



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

3

2020

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 БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

PLANT CELL BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

УДК [611.441:576.31]57.044

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ЙОДАККУМУЛИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭНДОКРИННОГО ДИСРАПТОРА ДДТ¹

С. С. ОБЕРНИХИН¹), Н. В. ЯГЛОВА¹), С. В. НАЗИМОВА¹), В. В. ЯГЛОВ¹)

¹) Научно-исследовательский институт морфологии человека,
ул. Цюрупы, 3, 117418, г. Москва, Россия

Воздействие на организм эндокринных дисрапторов вносит существенный вклад в увеличение числа заболеваний щитовидной железы. Йодаккумуляционная функция щитовидной железы обеспечивается работой натрий-йодного симпортера (НИС) – гликопротеина, встроенного в базолатеральную мембрану тироцитов. Следовательно,

¹ Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Обернихин СС, Яглова НВ, Назимова СВ, Яглов ВВ. Изменения продукции мембранных белков, обеспечивающих йодаккумуляционную функцию щитовидной железы, при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020; 3:3–12.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-3-12>

For citation:

Obernikhin SS, Yaglova NV, Nazimova SV, Yaglov VV. Altered production of membrane-associated proteins, providing iodine accumulation by thyroid gland, after exposure to endocrine disruptor DDT. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:3–12. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-3-12>

Авторы:

Сергей Станиславович Обернихин – доктор медицинских наук; старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Наталья Валентиновна Яглова – доктор медицинских наук; заведующий лабораторией развития эндокринной системы.

Светлана Владимировна Назимова – кандидат медицинских наук; старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Валентин Васильевич Яглов – доктор медицинских наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Authors:

Sergey S. Obernikhin, doctor of science (medicine); senior researcher at the laboratory of endocrine system development.
ober@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0997-6766>

Nataliya V. Yaglova, doctor of science (medicine); head of the laboratory of endocrine system development.
yaglova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8239-5039>

Svetlana V. Nazimova, PhD (medicine); senior researcher at the laboratory of endocrine system development.
pimka60@list.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5118-7037>

Valentin V. Yaglov, doctor of science (medicine), full professor; chief researcher at the laboratory of endocrine system development.

vyaglov@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4357-0639>

НИС также может быть мишенью действия эндокринных дисрапторов. Цель исследования – изучить продукцию НИС под влиянием на организм низких доз эндокринного дисраптора дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) в различные периоды развития. В ходе эксперимента самцов крыс вистар в течение 6 и 10 нед. подвергали воздействию низких доз ДДТ начиная с 7-недельного возраста и с первых суток после рождения. Осуществляли иммуногистохимическое выявление НИС в фолликулярном эпителии щитовидной железы. Определяли концентрации НИС, тиреоидных (Т3 и Т4) и тиреотропного (ТТГ) гормонов в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Проводили морфологическое и морфометрическое исследование препаратов щитовидной железы. У половозрелых крыс, подвергавшихся низкодозовому воздействию ДДТ, через 6 нед. отмечено уменьшение продукции общего Т4 и увеличение выработки Т3, а также падение уровня ТТГ и НИС. У крыс, находившихся под влиянием ДДТ с первых суток после рождения, снижение синтеза Т4 и НИС было менее выраженным. У половозрелых крыс через 10 нед. воздействия обнаружены пониженная концентрация свободного Т3 и повышенный уровень ТТГ. Содержание НИС в системном кровотоке превышало контрольные значения, что было обусловлено увеличением числа клеток-продуцентов за счет микрофолликулярной перестройки паренхимы. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с первых суток после рождения, через 10 нед. выявлены уменьшение концентраций общего и свободного Т3 и повышенный уровень ТТГ. Экспрессия НИС не увеличивалась. Морфологическое исследование показало отсутствие микрофолликулярной перестройки и даже увеличение размеров фолликулов. Сделан вывод, что низкие дозы эндокринного дисраптора ДДТ необратимо подавляют экспрессию мембранного гликопротеина НИС, обеспечивающего йодаккумулятирующую функцию щитовидной железы, а при воздействии на развивающийся организм также нарушают развитие компенсаторно-приспособительных реакций в виде пролиферации эпителия, направленных на увеличение его продукции.

Ключевые слова: щитовидная железа; натрий-йодный симпортер; тиреоидные гормоны; морфология; эндокринный дисраптор; ДДТ.

Благодарность. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (регистрационный номер АААА-А17-117013050048-6).

ALTERED PRODUCTION OF MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEINS, PROVIDING IODINE ACCUMULATION BY THYROID GLAND, AFTER EXPOSURE TO ENDOCRINE DISRUPTOR DDT

S. S. OBERNIKHIN^a, N. V. YAGLOVA^a, S. V. NAZIMOVA^a, V. V. YAGLOV^a

^aResearch Institute of Human Morphology, 3 Tsyurupy Street, Moscow 117418, Russia

Corresponding author: S. S. Obernikhin (ober@mail.ru)

Exposure to endocrine disruptors has a sufficient impact in rise of thyroid disorders. Iodine accumulation by the thyroid is provided by sodium iodide symporter, a glycoprotein, located in the basolateral membrane of thyroid cells. Therefore, sodium iodide symporter might be a putative target for endocrine disruptors. Objective of the research – investigation of sodium iodide symporter production after long-term exposure to endocrine disruptor dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) in different periods on postnatal development. Newly borne and 7-week old male Wistar rats were exposed to low doses of DDT during 6 and 10 weeks. Expression of sodium iodide symporter in thyroid cells was evaluated by immunohistochemistry. Quantification of sodium iodide symporter, thyroid hormones (T3 and T4) and thyroid stimulating hormone (TSH) in serum was performed by enzyme-linked immunosorbent assay. The investigation also included morphological examination of thyroid slides and morphometry. Adult rats after 6 weeks of exposure showed diminished level of total T4 and increase in T3 production, associated with significantly lowered TSH and sodium iodide symporter serum concentration. Rats, exposed to endocrine disruptor since birth, demonstrated slight decrease in T4 and sodium iodide symporter. Reduced level of free T3 and elevated serum TSH were found in adult rats after 10 weeks of exposure. Exceeded level of serum sodium iodide symporter was revealed. It was provided by increased number of thyroid cells, producing this protein, due to formation of numerous microfollicles in the thyroid gland. Young rats after 10 weeks of exposure demonstrated diminished total and free T3 levels and elevated TSH. No up-regulation of sodium iodide symporter expression was found. Morphological examination revealed enlarged follicles and no microfollicular rearrangement of thyroid parenchyma. Considered that low dose exposure to endocrine disruptor DDT irreversibly depresses expression of membrane glycoprotein sodium iodide symporter, which provides iodine uptake by the thyroid gland. After-birth exposure impairs compensatory activation of proliferation and increase in number of sodium iodide symporter-producing cells.

Keywords: thyroid gland; sodium iodide symporter; thyroid hormones; morphology; endocrine disruptor; DDT.

Acknowledgements. The research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (registration number АААА-А17-117013050048-6).

Введение

Увеличение числа заболеваний щитовидной железы у взрослых и детей наблюдается во многих странах. По мнению специалистов, существенный вклад в этот процесс вносит воздействие на организм эндокринных дисрапторов, нарушающих секреторную деятельность железы и ее гипоталамо-гипофизарную регуляцию [1]. Известно, что эндокринные дисрапторы способны препятствовать связыванию тиреоидных гормонов с транспортирующими их белками, а также связыванию гормонов с рецепторами [2–4]. Существует еще один немаловажный аспект – влияние эндокринных дисрапторов на йод-аккумулирующую функцию щитовидной железы. Проблема йододефицита стоит достаточно остро во многих странах, а воздействие эндокринных дисрапторов является универсальным, следовательно, возможно усугубление природного дефицита йода нарушениями его органификации щитовидной железой [5]. Йодаккумулирующая функция щитовидной железы обеспечивается работой ионного канала в наружной цитоплазматической мембране, осуществляющего транспорт йодидов в тироцит против градиента концентрации [6]. Его формирует гликопротеин натрий-йодный симпортер (НИС) [7]. Следовательно, НИС может быть мишенью действия эндокринных дисрапторов. Одним из самых распространенных в окружающей среде эндокринных дисрапторов является пестицид дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Его метаболиты обнаруживаются у 100 % исследуемых выборок населения развитых и развивающихся стран [8; 9]. По имеющимся данным, ДДТ способен оказывать дисрапторное действие на функционирование щитовидной железы [10–12]. Однако механизмы этого процесса требуют тщательного изучения.

Цель настоящей работы – проанализировать продукцию мембранного гликопротеина НИС при воздействии на организм низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в различные периоды развития.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на самцах крыс вистар. Первую экспериментальную группу ($n = 20$) составили половозрелые животные, которые длительно получали вместо питьевой воды раствор *o,n*-ДДТ (*Sigma-Aldrich*, США) с концентрацией 20 мкг/л начиная с 7-недельного возраста. Во вторую экспериментальную группу ($n = 20$) вошли новорожденные самцы, которые в течение первых 3 нед. получали ДДТ лактационным путем, а затем – самостоятельно. Контрольной группой служило потомство мужского пола, рожденное интактными самками, аналогичное по возрасту ($n = 10$ для каждой экспериментальной группы). Животных выводили из эксперимента через 6 и 10 нед. от начала воздействия ДДТ передозировкой золетила. Среднесуточное потребление ДДТ крысами первой экспериментальной группы составило в среднем 2 мкг/кг, а самостоятельное потребление крысами второй экспериментальной группы – 3 мкг/кг. Эти дозы соответствуют допустимому уровню воздействия ДДТ на организм человека с продуктами питания, установленному техническим регламентом Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/011). Эксперимент одобрен этическим комитетом НИИ морфологии человека.

Доли щитовидной железы фиксировали в растворе Буэна, после стандартной гистологической обработки получали парафиновые срезы. Также железу фиксировали в 2,5 % растворе глutarового альдегида и после обезвоживания в спиртах восходящей концентрации заливали в смесь эпона и аралдита. Изготавливали полутонкие срезы, для исследования которых применяли комбинированный способ гистохимического выявления дезоксирибонуклеопротеинов, полисахаридов и углеводных компонентов биополимеров по Ягловой [13]. Проводили иммуногистохимическое обнаружение НИС в фолликулярном эпителии щитовидной железы с помощью моноклональных антител (*Santa Cruz Biotechnology*, США) на парафиновых срезах. Для количественной оценки результатов определяли процент клеток с высокой (диффузное распределение в цитоплазме), умеренной (наличие в базальной части клеток) и низкой (присутствие только в базолатеральной мембране) экспрессией НИС, а также его концентрацию в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с использованием набора реактивов (*Cusabio*, Китай). Устанавливали диаметр фолликулов у крыс после 10-недельного воздействия ДДТ посредством компьютерной морфометрии с помощью программы *ImageScope* (*Leica Microsystems*, Германия). В сыворотке крови крыс методом иммуноферментного анализа с применением наборов реактивов (*Monobind Inc.*, США; *Cusabio*, Китай) определяли концентрации общего и свободного тироксина (Т4 и сТ4) и общего и свободного трийодтиронина (Т3 и сТ3), тиреотропного гормона (ТТГ).

Статистический анализ осуществляли в программе *Statistica 7.0* (*StatSoft Inc.*, США). Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом

значений критерия Левена о равенстве дисперсий, по качественному признаку – с помощью критерия χ^2 . Статистически значимыми считались различия при $p < 0,01$. В связи с отсутствием статистически значимых различий между параметрами двух контрольных групп последние были объединены в общую контрольную группу.

Результаты и их обсуждение

У половозрелых крыс, подвергавшихся низкодозовому воздействию ДДТ, через 6 нед. обнаружено уменьшение концентрации Т4 в сыворотке крови и одновременно снижение уровня ТТГ. Причиной низкой секреции ТТГ было повышение концентраций сТ4, а также Т3 и сТ3, что является ранним признаком развития йододефицитного состояния (рис. 1, а). Основным гормоном щитовидной железы выступает Т4, так как Т3 образуется в значительной мере за счет конвертации Т4 в периферических органах. Следовательно, выявленное избирательное снижение уровня Т4 и компенсаторное увеличение превращения его в Т3 указывают на нарушение органификации йодидов в железе.

Концентрация НИС в сыворотке крови была в 4,5 раза ниже контрольных значений (рис. 2, а). Иммуногистохимическое исследование выявило уменьшение продукции НИС фолликулярными тироцитами. Следовательно, воздействие низких доз ДДТ подавляет формирование мембранных каналов, осуществляющих транспорт йодидов, и обуславливает снижение выработки Т4 щитовидной железой (рис. 3, а).

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с первых суток после рождения, через 6 нед. отмечалось снижение уровня Т4 и повышение секреции ТТГ (см. рис. 1, б). Концентрация НИС в сыворотке крови была меньше значений контрольной группы, однако ее снижение являлось не таким выраженным, как в предыдущей группе (см. рис. 2, б). Аналогично и уменьшение экспрессии НИС фолликулярными тироцитами по данным иммуногистохимического исследования было не столь значительным (см. рис. 3, б). То есть изменения оказались схожими с результатами половозрелых животных, но развивались медленнее.

Через 10 нед. воздействия эндокринного дисраптора у половозрелых крыс обнаружены пониженная концентрация сТ3 и повышенный уровень ТТГ. Другие показатели тиреоидного статуса не отличались от контрольных величин (см. рис. 1, а). Концентрация НИС в системном кровотоке превышала значения контрольной группы (см. рис. 2, а).

Иммуноморфологическое исследование выявило структурные изменения в щитовидной железе, заключающиеся в появлении микрофолликулов в центральной зоне ее долей (рис. 4, а), что подтверждалось результатами морфометрического анализа, показавшего статистически значимое уменьшение размеров фолликулов (рис. 5, а), однако уровень экспрессии НИС был ниже, чем в контрольной группе (см. рис. 3, б).

У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ с первых суток после рождения, через 10 нед. выявлены уменьшение концентраций Т3 и сТ3 и, как следствие, повышенный уровень ТТГ (см. рис. 1, б). Концентрация НИС была ниже контрольных значений (см. рис. 2, б).

Морфологическое исследование показало отсутствие микрофолликулярной перестройки и даже увеличение размеров фолликулов (см. рис. 4, б; 5, б), т. е. пролиферативные процессы в железе не развивались. Экспрессия НИС была подавлена (см. рис. 3, б).

Исходя из полученных данных, основным механизмом повышения синтеза НИС у половозрелых крыс было увеличение числа клеток-продуцентов, а не активация его экспрессии имеющимися клетками. Синтез НИС фолликулярными тироцитами является ТТГ-зависимым процессом [14]. Известно, что повышенная секреция ТТГ оказывает нормализующее действие на гормоногенез в железе даже в случае тяжелых функциональных расстройств [15; 16]. Выявленные изменения свидетельствуют о неспособности ТТГ восстановить экспрессию НИС в фолликулярных тироцитах, т. е. о необратимом ингибировании дисраптором синтеза ТТГ, вследствие чего активируются пролиферативные процессы, приводящие к формированию микрофолликулов, а значит, увеличивается число клеток – продуцентов НИС.

Сравнение изменений в обеих опытных группах показывает, что при воздействии дисраптора с первых дней жизни йодаккумулирующая функция страдает сильнее, так как к подавлению экспрессии НИС добавляется гибель тироцитов без активации пролиферации, т. е. происходит значительное уменьшение числа клеток – продуцентов НИС. Это свидетельствует о нарушении формирования ТТГ-зависимых регуляторных механизмов в железе, поскольку пролиферация тиреоидного эпителия также индуцируется ТТГ [17].

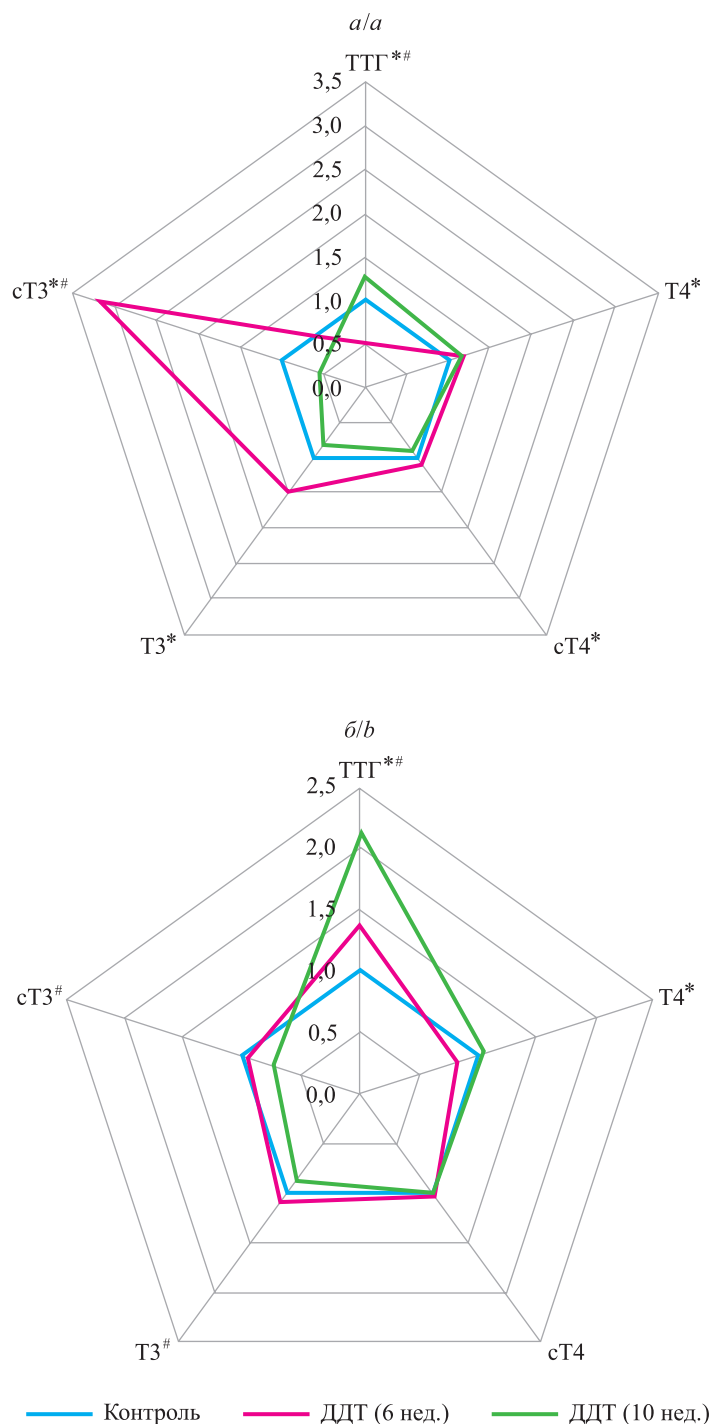


Рис. 1. Изменения тиреоидного профиля сыворотки крови крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ с половозрелого возраста (а) и с первых суток после рождения (б). Значения контрольной группы приняты за единицу.

*Статистически значимые отличия от контрольной группы.

#Статистически значимые отличия от 6-недельного срока исследования

Fig. 1. Alterations in thyroid serum profile of rats exposed to low doses of endocrine disruptor DDT since maturation (a) and since birth (b).

Levels are normalized to appropriate control.

*Statistically significant differences from control.

#Statistically significant differences from 6-weeks exposure

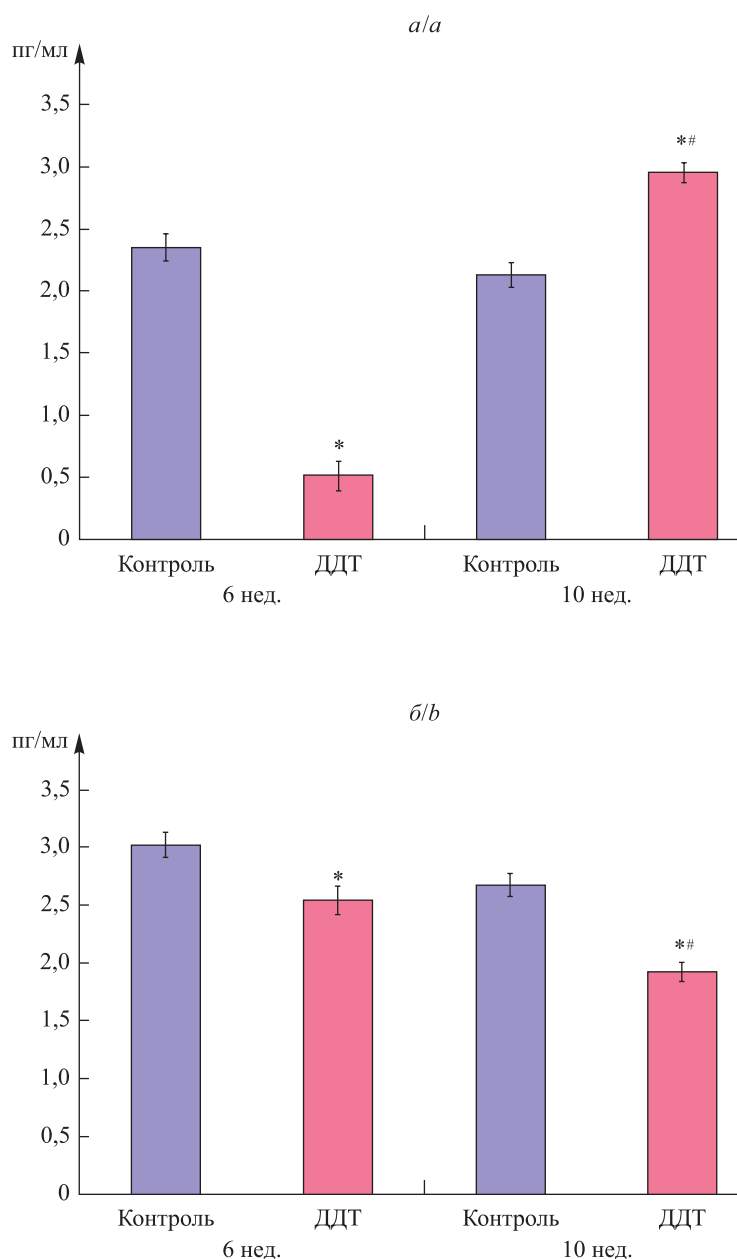


Рис. 2. Изменения концентрации НИС в сыворотке крови крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ с половозрелого возраста (*а*) и с первых суток после рождения (*б*).

*Статистически значимые отличия от контрольной группы.

#Статистически значимые отличия от 6-недельного срока исследования

Fig. 2. Changes in sodium iodide symporter serum concentration in rats exposed to low doses of endocrine disruptor DDT since maturation (*a*) and since birth (*b*).

*Statistically significant differences from control.

#Statistically significant differences from 6-weeks exposure

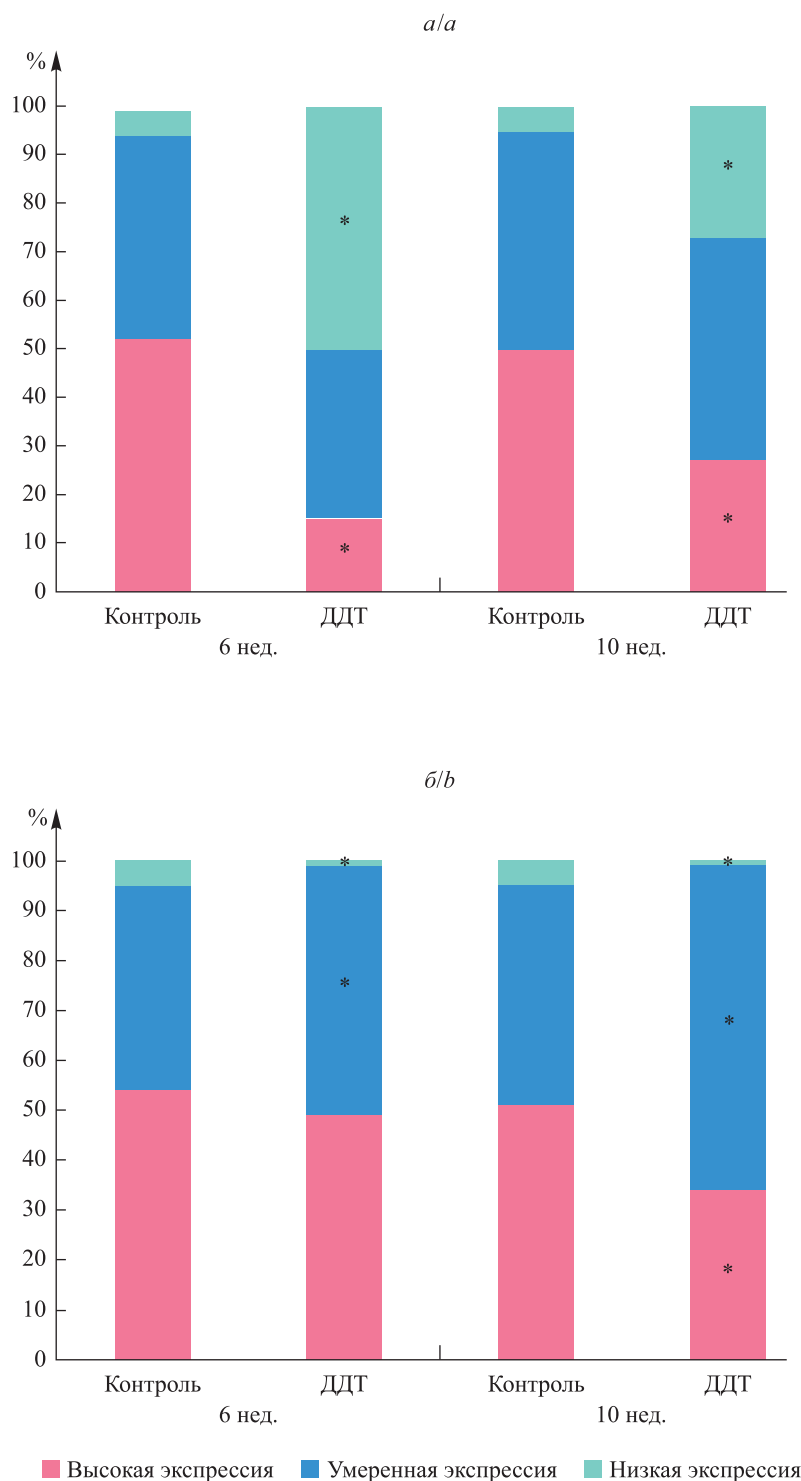


Рис. 3. Изменения экспрессии НИС фолликулярными тироцитами крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ с половозрелого возраста (*a*) и с первых суток после рождения (*б*).

*Статистически значимые отличия от контрольной группы

Fig. 3. Changes in sodium iodide symporter expression by follicular thyroid cells in rats exposed to low doses of endocrine disruptor DDT since maturation (*a*) and since birth (*b*).

*Statistically significant differences from control

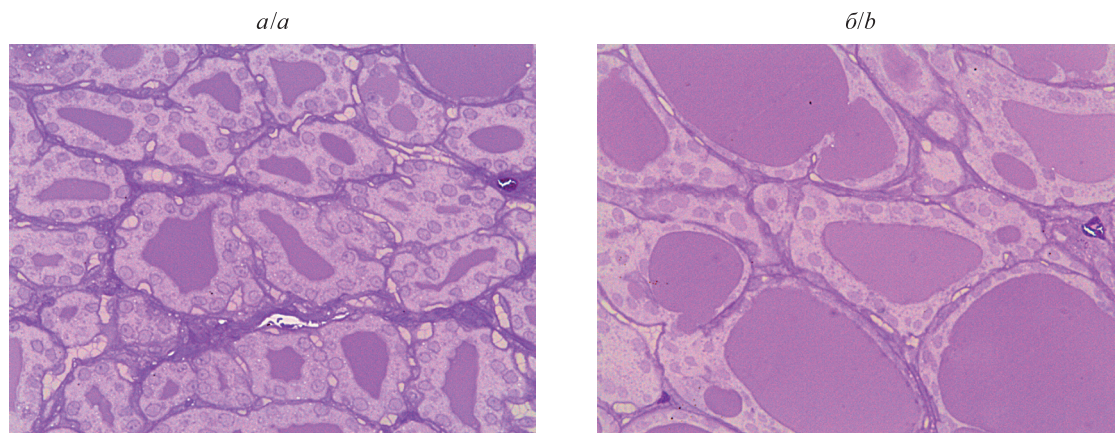


Рис. 4. Отличия в структуре щитовидной железы крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ с половозрелого возраста (*а*) и с первых суток после рождения (*б*) в течение 10 нед.:
а – паренхима представлена фолликулами малого размера с высоким содержанием ШИК-положительного тиреоглобулина;
б – фолликулы более крупные, менее выраженная ШИК-реакция тиреоглобулина (полутонкие срезы, окраска по Ягловой, увеличение $\times 400$)

Fig. 4. Differences in thyroid histology of rats after 10-weeks exposure to low doses of endocrine disruptor DDT since maturation (*a*) and since birth (*b*):
a – thyroid parenchyma demonstrates prevalence of smaller follicles with higher content of PAS-positive thyroglobulin; *b* – enlarged of follicles with less PAS-positive thyroglobulin (semithin sections, Yaglova's stain, magnification $\times 400$)

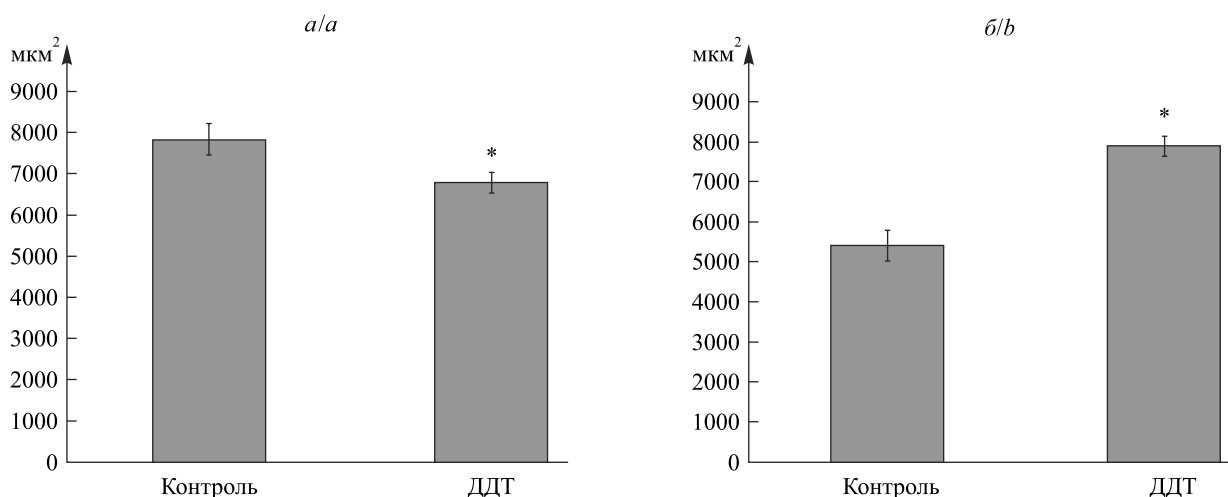


Рис. 5. Изменения размеров фолликулов щитовидной железы крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ с половозрелого возраста (*а*) и с первых суток после рождения (*б*) в течение 10 нед.

*Статистически значимые отличия от контрольной группы

Fig. 5. Changes in surface area of thyroid follicles in rats after 10-weeks exposure to low doses of endocrine disruptor DDT since maturation (*a*) and since birth (*b*).

*Statistically significant differences from control

Закключение

Таким образом, низкие дозы эндокринного дисраптора ДДТ необратимо подавляют экспрессию фолликулярными тироцитами мембранного гликопротеина НИС, обеспечивающего йодаккумулялирующую функцию щитовидной железы.

При воздействии на развивающийся организм низкие дозы эндокринного дисраптора ДДТ также нарушают развитие компенсаторно-приспособительных реакций в виде увеличения числа фолликулярных тироцитов – продуцентов НИС, направленных на повышение гормоногенеза в щитовидной железе.

