6; 7]. *Cardamine quinquefolia* (M. Bieb.) Schmalh. (=*Dentaria quinquefolia* M. Bieb.), по-видимому, ошибочно приводится для территории республики[1], а *C. glanduligera* O. Schwarz (=*Dentaria glandulosa* Waldst. et Kit.) известен лишь по старым (1825) гербарным сборам С. Б. Горского из окрестностей д. Дивин Кобринского района Брестской области[2]. Дикорастущие крупноцветковые растения рода представлены на территории республики охраняемым *C. bulbifera* (L.) Crantz (=*Dentaria bulbifera* L.), *C. amara* L. и группой морфологически сходных и еще недостаточно исследованных видов *C. dentata* Schult., *C. pratensis* L. и *C. submatthioli* (Tzvelev) Tzvelev.

[1]В Гербарии БГУ имеются сборы этого вида из Столбцовского (окрестность оз. Кромань) и Любанского (окрестность д. Мордвиловичи) районов. В обоих случаях вероятна путаница этикеток (ошибочное этикетирование места сбора).

[2]Хранится в Гербарии Вильнюсского университета (WI).

Все так называемые мелкоцветковые сердечники (*C. impatiens* L., *C. parviflora* L., *C. flexuosa* With., *C. hirsuta* L.), относимые иногда к отдельному подроду *Janchenia* V. I. Dorof, являются в Беларуси довольно редкими растениями [7].

Cardamine impatiens (сердечник недотроговый) – наиболее распространенный из дикорастущих мелкоцветковых сердечников во флоре Беларуси (рис. 1, *а*). Рассеянно встречается по всей территории республики и особенно характерен для тенистых оврагов и береговых склонов крупных рек.

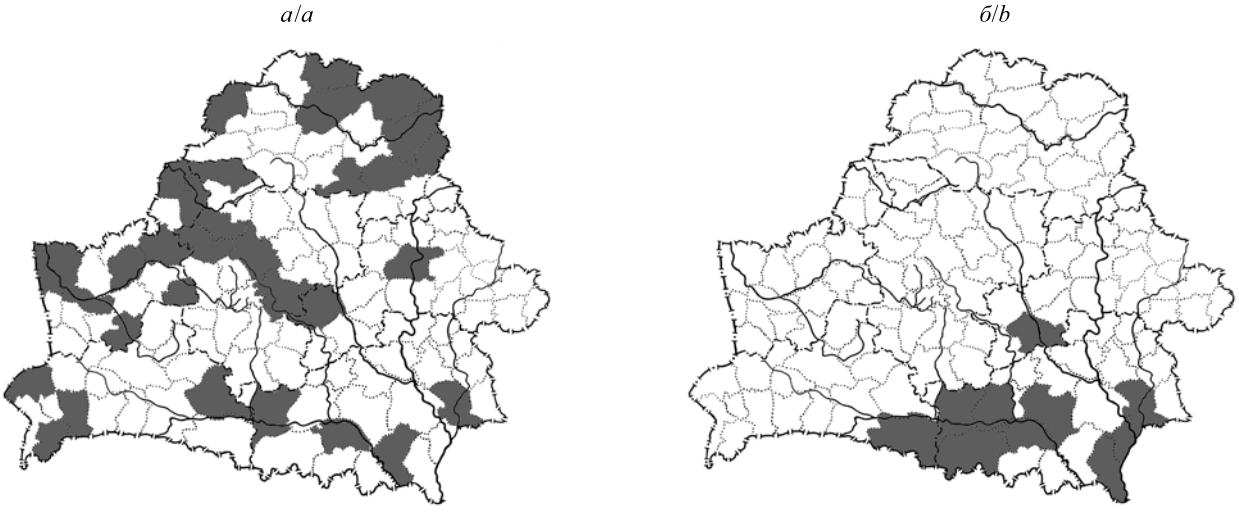


Рис. 1. Распространение *Cardamine impatiens* (*a*) и *C. parviflora* (*b*) на территории Беларуси
Fig. 1. Distribution of *Cardamine impatiens* (*a*) and *C. parviflora* (*b*) in Belarus

Cardamine parviflora (сердечник мелкоцветковый) – редкий аборигенный вид, произрастающий в Беларуси на северной границе ареала [8]. Встречается в основном на сыром заиленном аллювии в поймах крупных рек в юго-восточной части республики. Гораздо реже отмечается как сорное растение на сырых обнажениях торфа, полях, на дне спущенных рыборазводных прудов и т. п. Достоверно известен из Лоевского, Брагинского, Гомельского, Мозырского, Калинковичского, Петриковского, Житковичского, Лельчицкого районов Гомельской и Столинского района Брестской области (рис. 1, *б*).

Cardamine flexuosa (сердечник извилистый) – редкий вид, произрастающий в Беларуси в отдельных локалитетах на восточной границе европейской части ареала [8]. По гербарным и литературным данным отмечены места произрастания в Малоритском, Пружанском, Каменецком, Пинском районах Брестской области; Кличевском, Осиповичском, Бобруйском, Белыничском районах Могилёвской области; Речицком, Буда-Кошелевском, Светлогорском районах Гомельской области (рис. 2, *а*). Имеются литературные указания на произрастание вида в окрестности городов Лоева, Гродно и д. Кривошин (Барановичский район) [6]. Указание для окрестностей д. Велесницы Пинского района ошибочно и относится к *C. amara*.

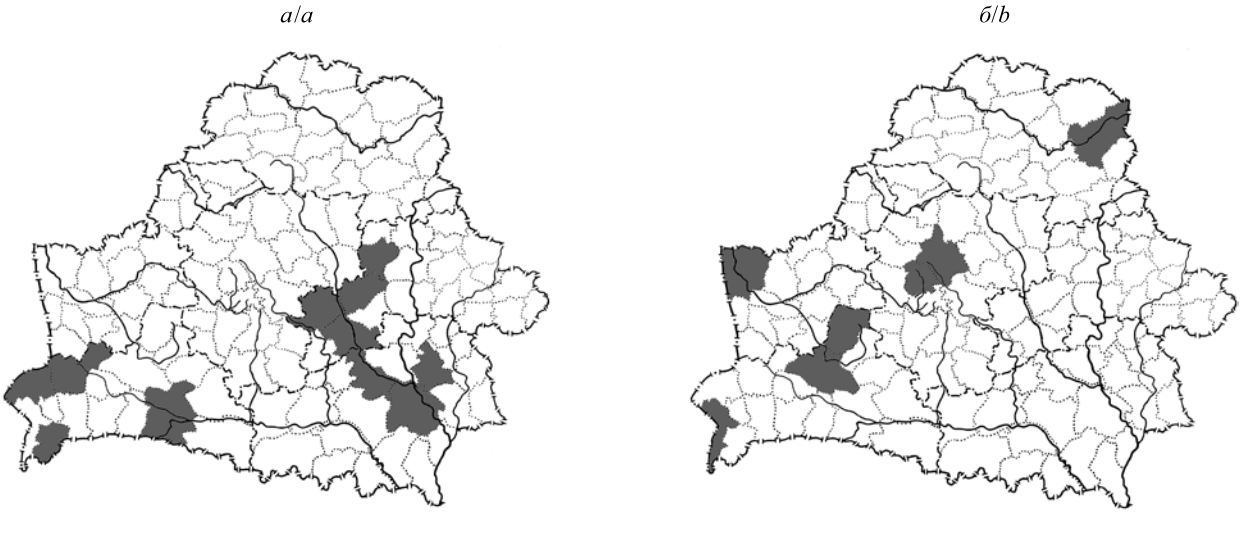


Рис. 2. Распространение *Cardamine flexuosa* (*a*) и *C. hirsuta* (*b*) на территории Беларуси
Fig. 2. Distribution of *Cardamine flexuosa* (*a*) and *C. hirsuta* (*b*) in Belarus