Библиографические ссылки

1. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the endocrine society. *Endocrinology*. 2012;153(9):4097–4110. DOI: 10.1210/en.2012-1422.
2. Ghassabian A, Trasande L. Disruption in thyroid signaling pathway: a mechanism for the effect of endocrine-disrupting chemicals on child neurodevelopment. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:204. DOI: 10.3389/fendo.2018.00204.
3. Li J, Ren S, Han S, Lei B, Li N. Identification of thyroid-receptor antagonists in water from the Guanting Reservoir, Beijing, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2014;67(1):68–77. DOI: 10.1007/s00244-014-0027-5.
4. Zoeller RT, Bansal R, Parris C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*. 2005;146(2):607–612. DOI: 10.1210/en.2004-1018.
5. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015;3(4):286–295. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70225-6.
6. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*. 1993;1154(1):65–82. DOI: 10.1016/0304-4157(93)90017-I.
7. Darrouzet E, Lindenthal S, Marcellin D, Pellequer J-L, Pourcher T. The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2014;1838(1):244–253. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.08.013.
8. Haug LS, Sakhi AK, Cequier E, Casas M, Maitre L, Basagana X, et al. In-utero and childhood chemical exposome in six European mother-child cohorts. *Environment International*. 2018;121(part 1):751–763. DOI: 10.1016/j.envint.2018.09.056.
9. Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini J-B. Pesticides with potential thyroid hormone-disrupting effects: a review of recent data. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10:743. DOI: 10.3389/fendo.2019.00743.
10. Freire C, Lopez-Espinosa M-J, Fernandez M, Molina-Molina J-M, Prada R, Olea N. Prenatal exposure to organochlorine pesticides and TSH status in newborns from Southern Spain. *Science of the Total Environment*. 2011;409(18):3281–3287. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.05.037.
11. Liu C, Shi Y, Li H, Wang Y, Yang K. *p,p'*-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes. *Hormone and Metabolic Research*. 2011;43(6):391–396. DOI: 10.1055/s-0031-1277135.
12. Яглова НВ, Яглов ВВ. Изменения тиреоидного статуса крыс при длительном воздействии низких доз дихлордифенилтрихлорэтана. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013;156(12):720–722.
13. Яглова НВ, Яглов ВВ, Следнева ЮП, авторы; Научно-исследовательский институт морфологии человека, правообладатель. Комбинированный способ гистохимического выявления дезоксирибонуклеопротеинов, полисахаридов и углеводных компонентов биополимеров в полутонких срезах тканей и органов. Патент RU 0002647420. 15 марта 2018 г.
14. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 1997;138(6):2227–2232. DOI: 10.1210/endo.138.6.5189.
15. Яглова НВ. Синдром нетиреоидных заболеваний при остром бактериальном эндотоксикозе: патогенетические механизмы и методы коррекции. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013;68(3):24–32. DOI: 10.15690/vramn.v68i3.597.
16. Яглова НВ. Нарушения секреторного цикла фолликулярных тироцитов и их коррекция тиреотропным гормоном при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2011;152(8):215–219.
17. Medina DL, Santisteban P. Thyrotropin-dependent proliferation of *in vitro* rat thyroid cell systems. *European Journal of Endocrinology*. 2000;143(2):161–178. DOI: 10.1530/eje.0.1430161.

References

1. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the endocrine society. *Endocrinology*. 2012;153(9):4097–4110. DOI: 10.1210/en.2012-1422.
2. Ghassabian A, Trasande L. Disruption in thyroid signaling pathway: a mechanism for the effect of endocrine-disrupting chemicals on child neurodevelopment. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:204. DOI: 10.3389/fendo.2018.00204.
3. Li J, Ren S, Han S, Lei B, Li N. Identification of thyroid-receptor antagonists in water from the Guanting Reservoir, Beijing, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2014;67(1):68–77. DOI: 10.1007/s00244-014-0027-5.
4. Zoeller RT, Bansal R, Parris C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist *in vitro*, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology*. 2005;146(2):607–612. DOI: 10.1210/en.2004-1018.
5. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015;3(4):286–295. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70225-6.
6. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Biomembranes*. 1993;1154(1):65–82. DOI: 10.1016/0304-4157(93)90017-I.
7. Darrouzet E, Lindenthal S, Marcellin D, Pellequer J-L, Pourcher T. The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2014;1838(1):244–253. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.08.013.
8. Haug LS, Sakhi AK, Cequier E, Casas M, Maitre L, Basagana X, et al. In-utero and childhood chemical exposome in six European mother-child cohorts. *Environment International*. 2018;121(part 1):751–763. DOI: 10.1016/j.envint.2018.09.056.
9. Leemans M, Couderq S, Demeneix B, Fini J-B. Pesticides with potential thyroid hormone-disrupting effects: a review of recent data. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10:743. DOI: 10.3389/fendo.2019.00743.
10. Freire C, Lopez-Espinosa M-J, Fernandez M, Molina-Molina J-M, Prada R, Olea N. Prenatal exposure to organochlorine pesticides and TSH status in newborns from Southern Spain. *Science of the Total Environment*. 2011;409(18):3281–3287. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.05.037.

11. Liu C, Shi Y, Li H, Wang Y, Yang K. *p,p'*-DDE disturbs the homeostasis of thyroid hormones via thyroid hormone receptors, transthyretin, and hepatic enzymes. *Hormone and Metabolic Research*. 2011;43(6):391–396. DOI: 10.1055/s-0031-1277135.
12. Yaglova NV, Yaglov VV. [Changes in thyroid status of rats after prolonged exposure to low dose dichlorodiphenyltrichloroethane]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2013;156(12):720–722. Russian.
13. Yaglova NV, Yaglov VV, Sledneva YuP, inventors; Research Institute of Human Morphology, assignee. *Combined method of histochemical detection of deoxiribonucleoproteins, polysaccharides and hydrocarbon components of biopolymers in semithin sections of tissues and organs*. Russian Federation Patent RU 0002647420. 2018 March 15. Russian.
14. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 1997;138(6):2227–2232. DOI: 10.1210/endo.138.6.5189.
15. Yaglova NV. Nonthyroidal illness syndrome in acute bacterial endotoxemia: pathogenesis and methods of correction. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk*. 2013;68(3):24–32. Russian.
16. Yaglova NV. [Disorders in the secretory cycle of follicular thyrocytes and their correction with thyrotropic hormone in experimental non-thyroidal illness syndrome]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2011;152(8):215–219. Russian.
17. Medina DL, Santisteban P. Thyrotropin-dependent proliferation of *in vitro* rat thyroid cell systems. *European Journal of Endocrinology*. 2000;143(2):161–178. DOI: 10.1530/eje.0.1430161.

Статья поступила в редакцию 07.06.2020.
Received by editorial board 07.06.2020.

РОЛЬ СТРУКТУРНОЙ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО АППАРАТА В ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЯХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КОРКОВОГО ВЕЩЕСТВА НАДПОЧЕЧНИКОВ¹

Е. П. ТИМОХИНА¹⁾, В. В. ЯГЛОВ¹⁾, С. С. ОБЕРНИХИН¹⁾,
Н. В. ЯГЛОВА¹⁾, С. В. НАЗИМОВА¹⁾, Д. А. ЦОМАРТОВА¹⁾

¹⁾Научно-исследовательский институт морфологии человека,
ул. Цюрупы, 3, 117418, г. Москва, Россия

Стероидогенная активность кортикостероцитов существенно меняется в постнатальном периоде онтогенеза. Однако возрастные изменения митохондриального аппарата кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторной функции мало изучены. Целью работы был анализ структурных перестроек митохондриального аппарата кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон коркового вещества надпочечников крыс в процессе возрастных изменений и сопоставление их с динамикой морфофункциональных трансформаций коркового вещества. Исследование проведено на самцах крыс вистар пубертатного и постпубертатного возраста. Определены количественные показатели структуры коркового вещества методом световой микроскопии и ультраструктуры кортикостероцитов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, а также продукция соответствующих стероидных гормонов посредством иммуноферментного анализа. Выявлены различные структурные изменения митохондриального аппарата, происходящие в кортикостероцитах при переходе от пубертатного периода к постпубертатному, которые влияют на активность

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Тимохина ЕП, Яглов ВВ, Обернихин СС, Яглова НВ, Назимова СВ, Цомартова ДА. Роль структурной реорганизации митохондриального аппарата в возрастных изменениях функционирования коркового вещества надпочечников. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:13–18.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-13-18>

For citation:

Timokhina EP, Yaglov VV, Obernihyn SS, Yaglova NV, Nazimova SV, Tsomartova DA. Role of reorganization of mitochondria structure in age-dependent changes of adrenal cortex function. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:13–18. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-13-18>

Авторы:

Екатерина Петровна Тимохина – кандидат биологических наук; научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Валентин Васильевич Яглов – доктор медицинских наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Сергей Станиславович Обернихин – доктор медицинских наук; старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Наталья Валентиновна Яглова – доктор медицинских наук; заведующий лабораторией развития эндокринной системы.

Светлана Владимировна Назимова – кандидат медицинских наук; старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Дибакхан Асланбековна Цомартова – кандидат медицинских наук; младший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Authors:

Ekaterina P. Timokhina, PhD (biology); researcher at the laboratory of endocrine system development.

rodich_k@mail.ru

Valentin V. Yaglov, doctor of science (medicine), full professor; chief researcher at the laboratory of endocrine system development.

vyaglov@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4357-0639>

Sergey S. Obernihyn, doctor of science (medicine); senior researcher at the laboratory of endocrine system development.

ober@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0997-6766>

Natalia V. Yaglova, doctor of science (medicine); head of the laboratory of endocrine system development.

yaglova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-8239-5039>

Svetlana V. Nazimova, PhD (medicine); senior researcher at the laboratory of endocrine system development.

pimka60@list.ru

<https://orcid.org/0000-0001-5118-7037>

Dibakhan A. Tsomartova, PhD (medicine); junior researcher at the laboratory of endocrine system development.

стероидогенеза в большей степени, чем структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Выраженность связи секреции стероидных гормонов и структурных перестроек митохондрий указывает на необходимость дополнительных ультраструктурных исследований при морфологической оценке состояния коркового вещества надпочечников развивающегося организма.

Ключевые слова: митохондрия; надпочечник; кортикостероцит; стероидогенез; стероидные гормоны; постнатальное развитие.

ROLE OF REORGANIZATION OF MITOCHONDRIA STRUCTURE IN AGE-DEPENDENT CHANGES OF ADRENAL CORTEX FUNCTION

*E. P. TIMOKHINA^a, V. V. YAGLOV^a, S. S. OBERNIKIN^a,
N. V. YAGLOVA^a, S. V. NAZIMOVA^a, D. A. TSOMARTOVA^a*

^aResearch Institute of Human Morphology, 3 Tsyurupy Street, Moscow 117418, Russia

Corresponding author: E. P. Timokhina (rodich_k@mail.ru)

Steroidogenic activity of adrenal cortical cells is known to change significantly during postnatal development. Age-dependent changes of mitochondrial apparatus and its impact in secretory activity of the adrenal cortex are less studied. The aim was to uncover age-dependent mitochondrial dynamics in rat glomerulosa, fasciculata and reticularis cells, and to assess them together with changes in adrenal cortex morphology and function. Pubertal and postpubertal male Wistar rats were used in the research. Quantitative parameters of adrenal cortex morphology and fine structure of adrenocortical cells were examined by light and transmission electron microscopy. Production of adrenal hormones was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. Discrete age-dependent changes of mitochondrial dynamics was revealed. These changes were found more sufficient for hormone production than alterations in morphology of adrenocortical zones. Association of changes in mitochondrial structure with intensity of hormone secretion demonstrate that morphological studies of adrenal cortex requires examination of fine structure for correct assessment of adrenal development.

Keywords: mitochondrion; adrenal gland; adrenal cortical cell; steroidogenesis; steroid hormones; postnatal development.

Введение

В литературе имеется достаточное количество работ, раскрывающих структурные основы синтеза стероидных гормонов в клетках коркового вещества надпочечников. Процессы стероидогенеза обеспечиваются ферментами, локализованными в митохондриях и гладкой эндоплазматической сети. Известно, что наибольшие изменения при стимулировании или подавлении стероидогенеза претерпевают именно митохондрии [1; 2]. Следовательно, структура митохондриального аппарата служит одним из основных показателей секреторной активности кортикостероцитов [3–5]. Известно, что в постнатальном периоде онтогенеза стероидогенная функция клеток существенно меняется. Наиболее сложное развитие и становление стероидогенеза наблюдается в корковом веществе надпочечников. У крыс секреторная активность пучковой зоны усиливается в пренатальном периоде и снижается в постнатальном [6–8]. С трехнедельного возраста начинается синтез половых гормонов в сетчатой зоне [9]. Данные процессы обусловлены активацией ферментов гидроксилаз, однако возрастные изменения митохондриального аппарата кортикостероцитов при развитии коркового вещества надпочечников и вклад этих изменений в обеспечение секреторной функции изучены в значительно меньшей степени.

Цель работы – проанализировать структурные перестройки митохондриального аппарата кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон коркового вещества надпочечников крыс в процессе возрастных изменений и сопоставить их с динамикой морфофункциональных трансформаций коркового вещества.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 20 самцах крыс вистар. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила в возрасте 6 нед. ($n = 10$), что соответствует пубертатному периоду, и 10 нед. ($n = 10$), т. е. после наступления половой зрелости, когда надпочечники крыс достигают своего максимального развития [9]. Эксперимент выполнен в соответствии с нормами обращения с лабораторными

животными, закрепленными в Международных рекомендациях (этическом кодексе) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (разработаны и опубликованы Советом международных научных организаций в 1985 г.), Правилах лабораторной практики в Российской Федерации (утверждены приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 г. № 267), Федеральном законе «О защите животных от жестокого обращения» от 1 декабря 1999 г. (проект № 97802163-2), а также Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных (утверждены приказом Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755).

Надпочечники фиксировали в жидкости Буэна. Изготавливали препараты экваториальных срезов органа, которые после стандартной гистологической проводки окрашивали гематоксилином и эозином (ООО «БиоВитрум», Россия). Гистологические препараты изучали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Leica DM2500 (*Leica Microsystems*, Германия). Морфометрическое исследование проводили с помощью программы *ImageScope* (*Leica Microsystems*, Германия). Для изучения ультраструктуры надпочечники фиксировали в 2,5 % растворе глutarового альдегида в 0,1 моль/л какодильном буфере (рН 7,3) с последующей заливкой в смесь эпона и аралдита. Контрастирование срезов проводили водным раствором 2,5 % уранилацетата и цитрата свинца. Исследование срезов выполняли методом электронной трансмиссионной микроскопии с применением микроскопа Libra 120 (*Carl Zeiss*, Германия). В сыворотке крови крыс иммуноферментным методом с помощью коммерческих наборов (*Cusabio*, Китай) определяли концентрацию альдостерона, кортикостерона, а также эстрогена как конечного продукта синтеза половых стероидов сетчатой зоны.

Центральные тенденции и рассеяние признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом критерия Левена о равенстве дисперсий. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Надпочечники крыс пубертатного периода имели типичное строение. На гистологических срезах четко различались корковое и мозговое вещества. Клубочковая зона коркового вещества включала эндокриноциты с круглыми и овальными ядрами и просветленной цитоплазмой, располагалась под капсулой в виде непрерывного слоя равномерной толщины и занимала менее 10 % площади коркового вещества. Сетчатая зона была представлена анастомозирующей сетью эндокриноцитов, между которыми размещались капилляры. Большинство просветов сосудов были свободны, в остальных находилась плазма, в единичных случаях – эритроциты. Клетки наружной части имели кубическую форму и круглые ядра, клетки внутренней части – меньший размер, полигональную форму. Цитоплазма клеток проявляла ярко выраженные оксифильные свойства, в ней присутствовали липидные включения. Пучковая зона была представлена кубическими эндокриноцитами, образующими тяжи. Пучковая и сетчатая зоны имели одинаковый размер и занимали приблизительно 90 % площади коркового вещества.

Электронно-микроскопическое исследование показало, что кортикостероциты клубочковой зоны содержали митохондрии овальной или округлой формы с пластинчатыми кристами и гомогенным матриксом (рис. 1, а). У значительной части митохондрий наблюдался отек матрикса различной степени. Липидные капли умеренной плотности контактировали с митохондриями и встречались не во всех клетках. В пучковой зоне митохондрии были большего размера и более округлой формы с везикулярными кристами (см. рис. 1, б). Также отмечено большее количество митохондрий с отеком матрикса, чем в клубочковой зоне (см. таблицу). В сетчатой зоне митохондрии имели округлую или овальную форму, а также матрикс средней электронной плотности (см. рис. 1, в). Липидные капли характеризовались выраженной осмиофильностью.

После наступления половой зрелости, когда надпочечники достигают своего максимального развития, наблюдалось уменьшение площади клубочковой зоны (рис. 2) и объемов ее клеток, при этом диаметр ядер остался неизменным. Количество митохондрий увеличилось, однако их размер уменьшился. Снизилась доля митохондрий с отеком матрикса (см. таблицу). Липидные включения встречались реже и были представлены скоплением большого числа липидных капель низкой плотности, которые мало контактировали с митохондриями. Отмечено увеличение концентрации альдостерона в сыворотке крови (рис. 3).

Исследование пучковой зоны надпочечников крыс после наступления половой зрелости показало увеличение ее размеров (см. рис. 2). Количество митохондрий в клетках уменьшилось, а их диаметр увеличился. Снизилась доля митохондрий с отеком матрикса (см. таблицу) и концентрация кортикостерона в сыворотке крови (см. рис. 3).

Сетчатая зона надпочечников крыс в постпубертатном периоде развития не изменилась в размере. Отмечалось уменьшение диаметра клеток, при этом количество митохондрий значительно увеличилось (см. таблицу). По сравнению с предыдущим сроком исследования снизилась продукция половых гормонов в сыворотке крови (см. рис. 3).

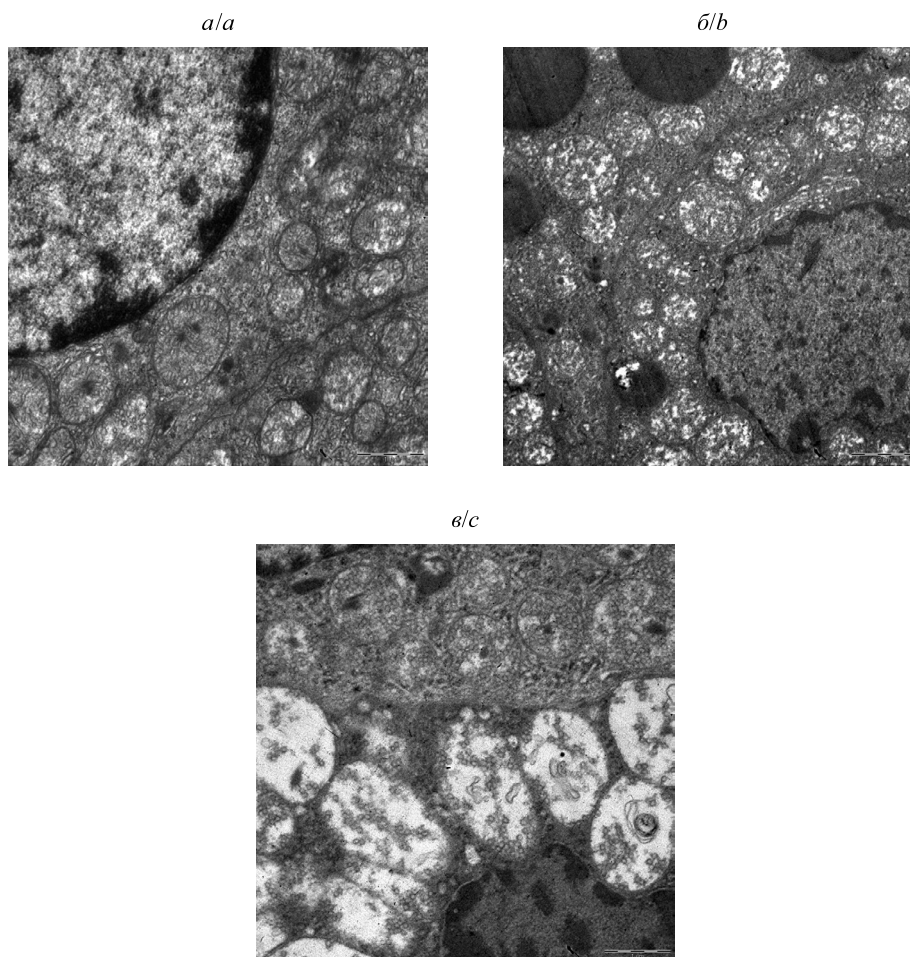


Рис. 1. Структура митохондрий кортикостероцитов клубочковой (а), пучковой (б) и сетчатой (в) зон коркового вещества надпочечников крысы в пубертатном периоде

Fig. 1. Mitochondria structure in adrenal cortical cells of zona glomerulosa (a), zona fasciculata (b) and zona reticularis (c) in pubertal rats

Морфологическая характеристика митохондрий кортикостероцитов клубочковой, пучковой и сетчатой зон надпочечников крысы в пубертатном (6 нед.) и постпубертатном (10 нед.) периодах ($M \pm m$)

Morphological characteristics of mitochondria of adrenal cortical cells of the glomerular, fascicular and reticular zones of the rat adrenal glands in the pubertal (6 weeks) and postpubertal (10 weeks) periods ($M \pm m$)

Параметры	Клубочковая зона		Пучковая зона		Сетчатая зона	
	6 нед.	10 нед.	6 нед.	10 нед.	6 нед.	10 нед.
Диаметр митохондрий, мкм	$0,99 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,02^*$	$1,11 \pm 0,03$	$1,32 \pm 0,05^*$	$1,58 \pm 0,04$	$1,32 \pm 0,04^*$
Количество митохондрий в 1 мкм^2 цитоплазмы	$0,36 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,04^*$	$0,36 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01^*$	$0,29 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,02^*$
Доля митохондрий с отеком матрикса, %	$44,59 \pm 3,34$	$30,22 \pm 1,03^*$	$53,62 \pm 3,34$	$36,87 \pm 1,22^*$	$95,77 \pm 1,22$	$97,25 \pm 3,24^*$

*Статистически значимые отличия от значений предыдущего срока.

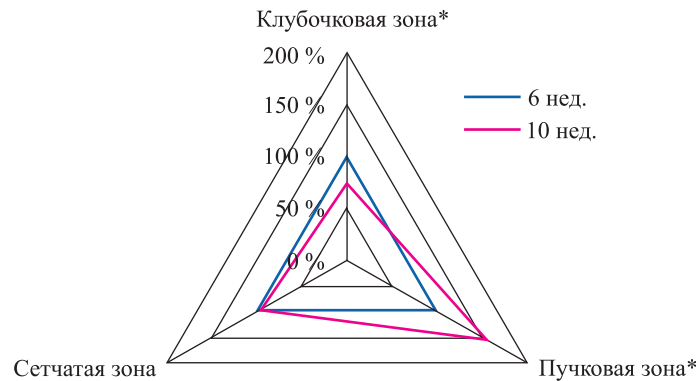


Рис. 2. Возрастные изменения площадей зон коркового вещества надпочечников крысы при переходе от пубертатного периода (6 нед.) к половой зрелости (10 нед.). Значения показателей пубертатного периода приняты за 100 %.
*Статистически значимые отличия от значений предыдущего срока
Fig. 2. Age-dependent changes in the areas of the rat adrenal cortex zones during the transition from pubertal (6 weeks) to postpubertal (10 weeks) periods. The values of the indicators of puberty are taken as 100 %.
*Statistically significant differences from previous values

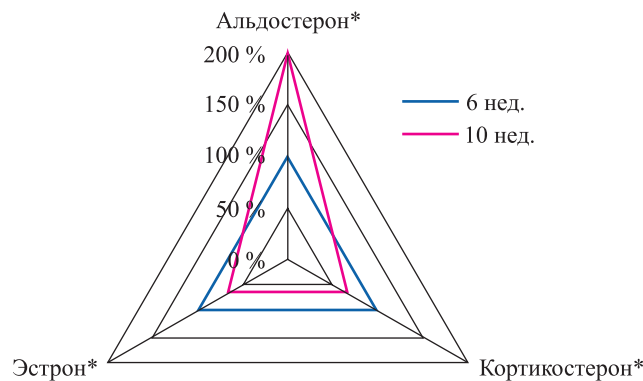


Рис. 3. Концентрации гормонов коркового вещества надпочечников в сыворотке крови крысы при переходе от пубертатного периода (6 нед.) к половой зрелости (10 нед.). Значения показателей пубертатного периода приняты за 100 %.
*Статистически значимые отличия от значений предыдущего срока
Fig. 3. Concentration of adrenal hormones during the transition from pubertal (6 weeks) to postpubertal (10 weeks) periods. The values of the indicators of puberty are taken as 100 %.
*Statistically significant differences from previous values

Как известно, митохондрии находятся в состоянии динамического равновесия, которое поддерживается двумя противоположными процессами: регулируемым делением (фрагментацией), приводящим к образованию органелл меньшего размера, и слиянием, опосредующим формирование трубчатых или сетчатых митохондриальных структур [10–13]. Проведенное исследование показало различные изменения в строении коркового вещества, ультраструктуре кортикостероцитов и их секреторной деятельности. В пубертатном периоде активный синтез альдостерона приводил к отеку матрикса митохондрий. После наступления половой зрелости размеры клубочковой зоны уменьшались, а продукция альдостерона увеличивалась. Усиление синтеза гормона обеспечивалось двукратным возрастанием количества митохондрий в клетках в сочетании с уменьшением их размера, что способствовало увеличению площади поверхности внутренних мембран и тем самым повышению стероидогенной активности. Этот факт подтверждает и снижение доли митохондрий с отеком матрикса, который возникает при их функциональной нагрузке. Важно отметить, что стероидогенез обеспечивается последовательными процессами в двух органеллах – митохондриях и гладкой эндоплазматической сети. Как показали исследования, деление митохондрий происходит при участии ретикулярных структур путем образования «петли», перетягивающей митохондрию [14], что свидетельствует о связи активности синтеза стероидов и изменений его структурного обеспечения.

Пучковая зона коркового вещества при переходе к постпубертатному периоду увеличивалась в размерах, при этом продукция кортикостерона не повышалась. Электронно-микроскопическое исследование выявило снижение морфологического субстрата стероидогенной активности: уменьшение количества митохондрий в клетках, в том числе с отеком матрикса, и увеличение их размера. Данное изменение структуры митохондрий, вероятно, происходит за счет их слияния [15]. Известно, что после достижения половой зрелости, когда усиливается синтез стероидов в семенниках, функциональная активность клеток сетчатой зоны уменьшается [9]. Наши исследования показали также снижение продукции половых стероидов. Изменений размеров сетчатой зоны при переходе к постпубертатному периоду развития практически не выявлено, но, в отличие от пучковой зоны, в ней отмечено уменьшение размеров клеток. Возрастные изменения митохондриального аппарата были фактически идентичны изменениям в клубочковой зоне. Тем не менее увеличения продукции женских половых стероидов не наблюдалось. Степень отека матрикса митохондрий также была одинакова в пубертатном и постпубертатном периодах. Предположительно, такая перестройка митохондриального аппарата клеток обусловлена значительным уменьшением объема цитоплазмы. Клетки сетчатой зоны отличаются наименьшими размерами среди кортикостероцитов всех зон коркового вещества надпочечников, а соответственно, и меньшим количеством митохондрий. После достижения половой зрелости уменьшение изначально небольших размеров цитоплазмы требовало перестройки митохондриального аппарата для обеспечения биоэнергетических процессов при ее малом объеме, что подтверждается неизменно высоким уровнем клеток с отеком матрикса митохондрий.

Таким образом, структурная реорганизация митохондриального аппарата влияет на активность стероидогенеза в большей степени, чем изменения размеров зон коркового вещества надпочечников.

Заключение

При переходе от пубертатного периода к постпубертатному в кортикостероцитах происходят структурные перестройки митохондрий, оказывающие более сильное влияние на активность стероидогенеза, чем структурные изменения соответствующих зон коркового вещества. Выраженность связи секреции стероидных гормонов и реорганизации митохондриального аппарата указывает на необходимость дополнительных ультраструктурных исследований при морфологической оценке состояния коркового вещества надпочечников развивающегося организма.

Библиографические ссылки / References

1. Chow J, Rahman J, Achermann JC, Dattani MT, Rahman S. Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;13(2):92–104. DOI: 10.1038/nrendo.2016.151.
2. Tsomartova DA, Yaglova NV, Obernikhin SS, Nazimova SV, Yaglov VV. Secretion of adrenal zona glomerulosa cells in rats exposed to low doses of dichlorodiphenyltrichloroethane during prenatal and postnatal development. *Russian Open Medical Journal*. 2018;7(3):e0302. DOI: 10.15275/rusomj.2018.0302.
3. Domoto DT, Boyd JE, Mulrow PJ, Kashgarian M. The ultrastructure of the adrenal zona glomerulosa of rats on potassium-supplemented or sodium-depleted diets. *The American Journal of Pathology*. 1973;72(3):433–446.
4. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell*. 2012;148(6):1145–1159. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.035.
5. Zemirli N, Morel E, Molino D. Mitochondrial dynamics in basal and stressful conditions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(2):564. DOI: 10.3390/ijms19020564.
6. Could E, Woolley CS, McEwen BS. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: I. Effects of glucocorticoids on cell death. *The Journal of Comparative Neurology*. 1991;313(3):479–485. DOI: 10.1002/cne.903130308.
7. Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y. Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. *Endocrinology*. 1999;140(7):3342–3353. DOI: 10.1210/endo.140.7.6859.
8. Dupouy JP, Coffigny H, Magre S. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *Journal of Endocrinology*. 1975;65(3):347–352. DOI: 10.1677/joe.0.0650347.
9. Pignatelli D, Xiao F, Gouvtia AM, Ferreira JG, Vinson GP. Adrenarche in the rat. *Journal of Endocrinology*. 2006;191(1):301–308. DOI: 10.1677/joe.1.06972.
10. Van der Bliek AM, Shen Q, Kawajiri S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(6):a011072. DOI: 10.1101/cshperspect.a011072.
11. Archer SL. Mitochondrial dynamics – mitochondrial fission and fusion in human diseases. *The New England Journal of Medicine*. 2013;369(23):2236–2251. DOI: 10.1056/NEJMr1215233.
12. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*. 2018;62(3):341–360. DOI: 10.1042/ebc20170104.
13. Twig G, Liu X, Liesa M, Wikstrom JD, Molina AJA, Las G, et al. Biophysical properties of mitochondrial fusion events in pancreatic beta-cells and cardiac cells unravel potential control mechanisms of its selectivity. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. 2010;299(2):477–487. DOI: 10.1152/ajpcell.00427.2009.
14. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 2011;334(6054):358–362. DOI: 10.1126/science.1207385.
15. Pernas L, Scorrano L. Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annual Review of Physiology*. 2016;78:505–531. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021115-105011.

Статья поступила в редакцию 29.06.2020.
Received by editorial board 29.06.2020.

ЭФФЕКТЫ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНО-4,6-ДИ-ТРЕТ-БУТИЛФЕНОЛА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА¹

Д. Б. НИЖЕГОРОВОДА¹), Г. А. КСЕНДЗОВА²), А. Г. СЫСА¹),
М. Ю. ЮРКЕВИЧ¹), М. В. ЛОБАЙ¹), О. И. ШАДЫРО²), М. М. ЗАФРАНСКАЯ¹)

¹)Международный государственный институт им. А. Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

²)Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ,
ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Беларусь

Производные 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола проявляют противовирусные свойства и радикалрегуляторную активность в отношении различных типов органических радикалов, что обуславливает актуальность их дальнейшего изучения. До сих пор остается открытым вопрос об иммуномодулирующей активности производных аминифенольных соединений. В настоящей работе осуществляется оценка влияния производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на жизнеспособность и функциональный потенциал лимфоцитов периферической крови человека. Проведенный анализ показал, что исследуемые соединения в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} моль не оказывали цитотоксического действия, в то время как эти соединения в концентрации 10^{-4} моль проявляли цитотоксический эффект за счет индукции вторичного некроза. Соединения N-(2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид и 2,4-ди-*трет*-бутил-6-морфолинофенол в концентрации 10^{-6} моль стимулировали

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Нижегорода ДБ, Ксендзова ГА, Сыса АГ, Юркевич МЮ, Лобай МВ, Шадыро ОИ, Зафранская ММ. Эффекты производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на жизнеспособность и функциональное состояние лимфоцитов периферической крови человека. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:19–28.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-19-28>

For citation:

Nizheharodava DB, Ksendzova GA, Syasa AG, Yurkevich MYu, Labai MV, Shadyro OI, Zafranskaya MM. Effects of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives on the viability and functional state of human peripheral blood lymphocytes. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:19–28. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-19-28>

Авторы:

Дарья Борисовна Нижегородова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

Галина Анатольевна Ксендзова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории химии свободнорадикальных процессов.

Алексей Григорьевич Сыса – кандидат химических наук, доцент; декан факультета экологической медицины.

Мария Юрьевна Юркевич – кандидат биологических наук; доцент кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

Марина Валерьевна Лобай – преподаватель кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

Олег Иосифович Шадыро – доктор химических наук, профессор; заведующий лабораторией химии свободнорадикальных процессов.

Марина Михайловна Зафранская – доктор медицинских наук, доцент; заведующий кафедрой иммунологии факультета экологической медицины.

Authors:

Darya B. Nizheharodava, PhD (biology), docent; associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

nzh@tut.by

Galina A. Ksendzova, PhD (chemistry); leading researcher at the free radical processes chemistry laboratory.

ksja-bn@tut.by

Aliaksei G. Syasa, PhD (chemistry), docent; dean of the faculty of environmental medicine.

aliaksei.syasa@iseu.by

Mariya Yu. Yurkevich, PhD (biology); associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

mariya4567@gmail.com

Maryna V. Labai, lecturer at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

marina.lobai@mail.ru

Oleg I. Shadyro, doctor of science (chemistry), full professor; head of the free radical processes chemistry laboratory.

shadyro@tut.by

Marina M. Zafranskaya, doctor of science (medicine), docent; head of the department of immunology, faculty of environmental medicine.

zafranskaya@gmail.com

внутриклеточную продукцию α -интерферона мононуклеарами периферической крови и внутриклеточную продукцию γ -интерферона CD3⁺Т-лимфоцитами. Выявлен иммуносупрессивный эффект (более 50 %) соединений N-(2-гидрокси-3,5-ди-*т*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида и 2,4-ди-*т*-бутил-6-морфолинофенола в концентрации 10^{-5} моль на митогениндуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: производные 2-амино-4,6-ди-*т*-бутилфенола; иммунная система; лимфоидные клетки; интерфероны; пролиферация; цитотоксичность.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Министерству образования Республики Беларусь за финансовую поддержку исследования в рамках научно-исследовательской работы «Разработка инновационных мишень-адресованных антиВИЧ-агентов» (номер государственной регистрации 20191188).

EFFECTS OF 2-AMINO-4,6-DI-*TERT*-BUTYLPHENOL DERIVATIVES ON THE VIABILITY AND FUNCTIONAL STATE OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

D. B. NIZHEHARODAVA^a, G. A. KSENDZOVA^b, A. G. SYSA^a,
M. Yu. YURKEVICH^a, M. V. LABAI^a, O. I. SHADYRO^b, M. M. ZAFRANSKAYA^a

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

^bResearch Institute of Physical and Chemical Problems, Belarusian State University,
14 Lieninhradskaja Street, Minsk 220006, Belarus

Corresponding author: D. B. Nizheharodava (nzh@tut.by)

Derivatives of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol exhibit antiviral properties and radical regulatory activity against various types of organic radicals which determines the actuality of their further investigation. But the question of amino-phenol derivatives immunomodulatory activity remains open. In this regard, the aim of the study was to assess the effects of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives on the viability and functional potential of human peripheral blood lymphocytes. As a result of the studies, it was shown that aminophenol compounds at concentrations of 10^{-5} – 10^{-7} mol did not exert a toxic effect while at a concentration of 10^{-4} mol showed a cytotoxic effect due to the induction of secondary necrosis. Compounds N-(2-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylphenyl)-4-methylbenzenesulfonamide and 2,4-di-*tert*-butyl-6-morpholinophenol at a concentration of 10^{-6} mol stimulated the extracellular production of α -interferon by peripheral blood mononuclear cells and intracellular production of γ -interferon by CD3⁺T-lymphocytes. An immunosuppressive effect (more than 50 %) of N-(2-hydroxy-3,5-di-*tert*-butylphenyl)-4-methylbenzenesulfonamide and 2,4-di-*tert*-butyl-6-morpholinophenol compounds at a concentration of 10^{-5} mol was revealed to the mitogen-induced proliferation of T-lymphocytes.

Keywords: 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives; immune system; lymphoid cells; interferons; proliferation; cytotoxicity.

Acknowledgements. The authors are grateful to the Ministry of Education of the Republic of Belarus for financial supporting of research as part of the scientific work «Development of innovative targeted antiHIV-agents» (state registration No. 20191188).

Введение

Производные 2-амино-4,6-ди-*т*-бутилфенола проявляют противовирусные свойства и радикалрегуляторную активность в отношении различных типов органических радикалов [1; 2], что обуславливает актуальность их дальнейшего изучения. До сих пор остается открытым вопрос об иммуномодулирующей активности производных аминифенольных соединений, в том числе их способности инициировать продукцию интерферонов типов I и II и регулировать неспецифический и специфический Т-клеточный иммунный ответ.

Ключевыми событиями в противовирусном иммунном ответе являются индукция генов системы интерферонов, активация неспецифических клеточных факторов защиты с последующей инициацией развития специфического противовирусного иммунитета [3]. Несмотря на то что интерфероны не обладают прямым противовирусным действием, при воздействии на различные типы клеток и их метаболизм они проявляют множественные биологические эффекты и, таким образом, выступают главным неспецифическим гуморальным фактором противовирусной защиты. Интерфероны типа I, включая α -интерферон (α IFN), синтезируются лейкоцитами на самых ранних этапах иммунного ответа и поэтому относятся к первой линии защиты организма, модулируя созревание дендритных клеток и инициацию

распознавания антигенных детерминант. В свою очередь, γ -интерферон (γ IFN) – интерферон типа II – синтезируется ограниченным спектром клеток и является участником как неспецифического, так и антигенспецифического иммунного ответа, активируя натуральные киллеры (НК-клетки), цитотоксические Т-лимфоциты и В-клетки [4; 5]. На более поздних стадиях решающим фактором выступает пролиферация Т-лимфоцитов и их дифференцировка в эффекторные клетки, которые с помощью различных механизмов (перфоринзависимый цитолиз и активационно-индуцированный апоптоз) приводят к элиминации патогена из организма [6].

В связи с этим цель исследования – оценить влияние производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина на жизнеспособность, цитокинсинтезирующую функцию и функциональный (пролиферативный и цитотоксический) потенциал лимфоцитов периферической крови человека.

Материалы и методы исследования

Материалом исследования явилась цельная периферическая венозная кровь здоровых доноров ($n = 15$).

Структурная характеристика объектов исследования – производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола (1–3) и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина (4), синтезированных по описанным ранее методикам [2; 7; 8], – представлена в табл. 1.

Таблица 1

Структурная характеристика соединений

Table 1

Structural characteristics of compounds

Номер соединения	Структурная формула	Название
1		N-(2-гидрокси-3,5-ди- <i>трет</i> -бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид
2		N-(2-метокси-3,5-ди- <i>трет</i> -бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамид
3		2,4-Ди- <i>трет</i> -бутил-6-морфолинофенол
4		2-(4,6-Ди- <i>трет</i> -бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусная кислота

Культуральный метод. Выделенные на градиенте плотности (Histopaque-1077, *Sigma*, Германия) мононуклеары периферической крови (МПК) в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток на лунку 96-луночного планшета культивировали в питательной среде RPMI-1640 (*Bio-Whittaker*, США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (*Gibco*, Германия), 2 ммоль L-глутамина (*Bio-Whittaker*, США), 1 % антибиотика-антимикотика (*Gibco*, Германия), в присутствии или отсутствии соединений 1–4 в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} моль в течение 48 ч, 72 ч и 6 дней соответственно, для оценки жизнеспособности, внутриклеточной продукции γ IFN и цитотоксичности, а также характеристики митогениндуцированной пролиферации лимфоцитов. Для стимуляции цитотоксичности в кокультуры добавляли интерлейкин-2 (IL-2, *Fluka*, Германия) в конечной концентрации 100 МЕ/мл. Митоген фитогемагглютинин (РНА, *Sigma*, Германия) добавляли в конечной концентрации 2,5 мкг/мл.

Проточная цитофлуориметрия. Жизнеспособность клеточных культур МПК определяли с использованием набора Annexin A5 FITC/7-AAD Kit (*Beckman Coulter*, США). Регистрацию результатов измерения выполняли на 10 000 событий на проточном цитометре Cytotflex (*Beckman Coulter*, США).

Для количественного определения уровня внутриклеточной продукции γ IFN за 4 ч до окончания культивирования добавляли 10 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (*Sigma*, Германия), 1 мкг/мл кальциевой соли иономицина (*Cayman Chemical*, США) и 10 мкг/мл брефелдина А (*Cayman Chemical*, США) с последующим окрашиванием МПК моноклональными антителами к поверхностному маркеру Т-лимфоцитов (CD3-PC7, *Beckman Coulter*, США) и дальнейшей фиксацией клеток в течение 10 мин 4 % раствором параформальдегида в физиологическом растворе. После отмывания клеток добавляли моноклональные антитела γ IFN-PE (*Beckman Coulter*, США). Учет результатов проводили на проточном цитометре Cytotflex на 10 000 CD3⁺Т-лимфоцитов.

CFSE-метод оценки клеточной пролиферации. Для оценки клеточной пролиферации МПК предварительно окрашивали флуоресцентным красителем – 5,6-карбоксифлуоресцеинсукцинилмидиловым эфиром (CFSE, *Fluka*, Германия) – и культивировали в течение 6 дней в присутствии или отсутствии митогена. Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих Т-клеточных субпопуляций осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител CD3-PC7 (*Beckman Coulter*, США). Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции устанавливали границы популяции CD3⁺Т-клеток среди жизнеспособных лимфоцитов. Проллиферацию Т-лимфоцитов оценивали как процент непролиферирующих и пролиферирующих Т-клеток. Учет результатов проводили на проточном цитометре Cytotflex на 50 000 CD3⁺Т-лимфоцитов.

Оценка цитотоксичности. Для оценки цитотоксичности к культуре МПК добавляли клетки-мишени – опухолевую клеточную линию K562, окрашенную CFSE, – в соотношении 5 : 1 и культивировали МПК в течение 4 ч. Процент гибели клеток-мишеней K562 в результате цитотоксичности МПК в кокультурах определяли путем добавления катионного красителя – пропидий йодида (PI, *Invitrogen*, Германия) – и идентификации нежизнеспособных клеток опухолевой линии (CFSE⁺PI⁺K562) с использованием проточного цитометра Cytotflex (*Beckman Coulter*, США) на 20 000 событий. Коэффициент стимуляции цитотоксичности рассчитывали как отношение процента гибели клеток K562 в кокультуре с МПК, стимулированными IL-2, к таковому в нестимулированных МПК.

Иммуноферментный анализ. Концентрацию γ IFN и α IFN определяли в супернатантах клеточных культур МПК исследуемых доноров методом твердофазного иммуноферментного анализа согласно инструкции производителя с использованием коммерческих наборов: гамма-интерферон-ИФА-БЕСТ (А-8752, *Вектор-Бест*, Россия) и альфа-интерферон-ИФА-БЕСТ (А-8758, *Вектор-Бест*, Россия). Результаты регистрировали на спектрофотометре (*Thermo Fischer*, Германия) при длине волны $\lambda = 450$ нм.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с применением стандартного пакета *Statistica 8.0* (*StatSoft Inc.*, США). Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы, нижнего и верхнего процентилей (25-й и 75-й процентиля). Определение достоверных различий между сравниваемыми группами осуществляли непараметрическими критериями: *U*-критерием Манна – Уитни и критерием Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Жизнеспособность лимфоидных клеток при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенола и 3,5-ди-трет-бутилпирокатехина. Жизнеспособность лимфоидных клеток при культивировании с соединениями 1–4 исследована с использованием комбинированной окраски культуры МПК аннексином V (AnnexinV), конъюгированным с флуорохромом, и 7-аминоактиномицином D (7-AAD). Комбинированная окраска аннексином V и 7-аминоактиномицином D позволяет идентифицировать жизнеспособные клетки (AnnexinV[−]7ADD[−]); ранние проапоптотические изменения в клетках (AnnexinV⁺7ADD[−]); позднюю стадию апоптоза, сопровождающуюся вторичным некрозом клеток (AnnexinV⁺7ADD⁺); некротический вариант клеточной гибели (AnnexinV[−]7ADD⁺). Результаты статистической обработки данных жизнеспособных клеток и клеток, подвергшихся апоптозу или некрозу при культивировании с соединениями 1–4, представлены в табл. 2.

Показано, что через 48 ч культивирования интактные культуры МПК характеризовались высокой жизнеспособностью: количество клеток AnnexinV[−]7AAD[−] составило 96,80 (94,35–97,99) %, в то время как большинство нежизнеспособных клеток идентифицировались как AnnexinV⁺7AAD[−], что соответствует стадии раннего апоптоза.

Таблица 2

Количество жизнеспособных, апоптотических и некротических клеток
в культуре МПК через 48 ч культивирования с соединениями 1–4, %

Table 2

The number of alive, apoptotic and necrotic cells in 48 h culture
of peripheral blood mononuclear cells with compounds 1–4, %

Условия культивирования		МПК			
		AnnexinV ⁻ 7AAD ⁻ (жизнеспособные)	AnnexinV ⁺ 7AAD ⁻ (ранний апоптоз)	AnnexinV ⁺ 7AAD ⁺ (поздний апоптоз)	AnnexinV ⁻ 7AAD ⁺ (некроз)
Культуральная среда		96,80 (94,35–97,99)	3,18 (1,99–5,57)	0,00 (0,00–0,02)	0,07 (0,01–0,13)
1	10 ⁻⁷ моль	96,31 (93,43–97,67)	3,69 (2,31–5,45)	0,00 (0,00–0,70)	0,05 (0,00–0,48)
	10 ⁻⁶ моль	97,49 (94,35–98,70)	2,51 (1,30–5,62)	0,00 (0,00–0,10)	0,03 (0,00–0,30)
	10 ⁻⁵ моль	98,02 (96,90–98,76)	1,56 (1,22–3,00)	0,02 (0,00–0,30)	0,10 (0,04–0,70)
	10 ⁻⁴ моль	63,75** (62,58–64,93)	0,10* (0,00–0,02)	0,10 (0,05–0,15)	36,05** (34,93–37,18)
2	10 ⁻⁷ моль	94,38 (91,69–96,58)	1,94 (1,18–6,24)	0,22 (0,19–0,32)	0,41 (0,36–1,93)
	10 ⁻⁶ моль	96,89 (94,55–97,27)	2,33 (2,32–4,75)	0,00 (0,00–0,03)	0,63 (0,32–0,71)
	10 ⁻⁵ моль	92,40 (89,92–93,18)	6,30 (4,32–7,82)	0,87 (0,44–0,94)	2,23 (1,33–2,98)
	10 ⁻⁴ моль	71,71** (71,10–82,63)	26,33* (13,40–27,92)	0,00 (0,00–0,00)	1,96 (0,98–3,98)
3	10 ⁻⁷ моль	96,47 (91,38–96,98)	3,42 (2,99–6,34)	0,00 (0,00–1,50)	0,10 (0,03–0,81)
	10 ⁻⁶ моль	96,20 (94,16–97,84)	2,40 (1,52–5,78)	0,02 (0,00–0,30)	0,10 (0,02–1,82)
	10 ⁻⁵ моль	98,07 (94,80–98,20)	1,70 (1,30–1,84)	0,02 (0,00–0,504)	0,10 (0,06–2,53)
	10 ⁻⁴ моль	63,25** (63,13–63,38)	0,15* (0,13–0,18)	0,10 (0,00–0,25)	36,30** (36,20–36,40)
4	10 ⁻⁷ моль	96,58 (89,25–97,17)	3,42 (2,76–7,82)	0,00 (0,00–1,21)	0,10 (0,01–1,30)
	10 ⁻⁶ моль	96,20 (94,80–98,30)	3,70 (1,63–5,00)	0,03 (0,00–0,10)	0,13 (0,10–1,20)
	10 ⁻⁵ моль	96,25 (93,44–97,90)	3,60 (2,00–6,51)	0,00 (0,00–0,08)	0,11 (0,06–1,20)
	10 ⁻⁴ моль	16,75** (14,83–18,68)	1,55* (1,43–1,68)	10,00* (8,90–11,10)	71,70** (70,75–72,65)

Примечание. * – статистически значимые различия с уровнем достоверности $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ относительно показателей клеток в культуральной среде без соединений 1–4; 1 – культуральная среда с добавлением N-(2-гидрокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида; 2 – культуральная среда с добавлением N-(2-метокси-3,5-ди-*трет*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида; 3 – культуральная среда с добавлением 2,4-ди-*трет*-бутил-6-морфолинофенола; 4 – культуральная среда с добавлением 2-(4,6-ди-*трет*-бутил-2,3-дигидроксифенилсульфанил)уксусной кислоты.

Внутриклеточная продукция γ IFN в лимфоидных клетках при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина. В результате проведенных исследований изучено влияние производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина на спонтанную продукцию γ IFN CD3⁺T-лимфоцитами в трехдневной культуре МПК. Установлено, что культивирование МПК с соединениями 1 и 3 сопровождалось повышением

спонтанной продукции γ IFN T-лимфоцитами: в присутствии соединения **1** в концентрации 10^{-6} моль наблюдалось увеличение количества γ IFN⁺CD3⁺T-клеток с 14,30 (12,5–16,1) до 25,90 (17,0–34,8) %, а при культивировании с соединением **3** в концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} моль процент γ IFN⁺CD3⁺T-клеток повышался до 23,00 (13,3–32,7) и 22,80 (13,6–32,0) соответственно ($p < 0,05$) (рис. 1). В то же время показано, что соединения (**2**) и (**4**) не приводили к статистически значимым различиям в спонтанной продукции γ IFN T-лимфоцитами у здоровых доноров.

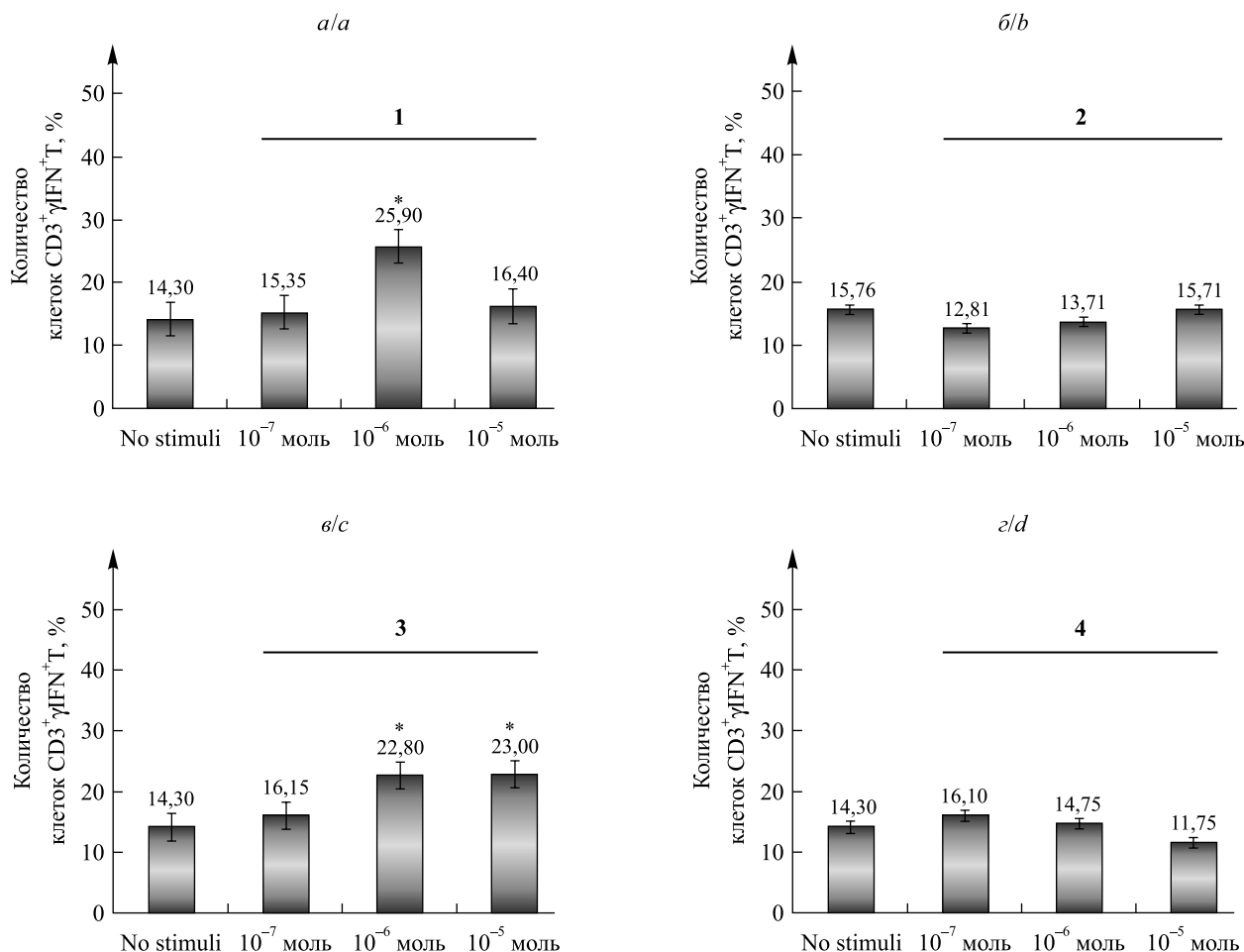


Рис. 1. Спонтанная продукция γ IFN CD3⁺T-лимфоцитами при культивировании с исследуемыми соединениями:
а – соединение **1**; б – соединение **2**; в – соединение **3**; г – соединение **4**
(* – статистически значимые различия с уровнем достоверности $p < 0,05$ относительно культур без соединений **1–4**)

Fig. 1. γ IFN spontaneous production by CD3⁺T-lymphocytes cultivated with investigated compounds:
a – compound **1**; b – compound **2**; c – compound **3**; d – compound **4**
(* – significant differences with $p < 0.05$ as compared to cultures without compounds **1–4**)

Согласно литературным данным γ IFN относится к интерферонам типа II – гликопротеинам, синтезируемым Т-лимфоцитами и НК-клетками под действием антигенной стимуляции и оказывающим противовирусное и иммуномодулирующее действие. Если интерфероны типа I принимают непосредственное участие в защите организма от вируса, то интерфероны типа II занимают более высокое положение, оказывая влияние на процессы специфического и неспецифического клеточного иммунитета. Так, во время ранней неспецифической защиты организма продукция γ IFN НК-клетками играет важную роль в развитии острого воспаления. γ IFN активирует адгезивные свойства эндотелиальных клеток и продукцию медиаторов воспаления моноцитами. Во время антигенспецифической фазы иммунного ответа γ IFN регулирует антигенную презентацию, пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов, влияет на взаимодействие лейкоцитов с эндотелием, действует на апоптоз, стимулирует или подавляет экспрессию более 200 различных генов и является нелинейным механизмом эффекторных цитотоксических CD3⁺CD8⁺T-лимфоцитов [9].

Пролиферация лимфоидных клеток при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола и 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина. Пролиферативный потенциал митогенстимулированных Т-лимфоцитов в присутствии соединений **1–4** в концентрациях 10^{-5} – 10^{-7} моль оценивался по количеству делящихся Т-лимфоцитов в шестидневной культуре МПК. Оригинальные гистограммы CFSE^{low} (пролиферирующих) Т-лимфоцитов представлены на рис. 2.

Установлено, что выраженный антипролиферативный эффект наблюдался при культивировании МПК с соединениями **1** и **4** в концентрации 10^{-5} моль, где количество CFSE^{low} (пролиферирующих) Т-лимфоцитов уменьшалось с 85,5 (75,2–87,0) до 37,0 (28,8–45,0) и 34,5 (23,2–66,9) % соответственно (см. рис. 2). В то же время показано, что культивирование МПК с соединениями **2** и **3** не приводило к статистически значимым различиям в РНА-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов у здоровых доноров.

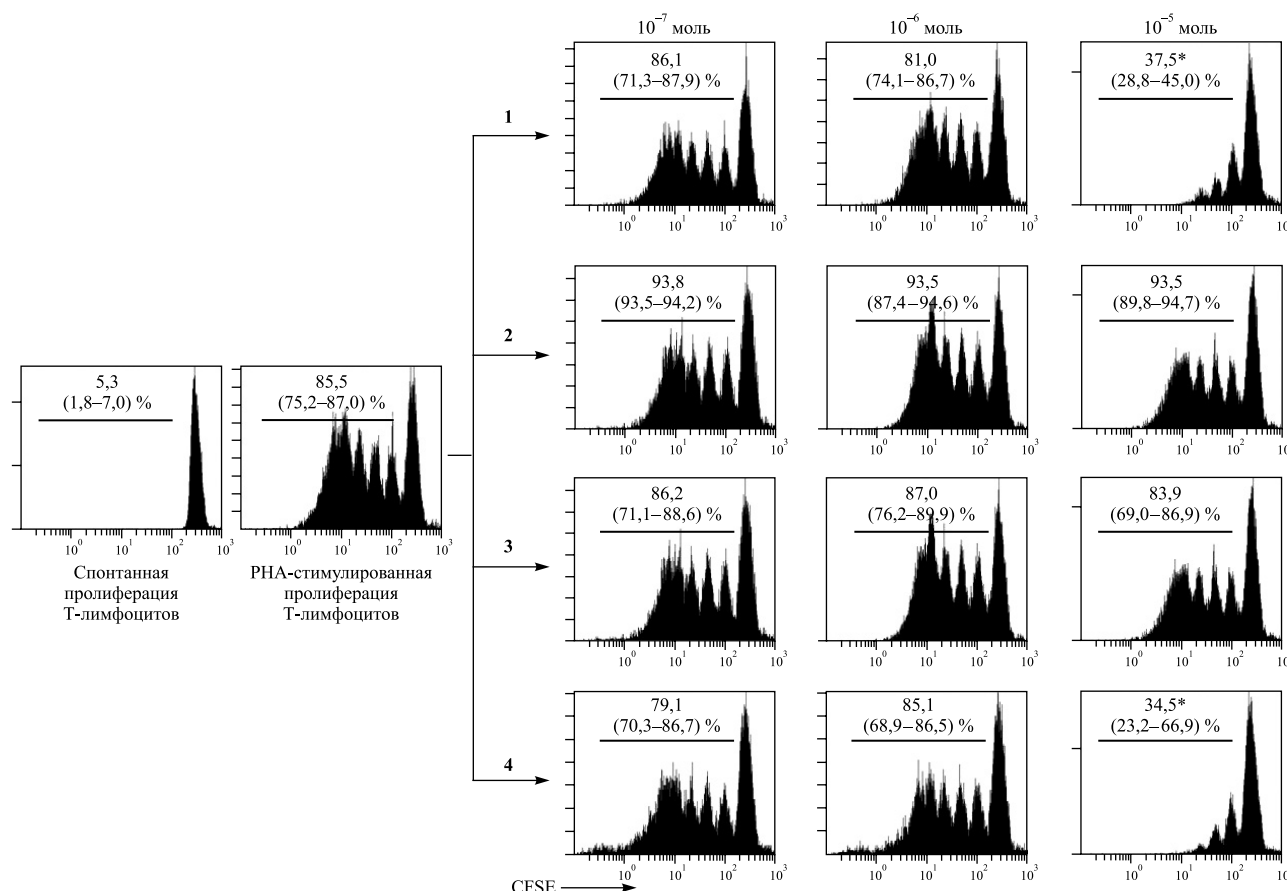


Рис. 2. Количество CFSE^{low} (пролиферирующих) Т-лимфоцитов в культурах МПК с соединениями **1–4** в условиях митогенной стимуляции
(* – статистически значимые различия с уровнем достоверности $p < 0,05$ относительно РНА-стимулированной пролиферации Т-лимфоцитов без соединений **1–4**)
Fig. 2. The number of CFSE^{low} (proliferating) T-lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells cultures with derivatives **1–4** under mitogen-stimulated condition
(* – significant differences with $p < 0.05$ as compared to РНА-stimulated T-lymphocytes proliferation without compounds **1–4**)

Цитотоксичность лимфоидных клеток при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола. Для оценки эффектов производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на спонтанную и IL-2-стимулированную цитотоксичность лимфоидных клеток по отношению к опухолевой клеточной линии K562 использовали показатели процента гибели клеток K562, детектируемых как клетки CFSE⁺PI⁺K562, и уровень внеклеточной продукции α IFN в кокультурах МПК и K562. Результаты количества нежизнеспособных клеток CFSE⁺PI⁺K562 в кокультурах с МПК при культивировании с исследуемыми соединениями в концентрации 10^{-6} моль представлены в табл. 3.

Показано, что при стимуляции IL-2 во всех исследуемых культурах наблюдалось выраженное увеличение цитотоксичности ($p < 0,01$). Однако на данном этапе исследования не выявлено стимулирующего влияния соединений **1–3** на спонтанную и IL-2-стимулированную цитотоксичность лимфоидных клеток.

Таблица 3

Количество клеток CFSE⁺PI⁺K562
в кокультурах с МПК при культивировании
с производными 2-амино-4,6-ди-*tert*-бутилфенола, %

Table 3

The number of cells CFSE⁺PI⁺K562 co-cultured with peripheral blood mononuclear cells and 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives, %

Условия культивирования		CFSE ⁺ PI ⁺ K562	ИС
Культуральная среда	Без IL-2	19,7 (15,6–22,0)	2,2 (1,8–3,2)
	IL-2	41,1 (40,0–43,2)	
1	Без IL-2	18,3 (14,9–22,0)	2,0 (1,8–3,3)
	IL-2	41,8 (37,2–46,6)	
2	Без IL-2	21,0 (17,1–23,3)	2,0 (1,8–2,5)
	IL-2	39,7 (35,8–44,6)	
3	Без IL-2	22,3 (16,9–24,1)	2,0 (1,9–2,7)
	IL-2	39,1 (38,9–45,3)	

Примечание. ИС – индекс стимуляции цитотоксичности МПК, рассчитываемый как отношение показателей IL-2-стимулированной цитотоксичности к спонтанной клеточной гибели; 1 – культуральная среда с добавлением N-(2-гидрокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10⁻⁶ моль; 2 – культуральная среда с добавлением N-(2-метокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10⁻⁶ моль; 3 – культуральная среда с добавлением 2,4-ди-*tert*-бутил-6-морфолинофенола в концентрации 10⁻⁶ моль.

Результаты продукции αIFN МПК в кокультурах с опухолевой клеточной линией K562 в условиях культивирования с аминифенольными соединениями в концентрации 10⁻⁶ моль представлены в табл. 4. Установлено, что в присутствии соединений 1 и 3 продукция αIFN МПК статистически значимо увеличивалась в 3,8 и 6,7 раза соответственно.

Таблица 4

Продукция αIFN МПК в кокультурах с K562
при культивировании с производными 2-амино-4,6-ди-*tert*-бутилфенола, пг/мл

Table 4

αIFN production by peripheral blood mononuclear cells in co-cultures
with K562 in the present of 2-amino-4,6-di-*tert*-butylphenol derivatives, pg/ml

Условия культивирования	Культуральная среда	1	2	3
αIFN, пг/мл	6,9 (6,0–8,1)	26,0* (9,1–43,3)	8,5 (6,4–18,7)	46,3** (15,1–80,4)

Примечание. * – статистически значимые различия с уровнем достоверности $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ относительно продукции αIFN в культурах без аминифенольных соединений; 1 – культуральная среда с добавлением N-(2-гидрокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10⁻⁶ моль; 2 – культуральная среда с добавлением N-(2-метокси-3,5-ди-*tert*-бутилфенил)-4-метилбензолсульфонамида в концентрации 10⁻⁶ моль; 3 – культуральная среда с добавлением 2,4-ди-*tert*-бутил-6-морфолинофенола в концентрации 10⁻⁶ моль.

Согласно литературным данным индукция экспрессии генов интерферонов типа I, включая αIFN, является ключевым событием в инициировании противинфекционного иммунного ответа. Интерфероны типа I модулируют созревание дендритных клеток и их кооперацию с лимфоцитами путем инициации

распознавания Т-клеточным рецептором главного комплекса гистосовместимости с антигенной детерминантой, активацию экспрессии костимулирующих молекул Т-лимфоцитов и секрецию цитокинов, обеспечивающих пролиферацию Т-лимфоцитов и их дифференцировку в эффекторные клетки. Кроме того, передача сигнала от интерферонов типа I с участием активатора транскрипции STAT1 параллельно стимулирует экспрессию генов интерферона типа II (γ IFN), который участвует в регуляции механизмов врожденного и приобретенного иммунитета, клеточного цикла, процессов апоптоза и воспалительной реакции посредством контроля транскрипции широкого спектра генов [10].

Таким образом, соединения **1** и **3** в концентрации 10^{-6} моль стимулируют продукцию α IFN МПК, тем самым усиливая противовирусное действие и потенциальную активацию киллерных клеток.

Заключение

В результате выполненных исследований проведена оценка влияния производных 2-амино-4,6-ди-*трет*-бутилфенола на жизнеспособность, цитокинсинтезирующую, пролиферативную способность и цитотоксичность лимфоцитов периферической крови человека.

Выявлено, что соединения **1**, **3** и **4** в концентрации 10^{-4} моль проявляют цитотоксический эффект на лимфоидные клетки преимущественно за счет индукции клеточной гибели путем вторичного некроза, а соединение **2** в концентрации 10^{-4} моль – за счет индукции клеточной гибели путем раннего апоптоза. Наиболее выраженный токсический эффект на лимфоидные клетки зарегистрирован у соединения **4** в концентрации 10^{-4} моль, при культивировании с которым выявлена клеточная гибель как путем вторичного некроза, так и позднего (вторичного) апоптоза.

Показано, что аминифенольные соединения **1** в концентрации 10^{-6} моль и соединение **3** в концентрациях 10^{-5} – 10^{-6} моль стимулируют спонтанную внутриклеточную продукцию γ IFN CD3⁺Т-лимфоцитами, а соединения **1** и **4** в концентрации 10^{-5} моль оказывают супрессивный эффект (более 50 %) на митогениндуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов, в то время как соединение **2** не влияет на синтез γ IFN и количество делящихся Т-лимфоцитов.

Установлено, что аминифенольные соединения не усиливают эффекторные киллерные свойства лимфоидных клеток, однако соединения **1** и **3** в концентрации 10^{-6} моль стимулируют продукцию α IFN МПК, тем самым усиливая противовирусное действие и потенциальную активацию киллерных клеток.