Cardamine hirsuta (сердечник шершавый) – редкий вид с неопределенным в Беларуси статусом, так как площадь республики находится непосредственно вблизи восточной границы ареала таксона [8]. Долгое время *C. hirsuta* ошибочно приводился для флоры Беларуси. Для территории республики впервые упоминается в работах Ж. Э. Жилибера для окрестности Гродно [9]. В последующих публикациях указывался для Беловежской пущи [10; 11], окрестности Могилёва [12], Кличевского района (с. Уболотье), Осиповичского района (Жорновская лесная дача) [6]. Имеющиеся в гербариях растения под таким названием чаще всего относятся к *C. amara* (сборы из окрестности Гродно и Могилёва) и реже – к *C. flexuosa* (Кличевский район).

Начиная примерно с 2005 г. *C. hirsuta* стал фиксироваться в Беларуси как сорняк в питомниках, на садовых участках и в ботанических садах, реже – в городских насаждениях декоративных растений. Во всех случаях основным вектором заноса является посадочный материал древесных и травянистых растений, привозимый из стран Центральной и Западной Европы (главным образом из питомников Польши и Голландии). Из первичных мест заноса (завоза с посадочным материалом) вид распространяется сперва вблизи мест культивирования или продажи растений, а далее с контейнерными растениями – в местах их высадки в открытый грунт. В настоящее время вид известен из Витебска (устное сообщение И. И. Шимко), Минска, Гродно, Бреста, Барановичей, пос. Телеханы (Ивацевичский район) (личные данные; [13]), населенных пунктов Дзержинского района (рис. 2, *б*).

Различные виды мелкоцветковых сердечников – одни из наиболее распространенных и обременительных сорняков в контейнерном цветоводстве, а также в оранжереях [14]. Начиная с конца 2000-х гг. в странах Европы регистрируется еще один заносный вид-неофит, таксономическая принадлежность которого была установлена относительно недавно [4; 5; 15–17]. К. Мархолдом и соавторами показано, что европейские и восточноазиатские популяции, традиционно называемые *C. flexuosa*, на самом деле принадлежат двум отдельным видам [16]. Установлено, что азиатские растения были описаны под названием *C. occulta* Hornem. еще в 1819 г. Йенсом В. Хорнеманом по экземплярам, выращенным в Копенгагенском ботаническом саду и происходящим из Китая. Наиболее ранние находки этого вида в Европе в качестве сорного растения датируются 1977 г. и происходят из Северной Италии, куда он, возможно, попал с импортируемым из Азии рисом, который выращивается также и в данном регионе Европы [17]. В азиатских странах (Китай, Япония, Вьетнам и др.) *C. occulta* является преимущественно сорняком рисовых полей. Последующее расширение ареала вида в Европе в основном обусловлено распространением его как сорного растения, связанным с промышленным цветоводством. В настоящее время вид в качестве заносного известен во многих странах преимущественно Центральной и Западной Европы (Голландия, Испания, Бельгия, Германия, Австрия, Франция, Великобритания, Чехия, Словакия, Греция, Швейцария, Италия, Швеция), а также в различных областях европейской части России и в других регионах земного шара (Северная и Центральная Америка, Южная Африка, Индия, Австралия и Новая Зеландия, Гавайские острова) [4; 5; 15–21]. В Гербарии БГУ имеются также сборы *C. occulta* из Турции (2013; г. Сиде), откуда этот вид ранее не указывался.

В последние годы *C. occulta* заселяет в Европе, помимо рудеральных местообитаний, прибрежно-водные биотопы вблизи озер (например, на Женевском озере в Швейцарии), прудов и других водоемов, где, по-видимому, условия временного затопления сходны с таковыми на рисовых полях [17].

В Беларуси (по данным Гербария БГУ) первые сборы *C. occulta* датируются 2010 г. Растения были собраны в Минске и в д. Домжерицы Лепельского района Витебской области. В последующие годы вид также собирался в Минске и его окрестностях вблизи деревень Птичи, Щемыслицы, Жуков Луг (см. раздел «Исследованный материал *C. occulta*»). В большинстве случаев собранные растения ранее ошибочно определялись как *C. hirsuta* [22]. В Беларуси *C. occulta* встречается в аналогичных условиях, что и *C. hirsuta*, а иногда и вместе с ним как сорняк в коммерческих питомниках и оранжереях (чаще всего в цветочных горшках), на садовых участках, коллекционных посадках, дендрариях и т. п. По всей видимости, занос его, как и *C. hirsuta*, на территории Беларуси связан с экспортом посадочного материала из Польши и Голландии. Любопытно, что для территории Польши данный вид пока не отмечен. В Беларуси, как и в других странах Европы, *C. occulta* является неофитом. Его расширение, возможно, большее. Поэтому необходим пересмотр гербарного материала по *C. hirsuta* из локалитетов, где этот вид указывается по данным литературы [13]. В отличие от России в Беларуси *C. occulta* является пока более редким видом и попал на территорию республики позже, чем *C. hirsuta* [21].

Вероятно, в последующие годы в связи с неконтролируемой интродукцией посадочного материала из Европы, а также последующим расселением (с посадочным материалом и почвой) из первичных центров заноса в Беларуси произойдет дальнейшее распространение обоих видов в республике. Весьма вероятно расширение спектра заселяемых биотопов, как это наблюдается в настоящее время для *C. hirsuta*, который, например, был уже обнаружен на газонах и слабосомкнутых синантропизированных луговых сообществах вблизи питомников.

В различных частях больших по размерам ареалов мелкоцветковые сердечники обладают значительным полиморфизмом и изменчивостью. Основными диагностическими признаками для их опреде-

ления являются форма и опушение сегментов листьев, наличие прикорневой розетки листьев, опушение стебля, количество тычинок, размеры и форма лепестков, длина плодоножек и угол, на который они отстоят от оси соцветия, длина и ширина стручков. В качестве хороших диагностических признаков могут использоваться также характер местообитания и число хромосом [5; 15–18]. На основании литературных данных [3; 15–18] и изучения гербарного материала приводим основные отличия *C. occulta* от морфологически сходных видов сердечников, встречающихся в Беларуси, и прежде всего от *C. hirsuta* (рис. 3, *а* и *б*), с которым он встречается в сходных местообитаниях (см. таблицу).