Библиографические ссылки

1. Shadyro OI, Ksendzova GA, Polozov GI, Sorokin VL, Boreko EI, Savinova OV, et al. Synthesis and study of anti-radical and antiviral properties of aminophenol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(7):2420–2423. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.02.055.
2. Шадыро ОИ, Сорокин ВЛ, Ксэндзова ГА, Савинова ОВ, Павлова НИ, Бореко ЕИ. Синтез и противовирусная активность производных стерически затрудненных *орто*-аминофенолов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012;46(7):27–30. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-7-27-30.
3. Braciale TJ, Hahn YS. Immunity to viruses. *Immunological Reviews*. 2013;255(1):5–12. DOI: 10.1111/imr.12109.
4. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*. 2018;11(9):2061. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02061.
5. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):778–809. DOI: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
6. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology*. 2012;13(3):214–222. DOI: 10.1038/ni.2229.
7. Ксэндзова ГА, Полозов ГИ, Скорняков ИВ, Сорокин ВЛ, Толсторожев ГБ, Шадыро ОИ и др. Проявление внутримолекулярных водородных связей в инфракрасных спектрах биоактивных аминифенолов. *Оптика и спектроскопия*. 2007;102(4):606–611.
8. Масловская ЛА, Петрикевич ДК, Тимошук ВА, Шадыро ОИ. Синтез и антиокислительная активность серосодержащих производных 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина. *Журнал общей химии*. 1996;66(11):1899–1902.
9. Kang S, Brown HM, Hwang S. Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma. *Immune Network*. 2018;18(5):e33. DOI: 10.4110/in.2018.18.e33.
10. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006;25(3):373–381. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.007.

References

1. Shadyro OI, Ksendzova GA, Polozov GI, Sorokin VL, Boreko EI, Savinova OV, et al. Synthesis and study of anti-radical and antiviral properties of aminophenol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(7):2420–2423. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.02.055.
2. Shadyro OI, Sorokin VL, Ksendzova GA, Savinova OV, Pavlova NI, Boreko EI. Synthesis and antiviral activity of sterically hindered *ortho*-aminophenol derivatives. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2012;46(7):27–30. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-7-27-30. Russian.
3. Braciale TJ, Hahn YS. Immunity to viruses. *Immunological Reviews*. 2013;255(1):5–12. DOI: 10.1111/imr.12109.

4. Lee AJ, Ashkar AA. The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*. 2018;11(9):2061. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02061.
5. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):778–809. DOI: 10.1128/CMR.14.4.778-809.2001.
6. Yan N, Chen ZJ. Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunology*. 2012;13(3):214–222. DOI: 10.1038/ni.2229.
7. Ksendzova GA, Polozov GI, Skornyakov IV, Sorokin VL, Tolstorozhev GB, Shadyro OI, et al. Manifestation of intramolecular hydrogen bonds in the IR-spectra of bioactive aminophenols. *Optika i spektroskopiya*. 2007;102(4):606–611. Russian.
8. Maslovskaya LA, Petrikevich DK, Timoshchuk VA, Shadyro OI. Synthesis and antioxidant activity of sulfur-containing derivatives of 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzenediol. *Zhurnal obshchei khimii*. 1996;66(11):1899–1902. Russian.
9. Kang S, Brown HM, Hwang S. Direct antiviral mechanisms of interferon-gamma. *Immune Network*. 2018;18(5):e33. DOI: 10.4110/in.2018.18.e33.
10. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*. 2006;25(3):373–381. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.007.

Статья поступила в редколлегию 30.06.2020.
Received by editorial board 30.06.2020.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ИММУННЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКТОВ ГРИБОВ *GANODERMA LUCIDUM, LENTINULA EDODES, BOLETUS EDULIS*¹

Е. В. ДУЖ¹⁾, А. Е. ГОНЧАРОВ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Водные экстракты грибов отдела Basidiomycota, таких как *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, обладают широким спектром иммуномодулирующей активности. Показано, что *Boletus edulis* в равной степени усиливает экспрессию поверхностных маркеров на перевиваемых лимфоидных линиях клеток Jurkat-tat и Daudi, увеличивает продукцию свободных радикалов кислорода дендритными клетками, моноцитами и нейтрофилами периферической крови, активизирует базофилы. Влияние грибных экстрактов на НК-клетки не установлено.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*; *Lentinula edodes*; *Boletus edulis*; базофилы; дендритные клетки; клеточные линии; НК-клетки; проточная цитометрия.

FUNCTIONAL PROPERTIES OF IMMUNE CELLS UNDER THE INFLUENCE OF EXTRACTS OF MUSHROOMS *GANODERMA LUCIDUM, LENTINULA EDODES, BOLETUS EDULIS*

E. V. DUZH^a, A. Y. HANCHAROU^a

^aThe Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: E. V. Duzh (lenaduzh@gmail.com)

The water extracts of Basidiomycota division mushrooms such as *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* possessed a wide spectrum of immunomodulatory activity. It was shown that *Boletus edulis* enhances the expression of surface markers on lymphoid cell lines Jurkat-tat and Daudi, and also increases the expression of reactive oxygen species by dendritic cells, monocytes and peripheral blood neutrophils, activates basophils. There was observed no effect of fungal extracts on NK-cells.

Keywords: *Ganoderma lucidum*; *Lentinula edodes*; *Boletus edulis*; basophils; dendritic cells; cell line; NK-cells; flow cytometry.

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Дуж ЕВ, Гончаров АЕ. Функциональные свойства иммунных клеток под действием экстрактов грибов *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Boletus edulis*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2020;3: 29–36.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-29-36>

For citation:

Duzh EV, Hancharou AY. Functional properties of immune cells under the influence of extracts of mushrooms *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Boletus edulis*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2020;3:29–36. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-29-36>

Авторы:

Елена Васильевна Дуж – научный сотрудник.
Андрей Евгеньевич Гончаров – кандидат медицинских наук, доцент; директор.

Authors:

Elena V. Duzh, researcher.
lenaduzh@gmail.com
Andrei Y. Hancharou, PhD (medicine), docent; director.
andrei.hancharou@gmail.com

Введение

На протяжении тысячелетий грибы широко применялись благодаря своей пищевой и лекарственной ценности. Современные исследования подтверждают терапевтический эффект традиционно используемых видов [1].

Грибы отдела Basidiomycota, такие как *Ganoderma lucidum* (рейши) и *Lentinula edodes* (шиитаке), представляют собой обширный и в то же время значительный ресурс мощных фармацевтических продуктов. В частности, они являются неограниченным источником полисахаридов с противоопухолевыми и иммуномодулирующими свойствами, что наиболее важно для современной медицины [2]. Кроме того, эти грибы богаты биологически активными полисахаридами, фенольными и индольными соединениями, микостероидами, жирными кислотами, каротиноидами, витаминами и биометаллами [3; 4].

Несмотря на высокий интерес медицины стран Юго-Восточной Азии к *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes* с точки зрения иммуномодулирующих свойств, перспективными для изучения с последующим применением в медицине и биологии могут быть и другие представители этого отдела грибов, в том числе типичные для Восточно-Европейского региона. Так, *Boletus edulis* (белый гриб, боровик), относящийся к семейству болетовых (Boletaceae), – распространенный гриб в Республике Беларусь [5].

На сегодняшний день в информационных базах имеется огромное количество научных данных разных лет о том, что в состав гриба *Boletus edulis* входят вещества, обладающие большим лечебным потенциалом, спектр активности которых довольно широк. Однако в то же время, несмотря на множество публикаций, нет достаточно данных об иммуномодулирующем действии *Boletus edulis* на иммунные клетки [6]. Целью исследования была оценка иммуномодулирующей активности *Boletus edulis* (боровик), *Ganoderma lucidum* (рейши), *Lentinula edodes* (шиитаке) *in vitro* в отношении функциональных свойств иммунных клеток.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись грибы видов *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* и *Boletus edulis*. В работе использовали перевиваемые линии клеток: Т-лимфоцитарную клеточную линию человека Jurkat-tat (Т-лимфобластный лейкоз) и В-лимфоцитарную клеточную линию Daudi (лимфома Беркитта), а также периферическую кровь доноров ($n = 9$).

Приготовление суспензии водного экстракта грибов. Исследуемые грибы высушивали до постоянного веса при 35 °С, затем измельчали в бытовой кофемолке. Для приготовления водного экстракта взвешивали 100 мг сухого гриба, смешивали с 2 мл бидистиллированной воды. Грибной экстракт выдерживали 30 мин при комнатной температуре, после чего нагревали суспензию на водяной бане при 90 °С в течение 10 мин. Далее полученный водный грибной экстракт центрифугировали для осаждения нерастворенных веществ и пропускали через фильтр 0,22 мкм для стерилизации.

Культивирование перевиваемых гемопоэтических клеточных линий. В качестве модели В- и Т-лимфоцитов были использованы перевиваемые гемопоэтические клеточные линии человека, которые способны отвечать на различные стимулы изменением экспрессии поверхностных молекул. Клеточные культуры Daudi и Jurkat-tat растили в питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 % термически инактивированную телячью эмбриональную сыворотку, L-глутамин, по 50 мкг/мл гентамицина и пирувата натрия.

Получение дендритных клеток (ДК). Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из образцов периферической крови доноров путем центрифугирования на градиенте плотности фиколла-пака (1077 г/л). Моноциты выделяли из фракции МПК методом адгезии и культивировали на протяжении 4 сут в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки и комбинации цитокинов (100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и интерферона альфа) при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂, что позволило получить фенотипически дифференцированные ДК из моноцитов крови [7].

Инкубация клеток с водными экстрактами грибов. Исследования были проведены в 3–5-кратной повторяемости. Взвесь культуры ДК, клеточные линии и гепаринизированную цельную кровь разливали по ячейкам 24-луночного планшета. Планшеты с клетками инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂. В-клетки и ДК сокультивировали с исследуемыми водными экстрактами грибов на протяжении 24 ч, Т-клетки – 6 ч, базофилы, нейтрофилы и моноциты периферической крови – 30 мин.

Определение поверхностных молекул. Для определения экспрессии поверхностных молекул к суспензии клеток добавляли моноклональные антитела и инкубировали в течение 15 мин при +4 °С в темноте. Несвязавшиеся антитела удаляли путем центрифугирования клеток в DPBS. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в DPBS [8].

Определение продукции свободных радикалов кислорода. Детекцию реактивных форм кислорода (*reactive oxygen species*, ROS) осуществляли с использованием дигидрородамина (DHR123). Для детекции ROS в 1,5 мл гепаринизированной периферической крови вносили DHR123 в концентрации 10 мкмоль/л и доводили объем взвеси питательной средой RPMI-1640 до 3,0 мл [9]. Суспензию инкубировали в термостате при температуре 37 °C в течение 10 мин. Затем к образцам добавляли: 1) 100 мкл DPBS – отрицательный контроль (ОК); 2) 25 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА) – положительный контроль (ПК); 3) рабочие растворы исследуемых грибов.

В каждую пробирку вносили по 200 мкл взвеси крови с DHR123 и инкубировали пробирки при температуре 37 °C на протяжении 30 мин. Эритроциты лизировали раствором хлорида аммония, клетки осаждали путем центрифугирования, после чего в пробирки вносили по 300 мкл DPBS и осуществляли учет результатов с помощью проточного цитофлуориметра.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения *Statistica 12* (StatSoft Inc., США) и *StatPlus 4.9* (AnalystSoft, США). Полученные показатели представлены как медиана с интерквартильным размахом в виде 25-го и 75-го перцентилей. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$ [10].

Результаты и их обсуждение

Оценка влияния водных экстрактов грибов на продукцию свободных радикалов кислорода нейтрофилами, моноцитами и ДК периферической крови. Исследуемые грибные экстракты *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* стимулировали продукцию ROS нейтрофилами, моноцитами и ДК (табл. 1).

Таблица 1

Влияние водных экстрактов *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* на продукцию ROS нейтрофилами, моноцитами и ДК периферической крови

Table 1

Effect of reishi, shiitake and boletus mushroom water soluble fraction on the ROS production by peripheral blood neutrophils, monocytes and DC

Образец	Нейтрофилы, %	p (с ОК)	Моноциты, %	p (с ОК)	ДК, %	p (с ОК)
ОК	1,66 (1,48–2,74)	–	12,4 (10,9–13,5)	–	28,1 (22,5–33,6)	–
ПК (ФМА)	98,9 (98,7–99,5)	0,025	92,1 (89,5–96,5)	0,032	87,1 (82,3–88,5)	0,190
<i>Boletus edulis</i>	19,2 (15,4–21,7)	0,018	86,6 (71,5–89,1)	0,017	92,5 (90,1–92,8)	0,029
<i>Ganoderma lucidum</i>	12,5 (11,8–15,2)	0,031	80,2 (75,7–90,5)	0,035	58,9 (57,1–65,2)	0,037
<i>Lentinula edodes</i>	11,7 (9,6–17,9)	0,040	75,6 (69,9–83,5)	0,012	57,1 (55,8–60,4)	0,040

Количество нейтрофилов, продуцирующих свободные радикалы кислорода, под действием водных экстрактов *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes* достоверно отличалось от отрицательного контроля. Экстракт *Boletus edulis* усиливал продукцию свободных радикалов кислорода нейтрофилов до 20 %, а экстракты других грибов – в 2 раза ниже.

Положительный контроль и все водные грибные экстракты характеризовались способностью индуцировать продукцию моноцитами значительного количества свободных радикалов кислорода (70–90 % клеток), тогда как в отрицательном контроле доля моноцитов, продуцирующих ROS без стимуляции, составила чуть более 10 %.

Показано, что количество ДК, продуцирующих свободные радикалы кислорода, было достоверно выше по сравнению с отрицательным контролем. При сокультивировании клеток с экстрактами грибов полученные результаты не различались достоверно между экстрактами *Ganoderma lucidum* ($p = 0,037$) и *Lentinula edodes* ($p = 0,04$), но имели достоверные различия с отрицательным и положительным контролем. *Boletus edulis* индуцировал усиление продукции свободных радикалов кислорода, сравнимое с действием других грибов (> 80 %) ($p = 0,029$).

Изучение влияния водных экстрактов грибов на дендритные клетки. Оценивали экспрессию CD205, CD206 и HLA-DR на ДК. На рис. 1 продемонстрированы результаты оценки экспрессии маркеров.

Выявлено увеличение экспрессии молекул CD205 при стимуляции ДК с липополисахаридом (ЛПС) в качестве положительного контроля. Результаты определения молекулы CD205 на поверхности ДК показали, что положительный контроль, *Boletus edulis* и *Lentinula edodes* вызывали активацию клеток ($p < 0,05$), в отличие от стимуляции ДК с *Ganoderma lucidum* (см. рис. 1).

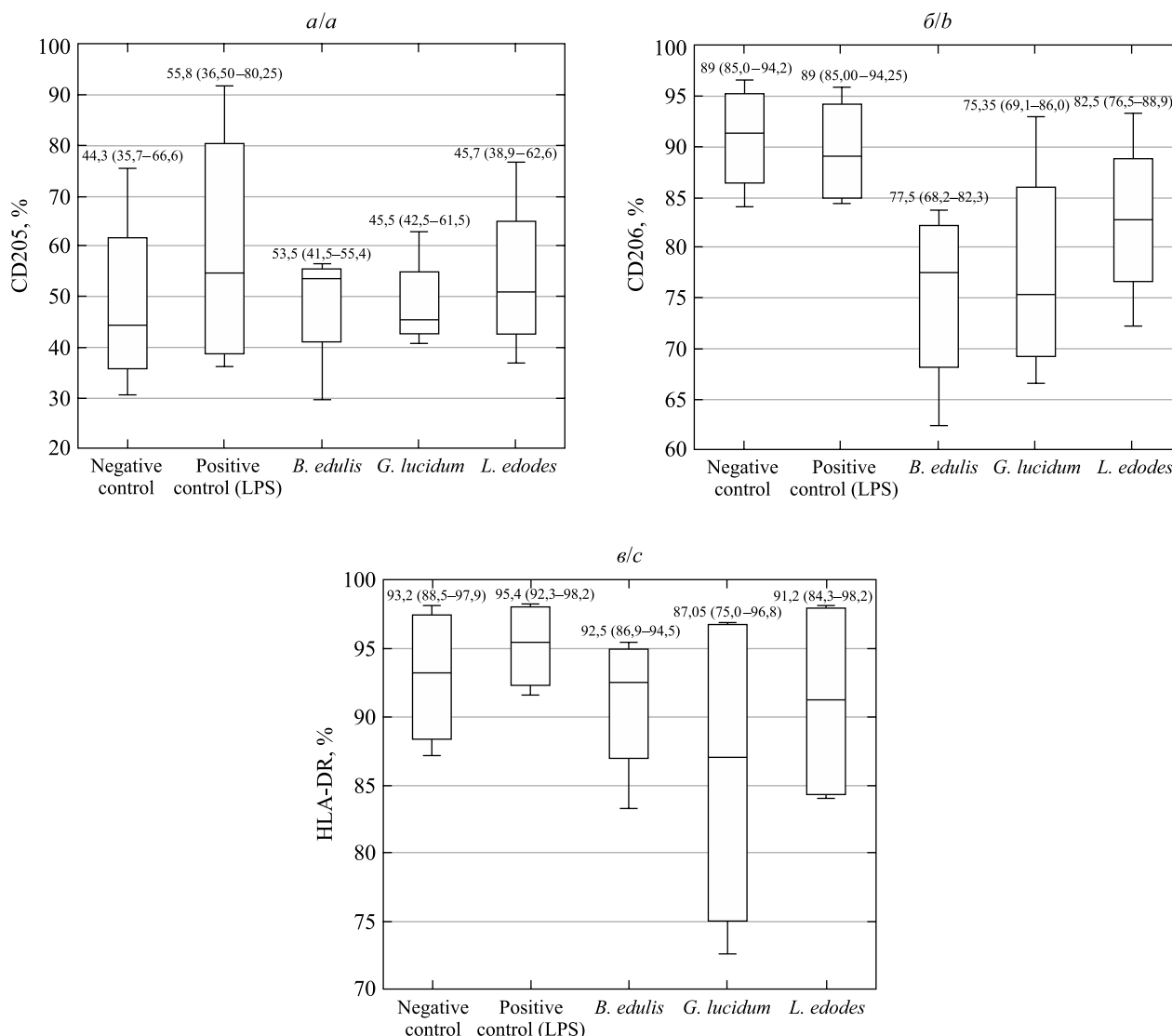


Рис. 1. Показатели экспрессии молекул CD205, CD206, HLA-DR дендритными клетками при сокультивировании с водными экстрактами грибов
Fig. 1. CD205, CD206, HLA-DR expression by DC incubated with water mushroom extracts

Исходя из представленных данных, экспрессия молекул CD206 и HLA-DR достоверно не изменилась при сокультивировании ДК с положительным контролем и исследуемыми видами грибных экстрактов.

Изучение влияния водных экстрактов грибов на Т-клетки линии Jurkat-tat. Клеточную линию Jurkat-tat сокультивировали с грибами в течение 6 ч. Положительным контролем выступал интерлейкин-2 (IL-2), который вызывает пролиферацию Т-клеток [11].

Для определения Т-клеточной активации в качестве классических маркеров использовали молекулу CD69 (ранний маркер активации Т-лимфоцитов) и молекулу HLA-DR (рис. 2).

Анализ иммунофенотипа клеток Jurkat-tat, культивированных с грибами, показал, что все исследованные водные грибные экстракты в разной степени усиливали экспрессию молекулы CD69 на линии клеток Jurkat-tat по сравнению с отрицательным контролем ($p < 0,02$). Самая высокая интенсивность экспрессии молекулы CD69 была отмечена при культивировании Jurkat-tat с экстрактом *Boletus edulis*. При сокультивировании клеток с *Ganoderma lucidum* наблюдалась экспрессия CD69 более 30 %, что почти в 3 раза превышает уровень отрицательного контроля. Интенсивность экспрессии CD69 при сокультивировании клеток с *Lentinula edodes* не превышала 15 %. Экспрессия HLA-DR не изменялась достоверно.

Изучение влияния водных грибных экстрактов на В-клетки. При анализе влияния грибов на функциональную активность в качестве В-лимфоцитов была выбрана линия Daudi, отличающаяся наибольшим изменением экспрессии поверхностных маркеров в ответ на стимуляцию [12]. Результаты определения уровня экспрессии молекул CD86 и HLA-DR представлены в табл. 2.

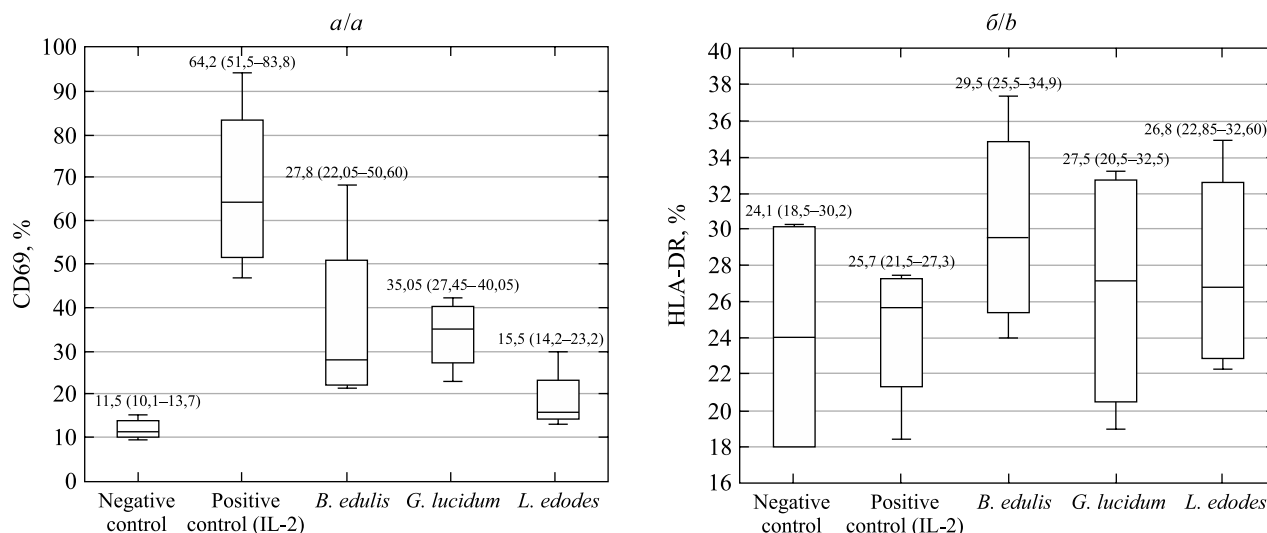


Рис. 2. Экспрессия молекул CD69, HLA-DR клетками линии Jurkat-tat при сокультивировании с водными грибными экстрактами

Fig. 2. CD69, HLA-DR expression by Jurkat-tat incubated with water mushroom extracts

Таблица 2

Экспрессия молекул CD86, HLA-DR В-клетками
при сокультивировании с грибами

Table 2

CD86, HLA-DR expression by B-cells incubated
with water mushroom extracts

Образец	CD86, %	<i>p</i> (с ОК)	HLA-DR, %	<i>p</i> (с ОК)
ОК	5,4 (4,1–6,7)	–	92,4 (91,9–93,9)	–
ПК (ЛПС)	20,5 (19,5–23,8)	0,020	93,4 (92,0–94,0)	0,028
<i>Boletus edulis</i>	38,6 (35,05–42,6)	0,012	92,5 (92,1–96,1)	0,598
<i>Ganoderma lucidum</i>	24,6 (23,45–30,05)	0,023	93,4 (92,6–94,2)	0,752
<i>Lentinula edodes</i>	16,5 (14,2–20,25)	0,042	96,4 (93,0–97,4)	0,635

Молекула CD86 в данном исследовании характеризуется усилением экспрессии по сравнению с отрицательным контролем, значение в котором составило чуть более 5 %. Под влиянием ЛПС достоверно увеличивалось содержание CD86 В-клеточной линии Daudi, а под влиянием *Boletus edulis* ($p = 0,012$) уровень молекулы CD86 почти в 2 раза превысил показатели положительного контроля ($p = 0,02$).

Анализ экспрессии HLA-DR не выявил отличий при сокультивировании ДК с ЛПС и всеми грибами.

Оценка функциональной активности базофилов периферической крови. Базофилы под действием различных стимуляционных факторов на своей поверхности могут повышать экспрессию молекул активации [13]. В качестве маркера активации была выбрана молекула CD203с (E-NPP3), а в качестве маркеров дегрануляции – молекулы CD63 (LAMP-3) и CD107a (LAMP-1), для положительного контроля использовали ФМА.

Показано, что положительный контроль ($p = 0,009$) и *Boletus edulis* ($p = 0,015$) достоверно усиливали активацию маркера CD203с ($p < 0,05$), а сокультивирование с *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes* повысило экспрессию CD203с в несколько раз по сравнению с отрицательным контролем (табл. 3).

Экспрессия молекулы дегрануляции CD63 также значительно усилилась после активации базофилов с водными грибными экстрактами *Boletus edulis* (52,5 (42,7–55,3) %), *Ganoderma lucidum* (33,7 (32,3–35,3) %) и *Lentinula edodes* (23,9 (23,7–24,7) %) по сравнению с нестимулированными базофилами (8,6 (5,74–11,70) %).

Таблица 3

Экспрессия молекул CD63, CD107a и CD203c
базофилами при сокультивировании с грибами

Table 3

CD63, CD107a, CD203c expression by basophils
incubated with water mushroom extracts

Образец	CD63, %	<i>p</i> (с ОК)	CD107a, %	<i>p</i> (с ОК)	CD203c, %	<i>p</i> (с ОК)
ОК	8,6 (5,74–11,70)	–	2,8 (1,57–3,66)	–	4,2 (3,43–4,70)	–
ПК (ФМА)	92,8 (91,3–97,6)	0,028	5,71 (5,32–6,10)	0,032	97,5 (94,6–98,3)	0,009
<i>Boletus edulis</i>	52,5 (42,7–55,3)	0,030	7,8 (5,34–12,30)	0,012	54,6 (52,9–66,5)	0,015
<i>Ganoderma lucidum</i>	33,7 (32,3–35,3)	0,025	6,8 (3,15–9,53)	0,019	33,5 (30,2–37,8)	0,041
<i>Lentinula edodes</i>	23,9 (23,7–24,7)	0,031	3,1 (2,1–4,2)	0,034	34,2 (31,2–35,2)	0,032

В то же время на неактивированных базофилах отмечалась незначительная экспрессия CD107a как в положительном контроле, так и в образцах при сокультивировании с грибами рейши и шиитаке. Максимальный уровень экспрессии CD107a выявлен под действием *Boletus edulis* по сравнению с отрицательным контролем ($p = 0,012$).

Изучение влияния водных грибных экстрактов на НК-клетки периферической крови. Результаты оценки влияния грибных экстрактов на экспрессию поверхностных молекул CD16 и CD336 (NCR2) НК-клетками представлены в табл. 4.

Таблица 4

Экспрессия молекул CD16, CD336 НК-клетками
при сокультивировании с грибами

Table 4

CD16, CD336 expression
by NK-cells incubated with water mushroom extracts

Образец	CD16, %	<i>p</i> (с ОК)	CD336, %	<i>p</i> (с ОК)
ОК	5,3 (4,1–6,7)	–	1,5 (0,9–1,7)	–
ПК (IL-2)	12,3 (10,95–13,25)	0,047	12,7 (11,55–12,90)	0,015
<i>Boletus edulis</i>	4,1 (3,45–5,55)	0,541	1,9 (1,85–2,54)	0,054
<i>Ganoderma lucidum</i>	3,95 (3,35–4,30)	0,768	3,6 (2,1–4,2)	0,035
<i>Lentinula edodes</i>	5,74 (4,60–7,55)	0,045	2,2 (2,05–3,20)	0,027

Установлено, что экстракты *Boletus edulis*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* не оказали значимого влияния на экспрессию CD16 и CD336 НК-клетками. Интерлейкин-2 как положительный контроль, напротив, увеличил экспрессию молекул CD16 и CD336 более чем в 2 раза.

В результате проведенного эксперимента было установлено, что сокультивирование НК-клеток с грибными экстрактами не приводило к их активации.

Заключение

По результатам проведенных исследований было выявлено, что водные экстракты всех изученных грибов отдела Basidiomycota индуцировали увеличение продукции ROS нейтрофилами, моноцитами и ДК. Каждый из экстрактов грибов стимулировал продукцию ROS, уровень которых был по крайней мере на 20 % больше, чем в отрицательном контроле. Эффект грибов родов *Ganoderma*, *Lentinula*, *Boletus* проявлялся в усилении экспрессии CD205 ДК, повышении экспрессии CD69 Т-лимфоцитами, CD86 В-лимфоцитами, в увеличении экспрессии маркера активации CD203c и молекул дегрануляции базофилов CD63 и CD107a, что свидетельствует о выраженной иммунобиологической активности исследуемых грибов. При сокультивировании НК-клеток с экстрактами грибов не было обнаружено статистически значимых эффектов, что подтверждается отсутствием усиления экспрессии молекул CD16 и CD336.

Установлено, что водные экстракты *Boletus edulis* (боровик) обладают иммуномодулирующей активностью, сравнимой с грибами *Ganoderma lucidum* (рейши) и *Lentinula edodes* (шиитаке). Таким образом, результаты исследований убедительно доказывают возможность применения экстрактов гриба *Boletus edulis* и биологически активных соединений, извлеченных из него, в перспективе в качестве нового природного иммуномодулятора.

Библиографические ссылки

1. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2010;12(1):1–16. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.10.
2. Bastiaan-Net S, Chanput W, Hertz A, Zwartink RD, Mes JJ, Wichers HJ. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). *International Immunopharmacology*. 2013;15(1):167–175. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.11.003.
3. Пучкова ТА, Черноок ТВ, Осадчая ОВ, Иконникова НВ, Капич АН. Перспективы использования новых штаммов лекарственных макромицетов для создания функциональных продуктов питания. В: Пручковская ОН, редактор. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 3*. Минск: Беларуская навука; 2011. с. 284–302.
4. Rubel R, Dalla Santa HS, Dos Santos LF, Fernandes LC, Figueiredo BC, Socol CR. Immunomodulatory and Antitumoral Properties of *Ganoderma lucidum* and *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes) Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2018;20(4):393–403. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025979.
5. Wang D, Sun S-Q, Wu W-Z, Yang S-L, Tan J-M. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis* and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice. *Carbohydrate Polymers*. 2014;105:127–134. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.12.085.
6. Lemieszek MK, Ribeiro M, Marques G, Nunes FM, Pożarowski P, Rzeski W. New insights into the molecular mechanism of *Boletus edulis* ribonucleic acid fraction (BE3) concerning antiproliferative activity on human colon cancer cells. *Food & Function*. 2017;8(5):1830–1839. DOI: 10.1039/c6fo01626j.
7. Гончаров АЕ, Титов ЛП, Романова ИВ, Скрягин АЕ, Солодовникова ВВ, Шпаковская НС и др. Оптимизация метода получения дендритных клеток из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга для иммунотерапии пациентов с туберкулезом. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2012;56(4):94–102.
8. Дуж ЕВ, Гончаров АЕ. Сравнительный профиль экспрессии поверхностных и внутриклеточных молекул Т-лимфоцитарных клеточных линий человека. *Новости медико-биологических наук*. 2018;18(3):126–134.
9. Титов ЛП, Гончаров АЕ, Мурашко АС, Головнева НА, Найдено ИА, Коломиец ЭИ. Взаимодействие лактобацилл и их компонентов с нейтрофилами, моноцитами и лимфоцитами периферической крови человека. *Известия НАН Беларуси. Серия медицинских наук*. 2013;3:19–27.
10. Genser B, Cooper PJ, Yazdanbaksh M, Barreto ML, Rodrigues LC. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunology* [Internet]. 2007 [cited 2014 May 22];8:27. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. DOI: 10.1186/1471-2172-8-27.
11. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and function of interleukin-2 in T-lymphocytes. *Annual Review of Immunology*. 2018;36(1):411–433. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053352.
12. Дуж ЕВ, Гончаров АЕ. Расширенная иммунофенотипическая характеристика В-лимфоцитарных клеточных линий человека. В: Титов ЛП, редактор. *Современные проблемы инфекционной патологии человека. Выпуск 11*. Минск: Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии; 2018. с. 165–171.
13. Karasuyama H, Mukai K, Tsujimura Y, Obata K. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(1):9–13. DOI: 10.1038/nri2458.

References

1. Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2010;12(1):1–16. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i1.10.
2. Bastiaan-Net S, Chanput W, Hertz A, Zwartink RD, Mes JJ, Wichers HJ. Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). *International Immunopharmacology*. 2013;15(1):167–175. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.11.003.
3. Puchkova TA, Chernook TV, Osadchya OV, Ikonnikova NV, Kapich AN. Application prospects of new medicinal macromycetes strains for production of functional food. In: Pruchkovskaya ON, editor. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Tom 3* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 3]. Minsk: Belaruskaya navuka; 2011. p. 284–302. Russian.
4. Rubel R, Dalla Santa HS, Dos Santos LF, Fernandes LC, Figueiredo BC, Socol CR. Immunomodulatory and Antitumoral Properties of *Ganoderma lucidum* and *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes) Medicinal Mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2018;20(4):393–403. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025979.
5. Wang D, Sun S-Q, Wu W-Z, Yang S-L, Tan J-M. Characterization of a water-soluble polysaccharide from *Boletus edulis* and its antitumor and immunomodulatory activities on renal cancer in mice. *Carbohydrate Polymers*. 2014;105:127–134. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.12.085.
6. Lemieszek MK, Ribeiro M, Marques G, Nunes FM, Pożarowski P, Rzeski W. New insights into the molecular mechanism of *Boletus edulis* ribonucleic acid fraction (BE3) concerning antiproliferative activity on human colon cancer cells. *Food & Function*. 2017;8(5):1830–1839. DOI: 10.1039/c6fo01626j.
7. Hancharou AY, Titov LP, Ramanava IU, Skrahin AE, Solodovnikova VV, Shpakovskaya NS, et al. Optimization of the method of dendritic cell generation from hematopoietic bone marrow derived stem cells for the purposes of immunotherapy of patients with tuberculosis. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2012;56(4):94–102. Russian.

8. Duzh EV, Goncharov AE. Comparative profile of surface and intracellular molecule expression of human T-lymphocyte cell lines. *News of Biomedical Sciences*. 2018;18(3):126–134. Russian.
9. Titov LP, Goncharov AE, Murashko AS, Golovneva NA, Naidenko IA, Kolomiets EI. Interaction of lactobacilli and their components with neutrophils, monocytes and lymphocytes of human peripheral blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Series*. 2013;3:19–27. Russian.
10. Genser B, Cooper PJ, Yazdanbaksh M, Barreto ML, Rodrigues LC. A guide to modern statistical analysis of immunological data. *BMC Immunology* [Internet]. 2007 [cited 2014 May 22];8:27. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/8/27>. DOI: 10.1186/1471-2172-8-27.
11. Ross SH, Cantrell DA. Signaling and function of interleukin-2 in T-lymphocytes. *Annual Review of Immunology*. 2018;36(1):411–433. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042617-053352.
12. Duzh EV, Hancharou AY. Extended immunophenotypic characteristic of human B-lymphocyte cell lines. In: Titov LP, editor. *Sovremennye problemy infektsionnoi patologii cheloveka. Vypusk 11* [Modern problems of human infectious pathology. Volume 11]. Minsk: The Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology; 2018. p. 165–171. Russian.
13. Karasuyama H, Mukai K, Tsujimura Y, Obata K. Newly discovered roles for basophils: a neglected minority gains new respect. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(1):9–13. DOI: 10.1038/nri2458.

Статья поступила в редколлегию 08.07.2020.
Received by editorial board 08.07.2020.

НАКОПЛЕНИЕ АСТАКСАНТИНА В КЛЕТКАХ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*, ИНДУЦИРОВАННОЕ ДЕФИЦИТОМ АЗОТА И СВЕТОМ ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ¹

Т. В. САМОВИЧ¹⁾, Р. Г. ГОНЧАРИК¹⁾,
Е. И. ПЕЧЕНКИНА¹⁾, Е. В. ВЯЗОВ¹⁾, Н. В. КОЗЕЛ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Установлено, что азотная недостаточность, инициированная на стадии покоя *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*), в сочетании со светом высокой интенсивности не является эффективным стрессовым фактором для индукции накопления астаксантина в клетках водоросли. Содержание астаксантина в клетках *H. pluvialis* при отсутствии азота было ниже, чем в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, независимо от интенсивности освещения. Данный факт указывает на необходимость наличия некоторого количества азота в среде для функционирования системы синтеза данного пигмента. Кроме того, низкий выход астаксантина в вариантах опыта с использованием неполной среды Рудика, помимо недостатка азота для его биосинтеза, связан также со снижением уровня экспрессии гена *PSY*, кодирующего ключевой фермент цепи биосинтеза каротиноидов – фитоенсинтазу.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*; свет высокой интенсивности; дефицит азота; астаксантин.

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Самович ТВ, Гончарик РГ, Печенкина ЕИ, Вязов ЕВ, Козел НВ. Накопление астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis*, индуцированное дефицитом азота и светом высокой интенсивности. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:37–45.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-37-45>

For citation:

Samovich TV, Goncharik RG, Pechenkina EI, Viazau YaV, Kozel NV. Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* cells induced by nitrogen deficiency and high light intensity. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020; 3:37–45. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-37-45>

Авторы:

Татьяна Викторовна Самович – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Руслан Геннадьевич Гончарик – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Елизавета Ивановна Печенкина – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Евгений Викторович Вязов – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки.

Authors:

Tatyana V. Samovich, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
samovich77@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-3469-3752>

Ruslan G. Goncharik, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
rusgon@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-2839-5214>

Elizaveta I. Pechenkina, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
eliza9214504@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0757-2872>

Yauhen V. Viazau, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
viazau@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0001-9750-2792>

Nikolay V. Kozel, PhD (biology); head of the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
kozelmikalai@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

ASTAXANTHIN ACCUMULATION IN *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* CELLS INDUCED BY NITROGEN DEFICIENCY AND HIGH LIGHT INTENSITY

T. V. SAMOVICH^a, R. G. GONCHARIK^a,
E. I. PECHENKINA^a, Ya. V. VIAZAU^a, N. V. KOZEL^a

^aInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: T. V. Samovich (samovich77@gmail.com)

It was established that nitrogen deficiency initiated at the resting phase of *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) is not an effective stress factor in combination with high light intensity to induce the accumulation of astaxanthin in algae cells. The amounts of astaxanthin in *H. pluvialis* cells in the absence of nitrogen were lower compared to those when complete Rudic medium was used, regardless of the light intensity. This fact indicates the need for a certain amount of nitrogen in the medium for the functioning of the astaxanthin synthesis system. In addition, the low yield of astaxanthin in the experimental variants cultivated on incomplete Rudic medium is associated with the insufficient amount of nitrogen for its biosynthesis and also with a decrease in the expression level of the *PSY* gene encoding a key enzyme of the carotenoid biosynthesis chain – phytoene synthase.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; high light intensity; nitrogen deficiency; astaxanthin.

Введение

Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* (*H. pluvialis*) рассматривается как наиболее эффективный продуцент каротиноида астаксантина: ее клетки способны накапливать данный пигмент в крайне высоких количествах (до 5 % от сухой массы) [1]. Астаксантин широко используется в сельском хозяйстве, пищевой и фармакологической промышленности, а также косметологии благодаря его антиоксидантным свойствам [2]. Сегодня значительная доля коммерческого астаксантина имеет искусственное происхождение, однако химически синтезированный пигмент представляет собой смесь из трех стереоизомеров и отличается от натурального гораздо меньшей биоактивностью [3; 4]. Существенно возросший в последние годы интерес к *H. pluvialis* связан с активизацией его промышленного производства в качестве источника натурального астаксантина. Более десятка крупных биотехнологических компаний по всему миру наладили получение этого антиоксиданта из клеток *H. pluvialis*. Но себестоимость выделения астаксантина из водорослей в настоящее время почти в 3 раза выше, чем затраты на выпуск синтетического продукта [5]. Поэтому исследования, направленные на увеличение как продуктивности *H. pluvialis*, так и каротиногенеза в его клетках, являются весьма актуальными. Большой интерес представляет познание природы механизмов, контролирующих процесс биосинтеза каротиноидов в клетках *H. pluvialis*.

В нормальных условиях клетки *H. pluvialis* имеют зеленую окраску, они подвижны и содержат небольшое количество астаксантина. Накопление этого пигмента в клетках водоросли происходит при воздействии на них неблагоприятных для роста факторов (свет высокой интенсивности, дефицит элементов минерального питания, высокая температура и др.) [6; 7]. В таких условиях клетки *H. pluvialis* переходят в состояние цисты, формирование которой сопровождается редукцией фотосинтетического аппарата, утолщением клеточной стенки и появлением в цитоплазме липидных включений, содержащих астаксантин в форме эфиров с жирными кислотами.

При культивировании *H. pluvialis* возникает ряд трудностей. В их числе низкий выход пигмента, невысокая скорость роста, неустойчивость существующих штаммов к контаминациям [6]. В связи с этим усилия ученых направлены на получение новых штаммов и исследование возможности повысить количество накапливаемого астаксантина, создавая условия с разными комбинациями и интенсивностью стрессовых факторов [6; 8].

В ряде работ показано, что свет высокой интенсивности в сочетании с азотным голоданием вызывает существенное увеличение содержания астаксантина в клетках *H. pluvialis* [9; 10]. Однако во всех подобных исследованиях азотную недостаточность инициировали на стадии активного роста культуры, что приводило к полному прекращению деления клеток и, соответственно, увеличения биомассы водоросли [9; 10]. Гораздо более эффективной с точки зрения выхода астаксантина является схема индукции

каротиногенеза, состоящая из двух стадий. На первой стадии (стадия активного роста) добиваются максимального прироста биомассы водоросли при нормальных условиях культивирования с последующим переходом клеток в неподвижное состояние. На второй стадии (стадия покоя) полученную культуру выносят на свет высокой интенсивности для индукции накопления астаксантина в клетках водоросли. В настоящем исследовании в дополнение к воздействию света высокой интенсивности на второй стадии была инициирована азотная недостаточность.

Таким образом, цель данной работы – выявление особенностей каротиногенеза в клетках гематококка (*H. pluvialis*, штамм IBCE H-17) при совместном действии двух стрессовых факторов – дефицита азота и света высокой интенсивности.

Материалы и методы исследования

В работе использовали альгологически чистую культуру одноклеточной зеленой жгутиковой водоросли *H. pluvialis* (штамм IBCE H-17) из коллекции микроводорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [11]. Клетки гематококка, взятые из альгологической коллекции, стерильно пересеивали на чашки Петри с агаризованной питательной средой BBM, подращивали на свету в течение 7–10 сут при температуре $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, после чего смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика [12] и выращивали в накопительном режиме при освещении люминесцентными лампами Philips TL-D 36W/54-765 (освещенность 1500 лк, 14 ч света/10 ч темноты при температуре в световом периоде $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$). Через 10–14 сут выращивания суспензию гематококка, содержащую около 80 % неподвижных клеток, использовали в экспериментах. При этом часть клеток переводили на свежую среду Рудика, остальные – на среду Рудика без азота и культивировали оба варианта при нормальном освещении (1500 лк) и освещении высокой интенсивности (10 000 лк). При постановке эксперимента и через 21 сут культивирования определяли количество клеток в суспензии, их размер и содержание астаксантина. Количество клеток в культуре водоросли оценивали с помощью камеры Горяева. Диаметр клеток гематококка определяли с использованием микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2, а также программного обеспечения *NIS-Elements Advanced Solutions v. 4.40* (Nikon, Япония).

Качественную и количественную оценку содержания хлорофиллов и каротиноидов в образцах проводили с помощью хроматографа высокого давления LC-20 Prominence (*Shimadzu*, Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы *Macherey-Nagel* (Германия). В основу метода выделения, разделения и идентификации пигментов были положены методики, описанные в работах [13; 14]. Содержание пигментов определяли спектрофотометрически, применяя детектор с диодной матрицей SPD-M20A (*Shimadzu*, Япония). Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 нм (для фотосинтетических пигментов) и 475 нм (для астаксантина). Площади пиков хроматограммы, найденные с помощью программного обеспечения *Shimadzu LC Solution*, использовали для количественного определения пигментов. Астаксантин с жирными кислотами образует большое количество эфиров. В связи с этим для точного количественного определения последнего проводили процедуру сапонификации. После сапонификации жирные кислоты отщепляются и астаксантин выходит в виде нескольких стереоизомеров, среди которых преобладает трансастаксантин [15].

Для определения уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих в клетках *H. pluvialis* ключевые ферменты биосинтеза каротиноидов – фитоенсинтазу и β -каротингидроксилазу соответственно, выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzol GTM (*AppliChem*, Германия), синтезировали кДНК с использованием ProtoScript II Reverse Transcriptase (*New England BioLabs*, США) в амплификаторе MJ Mini (*Bio-Rad*, США). Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР-анализа в реальном времени (ПЦР-РВ) с применением генспецифических праймеров и гена-нормализатора, кодирующего актин. Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 1 мкл кДНК, 10 пмоль каждого праймера, 4 мкл 2,5-кратной реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя *EVA Green* («Синтол», Россия) и воду. ПЦР-РВ проводили с помощью термоциклера C1000 Touch Thermal Cycler с оптическим реакционным модулем CFX96 (*Bio-Rad*, США) по следующей схеме: предварительная денатурация – 95°C , 5 мин; плавление – 95°C , 15 с; отжиг – $55\text{--}61^\circ\text{C}$, 45 с. Количество циклов амплификации – 40. Обработка полученных результатов выполнялась в программе *Bio-Rad CFX Maestro* [16].

В статье приведены средние значения из 3–5 экспериментов и их стандартные отклонения. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ *Microsoft Excel 2019*, *SigmaPlot 12.0* и статистические методы, принятые в области биологических исследований.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы были проанализированы продуктивность *H. pluvialis* и морфометрические показатели клеток микроводоросли при совместном действии на них дефицита азота в среде культивирования и света высокой интенсивности.

Установлено, что через 21 сут эксперимента количество клеток в суспензии уменьшилось во всех опытных вариантах. Более значительное снижение отмечено в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, вне зависимости от интенсивности освещения (рис. 1, а). В этих же образцах наблюдалось увеличение диаметра клеток водоросли, что является признаком стрессового состояния последних [17]. В вариантах эксперимента на среде Рудика без азота количество клеток несколько снижалось, но их диаметр не изменялся по сравнению с начальными значениями (см. рис. 1, б).

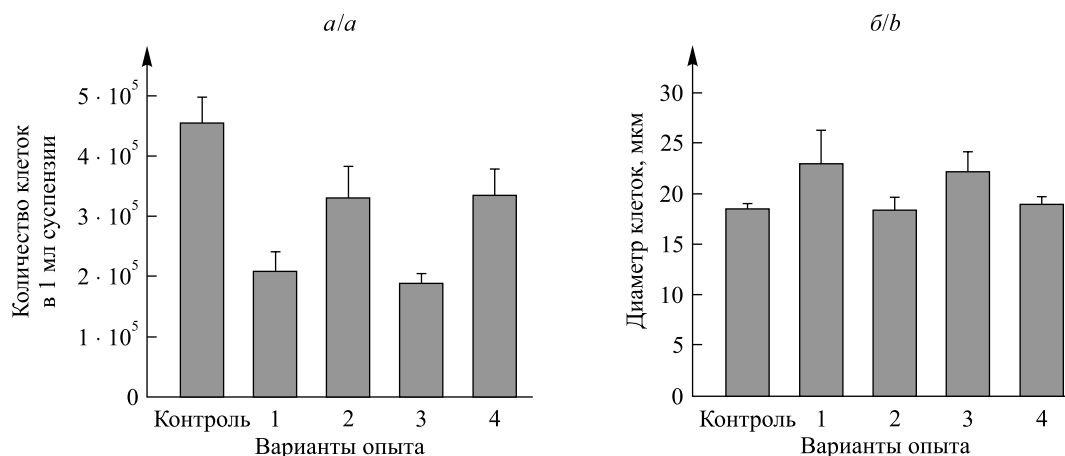


Рис. 1. Количество (а) и диаметр (б) клеток *H. pluvialis* в начале (контроль) и через 21 сут эксперимента на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) при освещенности 1500 лк (варианты 1, 2) и 10 000 лк (варианты 3, 4)

Fig. 1. The number of *H. pluvialis* cells in 1 ml of suspension (а) and their diameter (б) at the beginning (control) and after 21 d of the experiment in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) with illuminance of 1500 lx (cultures 1, 2) and 10 000 lx (cultures 3, 4)

Содержание хлорофилла и каротиноидов в клетках *H. pluvialis* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Анализ пигментных экстрактов суспензии *H. pluvialis* позволил выявить в исследуемых препаратах наличие каротиноидов (неоксантина, виолаксантина, лютеина и β-каротина) и хлорофиллов *a* и *b* (табл. 1).

Показано, что через 21 сут эксперимента во всех опытных вариантах происходило существенное снижение содержания как хлорофиллов *a* и *b*, так и каротиноидов по сравнению с исходной культурой (см. табл. 1). Однако наибольшая убыль пигментов была зафиксирована для вариантов с дефицитом азота. Так, если в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, через 21 сут содержание фотосинтетических пигментов снижалось в 3–4 раза по сравнению с исходной культурой, то в образцах, культивируемых на среде, дефицитной по азоту, – в 5–7 раз.

Таблица 1

Содержание пигментов в клетках *H. pluvialis* на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (1500 лк, варианты 1 и 2) и свету высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4), мкг на 1 мл суспензии

Table 1

The pigment content in *H. pluvialis* cells in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) after incubation for 21 d under normal light (1500 lx, cultures 1 and 2) and in high-intensity light (10 000 lx, cultures 3 and 4), μg in 1 mL of suspension

Пигменты	Исходная культура	Варианты опыта			
		1	2	3	4
Неоксантин	0,150 ± 0,006	0,043 ± 0,004	0,035 ± 0,001	0,056 ± 0,021	0,027 ± 0,004
Виолаксантин	0,091 ± 0,022	0,037 ± 0,006	0,032 ± 0,005	0,046 ± 0,022	0,023 ± 0,006

Окончание табл. 1
Ending table 1

Пигменты	Исходная культура	Варианты опыта			
		1	2	3	4
Лютеин	1,001 ± 0,068	0,210 ± 0,021	0,216 ± 0,008	0,344 ± 0,163	0,204 ± 0,013
Хлорофилл <i>b</i>	3,252 ± 0,420	0,733 ± 0,130	0,467 ± 0,013	0,712 ± 0,330	0,428 ± 0,065
Хлорофилл <i>a</i>	6,223 ± 0,310	1,503 ± 0,245	1,049 ± 0,031	1,691 ± 0,737	0,886 ± 0,129
β-Каротин	0,600 ± 0,012	0,373 ± 0,218	0,100 ± 0,004	0,186 ± 0,084	0,088 ± 0,016
Сумма хлорофиллов	9,475 ± 0,738	2,237 ± 0,374	1,515 ± 0,044	2,403 ± 1,063	1,315 ± 0,195
Сумма каротиноидов	1,841 ± 0,085	0,663 ± 0,223	0,383 ± 0,015	0,631 ± 0,290	0,343 ± 0,036
Отношение каротиноидов к хлорофиллам	0,19	0,29	0,25	0,26	0,26

При исследовании эффективности каротиногенеза в клетках *H. pluvialis* важным является показатель, отражающий отношение общего содержания каротиноидов к общему содержанию хлорофиллов. В наших экспериментах мы зарегистрировали увеличение данного показателя на 30–50 % в зависимости от условий культивирования по сравнению с исходной культурой (см. табл. 1). Поддержание примерно постоянного значения отношения каротиноидов к хлорофиллам в нормальных условиях культивирования *H. pluvialis* объясняется тем, что в норме в клетках присутствуют только каротиноиды, ассоциированные с фотосинтетическим аппаратом пластид в пигмент-белковых комплексах. Между различными компонентами пигмент-белковых комплексов фотосинтетического аппарата соблюдается строгая стехиометрия, за счет чего сохраняется соотношение пигментов [18; 19]. Индукция формирования гематоцист, сопровождающаяся индукцией синтеза астаксантина, структурно и функционально не связанного с фотосинтетическим аппаратом (т. е. соответствующего определению вторичных каротиноидов), приводит к нарушению стехиометрии между пигментами, в результате чего отношение каротиноидов к хлорофиллам возрастает, что также подтверждается литературными данными [20].

В целях исследования перспективности использования сочетанного действия дефицита азота и света высокой интенсивности в качестве индуктора накопления астаксантина в клетках *H. pluvialis* определяли количество непосредственно накопившегося в клетках водоросли пигмента. В исходной культуре (начало эксперимента) были зарегистрированы следовые количества астаксантина. Однако после 21 сут культивирования в вариантах опыта на полной среде Рудика как на ярком свете, так и при нормальном освещении выявлено значительное накопление этого пигмента в клетках *H. pluvialis* (рис. 2). В вариантах эксперимента, полностью лишенных азота, содержание астаксантина в клетках было существенно ниже (более чем в 5 раз) по сравнению с опытными вариантами на полной среде Рудика независимо от интенсивности освещения, что видно в том числе и по окраске культуры (рис. 3). Данный факт указывает на необходимость наличия некоторого количества азота в среде для функционирования системы синтеза астаксантина, что подтверждается литературными данными [8].

Также нами было проведено исследование уровня экспрессии генов *PSY* и *CHY*, кодирующих ферменты биосинтеза астаксантина – фитоенсинтазу и β-каротингидроксилазу соответственно, в клетках *H. pluvialis* при совместном действии дефицита азота в среде культивирования и света высокой интенсивности в течение 21 сут. Последовательности праймеров, специфичных к генам *PSY* и *CHY*, а также к гену, кодирующему актин (ген-нормализатор), рассчитывали и оптимизировали в указанных условиях, используя литературные данные [21] (табл. 2). Праймеры синтезировали в лаборатории ДНК-праймеров Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

В вариантах опыта на среде Рудика без азота независимо от интенсивности освещения мы регистрировали существенное снижение в клетках *H. pluvialis* уровня экспрессии гена *PSY* относительно контроля (табл. 3). При этом экспрессия гена *CHY* была значительно выше в вариантах опыта, лишенных азота, вне зависимости от интенсивности освещения (см. табл. 3). Отметим, что катализируемая фитоенсинтазой конденсация двух молекул геранилгеранилпирофосфата с образованием фитоена может являться лимитирующей стадией биосинтеза каротиноидов, поскольку этот фермент есть только у *de novo* синтезирующих каротиноиды организмов. Снижение уровня экспрессии гена *PSY* может быть причиной низкого выхода астаксантина в вариантах опыта с азотной недостаточностью.

Таблица 2

Характеристики используемых праймеров

Table 2

Characteristics of the primers used

Гены	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Температура отжига, °С	Длина продукта, п. н.
<i>CHY</i>	FW – CTACACCACAGCGGCAAGTA	55	521
	RV – GCCTCACCTGATCCTACCAA		
<i>PSY</i>	FW – ATGTACCATCCCAAGGCAAC	60	402
	RV – CTGGACCAGGCCTACGAC		
Ген актина (нормализатор)	FW – AGCGGGAGATAGTGC GGGACA RV – ATGCCACCGCCTCCATGC	61	200

Примечание. FW – прямой праймер; RV – обратный праймер; п. н. – пар нуклеотидов.

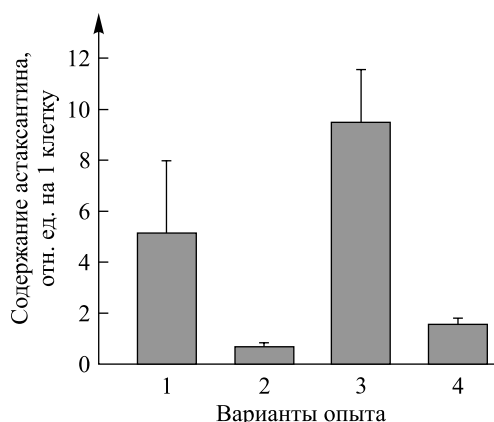


Рис. 2. Количество астаксантина в клетках *H. pluvialis* через 21 сут эксперимента на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4), при освещенности 1500 лк (варианты 1, 2) и 10 000 лк (варианты 3, 4)

Fig. 2. The amount of astaxanthin in *H. pluvialis* cells after 21 d of the experiment in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4), with illumination of 1500 lx (cultures 1, 2) and 10 000 lx (cultures 3, 4)



Рис. 3. Суспензия *H. pluvialis* на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (1500 лк, варианты 1 и 2) и свете высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Fig. 3. Suspension of *H. pluvialis* in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) after incubation for 21 d under normal light (1500 lx, cultures 1 and 2) and in high-intensity light (10 000 lx, cultures 3 and 4)

Таблица 3

Экспрессия генов β -каротингидроксилазы и фитоенсинтазы в клетках *H. pluvialis* на полной среде Рудика (варианты 1, 3) и среде Рудика без азота (варианты 2, 4) после инкубации в течение 21 сут на нормальном свете (1500 лк, варианты 1 и 2) и свету высокой интенсивности (10 000 лк, варианты 3 и 4)

Table 3

Expression of the β -carotene hydroxylase and phytoene synthase genes in *H. pluvialis* cells in complete Rudik medium (cultures 1, 3) and in Rudik medium without nitrogen (cultures 2, 4) after incubation for 21 d in normal light (1500 lx, cultures 1 and 2) and in high-intensity light (10 000 lx, cultures 3 and 4)

Варианты опыта	Фитоенсинтаза	β -Каротингидроксилаза
1	2,62 $\pm$ 1,84	1,2 $\pm$ 0,21
2	0,71 $\pm$ 0,44	20,6 $\pm$ 8,19
3	4,39 $\pm$ 2,79	2,03 $\pm$ 1,04
4	0,15 $\pm$ 0,06	6,27 $\pm$ 1,75

Заключение

Таким образом, установлено, что азотная недостаточность, инициированная на стадии покоя *H. pluvialis*, в сочетании со светом высокой интенсивности не является эффективным стрессовым фактором для индукции астаксантина в клетках водоросли. При этом важно отметить, что количества астаксантина в клетках *H. pluvialis* при отсутствии азота были ниже, чем в образцах, культивируемых на полной среде Рудика, независимо от интенсивности освещения. Этот факт указывает на необходимость наличия некоторого количества азота в среде для функционирования системы синтеза астаксантина, что подтверждается литературными данными. Кроме того, низкий выход астаксантина в вариантах эксперимента с использованием неполной среды Рудика, помимо недостатка азота для его биосинтеза, связан также со снижением уровня экспрессии гена *PSY*, кодирующего ключевой фермент цепи биосинтеза каротиноидов – фитоенсинтазу.

Библиографические ссылки

1. Hagen C, Grünwald K, Schmidt S, Müller J. Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *European Journal of Phycology*. 2000;35(1):75–82. DOI: 10.1080/09670260010001735651.
2. Shimidzu N, Goto M, Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*. 1996;62(1):134–137. DOI: 10.2331/fishsci.62.134.
3. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(5):210–216. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7.
4. Yuan J-P, Chen F. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*. 1997;11(7):455–459. DOI: 10.1023/A:1018441411746.
5. Carlsson AS, van Beilen JB, Möller R, Clayton D. *Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project*. Bowles D, editor. Newbury: CPL Press; 2007. 86 p.
6. Han D, Li Y, Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*. 2013;28(2):131–147. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.131.
7. Imamoglu A, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*. 2009;26(3–4):199–204. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.08.007.
8. Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. 2005;96(3):373–378. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.04.006.
9. Dong Q, Zhao X, Xing X, Hu J, Gong J. Concomitant NH_4^+ secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2007;15(2):162–166. DOI: 10.1016/S1004-9541(07)60052-4.
10. Scibilia L, Girolomoni L, Berteotti S, Alboresi A, Ballottari M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*. 2015;12:170–181. DOI: 10.1016/j.algal.2015.08.024.

11. Мельников СС, Мананкина ЕЕ, Будакова ЕА, Шалыго НВ, составители. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей*. Минск: Беларуская навука; 2011. 101 с.
12. Imamoglu E, Vardar Sukan F, Conk Dalay M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Science*. 2007;1(3):05–09.
13. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (HarvestPlus technical monograph. Series 2).
14. Milenković SM, Zvezdanović JB, Anđelković TD, Marković DZ. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*. 2012;1(1):16–24.
15. Yuan J-P, Chen F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(1):31–35. DOI: 10.1021/jf980465x.
16. Доманская ИН, Радюк МС, Будакова ЕА, Самович ТВ, Спивак ЕА, Шалыго НВ. *Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе*. Минск: Право и экономика; 2011. 31 с.
17. Kakizono T, Kobayashi M, Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of fermentation and bioengineering*. 1992;74(6):403–405. DOI: 10.1016/0922-338X(92)90041-R.
18. Dainese P, Bassi R. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(13):8136–8142.
19. Peter GF, Thornber JP. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16745–16754.
20. Solovchenko AE, Chivkunova OB, Maslova IP. Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011;58(1):9–17. DOI: 10.1134/S1021443710061056.
21. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(6):1409–1418. DOI: 10.1093/jxb/ern048.

References

1. Hagen C, Grünwald K, Schmidt S, Müller J. Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. *European Journal of Phycology*. 2000;35(1):75–82. DOI: 10.1080/09670260010001735651.
2. Shimidzu N, Goto M, Miki W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science*. 1996;62(1):134–137. DOI: 10.2331/fishsci.62.134.
3. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(5):210–216. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00078-7.
4. Yuan J-P, Chen F. Identification of astaxanthin isomers in *Haematococcus lacustris* by HPLC-photodiode array detection. *Biotechnology Techniques*. 1997;11(7):455–459. DOI: 10.1023/A:1018441411746.
5. Carlsson AS, van Beilen JB, Möller R, Clayton D. *Micro- and macro-algae: utility for industrial applications. Outputs from EPOBIO project*. Bowles D, editor. Newbury: CPL Press; 2007. 86 p.
6. Han D, Li Y, Hu Q. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*. 2013;28(2):131–147. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.131.
7. Imamoglu A, Dalay MC, Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnology*. 2009;26(3–4):199–204. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.08.007.
8. Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. 2005;96(3):373–378. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.04.006.
9. Dong Q, Zhao X, Xing X, Hu J, Gong J. Concomitant NH_4^+ secretion during astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* under high irradiance and nitrogen deficient conditions. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2007;15(2):162–166. DOI: 10.1016/S1004-9541(07)60052-4.
10. Scibilia L, Girolomoni L, Berteotti S, Alboresi A, Ballottari M. Photosynthetic response to nitrogen starvation and high light in *Haematococcus pluvialis*. *Algal Research*. 2015;12:170–181. DOI: 10.1016/j.algal.2015.08.024.
11. Mel'nikov SS, Manankina EE, Budakova EA, Shalygo NV, compilers. *Katalog geneticheskogo fonda khozyaistvenno poleznykh vidov vodoroslei* [Catalogue of the genetic fund of economically useful species of algae]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2011. 101 p. Russian.
12. Imamoglu E, Vardar Sukan F, Conk Dalay M. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. *International Journal of Natural and Engineering Science*. 2007;1(3):05–09.
13. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (HarvestPlus technical monograph. Series 2).
14. Milenković SM, Zvezdanović JB, Anđelković TD, Marković DZ. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*. 2012;1(1):16–24.
15. Yuan J-P, Chen F. Hydrolysis kinetics of astaxanthin esters and stability of astaxanthin of *Haematococcus pluvialis* during saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999;47(1):31–35. DOI: 10.1021/jf980465x.
16. Domanskaya IN, Radyuk MS, Budakova EA, Samovich TV, Spivak EA, Shalygo NV. *Tekhnologiya DNK-tipirovaniya genov ustoichivosti yachmenya k zasukhe* [DNA typing technology for genes of barley resistance to drought]. Minsk: Pravo i ekonomika; 2011. 31 p. Russian.
17. Kakizono T, Kobayashi M, Nagai S. Effect of carbon/nitrogen ratio on encystment accompanied with astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of fermentation and bioengineering*. 1992;74(6):403–405. DOI: 10.1016/0922-338X(92)90041-R.

18. Dainese P, Bassi R. Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll *a/b* binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(13):8136–8142.
19. Peter GF, Thornber JP. Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment-proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(25):16745–16754.
20. Solovchenko AE, Chivkunova OB, Maslova IP. Pigment composition, optical properties, and resistance to photodamage of the microalga *Haematococcus pluvialis* cultivated under high light. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2011;58(1):9–17. DOI: 10.1134/S1021443710061056.
21. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green algae *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. 2008;59(6):1409–1418. DOI: 10.1093/jxb/ern048.

Статья поступила в редколлегию 30.06.2020.
Received by editorial board 30.06.2020.

УДК 577.355.3

ВЛИЯНИЕ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ НА СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В РАСТЕНИЯХ ЯЧМЕНЯ СОРТА БРОВАР¹

Т. Г. КАЛЯГА¹⁾, Н. В. КОЗЕЛ¹⁾

¹⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Установлено существенное влияние почвенной засухи на морфометрические параметры листьев ячменя сорта Бровар, а также содержание в них фотосинтетических пигментов – хлорофилла и каротиноидов. Однако вызванные засухой значительное ухудшение ростовых показателей растений, снижение концентрации хлорофилла и в особенности каротиноидов происходили в отсутствие изменения уровня феофитина. Высказано предположение, что уменьшение количества пигментов связано в основном не с деструкцией в результате стресса, а с подавлением их синтеза, что может быть адаптационной реакцией растений, позволяющей минимизировать вероятность образования активных форм кислорода в фотосинтетических мембранах при недостатке влаги, а также оптимизировать в данных условиях использование энергии света для фотосинтетических процессов, на что указывает преимущественное снижение таких каротиноидов, как неоксантин, виолаксантин и β -каротин, активно участвующих в светосборе и передаче энергии на реакционные центры.

Ключевые слова: почвенная засуха; абиотический стресс; фотосинтез; фотосинтетические пигменты; хлорофилл; каротиноиды; феофитин; ячмень.