Рис. 3. Внешний вид *C. hirsuta* (*a*) и *C. occulta* (*b*) из Беларуси
Fig. 3. Total view of *C. hirsuta* (*a*) and *C. occulta* (*b*) from Belarus

Основные диагностические признаки *C. occulta*, *C. hirsuta, C. flexuosa*, *C. parviflora*

Summary table of main diagnostic features among *C. occulta*, *C. hirsuta, C. flexuosa*, *C. parviflora*

Признак	*C. occulta*	*C. hirsuta*	*C. flexuosa*	*C. parviflora*
Опушение стебля	В нижней части опушен кроющими трихомами, в средней и верхней – слабоопушенный или голый	Голый или слабоопушенный	Довольно густо опушен почти по всей длине	Голый
Листья	Листовая розетка ко времени цветения обычно отсутствует. Конечные сегменты листьев округлые или яйцевидные, по краю 3(4–5)-лопастные. Верхняя сторона листьев голая, снизу голая или слабоопушенная	Листовая розетка имеется. Конечные сегменты листьев округлые или яйцевидные, по краю 3(4–5)-лопастные. Верхняя сторона слабоопушенная, снизу голая	Листовая розетка ко времени цветения обычно отсутствует. Конечные сегменты листьев округлые или яйцевидные, по краю 3(4–5)-лопастные. Верхняя сторона листьев опушенная, снизу слабо опушенная	Листовая розетка ко времени цветения обычно отсутствует. Конечные сегменты листьев линейные или линейно-ланцетные, цельные. Листья голые
Количество тычинок	6	4 (редко 5, 6)	6	6
Плодоножки	Отогнуты от оси соцветия	Часто прижаты к оси соцветия	Отогнуты от оси соцветия	Отогнуты от оси соцветия
Типичные биотопы	Сорное в питомниках, на садовых участках, в ботанических садах, на клумбах, газонах и т. п.	Сорное в питомниках, на садовых участках, в ботанических садах, на клумбах, газонах и т. п.	Сырые обочины и колеи лесных дорог в широколиственных и смешанных лесах	Отмельные участки и сырые обнажения грунта вблизи рек и водоемов
Число хромосом	$2n = 64$	$2n = 16$	$2n = 32$	$2n = 16$

Исследованный материал *C. occulta*

1. Беларусь, Минская область, Минский район, юго-западная окраина г. Минска, ул. Курчатова. 11.06.2010. № 143. М. А. Джус (Belarus, Minsk region, Minsk district, SW part of Minsk city, Kurchatova Street. 11.06.2010. № 143. M. A. Dzhus).

2. Беларусь, Витебская область, Лепельский район, Домжерицкий сельсовет, д. Домжерицы. 24.09.2010. № 1983. М. А. Джус (Belarus, Vitebsk region, Lepel' district, Domzheritsy village. 24.09.2010. № 1983. M. A. Dzhus).

3. Беларусь, Минская область, Минский район, г. Минск, ул. Есенина. 10.05.2014. № 111. М. А. Джус. (Belarus, Minsk region, Minsk district, Minsk city, Esenina Street. 10.05.2014. № 111. M. A. Dzhus).

4. Беларусь, Минская область, Минский район, окрестность ж.-д. ст. Птичь, садовое товарищество «Солнечное». 01.04.2014. № 22. Там же. 07.07.2014. № 739. М. А. Джус (Belarus, Minsk region, Minsk district, near Ptitch railway station. 01.04.2014. № 22. M. A. Dzhus. 07.07.2014. № 739. M. A. Dzhus).

5. Беларусь, Минская область, Минский район, окрестность д. Жуков Луг. 07.06.2017. М. А. Джус (Belarus, Minsk region, Minsk district, near Zhukov Lug village. 07.06.2017. M. A. Dzhus).

6. Турция, провинция Анталия, район Манавгат, г. Сиде. 05.10.2013. № 2284. М. А. Джус (Turkey, Antalya province, Manavgat district, Side village. 05.10.2013. № 2284. M. A. Dzhus).

Заключение

В результате полевых исследований и изучения гербарных материалов проведена ревизия видового состава мелкоцветковых сердечников флоры Беларуси. Из данной группы на территории республики достоверно встречаются 5 видов: *Cardamine impatiens*, *C. parviflora*, *C. flexuosa*, *C. hirsuta* и *C. occulta.* Последний из перечисленных видов впервые указывается для флоры Беларуси, где он отмечается с 2010 г. В настоящее время *C. occulta* зафиксирован в Минском районе Минской области и Лепельском районе Витебской области. Прогнозируется дальнейшее расселение по территории республики *C. occulta* и *C. hirsuta*, которое происходит преимущественно с посадочным материалом интродуцированных растений открытого и закрытого грунта.

Библиографические ссылки

1. Carlsen T, Bleeker W, Hurka H, Elven R, Brochmann C. Biogeography and Phylogeny of *Cardamine* (Brassicaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 2009;96(2):215–236. DOI: 10.3417/2007047.

2. Третьяков ДИ. *Cardamine* L. В: Парфенов ВИ, редактор. *Определитель высших растений Беларуси*. Минск: Дизайн ПРО; 1998. 472 с.

3. Heenan PB. A taxonomic revision of *Cardamine* L. (Brassicaceae) in New Zealand. *Phytotaxa*. 2017;330(1):1–154. DOI: 10.11646/phytotaxa.330.1.1.

4. Hepenstrick D, Hoffer-Massard F. Un xénophyte asiatique du groupe *Cardamine flexuosa*: identification, nomenclature et génétique. *Bulletin du Cercle Vaudois de Botanique.* 2014;43:69–76.

5. Lihová J, Marhold K, Kudoh H, Koch MA. Worldwide phylogeny and biogeography of *Cardamine flexuosa* (Brassicaceae) and its relatives. *American Journal of Botany*. 2006;93:1206–1221. DOI: 10.3732/ajb.93.8.1206.

6. Иванова ЕВ. Род *Cardamine* L. В: Дорожкин НА, редактор. *Флора БССР. Том 2*. Минск: Издательство АН Белорусской ССР; 1949. 510 с.

7. Дорофеев ВИ. *Cardamine* L. В: Цвелев НН, редактор. *Конспект флоры Восточной Европы. Том 1.* Санкт-Петербург: Товарищество научных изданий «КМК»; 2012. 631 с.

8. Jalas J, Suominen J. *Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe. Volume 10*. Helsinki: Committee for Mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Vanamo; 1994. 224 p.

9. Gilibert JE. *Flora lithuanica inchoata, Seu enumeratio plantarum, Quas Circa Grodnam collegit et determinavit Joannes Emmanuel Gilibert. Volume IV.* Vilnae: Typis S.R.M.; 1782. 117 p.

10. Ejsmond A, Drymmer K. Spis roślin Skrytokwiatowych naczyniowych i Jawnokwiatowych, znalezionych w lecie 1887 r. W Puszczy Białowieskiéj. *Pamiętnik Fizyjograficzny*. *Dział III. Botanika i Zoologija.* 1888;8:120–155.

11. Drymmer K. Spis roślin Skrytokwiatowych naczyniowych i Jawnokwiatowych zebranych w 1888 r. W puczczy Białowieskiéj Labzkiéj i Świsłockiéj. *Pamiętnik Fizyjograficzny*. *Dział III. Botanika i Zoologija.* 1889;9:102–115.

12. Downar N. Enumeratio plantarum, circa Mohilevionai ad Borysthenem collectarum, tam sponte crescentium quam solo assuefactum, spatio X. millia passuum. *Bulletin de la Société des naturalistes de Moscou*. 1861;34(1):162–189.