THE EFFECT OF SOIL DROUGHT ON THE CONTENT OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN BARLEY PLANTS OF THE BROVAR VARIETY

T. G. KALIAHA^a, N. V. KOZEL^a

^aInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: T. G. Kaliaha (t_kalyaga@mail.ru)

A significant effect of soil drought on the morphometric parameters of the leaves of barley plants of the Brovar variety, as well as the content of photosynthetic pigments (chlorophyll, carotenoids) in them was established. However,

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Каляга ТГ, Козел НВ. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:46–53.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-46-53>

For citation:

Kaliaha TG, Kozel NV. The effect of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020; 3:46–53. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-46-53>

Авторы:

Татьяна Геннадьевна Каляга – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки.

Authors:

Tatsiana G. Kaliaha, junior researcher at the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
t_kalyaga@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0001-7727-3451>
Nikolay V. Kozel, PhD (biology); head of the laboratory of biophysics and biochemistry of plant cells.
kozelmikalai@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-2958-7645>

a significant decrease in plant growth indicators under drought conditions, a decrease in the amount of chlorophyll and, to a greater extent, carotenoids occurred against the background of the absence of a change in the content of pheophytin. We assume that the decrease in the number of pigments is mainly associated not with destruction due to stress, but with a decrease in their synthesis, which can be an adaptive reaction of plants, which minimizes the likelihood of formation of reactive oxygen species in photosynthetic membranes under conditions of drought, and also optimizes the use of light energy for photosynthetic processes under such conditions, as indicated by the predominant decrease in carotenoids such as neoxanthin, violaxanthin and β -carotene, which are actively involved in light harvesting and energy transfer to reaction centers.

Keywords: soil drought; abiotic stress; photosynthesis; photosynthetic pigments; chlorophyll; carotenoids; pheophytin; barley.

Введение

Стрессовые условия, такие как засоление, засуха и высокая температура (жара), вызывают значительные изменения в протекании важных физиолого-биохимических процессов в растительном организме. Фотосинтез, как одно из фундаментальных и наиболее сложных физиологических явлений у всех растений, также подвергается сильному воздействию стрессовых факторов, в результате чего изменяется ультраструктура органелл и концентрация фотосинтетических пигментов, метаболитов и ферментов, участвующих в этом процессе [1]. Так как в фотосинтезе задействованы различные компоненты, в частности пигментный аппарат и фотосистемы в целом, электрон-транспортная система и пути утилизации CO_2 , даже незначительное повреждение, вызванное неблагоприятными факторами окружающей среды, может снизить общую фотосинтетическую способность зеленого растения, что существенным образом сказывается на сельскохозяйственном производстве.

Среди многочисленных стрессовых воздействий в последние годы именно засуха является наиболее весомым абиотическим фактором, имеющим всеобщее значение, в том числе и для Республики Беларусь, и заметно снижающим урожайность [2]. Дефицит воды вызывает серьезные изменения большинства физиологических процессов у растения: задержку роста и развития, потерю тургора, снижение скорости фотосинтеза и усвоения углерода, нарушение минерального питания и газообмена листьев и многое другое, что в значительной степени влияет на продуктивность сельскохозяйственных культур [3; 4].

В целом различные стрессовые условия, включая засуху, обычно приводят к существенному уменьшению содержания фотосинтетических пигментов – хлорофиллов (Хл, международное обозначение – Chl) и каротиноидов. Снижение концентрации Хл может быть связано с вызванными стрессом нарушениями биосинтеза пигментов или их разрушением. Однако степень повреждения растительной клетки в результате действия неблагоприятных факторов внешней среды зависит от вида, сорта растения, продолжительности воздействия и переносимости стресса [1]. Таким образом, уменьшение количества фотосинтетических пигментов, связанное с нарушением биосинтеза последних или же их разрушением, может привести к нарушению транспорта электронов и, следовательно, к снижению фотосинтетической способности у большинства зеленых растений.

В условиях засухи ключевую роль играют адаптационные механизмы, в частности механизмы адаптации фотосинтетического аппарата, позволяющие растению преодолеть стрессовое воздействие [5]. Важным аспектом повышения эффективности сельскохозяйственного производства при стремительном изменении климата, в том числе на фоне частых засух, выступает мониторинг роста и развития растений [6]. В связи с этим крайне актуальными на сегодняшний день являются исследования, направленные на разработку новых подходов по повышению устойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур в неблагоприятных условиях культивирования [4; 5; 7–9].

Целью данной работы было изучение действия почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в 7-дневных проростках ячменя сорта Бровар.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали первый настоящий лист зеленых проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Бровар, выращенных в лабораторных условиях под люминесцентными лампами Philips TL-D 36W/54-765 в режиме 14 ч света (интенсивность 6 тыс. лк) и 10 ч темноты при температуре $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 30 % в нормальных условиях (контроль) и при засухе.

Исследование влияния засухи на зеленые проростки ячменя проводили в культуре, выращенной в почве. Для этого семена, обработанные в хлорсодержащем растворе и отмытые водопроводной водой, предварительно проращивали на сетках при $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2 сут. Затем одинаковые по размеру проростки семян высаживали в сосуды, заполненные влажным грунтом «Восторг». Варианты эксперимента были следующими:

- 1) контроль – осуществляли ежедневный полив водопроводной водой объемом 25 мл;
- 2) засуха – растения не поливали с момента посадки в почву.

Длину зеленых проростков измеряли от зерновки через 7 сут после высадки в грунт. Для определения сухого веса (или массовой доли воды) навески листьев ячменя массой 1 г помещали в стеклянные бюксы. Масса бюксов была предварительно измерена. Затем бюксы с навесками листьев помещали в вакуумный сушильный шкаф VacuCell 111 Standard (MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Германия) и высушивали при температуре 100°C и давлении 0,05 атм в течение 2 ч. Через 1,0; 1,5 и 2,0 ч от начала сушки бюксы с навесками листьев взвешивали, чтобы зафиксировать сухую массу, которая в последних двух измерениях не менялась, что свидетельствовало о полной потере воды образцами. Массовую долю воды рассчитывали по разнице между начальной и конечной массой бюксов с образцами².

Состав и содержание Хл, феофитинов (Фео, международное обозначение – Pheo) и каротиноидов в листьях ячменя сорта Бровар определяли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с хроматографической колонкой Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 3 мкм, длина 15 см) фирмы Macherey-Nagel (Германия) по методике, разработанной в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно работам [10–13]. Разделение пигментов на колонке проводили с использованием раствора А (90 % ацетонитрил, 9,9 % вода, 0,1 % триэтиламин) и раствора Б (100 % этилацетат) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Пигменты регистрировали с помощью спектрофотометрического детектора с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu, Япония) в диапазоне 200–800 нм. Визуализацию профиля хроматограммы осуществляли по спектрам поглощения при 440 нм (для Хл *a* и Хл *b*, а также каротиноидов) и 410 нм (для Фео *a* и Фео *b*). Для количественного определения пигментов использовали площади пиков хроматограммы и коэффициенты, полученные для каждого пигмента с помощью стандартов. Расчет содержания пигментов производили по формуле

$$C_{\text{пигм}} = \frac{S_{440} \cdot F_{\text{пигм}} \cdot V}{V_{\text{инъекц}} \cdot m},$$

где $C_{\text{пигм}}$ – содержание пигмента, мкг/г сухой массы; S_{440} – площадь пика поглощения при 440 нм (для Фео – 410 нм); $F_{\text{пигм}}$ – фактор (коэффициент) для расчета; V – объем супернатанта, мкл; $V_{\text{инъекц}}$ – объем инъекции, мкл; m – масса навески, г.

На рис. 1 представлена типичная для исследованных препаратов хроматограмма ацетонового экстракта из листьев ячменя с ярко выраженными пиками неоксантина (пик 1, время удержания 3,88 мин), виолаксантина (пик 2, время удержания 4,44 мин), антраксантина (пик 3, время удержания 4,97 мин), лютеина (пик 4, время удержания 5,87 мин), Хл *b* (пик 5, время удержания 7,81 мин), Хл *a* (пик 6, время удержания 8,48 мин), Фео *a* (пик 7, время удержания 9,81 мин) и β -каротина (пик 8, время удержания 10,36 мин).

На рис. 2 приведены спектры выделенных пигментов, зарегистрированные спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей, нормированные на единицу.

В исследовании были использованы следующие реагенты: ацетон «х. ч.» ($\geq 99,8\%$) производства АО «Экос-1» (Россия), ацетонитрил для ВЭЖХ ($\geq 99,9\%$) и этилацетат для ВЭЖХ ($\geq 99,7\%$) компании Honeywell (Германия), триэтиламин ($\geq 99,5\%$) фирмы AppliChem (Германия), стандарты фотосинтетических пигментов компании Sigma-Aldrich (Германия). В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее значение, стандартное отклонение среднего значения, достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и соответствующего числа степеней свободы. Представлены результаты трех опытов в трехкратной биологической повторности. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Microsoft Excel 2019, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [14].

²Вязов Е. В. Механизмы адаптации фотосинтетического аппарата и защитной системы растений огурца к светодиодному излучению различного спектрального состава : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.02 / Ин-т биофизики и клеточ. инженерии НАН Беларуси. Минск, 2017.

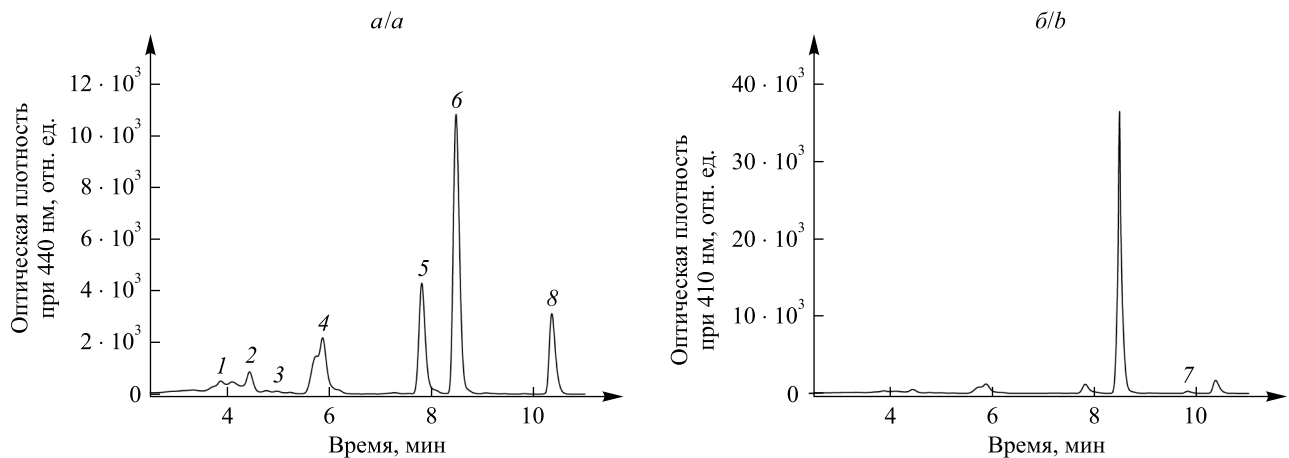


Рис. 1. Хроматограмма экстракта пигментов из листьев растений ячменя. Визуализация профиля хроматограммы осуществлена по спектрам поглощения при 440 нм (а) и 410 нм (б): 1 – неоксантин; 2 – виолаксантин; 3 – антераксантин; 4 – лютеин; 5 – Хл b; 6 – Хл a; 7 – Фео a; 8 – β -каротин

Fig. 1. Chromatogram of the extract of pigments from the leaves of barley plants. The chromatogram profile was visualized by the absorption spectra at 440 nm (a) and at 410 nm (b): 1 – neoxanthin; 2 – violaxanthin; 3 – antheraxanthin; 4 – lutein; 5 – Chl b; 6 – Chl a; 7 – Pheo a; 8 – β -carotene

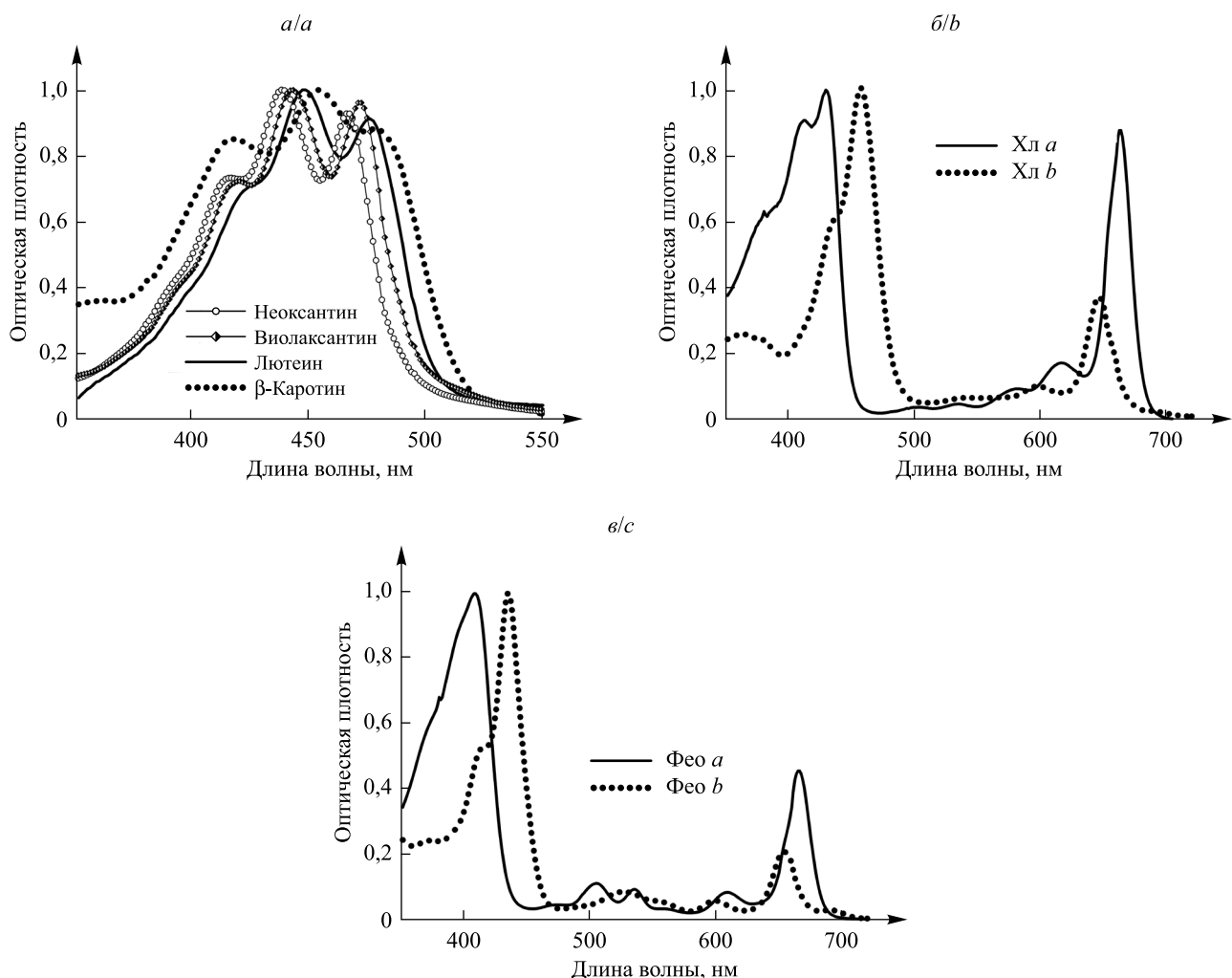


Рис. 2. Спектры поглощения пигментов, выделенных из листьев ячменя (нормированы на единицу по основному максимуму поглощения)

Fig. 2. Absorption spectra of pigments extracted from barley leaves (the spectra are normalized according to the main absorption maximum)

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования было проанализировано воздействие почвенной засухи на морфометрические параметры и содержание пигментов (Хл *a* и Хл *b*, Фео и каротиноидов) в листьях ячменя. Растения, выращенные в почве с поливом, в опытах выступали в качестве контроля.

Изучение ростовых показателей первого листа ячменя, определяемых по длине проростков от зерновки, позволило установить, что недостаток воды приводит к изменению морфометрических характеристик листьев ячменя: длина проростков снизилась на 28 % по сравнению с контрольными образцами (табл. 1). Также стоит отметить визуально наблюдаемое уменьшение ширины листовой пластинки растений ячменя, подвергшихся воздействию засухи. При этом признаков увядания растений не выявлено. Анализ массовой доли воды в проростках ячменя показал незначительное, но достоверное снижение этого параметра в условиях засухи (на 3 % по сравнению с контролем) (см. табл. 1).

Таблица 1

Изменение длины проростков ячменя и массовой доли воды в них под влиянием почвенной засухи

Table 1

Change in the length of barley seedlings and the mass fraction of water in them under the effect of soil drought

Варианты эксперимента	Длина проростков от зерновки, см	Массовая доля воды, %
Контроль	17,37 ± 0,35	92,45 ± 0,11
Засуха	12,49 ± 0,37*	89,72 ± 0,38*

*Различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

Методом ВЭЖХ был проанализирован качественный и количественный состав фотосинтетических пигментов листьев растений ячменя в условиях почвенной засухи. Изучение пигментных экстрактов позволило идентифицировать во всех исследуемых образцах кислородсодержащие ксантофиллы – неоксантин, виолаксантин, антраксантин и лютеин, бескислородный каротиноид β-каротин, а также Хл *a* и Хл *b*, Фео *a* и следовые количества Фео *b*.

В ходе работы было рассмотрено изменение содержания Хл *a* и Хл *b*, Фео *a* и каротиноидов в 7-дневных зеленых листьях ячменя в нормальных условиях (контроль) и под воздействием абиотического стресса, вызванного недостатком влаги в почве (засуха). Данные представлены в табл. 2 и на рис. 3.

Таблица 2

Содержание каротиноидов и Фео *a* в листьях ячменя под воздействием почвенной засухи, мкг/г сухой массы

Table 2

The content of carotenoids and Pheo *a* in barley leaves under the effect of soil drought, μg/g dry weight

Пигменты	Варианты эксперимента	
	Контроль	Засуха
Неоксантин	1124,25 ± 59,93	616,73 ± 40,76*
Виолаксантин	786,82 ± 25,60	418,72 ± 29,25*
Антраксантин	89,58 ± 8,66	54,65 ± 7,62*
Лютеин	1881,93 ± 43,65	1430,14 ± 38,45*
Фео <i>a</i>	120,22 ± 1,34	121,59 ± 10,31
β-Каротин	2427,06 ± 71,68	1414,24 ± 137,59*

*Различия по сравнению с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

Как видно на рис. 3, *a*, в условиях засухи достоверно уменьшается общее количество Хл *a* + Хл *b* на 13,3 % относительно контроля. Такая же тенденция наблюдается для каждой формы Хл в отдельности: анализ показал, что при дефиците воды содержание Хл *a* и Хл *b* в зеленых листьях ячменя снижается

на 15,0 и 9,0 % соответственно (см. рис. 3, б). Кроме того, следует отметить, что отношение Хл *a* : Хл *b* в контрольных образцах, выращенных в почве с поливом, превышает аналогичный показатель в растениях, культивируемых при недостатке влаги, на 6,5 % (см. рис. 3, в), что может быть результатом уменьшения размера антенны фотосистем.

Также было установлено, что образцы, выращенные в условиях почвенной засухи, отличаются от контроля пониженным содержанием каротиноидов (на 37,6 % меньше в пересчете на сухой вес) (см. рис. 3, а). При этом наблюдается значительное падение концентрации как ксантофилловых каротиноидов – неоксантина, виолаксантина, антераксантина и лютеина (на 45,1; 46,8; 39,0 и 24,0 % соответственно), так и β-каротина (на 41,7 %) (см. табл. 2). Однако обращает на себя внимание меньшее снижение количества лютеина, выполняющего преимущественно функцию нейтрализации окислителей и свободных радикалов в клетке, по сравнению с неоксантином, виолаксантином и β-каротином, которые активно участвуют в светосборе и передаче энергии на реакционные центры.

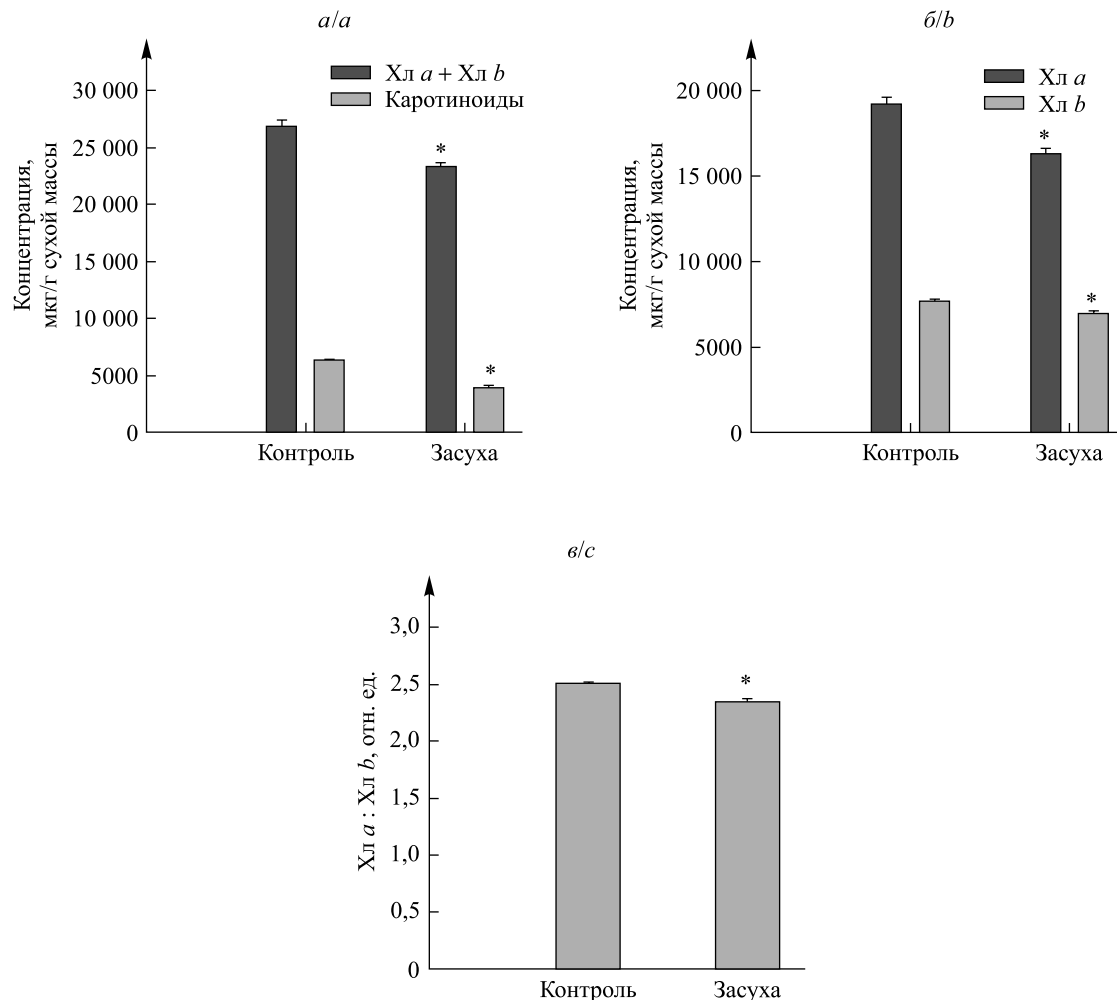


Рис. 3. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях ячменя под воздействием почвенной засухи:
a – количество Хл *a* + Хл *b* и каротиноидов; *б* – количество Хл *a* и Хл *b*;
в – отношение Хл *a* : Хл *b*; * – достоверно при $p \leq 0,05$

Fig. 3. Content of photosynthetic pigments in barley leaves under the effect of soil drought:
a – the content of Chl *a* + Chl *b* and carotenoids; *b* – the content of Chl *a* and Chl *b*;
c – the ratio of Chl *a* : Chl *b*; * – significant difference, $p \leq 0.05$

В целом приведенные выше данные свидетельствуют, что недостаток влаги в почве отрицательно влияет на накопление Хл и каротиноидов в клетках растений ячменя сорта Бровар. Однако интерес представляет неизменность содержания при этом феофитиновых пигментов (см. табл. 2). Известно, что одним из показателей развития окислительного стресса в растительной клетке служит избыточное накопление Фео, который в нормальных условиях содержится в клетке в крайне низких концентрациях и выполняет функцию первичного акцептора электронов в фотосистеме 2 [15]. Повышенное количество Фео является не просто показателем развития окислительного стресса, при котором происходит

модификация молекул Хл с образованием безметалльных порфиринов, это также потенциально опасное состояние с точки зрения усиления развития окислительного стресса, поскольку Фео – мощный фотосенсибилизатор, способный на свету генерировать синглетный молекулярный кислород [16]. Отсутствие факта накопления Фео в листьях ячменя сорта Бровар в условиях почвенной засухи может указывать на отсутствие активно идущих в клетках растений окислительных процессов. Однако прямым способом выявления окислительного стресса в клетках является регистрация изменения в них уровня активных форм кислорода. В дальнейшем планируется провести соответствующие исследования для проверки высказанного предположения.

Заключение

Таким образом, нами установлено существенное влияние почвенной засухи на морфометрические параметры листьев ячменя сорта Бровар, а также содержание в них фотосинтетических пигментов – Хл и каротиноидов. Однако значительное снижение ростовых показателей растений в условиях засухи, уменьшение количества Хл и в особенности каротиноидов происходили на фоне отсутствия изменения уровня феофитина. Мы предполагаем, что падение концентрации пигментов связано в основном не с деструкцией в результате стресса, а со снижением их синтеза, что может быть адаптационной реакцией растений, позволяющей минимизировать вероятность образования активных форм кислорода в фотосинтетических мембранах при недостатке влаги, а также оптимизировать в этих условиях использование энергии света для фотосинтетических процессов, на что указывает преимущественное снижение таких каротиноидов, как неоксантин, виолаксантин и β -каротин, активно участвующих в светосборе и передаче энергии на реакционные центры. Стоит отметить, что выбранный для исследования сорт ячменя Бровар является засухоустойчивым [17]. Обнаруженная нами тонкая подстройка компонентов фотосинтетического аппарата к действию засухи может быть одним из ключевых факторов, определяющих устойчивость этого сорта к данному виду абиотического стресса.

Библиографические ссылки

1. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
2. Tanveer M, Shahzad B, Sharma A, Khan EA. 24-Epibrassinolide application in plants: an implication for improving drought stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:295–303. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.12.013.
3. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
4. Wang X, Gao Y, Wang Q, Chen M, Ye X, Li D, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.
5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.
6. Sezgin A, Altuntaş C, Demiralay M, Cinemre S, Terzi R. Exogenous alpha lipoic acid can stimulate photosystem II activity and the gene expressions of carbon fixation and chlorophyll metabolism enzymes in maize seedlings under drought. *Journal of Plant Physiology*. 2018;232:65–73. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.11.026.
7. Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun B-G, et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019;161:120–133. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
8. Kebede A, Kang MS, Bekele E. Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley. *Advances in Agronomy*. 2019;156:265–314. DOI: 10.1016/bs.agron.2019.01.008.
9. Cominelli E, Conti L, Tonelli C, Galbiati M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*. 2013;30(4):355–361. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.001.
10. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (Technical monograph series 2).
11. Milenković SV, Zvezdanović JB, Anđelković TD, Marković DZ. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*. 2012;1(1):16–24.
12. Forni E, Ghezzi M, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*. 1988;26:120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
13. Olajire AA, Ameen AB, Abdul-Hammed M, Adekola FA. Occurrence and distribution of metals and porphyrins in Nigerian coal minerals. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*. 2007;35(6):641–647. DOI: 10.1016/S1872-5813(08)60001-8.
14. Рокицкий ПФ. *Биологическая статистика*. Минск: Вышэйшая школа; 1973. 320 с.
15. Аверина НГ, Шальго НВ, Линник НН. Изучение феофитинизации хлорофилла под действием хелаторов металлов пиридинового ряда. *Физиология растений*. 1991;38(6):1059–1065.
16. Krasnovsky AA. Singlet oxygen and primary mechanisms of photodynamic therapy and photodynamic diseases. In: Uzdensky AB, editor. *Photodynamic therapy at the cellular level*. Trivandrum: Research Signpost; 2007. p. 17–62.
17. Доманская ИН, Радюк МС, Будакова ЕА, Самович ТВ, Спивак ЕА, Шальго НВ, составители. *Технология ДНК-мутирования генов устойчивости ячменя к засухе*. Минск: Право и экономика; 2011. 31 с.

References

1. Ashraf M, Harris PJC. Photosynthesis under stressful environments: an overview. *Photosynthetica*. 2013;51(2):163–190. DOI: 10.1007/s11099-013-0021-6.
2. Tanveer M, Shahzad B, Sharma A, Khan EA. 24-Epibrassinolide application in plants: an implication for improving drought stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:295–303. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.12.013.
3. Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*. 2009;29(1):185–212. DOI: 10.1051/agro:2008021.
4. Wang X, Gao Y, Wang Q, Chen M, Ye X, Li D, et al. 24-Epibrassinolide-alleviated drought stress damage influences antioxidant enzymes and autophagy changes in peach (*Prunus persicae* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2019;135:30–40. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.026.
5. Bartels D, Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2005;24(1):23–58. DOI: 10.1080/07352680590910410.
6. Sezgin A, Altuntaş C, Demiralay M, Cinemre S, Terzi R. Exogenous alpha lipoic acid can stimulate photosystem II activity and the gene expressions of carbon fixation and chlorophyll metabolism enzymes in maize seedlings under drought. *Journal of Plant Physiology*. 2018;232:65–73. DOI: 10.1016/j.jplph.2018.11.026.
7. Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun B-G, et al. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2019;161:120–133. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2019.02.003.
8. Kebede A, Kang MS, Bekele E. Advances in mechanisms of drought tolerance in crops, with emphasis on barley. *Advances in Agronomy*. 2019;156:265–314. DOI: 10.1016/bs.agron.2019.01.008.
9. Cominelli E, Conti L, Tonelli C, Galbiati M. Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnology*. 2013;30(4):355–361. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.001.
10. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 58 p. (Technical monograph series 2).
11. Milenković SV, Zvezdanović JB, Anđelković TD, Marković DZ. The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures: HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies. *Advanced technologies*. 2012;1(1):16–24.
12. Forni E, Ghezzi M, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatography*. 1988;26:120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
13. Olajire AA, Ameen AB, Abdul-Hammed M, Adekola FA. Occurrence and distribution of metals and porphyrins in Nigerian coal minerals. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*. 2007;35(6):641–647. DOI: 10.1016/S1872-5813(08)60001-8.
14. Rokitskii PF. *Biologicheskaya statistika* [Biological statistics]. Minsk: Vyshhejschaja shkola; 1973. 320 p. Russian.
15. Averina NG, Shalygo NV, Linnik NN. [Study of chlorophyll pheophytinization under the influence of metal chelators of the pyridine series]. *Fiziologiya rastenii*. 1991;38(6):1059–1065. Russian.
16. Krasnovsky AA. Singlet oxygen and primary mechanisms of photodynamic therapy and photodynamic diseases. In: Uzdensky AB, editor. *Photodynamic therapy at the cellular level*. Trivandrum: Research Signpost; 2007. p. 17–62.
17. Domanskaya IN, Radyuk MS, Budakova EA, Samovich TV, Spivak EA, Shalygo NV, compilers. *Tekhnologiya DNK-tipirovaniya genov ustoichivosti yachmenya k zasukhe* [DNA typing technology for genes of barley resistance to drought]. Minsk: Pravo i ekonomika; 2011. 31 p. Russian.

Статья поступила в редколлегию 30.06.2020.
Received by editorial board 30.06.2020.

УДК 577.1

БЕЛОРУССКИЙ ИЗОЛЯТ *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* КК-1: ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ГЕРБИЦИДУ ГЛИФОСАТУ

Е. В. КУЛИК¹⁾, М. А. ШУКШИНА¹⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

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

Проанализированы рост мицелия, формирование склероциев, а также полигалактуроназная, α -амилазная и целлюлазная активность у белорусского изолята гриба *Sclerotinia sclerotiorum* КК-1, выделенного из инфицированной ткани корнеплода моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus*). Установлено, что продукция полигалактуроназы индуцируется пектином и подвергается катаболитной репрессии. С использованием PDA-среды, содержащей индикаторный реактив бромфеноловый синий, выявлена секреция щавелевой кислоты, которая является значимым фактором патогенности гриба. Показано, что глифосат (коммерческий аналог – «Торнадо»), добавленный в среду культивирования в минимальной из используемых доз (200 мг/л), вызывал существенное ингибирование как роста мицелия, так и формирования склероциев. Установлено, что продукция α -амилазы и целлюлазы, в отличие от синтеза полигалактуроназы, ингибируется глифосатом.

Ключевые слова: *Sclerotinia sclerotiorum*; формирование склероциев; полигалактуроназная активность; α -амилазная активность; целлюлазная активность; глифосат.

SCLEROTINIA SCLEROTIORUM KK-1 ISOLATE FROM BELARUS: PATHOGENICITY FACTORS AND GLYPHOSATE SENSITIVITY

A. V. KULIK^a, M. A. SHUKSHINA^a, A. N. EVTUSHENKOV^a

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

Corresponding author: A. V. Kulik (alena.kulik31@gmail.com)

In the presence work, mycelial growth, sclerotia formation, polygalacturonase, α -amylase and cellulase activities of a Belarusian fungal isolate *Sclerotinia sclerotiorum* KK-1 collected from infected carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) were analyzed. It was established that polygalacturonase was induced by pectin and subject to catabolite repression by

Образец цитирования:

Кулик ЕВ, Шукшина МА, Евтушенков АН. Белорусский изолят *Sclerotinia sclerotiorum* КК-1: факторы патогенности и чувствительность к гербициду глифосату. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2020; 3:54–63.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-54-63>

For citation:

Kulik AV, Shukshina MA, Evtushenkov AN. *Sclerotinia sclerotiorum* KK-1 isolate from Belarus: pathogenicity factors and glyphosate sensitivity. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:54–63. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-54-63>

Авторы:

Елена Вячеславовна Кулик – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией трансгенных растений кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Маргарита Александровна Шукшина – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Е. В. Кулик.

Анатолий Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Alena V. Kulik, PhD (biology); head of the laboratory of transgenic plants, department of molecular biology, faculty of biology.

alena.kulik31@gmail.com

Margarita A. Shukshina, student at the faculty of biology.

shukshina.margarita@yandex.by

Anatoliy N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; head of the department of molecular biology, faculty of biology.

evtushenkov@bsu.by

glucose. The ability of the isolate to produce oxalic acid, an important factor of pathogenesis, was observed throughout fungus incubation on PDA medium amended with bromophenol blue. Glyphosate (commercial counterpart «Tornado») starting from its level in the medium of 200 mg/L caused a significant inhibition of mycelial growth and sclerotia formation. It was observed that α -amylase and cellulase activities were inhibited by glyphosate unlike polygalacturonase activity.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; sclerotia formation; polygalacturonase activity; α -amylase activity; cellulase activity; glyphosate.

Введение

Sclerotinia sclerotiorum – широко распространенный фитопатогенный гриб, который поражает более 400 видов растений и вызывает заболевание под названием «склеротиниоз», или «белая гниль» [1]. Большинство растений, подверженных заражению, относятся к двудольным, хотя выявлено значительное количество сельскохозяйственных видов однодольных растений, поражаемых *S. sclerotiorum*. Особенно сильную угрозу склеротиниоз представляет для соевых бобов, фасоли, подсолнечника, рапса, арахиса. Как в процессе культивирования растений на полях, так и при размещении их в хранилищах гриб может заражать молодые саженцы, взрослые растения, плоды, корнеплоды. Благодаря способности *S. sclerotiorum* выживать на инфицированных тканях, в почве, на живых растениях заболевание может быстро распространяться от растения к растению.

Данные, накопленные в течение последних лет, указывают на тонкое взаимодействие этого агрессивного некротрофного патогена с его многочисленными хозяевами. У склеротинии были идентифицированы небольшие секреторные белки, функция которых заключается не только в подавлении защитных механизмов хозяина, но и в индукции гибели его клеток [2; 3]. Кроме того, характеристика генов, участвующих в биосинтезе и деградации щавелевой кислоты, показала, что высокий уровень вирулентности поддерживается благодаря динамическому контролю накопления щавелевой кислоты, осуществляемому посредством разнообразных механизмов. Результаты экспериментов с мутантами фитопатогена, у которых отсутствовала щавелевая кислота, указывали на возможную ее роль как фактора колонизации [4].

Фитопатогенный гриб *S. sclerotiorum* – один из наиболее неспецифичных растительных патогенов. На начальных этапах инфекционного процесса он секретирует большое количество гидролитических ферментов, участвующих в деградации клеточной стенки растений, – полигалактуроназы [5; 6], целлюлазы [7], глюканазы, ксиланазы [8–10], амилазы [11; 12].

Среди различных гидролаз полигалактуроназа является значимым ферментом пектолитического комплекса склеротинии и считается одним из основных факторов патогенности, который необходим для внедрения гриба в клетки хозяина. Результаты молекулярно-генетических исследований показали, что образование у *S. sclerotiorum* множественных форм эндополигалактуроназ объясняется посттрансляционной (гликолизирование) или постсекреционной (протеолиз) модификацией фермента. Альтернативной причиной такого разнообразия эндополигалактуроназ может быть принадлежность кодирующих их генов к мультигенному семейству [5; 6]. Весьма вероятно, что наличие множественности пектиназных генов у гриба обеспечивает гибкость и адаптацию патогена к широкому спектру поражаемых растений.

Физиологические исследования патогенеза, вызванного *S. sclerotiorum*, выявили тесную связь с целлюлолитическими ферментами [7]. Наблюдаемая последовательная деградация как нативной, так и растворимой целлюлозы указывает на то, что этот гриб обладает полной целлюлолитической системой. Установлено, что целлюлаза *S. sclerotiorum* представлена комплексом из трех ферментов: фактора набухания, инициирующего подготовку к дальнейшему расщеплению целлюлозы, термостабильной «вискозиметрической» целлюлазы и термолабильной β -глюкозидазы.

Амилаза – конститутивный фермент, встречающийся у представителей различных таксономических групп. Она есть не один фермент, а комплекс энзимов, гидролизующих крахмал, – α -амилазы, декстриназы и глюкоамилазы. В культуральной жидкости коллекционного штамма *S. sclerotiorum* (Тунис), выращенного на овсяной муке, были обнаружены две формы α -амилазы (1,4- α -D-глюканглюканогидролазы) с молекулярной массой 43 и 54 кДа [11; 12]. Выявленная у α -амилазы меньшей молекулярной массы способность образовывать мальтотриозу в качестве основного конечного продукта открывает перспективы ее использования в различных биотехнологических процессах.

На сегодняшний день главным способом защиты сельскохозяйственных растений от склеротиниоза остается применение фунгицидов. В ряде научно-исследовательских работ было показано, что уникальный гербицид глифосат, мишенью действия которого является фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтаза шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот у растений, обладает антифунгальной активностью *in vivo* и *in vitro* в отношении большого спектра фитопатогенных грибов:

Phytophthora cinnamomi (возбудитель корневой гнили сосны лучистой), *Septoria nodorum* (возбудитель септориоза колоса), *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (возбудитель желтой ржавчины пшеницы), *P. triticina* (возбудитель листовой ржавчины пшеницы), *Phakopsora pachyrhizi* (возбудитель азиатской ржавчины сои) [13–17].

Цель данной работы состояла в выявлении у белорусского изолята *S. sclerotiorum* КК-1 полигалактуроназной, α -амилазной, а также целлюлазной активности как основных факторов патогенности и оценке его чувствительности к гербициду глифосату.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлся белорусский изолят фитопатогенного гриба *S. sclerotiorum* КК-1, выделенный из пораженной ткани корнеплода моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus*).

Оценка чувствительности изолята к действующему веществу гербицида «Торнадо» (глифосат – изо-пропиламинная соль N-фосфонометилглицина) проводилась в чашках Петри на картофельно-глюкозной агаризованной среде PDA (*Fluka Biochemika*, Швейцария) без гербицида (контроль) и с его добавлением в диапазоне концентраций 200–1000 мг/л. На среду выкладывались агаризованные диски диаметром 5 мм с активно растущими колониями гриба. После инкубации в условиях темноты при температуре 20–22 °C на 5-й день осуществлялся учет результатов: измерение диаметра зоны покрытия мицелием среды и подсчет количества склероциев. Процент ингибирования (*I*) рассчитывался по формуле [18]

$$I = \frac{C - F}{C} \cdot 100,$$

где *C* – диаметр (в сантиметрах) зоны покрытия мицелием среды (или количество склероциев) на контрольной чашке без добавления гербицида; *F* – аналогичные параметры, анализируемые на чашке с гербицидом. Эксперимент проводился в трехкратной повторности.

Для получения препарата полигалактуроназы осуществлялось культивирование гриба в жидкой минимальной солевой среде, состав которой представлен в работе [9], с добавлением 1 % цитрусового пектина или 2 % глюкозы при 28 °C и непрерывном перемешивании со скоростью 150 об/мин. После инкубации в течение времени, определяемого экспериментом, выполняли центрифугирование (6000 об/мин, 20 мин) и отбор супернатанта, к которому добавляли 2 объема ацетона для осаждения белков. После инкубации при –20 °C в течение 18 ч белки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 20 мин), ацетон выпаривали, белковый препарат растворяли в ацетатном буфере (0,1 моль/л, pH 5,0).

Полигалактуроназную активность определяли методом, основанным на использовании 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНС) [19]. Предварительно нагретая на водяной бане до 50 °C реакционная смесь (400 мкл) содержала 1,1 % полигалактуронозой кислоты в ацетатном буфере (0,1 моль/л, pH 5,0). После введения 100 мкл ферментного препарата и инкубирования при 50 °C в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 1,5 мл реактива с ДНС и последующим немедленным помещением пробирок на кипящую водяную баню на 10 мин. Контрольные пробирки содержали те же компоненты, что и опытные образцы, но в них не прошла реакция гидролиза полигалактуронозой кислоты. Светопоглощение в охлажденных пробирках измеряли при длине волны 520 нм. За ноль принималась оптическая плотность смеси субстрата и натрий-ацетатного буфера после реакции с ДНС, за единицу активности полигалактуроназы – количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль/л моногалактуронозой кислоты за 1 мин реакции при 50 °C в пересчете на 1 мл культуральной жидкости или 1 мг белка. Для расчета значений активности пользовались калибровочным графиком зависимости интенсивности поглощения от концентрации моногалактуронозой кислоты.

Для получения препарата α -амилазы гриб культивировали в жидкой минимальной солевой среде, состав которой представлен в статье [11], с добавлением 1 % растворимого крахмала при 28 °C и непрерывном перемешивании со скоростью 150 об/мин. Спустя 7 дней инкубирования проводили центрифугирование (6000 об/мин, 20 мин) для отделения мицелия от супернатанта, к которому добавляли 2 объема ацетона для осаждения белков. После инкубации при –20 °C в течение 18 ч белки осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 20 мин), ацетон выпаривали, белковый препарат растворяли в ацетатном буфере (0,02 моль/л, pH 4,7).

Определение α -амилазной активности также проводили методом, основанным на использовании ДНС [19]. Предварительно нагретая на водяной бане до 50 °C реакционная смесь (400 мкл) содержала 1,1 % растворимого крахмала в ацетатном буфере (0,02 моль/л, pH 4,7). Реакцию начинали добавлением 100 мкл ферментного препарата. После инкубирования при 50 °C в течение 30 мин реакцию останавливали добавлением 1,5 мл реактива с ДНС и последующим немедленным помещением пробирок на кипящую водяную баню на 10 мин. Контрольные пробирки содержали те же компоненты, что и опытные

образцы, но в них не прошла реакция гидролиза крахмала. Светопоглощение в охлажденных пробирках измеряли при длине волны 540 нм. За ноль принималась оптическая плотность смеси субстрата и натрий-ацетатного буфера после реакции с ДНС, за единицу активности α -амилазы – количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль/л глюкозы за 1 мин реакции при 50 °С в пересчете на 1 мг белка. Для расчета значений активности пользовались калибровочным графиком зависимости интенсивности поглощения от концентрации глюкозы.

Количественное содержание белка в образцах определяли методом Бредфорда [20].

Качественное определение щавелевой кислоты проводили с использованием красителя бромфенолового синего в концентрации 50 мг/л, который вводили в среду культивирования PDA. Исходное значение pH среды доводили до 7,0, добавляя 0,1 моль/л NaOH. Изменение окраски среды с синей на желтую свидетельствовало о секреции щавелевой кислоты [21].

Для выявления влияния глифосата на целлюлолитическую активность *S. sclerotiorum* КК-1 гриб культивировали на минимальной агаризованной среде Чапека с 0,1 % карбоксиметилцеллюлозой (КМЦ) в присутствии коммерческого гербицидного препарата «Торнадо» в диапазоне концентраций действующего вещества 20–1800 мг/л. После 5-дневной инкубации при 22 °С на поверхность среды наслаивали 0,1 % водный раствор конго красного. Результат взаимодействия реактива с целлюлозой оценивали после 15 мин инкубации при комнатной температуре. Визуализацию зон гидролиза КМЦ осуществляли после отмывания среды 10 % NaCl. Эксперимент проводили в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение

Современные подходы к созданию агрокультуры, устойчивой к заболеваниям, включают как классические методы селекции, направленные на получение резистентных сортов, так и конструирование генно-модифицированных сельскохозяйственных растений, обладающих определенными свойствами. Одним из направлений в области трансгенных растений является придание им свойства устойчивости к гербицидам. В ряде стран в хозяйственной деятельности широко используются трансгенные сорта таких сельскохозяйственных растений, как рапс, хлопчатник, кукуруза, соя, сахарная свекла, которые обладают резистентностью к гербициду глифосату¹. В Республике Беларусь также созданы и зарегистрированы в международной базе BCH (*Biosafety Clearing-House*) трансгенные линии рапса (*Brassica napus* subsp. *oleifera* (Moench) DC.) и картофеля (*Solanum tuberosum* L.), имеющие вышеуказанную устойчивость. Культивирование таких растений позволяет в течение вегетации использовать гербицид, селективно уничтожающий всю сорную растительность без повреждения агрокультуры. Гербицидное свойство глифосата обусловлено мишенью его действия – ферментом 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазой шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот у растений. Кроме воздействия глифосата на растения, в ряде исследований было установлено, что он оказывает угнетающее действие на фитопатогенные грибы на уровне роста мицелия, образования и прорастания спор, синтеза аминокислот, вирулентности [13–17].

В данной работе проводилась *in vitro* оценка чувствительности белорусского изолята *S. sclerotiorum* КК-1 к действующему веществу гербицида «Торнадо» – глифосату (изопропиламинная соль N-фосфонометилглицина). На 5-й день инкубации гриба в контрольной чашке при поверхностном культивировании без добавления гербицида был зарегистрирован максимальный рост мицелия по всей площади среды. Добавление глифосата в минимальной из используемых концентраций (200 мг/л) приводило к ингибированию как роста мицелия, так и формирования покоящихся образований – склероциев, что составило ($66,3 \pm 1,7$) и ($79,4 \pm 7,1$) % соответственно. По мере увеличения дозы гербицида в среде до 1000 мг/л процент ингибирования сохранялся на высоком уровне (табл. 1).

Выявленный фунгицидный эффект глифосата, выражающийся в подавлении образования склероциев, может учитываться при проведении защитных мероприятий от склеротиниоза, поскольку эти пигментированные структуры играют важную роль в циклах заражения и позволяют грибу оставаться жизнеспособным в течение длительного времени при неблагоприятных для роста условиях. В результате впитывания воды из почвы происходит прорастание склероциев с образованием апотециев, в которых формируются аскоспоры, являющиеся источником инфекции.

Основным барьером для распространения инфекции, вызванной *S. sclerotiorum*, служит растительная клеточная стенка, которая на 30 % состоит из пектина. Для преодоления этого барьера склеротиния синтезирует различные типы пектинолитических ферментов, такие как эндо- и экзополигалактуроназы, пектинметилэстераза, пектинлиазы, которые вызывают мацерацию растительных тканей и некроз. Показано, что именно начальное действие пектинолитических ферментов на клеточную стенку инфицированной растительной клетки определяет доступность ее составных компонентов для остальных энзимов [22].

¹Biosafety Clearing-House [Electronic resource]. URL: <http://bch.cbd.int/> (date of access: 21.03.2020) ; ISAAA [Electronic resource]. URL: <http://www.isaaa.org/> (date of access: 21.03.2020).

Таблица 1

Влияние гербицида глифосата («Торнадо») на рост мицелия
и образование склероциев у *S. sclerotiorum* КК-1

Table 1

Effect of glyphosate («Tornado») on mycelial growth
and sclerotial production of *S. sclerotiorum* КК-1

Концентрация глифосата, мг/л	Ингибирование, %	
	Рост мицелия	Образование склероциев
200	66,3 ± 1,7*	79,4 ± 7,1*
400	77,8 ± 4,7*	84,1 ± 3,1*
500	76,3 ± 3,6*	88,6 ± 3,0*
700	76,7 ± 3,8*	83,2 ± 2,8*
900	79,3 ± 1,3*	89,6 ± 4,3*
1000	80,7 ± 3,4*	97,9 ± 3,6*

* $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с контролем.

В результате исследований, направленных на выявление роли полигалактуроназ в инфекционном процессе, было установлено, что продукция полигалактуроназы индуцируется пектином или пектиновыми мономерами, в частности галактуроновой кислотой, и подвергается катаболитной репрессии в присутствии глюкозы [23]. Однако согласно другим работам отдельные пектинолитические ферменты *S. sclerotiorum* не синтезируются синхронно, что определяется конститутивной и индуцибельной экспрессией генов, детерминирующих эти ферменты. Например, у штаммов склеротинии были выявлены экзополигалактуроназа и экзометилполигалактуроназа, синтез которых не регулируется глюкозой или соответствующими субстратами [24].

В целях установления способа регуляции синтеза полигалактуроназы у белорусского изолята *S. sclerotiorum* КК-1 проводилось его культивирование в минимальной солевой среде с добавлением 1 % пектина или 2 % глюкозы. В течение 12-дневного периода инкубации начиная с 3-го дня через определенные промежутки времени выполнялся отбор проб культуральной жидкости, в которой измерялась ферментативная активность. В результате проведенной работы, как показано на рис. 1, полигалактуроназная активность гриба в среде с добавлением пектина достигла максимума на 5-й день культивирования и составила (6,7 ± 1,3) ед./мл. В среде, содержащей в качестве источника углерода только глюкозу, ферментативная активность оставалась практически на одном уровне на протяжении всего периода инкубации и равнялась (1,40 ± 0,26) ед./мл, что указывает на явление катаболитной репрессии.

В развитии инфекционного процесса, вызываемого склеротинией, кроме гидролаз, важное значение имеет секретируемая щавелевая кислота. Несмотря на простую химическую структуру и ограниченное химическое взаимодействие, она, как фактор патогенности, является значимым компонентом молекулярного механизма, участвующим в процессе заражения растений. Корреляция между патогенностью и синтезом оксалата была подтверждена в опытах, где мутанты *S. sclerotiorum*, дефектные по способности его синтезировать, не вызывали заболевания, в то время как ревертанты снова становились вирулентными [4]. Предположительно, существуют три механизма усиления вирулентности с помощью оксалата. Первый механизм основан на том, что некоторые ферменты грибного патогена, выделяемые во время вторжения в ткани растений (например, полигалактуроназа), имеют максимальную активность при низких значениях pH. Второй механизм обусловлен токсичностью оксалата для клеток растений-хозяев, по-видимому, из-за его кислотности, что приводит к ослаблению растения, тем самым способствуя вторжению патогена. Согласно третьему механизму оксалат-анионы хелатируют ионы кальция, которые находятся в клеточной стенке растений. Хотя каждая из перечисленных гипотез имеет свою логику и привлекательность, подтверждающие их данные являются неполными.

Несмотря на то что щавелевая кислота – фактор патогенности склеротинии, было установлено, что штаммы гриба различаются по ее количественному накоплению в условиях *in vivo* и *in vitro* [22]. В целях выявления у изучаемого белорусского изолята способности к образованию и секреции щавелевой кислоты в данной работе проводился качественный анализ изменения pH агаризованной среды культивирования гриба с использованием индикаторного реактива бромфенолового синего, который изменяет окраску с синей на желтую при значениях pH 3,0–4,6. Как показано на рис. 2, на 7-й день культивирования *S. sclerotiorum* КК-1 четко визуализировалось окрашивание среды в желтый цвет, что свидетельствует о секреции щавелевой кислоты.

Исследование динамики секреции щавелевой кислоты, проводимое путем измерения pH-профиля жидкой минимальной солевой среды с добавлением 1 % цитрусового пектина в процессе 12-дневной инкубации гриба, показало, что к 5-му дню культивирования значение pH среды снизилось с 6,0 до 4,0 и достигло 3,5 на 12-й день (рис. 3).

Таким образом, полученные данные указывают на то, что белорусский изолят склеротинии обладает способностью секретировать щавелевую кислоту, которая, снижая pH, содействует высокой мацерирующей активности, обеспечивающей эффективное разрушение клеточной стенки растений.

При изучении антифунгального потенциала гербицида глифосата в отношении изолята склеротинии нами было установлено, что его действие приводит к подавлению роста мицелия и образования склероциев. В целях выявления реакции *S. sclerotiorum* КК-1 на воздействие гербицида на уровне активности секретирующихся гидролитических ферментов, участвующих в патогенезе, оценивалась полигалактуроназная, α -амилазная и целлюлолитическая активность.

Для оценки α -амилазной и полигалактуроназной активности гриб культивировали в жидкой минимальной солевой среде в присутствии гербицида в диапазоне концентраций действующего вещества 20–1800 мг/л с добавлением цитрусового пектина в качестве индуктора синтеза полигалактуроназы или крахмала, являющегося субстратом для α -амилазы.

Как следует из результатов эксперимента, представленных на рис. 4, отмечается статистически значимое ($p < 0,01$) по сравнению с контрольным вариантом (культивирование гриба в среде без добавления гербицида) снижение α -амилазной активности в отличие от полигалактуроназной активности ($p > 0,05$).

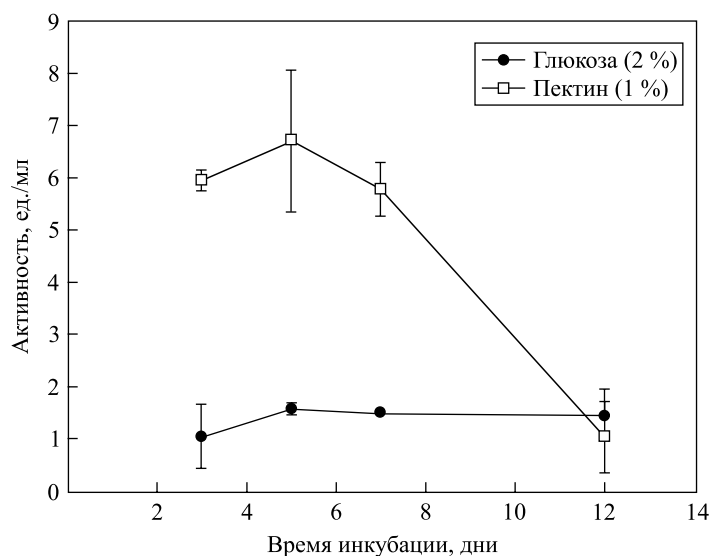


Рис. 1. Продукция полигалактуроназы *S. sclerotiorum* КК-1 при культивировании в минимальной солевой среде с добавлением 1 % цитрусового пектина или 2 % глюкозы

Fig. 1. Expression of polygalacturonase activity by *S. sclerotiorum* КК-1 in minimal salts medium containing 1 % citrus pectin or 2 % glucose

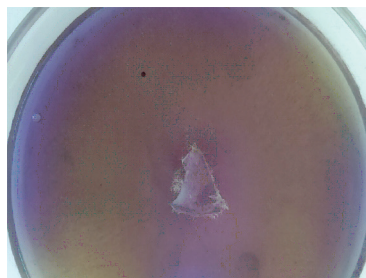


Рис. 2. Секреция щавелевой кислоты изолятом *S. sclerotiorum* КК-1, культивируемым на среде PDA с бромфеноловым синим

Fig. 2. Oxalic acid production of the *S. sclerotiorum* КК-1 isolate on PDA medium amended with bromophenol blue

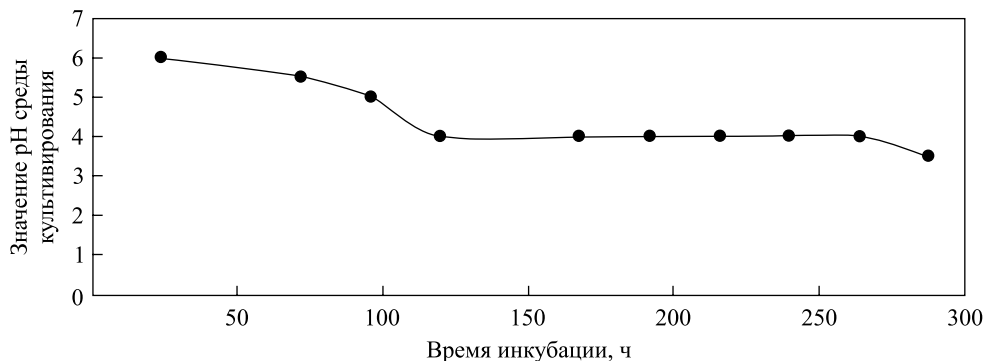


Рис. 3. pH-Профиль минимальной солевой среды культивирования *S. sclerotiorum* KK-1 с добавлением 1 % цитрусового пектина

Fig. 3. The pH of the minimal salts medium containing 1 % citrus pectin after incubation *S. sclerotiorum* KK-1

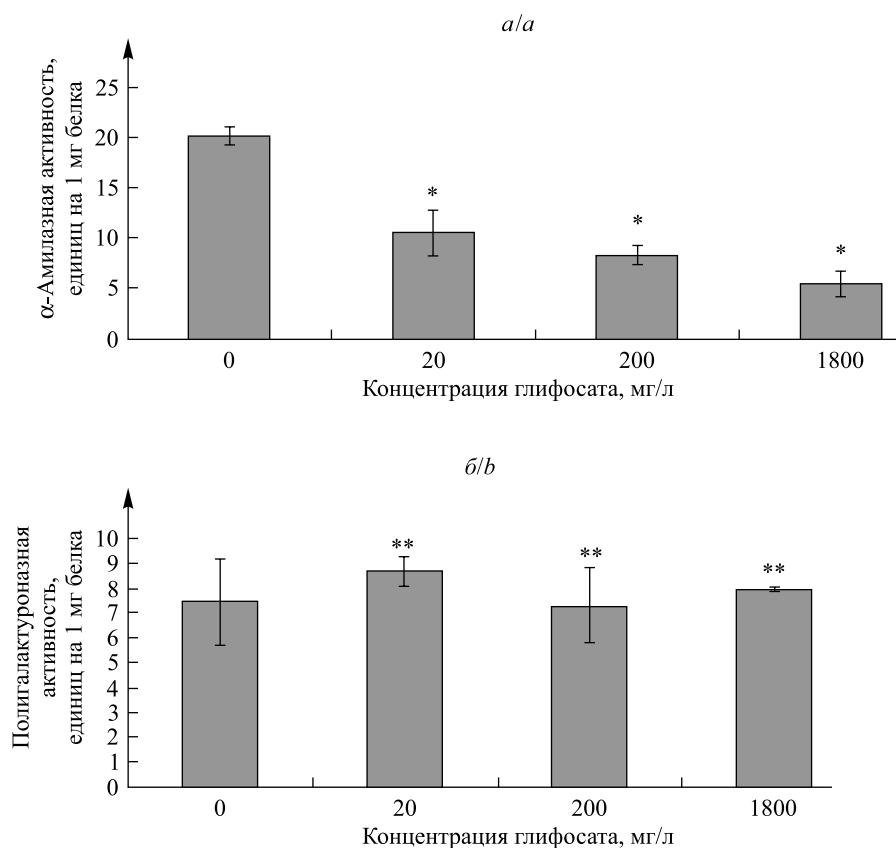


Рис. 4. α-Амилазная (а) и полигалактуроназная (б) активность изолята *S. sclerotiorum* KK-1, культивируемого в минимальной солевой среде с добавлением 2 % крахмала или 1 % цитрусового пектина соответственно в присутствии гербицида «Торнадо» (глифосат 20–1800 мг/л): 0 – контрольный образец. Достоверность различий рассчитывалась по отношению к контролю: * – $p < 0,01$; ** – $p > 0,05$

Fig. 4. α-Amylase (a) and polygalacturonase (b) activity of *S. sclerotiorum* KK-1 isolate in minimal salts media with 2 % starch or 1 % citrus pectin and containing herbicide «Tornado» (glyphosate 20–1800 mg/L): 0 – control. The significance of differences was calculated to the control: * – $p < 0.01$; ** – $p > 0.05$

Для выявления влияния глифосата на целлюлолитическую активность исследуемого изолята использовался чашечный метод, который заключался в инкубации гриба на поверхности минимальной агаризованной среды Чапека с добавлением 0,1 % КМЦ в присутствии коммерческого гербицидного препарата «Торнадо» в диапазоне концентраций действующего вещества 20–1800 мг/л. После 5-дневной инкубации при 22 °С для визуализации зон гидролиза КМЦ на поверхность среды наслаивался 0,1 % водный раствор конго красного.

В результате проведенного анализа установлено, что при добавлении в среду культивирования глифосата в дозе до 200 мг/л включительно продукция целлюлазы не ингибировалась, в то время как концентрация гербицида 800 мг/л и выше способствовала полному подавлению синтеза фермента (табл. 2).

Таблица 2

Продукция целлюлазы *S. sclerotiorum* КК-1
в присутствии гербицида глифосата («Торнадо»)

Table 2

Production of *S. sclerotiorum* КК-1 cellulases
in the presence of glyphosate («Tornado»)

Концентрация глифосата, мг/л	Диаметр зоны гидролиза КМЦ, см
0	2,63 ± 0,29
20	2,56 ± 0,29
100	2,30 ± 0,18
200	2,45 ± 0,28
800	0
1800	0

Заключение

Принимая во внимание полученные данные, можно заключить, что белорусский изолят *S. sclerotiorum* КК-1 проявляет чувствительность к действию гербицида глифосата, которая выражается в подавлении как роста мицелия, так и образования покоящихся структур – склероциев, а также в снижении α -амилазной и целлюлазной активности. Выявленный антифунгальный потенциал гербицида, по всей вероятности, обусловлен его взаимодействием с ключевым ферментом шикиматного пути синтеза ароматических аминокислот 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазой, что не только приводит к масштабному нарушению формирования морфологических структур гриба, но и подавляет активность его ферментных систем, необходимых для реализации патогенности.

Библиографические ссылки

1. Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1994;16(2):93–108. DOI: 10.1080/07060669409500766.
2. Bell JN, Ryder TB, Wingate VP, Bailey JA, Lamb CJ. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a comparable and an incomparable plant-pathogen interaction. *Molecular and Cellular Biology*. 1986;6(5):1615–1623. DOI: 10.1128/mcb.6.5.1615.
3. Liang Y, Strelkov SE, Kav NNV. The proteome of liquid sclerotial exudates from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(6):3290–3298. DOI: 10.1021/pr900942w.
4. Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1990;37(3):179–191. DOI: 10.1016/0885-5765(90)90010-U.
5. Li R, Rimmer R, Buchwaldt L, Sharpe AG, Seguin-Swartz G, Hegedus DD. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genetics and Biology*. 2004;41(8):754–765. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.03.002.
6. Bashi ZD, Rimmer SR, Khachatourians GG, Hegedus DD. *Brassica napus* polygalacturonase inhibitor proteins inhibit *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase enzymatic and necrotizing activities and delay symptoms in transgenic plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 2013;59(2):79–86. DOI: 10.1139/cjm-2012-0352.
7. Asoufi H, Hameed KM, Mahasneh A. The cellulase and pectinase activities associated with the virulence of indigenous *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in Jordan Valley. *The Plant Pathology Journal*. 2007;23(4):233–238. DOI: 10.5423/PPJ.2007.23.4.233.
8. Yajima W, Kav NN. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics*. 2006;6(22):5995–6007. DOI: 10.1002/pmic.200600424.

9. Oliveira MB, Barbosa SC, Petrofeza S. Comparative *in vitro* and *in planta* analyses of extracellular enzymes secreted by the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(2):1796–1807. DOI: 10.4238/2013.June.6.3.
10. Ellouze O, Mejri M, Smaali I, Limam F, Marzouki MN. Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus. *Journal of Food Biochemistry*. 2007;31(1):96–107. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00101.x.
11. Abdelmalek IB, Urdaci MC, Ali MB, Denayrolles M, Chaignepain S, Limam F, et al. Structural investigation and homology modeling studies of native and truncated forms of alpha-amylases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;19(11):1306–1318. DOI: 10.4014/jmb.0903.3013.
12. Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch CJr, Rigden DJ, et al. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from *Secale cereal* (rye). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2000;32(11–12):1195–1204. DOI: 10.1016/s1357-2725(00)00053-4.
13. Kassaby FY, Hepworth G. Phytophthora cinnamomi: effects of herbicide on radial growth, sporangial production, inoculum potential and root disease in *Pinus radiata*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1987;19(4):437–441. DOI: 10.1016/0038-0717(87)90035-6.
14. Harris D, Grossbard E. Effects of the herbicides gramoxone W and roundup on *Septorionodorum*. *Transactions of the British Mycological Society*. 1979;73(1):27–33. DOI: 10.1016/S0007-1536(79)80068-6.
15. Anderson JA, Kolmer JA. Rust control in glyphosate tolerant wheat following the application of the herbicide glyphosate. *Plant Disease*. 2005;89(11):1136–1142. DOI: 10.1094/PD-89-1136.
16. Feng PCC, Baley J, Clinton WP, Bunkers GJ, Alibhai MF, Paulitz TC, et al. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(48):17290–17295. DOI: 10.1073/pnas.0508873102.
17. Westerhuis D, Vawdrey LL, Piper R. An *in vitro* study into the effect of glyphosate on *Sclerotium rolfsii*. *Australasian Plant Disease Notes*. 2007;2(1):23–24. DOI: 10.1071/DN07010.
18. Attanayake RN, Carter PA, Jiang D, Del Rio-Mendoza L, Chen W. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology*. 2013;103(7):750–761. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0159-R.
19. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
20. Досон Р, Эллиот Д, Эллиот У, Джонс М. *Справочник биохимика*. Друза ВЛ, Королева ВН, переводчики. Москва: Мир; 1991. 544 с.
21. Naher N, Shamsi S, Rawshan Ali MD, Nahar MS, Bashar MA. Interrelation of oxalic acid formation with pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing white mold disease of mustard. *Bangladesh Journal of Botany*. 2017;46(3):963–970.
22. Favaron F, Sella L, D'Ovidio R. Relationships among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004;17(12):1402–1409. DOI: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1402.
23. Fraissinet-Tachet L, Fevre M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology*. 1996;33(1):49–53. DOI: 10.1007/s002849900073.
24. Riou C, Fraissinet-Tachet L, Freyssinet G, Fevre M. Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992;91(3):231–237. DOI: 10.1111/J.1574-6968.1992.TB05214.X.