13. Дубовик ДВ, Скуратович АН, Третьяков ДИ. Новые таксоны сосудистых растений для флоры Беларуси и ее отдельных регионов. В: Ламан НА, Парфенов ВИ, редакторы. *Ботаника (исследования). Сборник научных трудов. Выпуск 43.* Минск: Институт радиологии; 2014. с. 3–18.

14. Post AR, Ali R, Krings A, Xiang J, Sosinski BR, Neal JC. On the Identity of the Weedy Bittercresses (*Cardamine*: Brassicaceae) in United States Nurseries: Evidence from Molecules and Morphology. *Weed Science.* 2011;59(1):123–135. DOI: 10.1614/WS-D-10-00063.1.

15. Šlenker M, Zozomová-Lihová J, Mandáková T, Kudoh H, Zhao Y, Soejima A, et al. Morphology and genome size of the widespread weed *Cardamine occulta*: how it differs from cleistogamic *C. kokaiensis* and other closely related taxa in Europe and Asia. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2018;187(3):456–482. DOI: 10.1093/botlinnean/boy030.

16. Marhold K, Šlenker M, Kudoh H, Zozomová-Lihová J. *Cardamine occulta*, the correct species name for invasive Asian plants previously classified as *C. flexuosa*, and its occurrence in Europe. *PhytoKeys.* 2016;62:57–72. DOI: 10.3897/phytokeys.62.7865.

17. Šlenker M, Zozomová-Lihová J, Marhold K. *Cardamine occulta* – inconspicuous neophyte in Slovakia. *Bulletin Slovenskej botanickej spoločnosti*. 2019;41(1):13–23.

18. Майоров СР. Мелкоцветковые сердечники секции Pteroneuron (DC.) Rouy et Fouc. (*Cardamine* L., Cruciferae) во флоре Европейской России. *Фиторазнообразие Восточной Европы*. 2018;12:6–17. DOI: 10.24411/2072-8816-2018-10001.

19. Yatsu Y, Kachi N, Kudoh H. Ecological distribution and phenology of an invasive species, *Cardamine hirsute* L., and its native counterpart, *Cardamine flexuosa* With., in central Japan. *Plant Species Biology*. 2003;18(1):35–42. DOI: 10.1046/j.1442-1984.2003.00086.x.

20. Mandáková T, Zozomová-Lihová J, Kudoh H, Zhao Y, Lysak MA, Marhold K. The story of promiscuous crucifers: origin and genome evolution of an invasive species, *Cardamine occulta* (Brassicaceae), and its relatives. *Annals of Botany.* 2019;20:1–12. DOI: 10.1093/aob/mcz019.

21. Леостарин АВ, Майоров СР. *Cardamine occulta* Hornem. (Brassicaceae) во флоре Европейской России: инвазионный статус и распространение. *Российский журнал биологических инвазий*. 2019;2:52–63.

22. Джус МА. Дополнение к списку флоры сосудистых растений Березинского биосферного заповедника. В: *Особо охраняемые природные территории Беларуси. Исследования. Выпуск 9.* Минск: Белорусский дом печати; 2014. с. 61–75.

References

1. Carlsen T, Bleeker W, Hurka H, Elven R, Brochmann C. Biogeography and Phylogeny of *Cardamine* (Brassicaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 2009;96(2):215–236. DOI: 10.3417/2007047.

2. Tretjakov DI. *Cardamine* L. In: Parfenov VI, editor. *Opredelitel' vysshikh rastenii Belarusi* [Manual of Vascular Plants of Belarus]. Minsk: Dizain PRO; 1998. 472 p. Russian.

3. Heenan PB. A taxonomic revision of *Cardamine* L. (Brassicaceae) in New Zealand. *Phytotaxa*. 2017;330(1):1–154. DOI: 10.11646/phytotaxa.330.1.1.

4. Hepenstrick D, Hoffer-Massard F. Un xénophyte asiatique du groupe *Cardamine flexuosa*: identification, nomenclature et génétique. *Bulletin du Cercle Vaudois de Botanique.* 2014;43:69–76.

5. Lihová J, Marhold K, Kudoh H, Koch MA. Worldwide phylogeny and biogeography of *Cardamine flexuosa* (Brassicaceae) and its relatives. *American Journal of Botany*. 2006;93:1206–1221. DOI: 10.3732/ajb.93.8.1206.

6. Ivanova EV. *Cardamine* L. In: Dorozhkin NA, editor. *Flora BSSR. Tom 2* [Flora of Belarus. Volume 2]. Minsk: Izdatel'stvo Akademii nauk Belorusskoi SSR; 1949. 510 p. Russian.

7. Dorofeev VI. *Cardamine* L. In: Tsvelev NN, editor. *Konspekt flory Vostochnoi Evropy. Tom 1* [Abstract of the flora of Eastern Europe. Volume 1]. Saint Petersburg: Tovarishchestvo nauchnykh izdanii «KMK»; 2012. 631 p. Russian.

8. Jalas J, Suominen J. *Atlas Florae Europaeae. Distribution of Vascular Plants in Europe. Volume 10.* Helsinki: Committee for Mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Vanamo; 1994. 224 p.

9. Gilibert JE. *Flora lithuanica inchoata, Seu enumeratio plantarum, Quas Circa Grodnam collegit et determinavit Joannes Emmanuel Gilibert. Volume IV.* Vilnae: Typis S. R. M.; 1782. 117 p.

10. Ejsmond A, Drymmer K. Spis roślin Skrytokwiatowych naczyniowych i Jawnokwiatowych, znalezionych w lecie 1887 r. W Puszczy Białowieskiéj. *Pamiętnik Fizyjograficzny*. *Dział III. Botanika i Zoologija.* 1888;8:120–155.

11. Drymmer K. Spis roślin Skrytokwiatowych naczyniowych i Jawnokwiatowych zebranych w 1888 r. W puczczy Białowieskiéj Labzkiéj i Świsłockiéj. *Pamiętnik Fizyjograficzny*. *Dział III. Botanika i Zoologija.* 1889;9:102–115.

12. Downar N. Enumeratio plantarum, circa Mohilevionai ad Borysthenem collectarum, tam sponte crescentium quam solo assuefactum, spatio X. millia passuum. *Bulletin de la Société des naturalistes de Moscou*. 1861;34(1):162–189.

13. Dubovik DV, Skuratovich AN, Tret'yakov DI. [New taxa of vascular plants to the flora of Belarus and its selected regions]. In: Laman NA, Parfenov VI, editors. *Botanika (issledovaniya). Sbornik nauchnykh trudov. Vypusk 43* [Botanica (researches). Collection of scientific papers. Issue 43]. Minsk: Institut radiologii; 2014. p. 3–18. Russian.

14. Post AR, Ali R, Krings A, Xiang J, Sosinski BR, Neal JC. On the Identity of the Weedy Bittercresses (*Cardamine*: Brassicaceae) in United States Nurseries: Evidence from Molecules and Morphology. *Weed Science.* 2011;59(1):123–135. DOI: 10.1614/WS-D-10-00063.1.

15. Šlenker M, Zozomová-Lihová J, Mandáková T, Kudoh H, Zhao Y, Soejima A, et al. Morphology and genome size of the widespread weed *Cardamine occulta*: how it differs from cleistogamic *C. kokaiensis* and other closely related taxa in Europe and Asia. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2018;187(3):456–482. DOI: 10.1093/botlinnean/boy030.

16. Marhold K, Šlenker M, Kudoh H, Zozomová-Lihová J. *Cardamine occulta*, the correct species name for invasive Asian plants previously classified as *C. flexuosa*, and its occurrence in Europe. *PhytoKeys.* 2016;62:57–72. DOI: 10.3897/phytokeys.62.7865.

17. Šlenker M, Zozomová-Lihová J, Marhold K. *Cardamine occulta* – inconspicuous neophyte in Slovakia. *Bulletin Slovenskej botanickej spoločnosti*. 2019;41(1):13–23.

18. Maiorov SR. Small-flower bitter cresses of the section Pteroneuron (DC.) Rouy et Fouc. (*Cardamine* L., Cruciferae) in the flora of European Russia. *Phytodiversity of Eastern Europe.* 2018;12:6–17. Russian. DOI: 10.24411/2072-8816-2018-10001.

19. Yatsu Y, Kachi N, Kudoh H. Ecological distribution and phenology of an invasive species, *Cardamine hirsute* L., and its native counterpart, *Cardamine flexuosa* With., in central Japan. *Plant Species Biology*. 2003;18(1):35–42. DOI: 10.1046/j.1442-1984.2003.00086.x.

20. Mandáková T, Zozomová-Lihová J, Kudoh H, Zhao Y, Lysak MA, Marhold K. The story of promiscuous crucifers: origin and genome evolution of an invasive species, *Cardamine occulta* (Brassicaceae), and its relatives. *Annals of Botany.* 2019;20:1–12. DOI: 10.1093/aob/mcz019.

21. Leostrin AV, Mayorov SR. [*Cardamine occulta* Hornem. (Brassicaceae). Current state and distribution of alien weedy *Cardamine occulta* Hornem. (Brassicaceae) in European Russia]. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii*. 2019;2:52–63. Russian.

22. Dzhus MA. [Additions to the species list of vascular plants of Berezinsky biosphere reserve]. In: *Osobo okhranyaemye prirodnye territorii Belarusi. Issledovaniya. Vypusk 9.* Minsk: Belorusskii dom pechati; 2014. p. 61–75. Russian.

Статья поступила в редколлегию 22.04.2019.
Received by editorial board 22.04.2019.

Краткие сообщения

Short communications

УДК 576.895.1

ЛАНДШАФТНО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕЛЬМИНТОВ ГРЫЗУНОВ ГОРНЫХ И ПРЕДГОРНЫХ ТЕРРИТОРИЙ ЛЕНКОРАНСКОЙ ПРИРОДНОЙ ОБЛАСТИ АЗЕРБАЙДЖАНА

Г. Г. ФАТАЛИЕВ[1)]***, Э. К. АСЛАНОВА***[1)]

[1)]*Институт зоологии Национальной академии наук Азербайджана, ул. А. Аббасзаде, 1128, квартал 504, AZE1073, г. Баку, Азербайджан*

Впервые представлены данные по гельминтофауне грызунов и ландшафтно-экологические особенности ее распространения в горных и предгорных территориях Ленкоранской природной области. Во время исследований выявлено 38 видов гельминтов: 8 – трематод, 14 – цестод, 15 – нематод и 1 вид акантоцефалов. Из них по циклу развития 28 видов являются биогельминтами, 10 – геогельминтами. Общность с гельминтами человека и домашних животных имеют 9 видов.

Ключевые слова: грызуны; гельминтофауна; ландшафт; биогельминт; геогельминт; биотические факторы; абиотические факторы.

Образец цитирования:
Фаталиев ГГ, Асланова ЭК. Ландшафтно-экологические особенности гельминтов грызунов горных и предгорных территорий Ленкоранской природной области Азербайджана. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;2:89–94.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-89-94

For citation:
Fataliyev GH, Aslanova EK. Landscape ecological pecularities of rodent helminths of mountainous and foothill territories of Lankaran natural region of Azerbaijan. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;2:89–94. Russian.
https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-2-89-94

Авторы:
Гара Гусейн Фаталиев – доктор биологических наук; заведующий лабораторией паразитологии, старший научный сотрудник.
Эльнура Камиль Асланова – научный сотрудник лаборатории паразитологии.

Authors:
Gara Huseyn Fataliyev, doctor of science (biology); head of parasitology laboratory, senior researcher.
qarafataliyev@bk.ru
Elnura Kamil Aslanova, researcher at the parasitology laboratory.

Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;2:89–94
Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019;2:89–94

LANDSCAPE ECOLOGICAL PECULARITIES OF RODENT HELMINTHS OF MOUNTAINOUS AND FOOTHILL TERRITORIES OF LANKARAN NATURAL REGION OF AZERBAIJAN

G. H. FATALIYEV [a], ***E. K. ASLANOVA*** [a]

[a] *Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Azerbaijan, 1128 A. Abbaszade Street, 504 block, Baku AZE1073, Azerbaijan*

Corresponding author: G. H. Fataliyev (qarafataliyev@bk.ru)

The information about the helminthfauna of mouse and landscape-ecological pecularities of mountainous and foothill territories of Lankaran natural region is represented in the article for the first time. As a result of investigation 38 species of helminths have been revealed: 8 thrematods, 14 sestods, 15 nematods and 1 akantotsefal. From revealed helminths 28 species are biohelminths and 10 species geohelminths. 9 spesies have something common with the man's and domestic animal's helminths.

Keywords: rodents; helminthfauna; landscape; biohelmint; geohelminth; biotic factors; abiotic factors.

Введение

Грызуны (Rodentia) – это наземные, иногда земноводные и древесные животные мелких или средних размеров. Питаются преимущественно растительной пищей, изредка – животной. Они играют важную роль в распространении возбудителей чумы, туляремии, дикроцелиоза, гастродискоидоза, трихинеллеза и других гельминтозов, имеющих серьезное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение для человека и домашних животных.

В Азербайджане обитает 31 вид грызунов, относящихся к 6 семействам и 16 родам [1]. Нами исследованы 6 видов Rodentia, широко распространенных в Азербайджане, в том числе в Ленкоранской природной области. Здесь они имеют все условия для формирования собственной гельминтофауны, а также выступают в качестве промежуточных хозяев большого числа гельминтов, заражающих диких животных.

В литературе имеются некоторые сведения о гельминтофауне грызунов различных областей Азербайджана [2–4]. Однако видовое разнообразие, биоэкологические особенности ландшафтного распространения гельминтов грызунов Ленкоранской природной области до последнего времени остались неизученными.

С целью изучить гельминтофауну грызунов начиная с 2014 г. нами проведены работы в горных и предгорных территориях Ленкоранской природной области.

Материалы и методы исследования

Материал исследовался методом полного гельминтологического вскрытия по К. И. Скрябину [5]. Зверьки отлавливались плашками Геро, капканами и живоловками. Из собранных гельминтов трематоды, цестоды и акантоцефалы фиксировались в 70° спирте, а нематоды – в растворе Барбагалло.

Обработка материала проводилась по общепринятой в гельминтологии методике: трематоды и цестоды окрашивали квасцовым кармином и заключали в бальзам. Нематоды после раствора Барбагалло промывались в дистиллированной воде, размещались на предметном стекле в капле раствора глицерина и молочной кислоты в соотношении 50 : 50, накрывались покровным стеклом и рассматривались под микроскопом для видового определения. Видовой состав выявлялся в соответствии с определителем гельминтов [6; 7].

Результаты и их обсуждение

С целью изучить гельминтофауну грызунов и ее ландшафтно-экологические особенности исследовано 255 экземпляров зверьков, относящихся к 2 семействам, 6 родам, 6 видам (серая крыса – *Rattus norvegicus*, домовая мышь – *Mus musculus* L., лесная мышь – *Apodemus (Sylvaemus) sylvaticus* L., серый хомячок – *Cricetulus migratorius*, водяная полевка – *Arvicola terrestris* L. и общественная полевка – *Microtus socialis*), и у них выявлено 38 видов гельминтов. Гельминтофауна была представлена 8 видами трематод, 14 – цестод, 15 – нематод и 1 видом акантоцефалов (таблица).

Гельминтофауна грызунов в различных ландшафтах горных и предгорных территорий Ленкоранской природной области

Helminthfauna of rodents in different landscapes of mountainous and foothill territories of Lankaran natural region

Гельминты	Влажные субтропики						Умеренно теплые широколиственные горные леса						Лесостепной ландшафт						Горно-степной ландшафт					
	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка
Трематоды																								
Plagiorchis arvicolae Schulz et Skworsov, 1931	+				+		+				+													
Pl. eutamiatis Schulz, 1932	+				+		+				+													
Psilostomum arvicolae Schulz et Dobrowa, 1933					+						+													
Brachylaemus recurvus (Dujardin, 1845)			+																					
Notocotylus noyeri Joyeux, 1922					+						+													
Gastrodiscoides hominis (Lewis et Mc Connall, 1876)					+																			
Tetraserialis tscherbakovi Petrov et Tschertkova, 1960					+																			
Echinostoma miyagawai Ishii, 1932					+						+													
Цестоды																								
Andrya montana Kirschenblatt, 1949		+	+					+	+						+	+					+			
Paranoplosephala dentata Galli-Valerio, 1905			+		+				+		+				+						+			
P. omphalodes (Hermann, 1783)					+	+					+	+						+						+
Catenotaenia cricetorum Kirschenblatt, 1949				+						+						+						+		
C. pusilla (Goeze, 1782)		+						+	+						+	+					+			
Skrjabinotaenia lobata (Baer, 1925)		+						+						+										
Hymenolepis diminuta Rudolphi, 1819	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+		+	+			+
H. horrida (Linstow, 1901)	+	+					+	+						+										
Rodentolepis straminea (Goeze, 1782)	+	+		+			+	+																
Taenia hydatigena, larvae Pallas, 1766		+				+		+				+		+				+		+				+
T. pisiformis, larvae (Bloch, 1780)	+						+							+										

Окончание таблицы
Ending table

Гельминты	Влажные субтропики						Умеренно теплые широколиственные горные леса						Лесостепной ландшафт						Горно-степной ландшафт					
	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка	Серая крыса	Домовая мышь	Лесная мышь	Серый хомячок	Водяная полевка	Общественная полевка
Hydatigera taeniaeformis, larvae (Batsch, 1786)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+		+	+	+		+
Alveococcus multilocularis, larvae (Leuckart, 1863)	+	+	+			+	+	+	+			+		+	+			+		+				
Mesocestoides lineatus, larvea (Geoze, 1782)		+	+			+		+	+			+		+	+			+		+	+			
Нематоды																								
Capillaria wioletti Ruchljadeva, 1950					+																			
Hepaticola hepatica (Bancroft, 1893)				+		+				+		+				+		+				+		+
Trichocephalus muris Schrank, 1788	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+		+	+	+		
Heligmosomoides laevis (Dujardin, 1845)		+						+												+				
H. yorkei Schulz, 1926				+						+						+						+		
Heligmosomum costellatum (Dujardin, 1845)			+			+			+			+						+			+			+
Ganguleterakis spumosa Schneider, 1866	+	+				+	+	+										+						+
Aspiculuris kazakstanica Nasarova et Sweschnikowa, 1930			+			+			+			+			+			+			+			
A. tetraptera (Nitsch, 1821)		+						+												+				
Syphacia obvelata (Rudolphi, 1802)		+	+	+		+		+	+	+		+		+	+	+		+		+	+			
Gongylonema neoplasticum (Fibiger et Ditlevsen, 1914)	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+				+		+			+	+		+
G. problematicum Schulz, 1924		+		+				+		+										+				
G. minima Molin, 1857		+						+							+						+			
Rictularia caucasica Schulz, 1927		+	+					+	+					+	+					+	+			
Mastophorus muris (Gmelin, 1790)	+	+	+	+			+	+	+	+				+		+				+	+	+		
Акантоцефалы																								
Moniliformis moniliformis (Bremser, 1811)			+		+				+		+				+						+			
Всего	12	19	15	11	15	13	12	19	15	10	12	11	0	12	13	11	0	13	0	12	15	7	0	8

Как видно из таблицы, распространение выявленных паразитов среди грызунов и их гельминтофауна в целом изменялись в зависимости от характера исследуемых ландшафтов, каждый из которых обладает как свойственными ему климатообразующими компонентами, так и типами почв, растительными группами и видами животных. Во влажном субтропическом ландшафте выявлено 38 видов гельминтов, в умеренно теплом широколиственном горно-лесном – 34, в лесостепном и горно-степном – по 25 видов в каждом. Распределение гельминтов по ландшафтам связано с влиянием на развитие паразитов различных абиотических и биотических факторов, свойственных данным ландшафтам.

Во влажных субтропиках выявлено 8 видов трематод, в умеренно теплом широколиственном горно-лесном – 5 видов. В лесостепном и горно-степном ландшафтах трематоды не были обнаружены. Резкое различие соотношения количества трематод в этих ландшафтах объясняется благоприятными условиями для их развития (в связи с большим количеством водоемов) во влажно-субтропическом и умеренно теплом широколиственном горно-лесном ландшафтах.

Природно-климатические условия влажного субтропического и умеренно теплого широколиственного горно-лесного ландшафтов, а также обилие пищи, наличие биоценотических связей с представителями других систематических групп животных явились причиной зараженности водяной полевки большим числом видов гельминтов. В отличие от них климатические условия лесостепного и горно-степного ландшафтов (жаркое засушливое лето и холодная зима) не способствуют развитию растительных групп и животного мира [8; 9]. В связи с неблагоприятными условиями для жизни и размножения гельминты на этих типах ландшафтов обнаружены не были.

По циклу развития из выявленных гельминтов 28 видов являются биогельминтами, а 10 видов – геогельминтами. Как известно, цикл развития биогельминтов проходит при участии позвоночных и беспозвоночных животных, а цикл развития геогельминтов завершается между благоприятной внешней средой и организмом хозяина – грызуна. Также известно, что все цестоды – биогельминты. Как видно из таблицы, у грызунов во влажных субтропиках и в умеренно теплом широколиственном горно-лесном ландшафте выявлено по 14 видов цестод в каждом, в лесостепном ландшафте – 13 видов, в горно-степном – 10 видов.

Большее число видов цестод, отмеченных в умеренно теплом широколиственном горно-лесном ландшафте, можно объяснить наличием здесь благоприятных ландшафтно-экологических условий для развития их промежуточных хозяев – орибатидных клещей, а также насекомых и других членистоногих. В ходе наших исследований было установлено, что в завершении цикла развития цестод *Paranoplocephala dentata*, *Mesocestoides lineatus* на этих территориях в качестве резервных хозяев служат широко распространенные здесь заяц-русак, птицы, грызуны, пресмыкающиеся и хищные млекопитающие.

Во всех ландшафтах из цестод наиболее широко распространены *Hymenolepis diminuta*, *Hydatigera taeniaeformis, larvae*. Другие виды – *Taenia pisiformis*, *T. hydatigena*, *Hydatigera taeniaeformis*, *Alveococcus multilocularis* и *Mesocestoides lineatus* – были обнаружены в грызунах на стадии личинок, т. е. грызуны являются для них промежуточными хозяевами. Для развития указанных цестод характерно видовое разнообразие промежуточных и окончательных хозяев. Также они весьма пластичны по отношению к влиянию биотических и абиотических факторов. Во время питания окончательные хозяева вместе с пищей проглатывают яйца гельминтов, достигшие инвазионной стадии, и происходит заражение. Роль промежуточных хозяев играют грызуны. Причиной заражения последних является совместное ареальное обитание и наличие различных биоценотических связей с дикими и домашними плотоядными животными.

Во влажно-субтропическом ландшафте выявлено 15 видов нематод, в умеренно теплом широколиственном горно-лесном – 14 видов, в лесостепном – 11 видов и в горно-степном – 14 видов. Из них 5 видов – *Gongylonema neoplasticum*, *G. problematicum*, *G. minima*, *Rictularia caucasica*, *Mastophorus muris* – обладают сложным циклом развития. Для завершения цикла роль промежуточных хозяев выполняют жуки, а окончательных – грызуны. Из выявленных нематод 10 видов являются геогельминтами, их развитие происходит во внешней среде и завершается в организме грызунов. Во внешнюю среду попадают яйца нематод и в благоприятных условиях развиваются до инвазионной стадии. При проглатывании окончательным хозяином таких яиц вместе с пищей происходит заражение.

Среди отмеченных нематод *Capillaria wioletti* является характерным для водяных полевок. По географическому распространению этот вид наблюдался только в России и Азербайджане. Остальные виды обладают широкой географической зональностью, что обусловлено обширным ареалом их хозяев, многочисленностью и биоценотическими связями с представителями животных других систематических групп.

У одного отмеченного вида акантоцефалов – *Moniliformis moniliformis* – для завершения цикла развития жуки-чернотелки и тараканы выступают в роли промежуточных хозяев, а птицы и человек – в роли факультативного хозяина.

Заключение

Впервые нами изучена гельминтофауна грызунов горных и предгорных территорий Ленкоранской природной области, и у них выявлено 38 видов гельминтов: 8 – трематод, 14 – цестод, 15 – нематод и 1 вид акантоцефалов. Из указанных гельминтов по циклу развития 28 видов являются биогельминтами, а 10 видов – геогельминтами.

Дана эпизоотологическая и эпидемиологическая характеристика исследуемой гельминтофауны. Выяснилось, что 9 видов (трематоды – *Gastrodiscoides hominis*; цестоды – *Hymenolepis diminuta*, *Taenia pisiformis*, *T. hydatigena*, *Hydatigera taeniaeformis*, *Alveococcus multilocularis*, *Mesocestoides lineatus*; нематоды – *Syphacia obvelata*, *Hepaticola hepatica*) имеют общность с гельминтами человека и домашних животных. Эти виды во взрослой стадии неоднократно были отмечены у человека в Азербайджане и в нескольких зарубежных странах.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что на видовой состав, разнообразие и распространение гельминтов влияют физико-географические условия местности, различные биотические и абиотические факторы данного ландшафта, образ жизни и состав пищи животных, а также ряд экологических и социальных факторов.

Библиографические ссылки

1. Отряд Грызуны – Rodentia. В: Гаджиев ДВ, Рахматулина ИК, редакторы. *Животный мир Азербайджана. Том III. Позвоночные*. Баку: Элм; 2000. с. 506–540.

2. Мустафаев ЮШ. К изучению гельминтофауны грызунов Азербайджана. *Ученые записки Азербайджанского государственного университета. Серия: Биологические науки.* 1965;1:43–47.

3. Садыхов ИА. *Гельминты промысловых зверей Азербайджана*. Баку: Элм; 1981. 168 с.

4. Фаталиев ГГ. Гельминтофауна грызунов (Rodentia) Азербайджана и пути ее формирования. *Юг России: экология, развитие.* 2009;4(4):118–122.

5. Скрябин КИ. *Методы полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека.* Москва: МГУ; 1928. 45 с.

6. Рыжиков КМ, Гвоздев ЕВ, Токобаев ММ, Шалдыбин ЛС, Мацаберидзе ГВ, Меркулова ИВ и др. *Определитель гельминтов грызунов фауны СССР. Том 1.* Москва: Наука; 1978. 231 с.

7. Рыжиков КМ, Гвоздев ЕВ, Токобаев ММ, Шалдыбин ЛС, Мацаберидзе ГВ, Меркулова ИВ и др. *Определитель гельминтов грызунов фауны СССР. Том 2.* Москва: Наука; 1979. 278 с.

8. Асадов СМ. Ландшафтно-экологическая гельминтология в Азербайджане. *Известия АН Азербайджанской ССР. Серия: Биологические науки.* 1970;2:62–68.

9. Алиев АА, Гасанов ГК. Типологическое регионирование. В: Алиев АА, Гасанов ГК. *Ландшафт Талыша.* Баку: Элм; 1972. с. 60–95.

References

1. [Otryad Gryzuny – Rodentia]. In: Gadjiev DV, Rakhmatulina IK, editors. *Zhivotnyi mir Azerbaidzhana. Tom 3. Pozvonochnye* [Animal life of Azerbaijan. Volume III. Vertebrates]. Baku: Elm; 2000. p. 506–540. Russian.

2. Mustafaev YuSh. [On the study of helminthfauna of rodents in Azerbaijan]. *Uchenye zapiski Azerbaidzhanskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologicheskie nauki.* 1965;1:43–47. Russian.

3. Sadykhov IA. *Gel'minty promyslovykh zverei Azerbaidzhana* [Helminths of producers' animals of Azerbaijan]. Baku: Elm; 1981. 168 p. Russian.

4. Fataliyev QQ. [The ways of formation Rodentis (Rodentia) helminth fauna in Azerbaijan]. *Yug Rossii: ekologiya, razvitie.* 2009;4(4):118–122. Russian.

5. Skryabin KI. *Metody polnykh gel'mintologicheskikh vskrytii pozvonochnykh, vklyuchaya cheloveka* [Methods of full helminthological autopsy of vertebrates, including humans]. Moscow: Moscow State University; 1928. 45 p. Russian.

6. Ryzhikov KM, Gvozdev EV, Tokobaev MM, Shaldybin LS, Matsaberidze GV, Merkulova IV, et al. *Opredelitel' gel'mintov gryzunov fauny SSSR. Tom 1* [Definer of helminthes of rodents of USSR fauna. Volume 1]. Moscow: Nauka; 1978. 231 p. Russian.

7. Ryzhikov KM, Gvozdev EV, Tokobaev MM, Shaldybin LS, Matsaberidze GV, Merkulova IV, et al. *Opredelitel' gel'mintov gryzunov fauny SSSR. Tom 2* [Definer of helminthes of rodents of USSR fauna. Volume 2]. Moscow: Nauka; 1979. 278 p. Russian.

8. Asadov SM. [Landscape-ecological helminthology in Azerbaijan]. *Izvestiya AN Azerbaidzhanskoi SSR. Seriya: Biologicheskie nauki.* 1970;2:62–68. Russian.

9. Aliev AA, Gasanov GK. [Typological reionalization]. In: Aliev AA, Gasanov GK. *Landshaft Talysha* [Landscape of Talish]. Baku: Elm; 1972. p. 60–95. Russian.

Статья поступила в редколлегию 03.06.2019.
Received by editorial board 03.06.2019.

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ

INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 612.015(075.8)+616-074(075.8)
Губич О. И. **Клиническая биохимия** [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 02 «Биохимия» специализаций: 1-31 01 02 01 «Аналитическая биохимия», 1-31 01 02 02 «Биохимия лекарственных средств» / О. И. Губич ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2019. 78 с. : ил. Библиогр.: с. 77–78. Режим доступа: http://elib.bsu.by/handle/123456789/217914. Загл. с экрана. Деп. 02.04.2019, № 004702042019.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 «Биохимия». Содержание ЭУМК предполагает изучение изменения химического состава и обмена веществ в организме человека в динамике патологического состояния, а также методов биохимического выявления этих изменений в целях диагностики и прогноза эффективности терапевтических воздействий. Дисциплиной предусмотрено выполнение лабораторных работ, направленных на овладение комплексом практических знаний и умений для решения научных и прикладных задач в области клинической биохимии.

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Филипцова Г. Г. Роль эндогенных пептидных элиситоров в устойчивости растений к биотическим стрессам 3

Албухайдар А., Потапович А. И., Костюк В. А., Коркина Л. Г. Клеточные ответы на воздействие физиологических доз ультрафиолетового излучения и их модуляция растительными полифенолами 13

Федоренко М. П., Волотович А. А., Кудряшова О. А. Анализ изменчивости количественных признаков у адаптантов *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro* при разных условиях освещения 22

Потапович А. И., Сухан Т. О., Албухайдар А., Шман Т. В., Ермилова Т. И., де Люка К., Костюк В. А. Активация репарации ДНК и подавление апоптоза в кератиноцитах как возможный механизм цитопротекторного действия растительных полифенолов при воздействии УФ-излучения 29

Руткевич С. А., Люзина К. М., Микулич Р. Ю., Кабанов Д. М., Лебедок Е. В. Термография как способ оценки вегетативных реакций человека 36

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Ильюшёнок И. Н., Мигас А. А., Сухаревский А. Ю., Шнайдер О. Д., Гринев В. В. Вклад различных механизмов генерации альтернативных транскриптов в разнообразие мРНК гибридного онкогена *RUNX1-RUNX1T1* человека 45

Сяо Ю., Анохина В. С., Карпиевич В. А., Саук И. Б., Романчук И. Ю. Изучение разных форм фасоли обыкновенной по устойчивости к антракнозу с использованием проростков семян и ДНК-маркеров 60

Романовская Т. В., Кветко А. В., Гринев В. В. Эпигенетические маркеры хроматина ассоциированы со сплайсингом РНК в лейкозных клетках человека 70

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

Джус М. А. Cardamine occulta Hornem. – новый для флоры Беларуси адвентивный вид мелкоцветковых сердечников (*Cardamine* L., Brassicaceae) 82

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Фаталиев Г. Г., Асланова Э. К. Ландшафтно-экологические особенности гельминтов грызунов горных и предгорных территорий Ленкоранской природной области Азербайджана 89

Аннотации депонированных в БГУ работ 95

CONTENTS

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

Filiptsova H. G. The role of endogenous elicitor peptides in plant resistance to biotic stress 3

Albuhaydar A., Potapovich A. I., Kostyuk V. A., Korkina L. G. Cell responses to the impact of physiological doses of ultraviolet radiation and their modulation by plant polyphenols 13

Fedorenko M. P., Volotovich A. A., Kudryashova O. A. Analysis of variability of quantitave traits of *Vaccinium corymbosum* L. *ex vitro* under different lighting modes 22

Potapovich A. I., Suhan T. O., Albuhaydar A., Shman T. V., Ermilova T. I., de Luca C., Kostyuk V. A. DNA repair activation and apoptosis suppression in keratinocytes as a possible mechanism of cytoprotective action of plant polyphenols under conditions of UV-irradiation 29

Rutkevich S. A., Liuzina K. M., Mikulich R. Yu., Kabanau D. M., Lebiadok Ya. V. Thermography as a method for evaluating human vegetative reactions 36

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

Ilyushonak I. M., Migas A. A., Sukhareuski A. Y., Schneider A. D., Grinev V. V. The contribution of various mechanisms to mRNA diversity of human fusion oncogene *RUNX1-RUNX1T1* 45

Xiao Yu., Anokhina V. S., Karpievich V. A., Sauk I. B., Romanchuk I. Yu. The study different forms of common bean to anthracnose resistance using seedlings and DNA markers..... 60

Ramanouskaya T. V., Kviatko A. V., Grinev V. V. Epigenetic marks on the chromatin are associated with RNA splicing in human leukemia cells..... 70

BIODIVERSITY

Dzhus M. A. Cardamine occulta Hornem. – a new alien small flowered bittercress (*Cardamine* L., Brassicaceae) of the Belarusian flora..... 82

SHORT COMMUNICATIONS

Fataliyev G. H., Aslanova E. K. Landscape ecological pecularities of rodent helminths of mountainous and foothill territories of Lankaran natural region of Azerbaijan 89

Indicative abstracts of the papers deposited in BSU..... 95

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

Журнал Белорусского государственного университета. Биология. № 2. 2019

Учредитель:
Белорусский государственный университет

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

Редактор *Т. Р. Джум*
Технические редакторы *Ю. А. Тарайковская, В. В. Пишкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 27.06.2019.
Тираж 100 экз. Заказ 247.

Республиканское унитарное предприятие «Информационно-вычислительный центр Министерства финансов Республики Беларусь».
ЛП № 02330/89 от 03.03.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

© БГУ, 2019

Journal of the Belarusian State University. Biology. No. 2. 2019

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave., Minsk 220030.
Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave., Minsk 220030.
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).

Editor *T. R. Dzhum*
Technical editors *Y. A. Taraikouskaya, V. V. Pishkova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 27.06.2019.
Edition 100 copies. Order number 247.

Republican Unitary Enterprise «Informatsionno-vychislitel'nyi tsentr Ministerstva finansov Respubliki Belarus'».
License for publishing No. 02330/89, 3 March, 2014.
17 Kal'varyjskaja Str., Minsk 220004.

© BSU, 2019