References

1. Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1994;16(2):93–108. DOI: 10.1080/07060669409500766.
2. Bell JN, Ryder TB, Wingate VP, Bailey JA, Lamb CJ. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a comparable and an incomparable plant-pathogen interaction. *Molecular and Cellular Biology*. 1986;6(5):1615–1623. DOI: 10.1128/mcb.6.5.1615.
3. Liang Y, Strelkov SE, Kav NNV. The proteome of liquid sclerotial exudates from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Proteome Research*. 2010;9(6):3290–3298. DOI: 10.1021/pr900942w.
4. Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1990;37(3):179–191. DOI: 10.1016/0885-5765(90)90010-U.
5. Li R, Rimmer R, Buchwaldt L, Sharpe AG, Seguin-Swartz G, Hegedus DD. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genetics and Biology*. 2004;41(8):754–765. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.03.002.
6. Bashi ZD, Rimmer SR, Khachatourians GG, Hegedus DD. *Brassica napus* polygalacturonase inhibitor proteins inhibit *Sclerotinia sclerotiorum* polygalacturonase enzymatic and necrotizing activities and delay symptoms in transgenic plants. *Canadian Journal of Microbiology*. 2013;59(2):79–86. DOI: 10.1139/cjm-2012-0352.
7. Asoufi H, Hameed KM, Mahasneh A. The cellulase and pectinase activities associated with the virulence of indigenous *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in Jordan Valley. *The Plant Pathology Journal*. 2007;23(4):233–238. DOI: 10.5423/PPJ.2007.23.4.233.
8. Yajima W, Kav NN. The proteome of the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Proteomics*. 2006;6(22):5995–6007. DOI: 10.1002/pmic.200600424.
9. Oliveira MB, Barbosa SC, Petrofeza S. Comparative *in vitro* and *in planta* analyses of extracellular enzymes secreted by the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Genetics and Molecular Research*. 2013;12(2):1796–1807. DOI: 10.4238/2013.June.6.3.
10. Ellouze O, Mejri M, Smaali I, Limam F, Marzouki MN. Induction, properties and application of xylanase activity from *Sclerotinia sclerotiorum* S2 fungus. *Journal of Food Biochemistry*. 2007;31(1):96–107. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2007.00101.x.
11. Abdelmalek IB, Urdaci MC, Ali MB, Denayrolles M, Chaignepain S, Limam F, et al. Structural investigation and homology modeling studies of native and truncated forms of alpha-amylases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009;19(11):1306–1318. DOI: 10.4014/jmb.0903.3013.
12. Iulek J, Franco OL, Silva M, Slivinski CT, Bloch CJr, Rigden DJ, et al. Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from *Secale cereal* (rye). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2000;32(11–12):1195–1204. DOI: 10.1016/s1357-2725(00)00053-4.

13. Kassaby FY, Hepworth G. Phytophthora cinnamomi: effects of herbicide on radial growth, sporangial production, inoculum potential and root disease in *Pinus radiata*. *Soil Biology and Biochemistry*. 1987;19(4):437–441. DOI: 10.1016/0038-0717(87)90035-6.
14. Harris D, Grossbard E. Effects of the herbicides gramoxone *W* and roundup on *Septorianodorum*. *Transactions of the British Mycological Society*. 1979;73(1):27–33. DOI: 10.1016/S0007-1536(79)80068-6.
15. Anderson JA, Kolmer JA. Rust control in glyphosate tolerant wheat following the application of the herbicide glyphosate. *Plant Disease*. 2005;89(11):1136–1142. DOI: 10.1094/PD-89-1136.
16. Feng PCC, Baley J, Clinton WP, Bunkers GJ, Alibhai MF, Paulitz TC, et al. Glyphosate inhibits rust diseases in glyphosate-resistant wheat and soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(48):17290–17295. DOI: 10.1073/pnas.0508873102.
17. Westerhuis D, Vawdrey LL, Piper R. An *in vitro* study into the effect of glyphosate on *Sclerotium rolfsii*. *Australasian Plant Disease Notes*. 2007;2(1):23–24. DOI: 10.1071/DN07010.
18. Attanayake RN, Carter PA, Jiang D, Del Río-Mendoza L, Chen W. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology*. 2013;103(7):750–761. DOI: 10.1094/PHYTO-07-12-0159-R.
19. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959;31(3):426–428. DOI: 10.1021/ac60147a030.
20. Dawson R, Elliot D, Elliot U, Dzhons M. *Spravochnik biokhimika* [Biochemist's handbook]. Drutsa VL, Koroleva VN, translators. Moscow: Mir; 1991. 544 p. Russian.
21. Naher N, Shamsi S, Rawshan Ali MD, Nahar MS, Bashar MA. Interrelation of oxalic acid formation with pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing white mold disease of mustard. *Bangladesh Journal of Botany*. 2017;46(3):963–970.
22. Favaron F, Sella L, D'Ovidio R. Relationships among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2004;17(12):1402–1409. DOI: 10.1094/mpmi.2004.17.12.1402.
23. Fraissinet-Tachet L, Fevre M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Microbiology*. 1996;33(1):49–53. DOI: 10.1007/s002849900073.
24. Riou C, Fraissinet-Tachet L, Freyssinet G, Fevre M. Secretion of pectic isoenzymes by *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992;91(3):231–237. DOI: 10.1111/J.1574-6968.1992.TB05214.X.

Статья поступила в редколлегию 05.06.2020.
Received by editorial board 05.06.2020.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.6:53.047

АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА И МЕМБРАНОТРОПНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ¹

Л. С. ГАБРИЕЛЯН^{1), 2)}, А. А. ТРЧУНЯН^{1), 2)}

¹⁾Ереванский государственный университет, ул. Алека Манукяна, 1, 0025, г. Ереван, Армения

²⁾Российско-Армянский университет, ул. Овсена Эмина, 123, 0051, г. Ереван, Армения

В настоящее время наночастицы (НЧ) металлов могут рассматриваться в качестве альтернативных агентов для преодоления антибиотикоустойчивости. Исследовано влияние НЧ серебра на грамположительные (*Enterococcus hirae* ATCC9790, *Staphylococcus aureus* MDC5233) и грамотрицательные (*Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium*

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Габриелян ЛС, Трчунян АА. Антибактериальные свойства наночастиц серебра и мембранотропные механизмы их действия. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:64–71.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-64-71>

For citation:

Gabrielyan LS, Trchounian AA. Antibacterial properties of silver nanoparticles and their membranotropic action. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:64–71. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-64-71>

Авторы:

Лилит Сергеевна Габриелян – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета¹⁾, доцент кафедры медицинской биохимии и биотехнологии Института биомедицины и фармации²⁾.

Армен Амбарцумович Трчунян – член-корреспондент НАН Республики Армения, заслуженный деятель науки Республики Армения, доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета¹⁾, профессор кафедры медицинской биохимии и биотехнологии Института биомедицины и фармации²⁾.

Authors:

Lilit S. Gabrielyan, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology^a, and associate professor at the department of medical biochemistry and biotechnology, Institute of Biomedicine and Pharmacy^b.

lgabrielyan@ysu.am

Armen A. Trchounian, corresponding member of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, honored scientist of the Republic of Armenia, doctor of science (biology), full professor; head of the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology^a, and professor at the department of medical biochemistry and biotechnology, Institute of Biomedicine and Pharmacy^b.

trchounian@ysu.am

MDC1759) бактерии. НЧ серебра демонстрировали антибактериальную активность в отношении использованных бактерий, что проявлялось в подавлении удельной скорости роста и уменьшении количества колониеобразующих единиц. При этом бактерицидное действие НЧ серебра на грамположительные бактерии было более выраженным, чем на грамотрицательные бактерии. Для выявления механизмов влияния НЧ также были проанализированы изменение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП), потока протонов через бактериальную мембрану и выделение водорода (H_2). При добавлении НЧ наблюдалось ингибирование выхода H_2 и изменение энергозависимого переноса протонов через F_0F_1 -АТФазу, что свидетельствует о влиянии НЧ серебра на активность мембраносвязанных ферментов. Полученные данные указывают на то, что НЧ серебра обладают выраженным антибактериальным действием в отношении исследованных бактерий и могут применяться в биомедицине.

Ключевые слова: наночастицы серебра; рост бактерий; окислительно-восстановительный потенциал; энергозависимый поток протонов; выделение водорода.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках финансирования научно-исследовательской деятельности Российско-Армянского университета.

ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR MEMBRANOTROPHIC ACTION

L. S. GABRIELIAN^{a, b}, A. A. TRCHOUNIAN^{a, b}

^aYerevan State University, 1 Alex Manoukian Street, Yerevan 0025, Armenia

^bRussian-Armenian University, 123 Hovsep Emin Street, Yerevan 0051, Armenia

Corresponding author: L. S. Gabrielyan (lgabrielyan@ysu.am)

Nowadays, metal nanoparticles (NPs) can be considered as alternative agents for overcoming antibiotic resistance. The effect of silver NPs on gram-positive (*Enterococcus hirae* ATCC9790, *Staphylococcus aureus* MDC5233) and gram-negative (*Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* MDC1759) bacteria have been investigated in this work. Silver NPs demonstrated antibacterial activity against the bacteria used, expressed in the decrease of the specific growth rate and the number of colony forming units. Moreover, the bactericidal effect of silver NPs on gram-positive bacteria was more pronounced than on gram-negative bacteria. In order to find out the mechanisms of NPs' effects, the change of the redox potential, the hydrogen (H_2) production ability, and the protons flux across the bacterial membrane have been also studied. The addition of NPs led to inhibition of H_2 yield and to change of the energy-dependent proton flux through F_0F_1 -ATPase, indicating the silver NPs effect on the activity of membrane-bound enzymes. The data obtained point out that silver NPs show a pronounced antibacterial effect against the studied bacteria and can be used in biomedicine.

Keywords: silver nanoparticles; bacterial growth; redox potential; energy-dependent proton flux; hydrogen production.

Acknowledgements. This work was supported by basic support from Russian-Armenian University provided by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

Введение

Получение эффективных антибактериальных препаратов является актуальной проблемой современной медицины и биотехнологии в связи с ростом резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Наночастицы (НЧ) многих металлов обладают выраженными бактерицидными либо бактериостатическими свойствами, вследствие чего могут рассматриваться в качестве альтернативных агентов для преодоления антибиотикоустойчивости [1–4]. Достижения нанотехнологий позволяют использовать НЧ в различных сферах деятельности, включая биотехнологию, медицину, фармацевтическую, пищевую промышленность и т. д. [1–4].

Чувствительность бактерий к НЧ зависит от ряда факторов, таких как структура, форма и размер НЧ, их синтез, тип стабилизатора, структура бактериальной стенки, особенности метаболизма и др. [3–5]. По размеру НЧ близки к большинству биологических макромолекул, а по химической активности превосходят ионы, что обусловлено большой удельной площадью поверхности НЧ в растворах [4–6]. Малые размеры НЧ способствуют антибактериальному действию, так как благодаря этому они способны проникать через бактериальные мембраны [1; 4–6]. Воздействуя на мембраны, НЧ нарушают жизнедеятельность и вызывают гибель микроорганизмов. Помимо этого, НЧ влияют на формирование биопленок различными патогенами [7–9].

Ранее нами было исследовано действие НЧ оксида железа на рост и выживаемость разных бактерий, в том числе антибиотикорезистентных штаммов *Escherichia coli* [10; 11]. Обнаружено ингибирующее влияние НЧ Fe_3O_4 на параметры роста и мембраносвязанные процессы в данных бактериях. Возможно, причиной ингибирования является образование активных форм кислорода, что может привести к окислительному стрессу, повреждению белков и клеточных мембран. Среди мембраносвязанных процессов особую роль играет изменение активности протонной АТФазы, рассматриваемой в качестве одной из первичных мишеней для НЧ.

Поиск и применение новых НЧ с широким спектром терапевтического действия имеют очень важное значение для биомедицины и биотехнологии. Хорошо известны антимикробные свойства НЧ серебра (Ag) [5–8; 12]. Однако механизмы, лежащие в основе антибактериального действия НЧ, не исследованы полностью и различаются в зависимости от вида НЧ, способа их получения и вида бактерий.

В данной работе изучено влияние НЧ Ag на параметры роста (удельная скорость и выживаемость, окислительно-восстановительный потенциал среды (ОВП)) и мембраносвязанные процессы в грамположительных (*Enterococcus hirae* ATCC9790, *Staphylococcus aureus* MDC5233) и грамотрицательных (*Escherichia coli* K-12, *Salmonella typhimurium* MDC1759) бактериях.

Материалы и методы исследования

Бактерии и условия культивирования. В настоящей работе использовались штаммы *E. coli* K-12 дикого типа (лабораторный штамм) и *E. hirae* ATCC9790, предоставленный профессором М. Солиозом (Бернский университет, Швейцария), а также *S. typhimurium* MDC1759 и *S. aureus* MDC5233 из коллекции микроорганизмов биологического факультета Ереванского государственного университета (получены из Центра депонирования микробов Национальной академии наук Республики Армения). Бактерии *E. coli*, *S. typhimurium* и *S. aureus* выращивались в анаэробных условиях на пептонной среде (2,0 % пептона, 0,5 % NaCl, 0,2 % K_2HPO_4 и 0,2 % глюкозы) при 37 °C и pH 7,5 [10], а *E. hirae* ATCC9790 – на триптонной среде, как описано ранее [10]. Культивирование бактерий проводилось в стеклянных сосудах DURAN® (*Carl Roth*, Германия) объемом 250 мл с плотно закрывающимися воздухонепроницаемыми пробками. При этом питательную среду заливали доверху, оставляя между пробкой и ростовой средой небольшую прослойку воздуха (30 мл). В целях создания анаэробных условий атмосферный и растворенный O_2 удаляли из ростовой среды автоклавированием (при 120 °C в течение 20 мин), после чего сосуды закрывали пробками. Для сохранения анаэробных условий и поддержания уровня содержания O_2 сосуды хранили герметично закрытыми. Для посева использовали 1,5 % предварительно выращенной жидкой ночной бактериальной культуры.

Рост бактерий контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) суспензии на спектрофотометре SP-2000 UV Visible (*Ningbo Hinotek Instrument*, Китай) при длине волны 600 нм (ОП_{600}). Скорость роста (μ) определяли по формуле

$$\mu = \frac{\ln \text{ОП} - \ln \text{ОП}_0}{t},$$

где ОП_0 – начальное значение оптической плотности (ОП_{600}), а ОП_t есть ОП_{600} через время t . Величину μ выражали в часах в минус первой степени [10; 11]. Подсчет жизнеспособных бактерий проводили методом посева соответственно разведенной в определенном объеме бактериальной культуры на плотную питательную среду в чашки Петри и последующей количественной оценки сформированных колоний [10].

Характеристика НЧ серебра. НЧ Ag «Сильвертон» (фармацевтическая компания «Тонус-Лес», Армения) в концентрации от 5 до 30 мкг/мл добавляли непосредственно в ростовую среду. Структура, форма и размер НЧ Ag, синтезированных электрохимическим методом, были исследованы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с применением микроскопа JEM 2100 (*JEOL*, Япония) (рис. 1). НЧ имели сферическую форму, их средний размер составлял $(29,20 \pm 0,08)$ нм.

Определение pH, ОВП среды, выхода H_2 и энергозависимого потока протонов через бактериальную мембрану. Уровень pH среды измеряли с помощью pH-метра (*HANNA Instruments*, Португалия). Начальное значение pH поддерживалось в пределах $7,5 \pm 0,1$ путем добавления 0,1 моль/л NaOH или 0,1 моль/л HCl [10]. Величину ОВП среды определяли цифровыми иономерами И-160 МП (Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь) с использованием платинового (ЭПВ-01) и титан-силикатного (ЭО-21) электродов, как описано ранее [10; 11]. Выход H_2 рассчитывали по изменению величины ОВП и выражали в миллимолях на 1 л культуры [10; 11].

Поток H^+ через бактериальную мембрану определяли с помощью соответствующего селективного электрода HJ1131B (*HANNA Instruments*, Португалия), как описано ранее [7; 8]. Бактерии культивировали в присутствии НЧ Ag (10 мкг/мл) в течение 18–20 ч. Затем бактериальную культуру 20 мин центрифугировали при 6000 об/мин, полученный осадок переносили в 150 ммоль/л трисфосфатный буфер (pH 7,5)

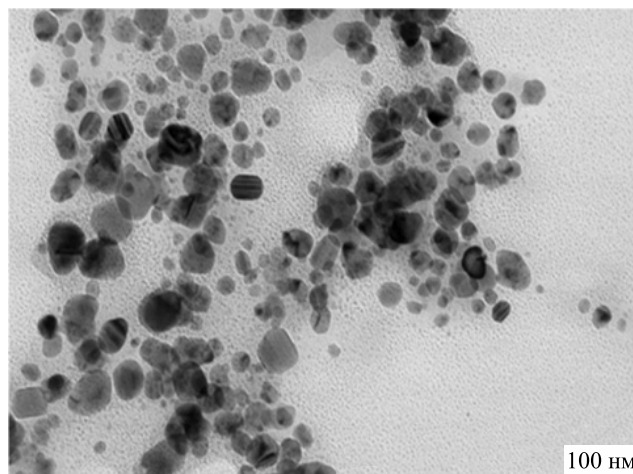


Рис. 1. Изображение НЧ серебра, полученное методом трансмиссионной электронной микроскопии

Fig. 1. The TEM image of silver nanoparticles

и добавляли источник энергии – глюкозу (11 ммоль/л). H^+ -поток (J_{H^+}) выражали в миллимолях в минуту на 10^{10} клеток [10; 11]. Для исследования влияния ингибитора протонного транспорта бактерии инкубировали с 0,2 ммоль/л *N,N'*-дициклогексилкарбодиимидом (ДЦКД) в течение 10 мин [10; 11].

Статистический анализ. Статистическую обработку данных выполняли с помощью компьютерной программы *Excel*. В работе приводятся средние арифметические значения из не менее четырех независимых экспериментов со среднеквадратическим отклонением результатов измерений и критерием достоверности Стьюдента для разницы результатов различных серий экспериментов [10; 11]. Данные считаются достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Было проанализировано влияние НЧ серебра на параметры роста грамотрицательных бактерий *E. coli* K-12 и *S. typhimurium* MDC1759 и грамположительных *E. hirae* ATCC9790 и *S. aureus* MDC5233. Выбор объектов изучения объясняется тем, что *E. coli* и *E. hirae* широко используются в микробиологических и биотехнологических исследованиях в качестве модельных организмов для грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно [3; 10; 13; 14]. Среди этих энтеробактерий также встречаются патогенные формы, которые вызывают различные заболевания, такие как инфекции желудочно-кишечного тракта, мочеполовой и центральной нервной системы [15; 16]. Представители родов *Staphylococcus* и *Salmonella* – патогенные бактерии, вызывающие широкий диапазон инфекционных заболеваний у человека и проявляющие устойчивость ко многим известным антибиотикам [17; 18].

НЧ Ag демонстрировали антибактериальную активность в отношении использованных бактерий, выражающуюся в подавлении удельной скорости роста (рис. 2). Обнаружена концентрационная зависимость антибактериального действия НЧ Ag: максимальный ингибирующий эффект НЧ Ag проявлялся при концентрации 30 мкг/мл (см. рис. 2). При этом действие НЧ Ag на *E. hirae* и *S. aureus* было более выраженным, чем на *E. coli* и *S. typhimurium*. Как видно из рис. 2, удельная скорость роста *S. typhimurium* MDC1759 и *E. coli* K-12 замедлялась примерно в 4,0 и 6,0 раза соответственно (см. рис. 2, а), тогда как рост *S. aureus* MDC5233 и *E. hirae* ATCC9790 подавлялся в 7,0 и 7,6 раза соответственно (см. рис. 2, б).

Таким образом, грамотрицательные бактерии оказались более устойчивыми к действию НЧ, чем грамположительные, что может быть связано со строением клеточной стенки и наличием наружной мембраны, служащей своеобразным барьером для НЧ. Предполагается, что антибактериальная активность НЧ Ag может быть результатом возникновения свободных положительно заряженных ионов Ag, их адсорбции на отрицательно заряженной поверхности бактериальной мембраны, взаимодействия с мембраносвязанными белками, в том числе с ферментами, и проникновения в клетку. Свободные ионы Ag^+ могут способствовать образованию активных форм кислорода, что может привести к окислительному стрессу, повреждению белков и клеточных мембран, а также к гибели бактерий [4–6; 12].

Было исследовано влияние НЧ Ag на количество колониеобразующих единиц (КОЕ) используемых бактерий (рис. 3). При добавлении 10 мкг/мл НЧ Ag количество жизнеспособных колоний *S. typhimurium* MDC1759 и *E. coli* K-12, выросших на плотной питательной среде, снижалось на 60 и 52 % соответственно по сравнению с контролем (см. рис. 3). В присутствии НЧ Ag наблюдалось также уменьшение числа колоний *S. aureus* MDC5233 и *E. hirae* ATCC9790 на 71 и 76 % соответственно относительно контроля, что свидетельствовало о бактерицидном действии данных НЧ (см. рис. 3).

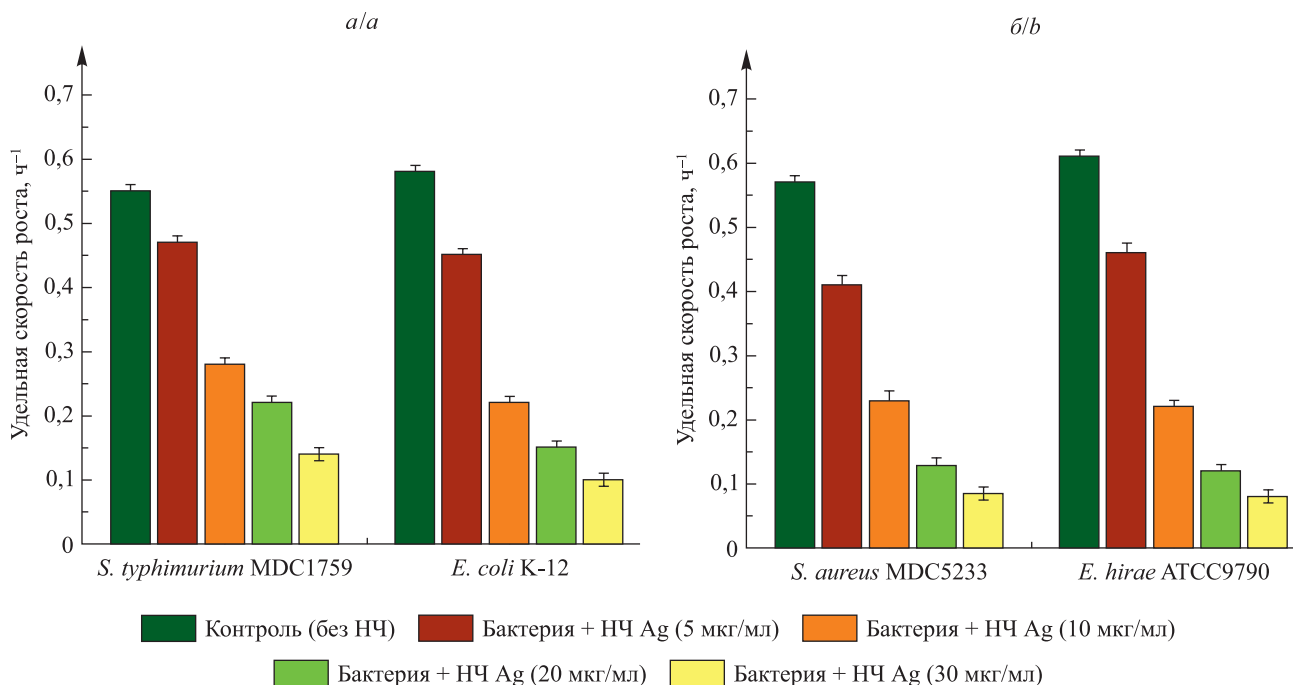


Рис. 2. Влияние различных концентраций НЧ Ag на удельную скорость роста грамотрицательных (а) и грамположительных (б) бактерий. Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 2. Effect of Ag NPs various concentrations on the specific growth rate of gram-negative (a) and gram-positive (b). Control was without nanoparticles addition

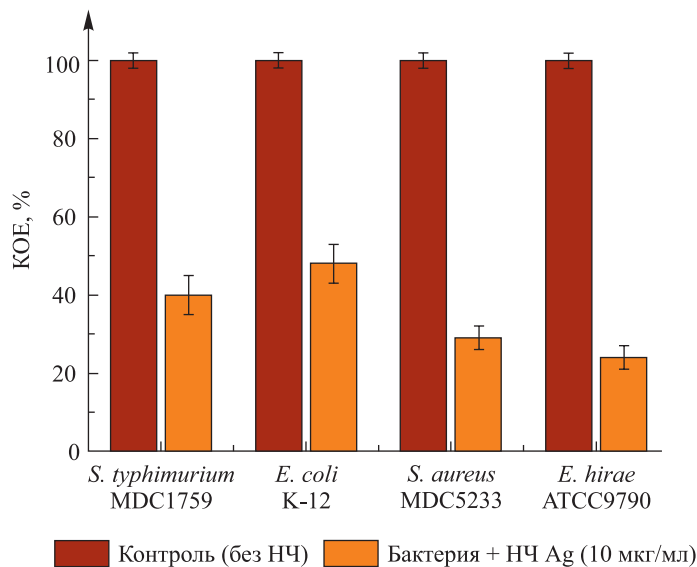


Рис. 3. Количество колониеобразующих единиц различных бактерий при росте в присутствии НЧ Ag (10 мкг/мл). Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 3. The number of colony forming units of various bacteria, grown in the presence of Ag NPs (10 μg/mL). Control was without nanoparticles addition

ОВП является важным фактором, характеризующим метаболическую активность бактерий при росте в различных условиях [3; 10; 19]. Установлено, что рост бактерий в отсутствие кислорода сопровождается снижением ОВП от положительных до отрицательных значений [3; 10; 19]. В работе было исследовано изменение ОВП в процессе бактериального роста в присутствии НЧ Ag (рис. 4). Рост *S. typhimurium* MDC1759 и *E. coli* K-12 (без НЧ) в анаэробных условиях в течение 20 ч сопровождался снижением значений ОВП от $(+120 \pm 10)$ мВ в начале лаг-фазы до (-430 ± 15) мВ и (-580 ± 15) мВ соответственно (см. рис. 4). Падение ОВП указывает на повышение интенсивности восстановительных реакций, что является характерным для метаболических процессов при росте бактерий в анаэробных

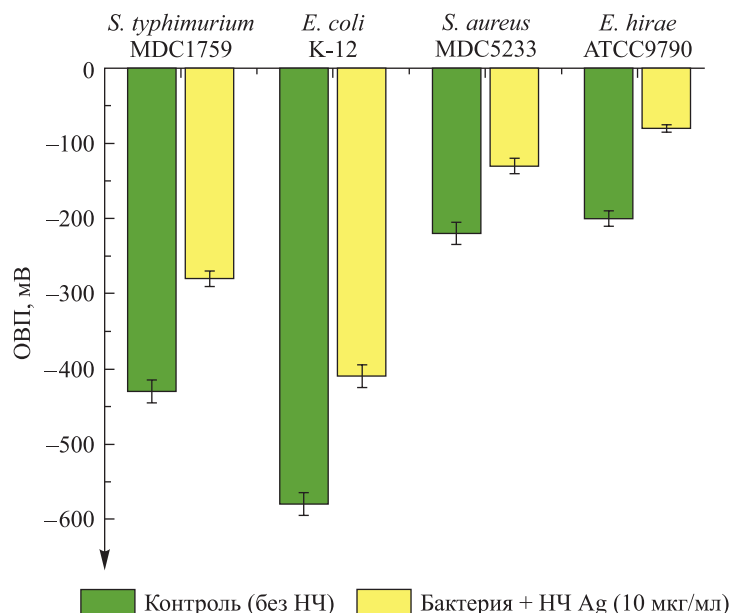


Рис. 4. Изменение ОВП среды различных бактерий при росте в присутствии НЧ Ag (10 мкг/мл). Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 4. Changes of medium redox potential of various bacteria grown in the presence of Ag NPs (10 µg/mL). Control was without nanoparticles addition

условиях и мембраносвязанного выделения H_2 [3; 10; 19]. Добавление НЧ Ag приводит к замедлению падения ОВП. Так, в присутствии 10 мкг/мл НЧ Ag значение ОВП снижалось до (-280 ± 10) мВ (*S. typhimurium*) и (-410 ± 10) мВ (*E. coli*) (см. рис. 4). В случае грамположительных бактерий изменение ОВП было не столь выраженным (см. рис. 4).

Взаимосвязь между снижением величины ОВП и выделением H_2 была показана для разных микроорганизмов в нашей лаборатории [19–22]. Известно, что выделение H_2 бактериями *E. coli* связано с деятельностью гидрогеназ и формат-водород-лиазных (ФВЛ) комплексов [19; 20]. НЧ Ag подавляли выход H_2 в *E. coli* K-12 примерно в 5 раз и полностью ингибировали данный процесс в *S. typhimurium* MDC1759 (данные не приводятся). Действие НЧ на мембраносвязанное выделение H_2 может быть обусловлено подавлением активности гидрогеназ и ФВЛ-комплексов. Грамположительные бактерии *S. aureus* MDC5233 и *E. hirae* ATCC9790 неспособны к выделению биоводорода.

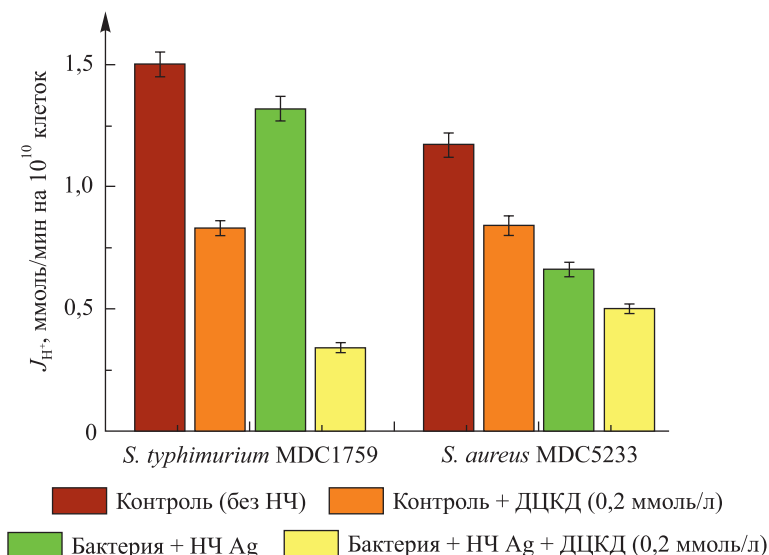


Рис. 5. Влияние НЧ Ag (10 мкг/мл) на поток H^+ через мембраны *S. typhimurium* MDC1759 и *S. aureus* MDC5233. Контроль – бактерии, выращенные без НЧ

Fig. 5. Effect of Ag NPs (10 µg/mL) on the H^+ -flux across the membranes of *S. typhimurium* MDC1759 and *S. aureus* MDC5233. Control was without nanoparticles addition

Для выявления механизмов влияния НЧ также исследовали энергозависимый перенос протонов через бактериальную мембрану. При добавлении НЧ Ag наблюдалось изменение энергозависимого потока протонов через мембрану в *S. typhimurium* MDC1759 и *S. aureus* MDC5233 даже в присутствии ингибитора ДЦКД, свидетельствующее о том, что антибактериальное действие НЧ может быть связано с изменением активности F_0F_1 -АТФазы (см. рис. 5). Полученные результаты указывают на то, что мембраносвязанная протонная АТФаза может являться основной мишенью действия НЧ Ag.

Заключение

Таким образом, обнаружено антибактериальное действие НЧ Ag на исследованные бактерии, проявляющееся в подавлении удельной скорости роста, уменьшении количества жизнеспособных бактериальных колоний, изменениях ОВП, переноса протонов через мембрану и выделении биоводорода. При этом бактерицидное влияние НЧ Ag на грамположительные бактерии *E. hirae* и *S. aureus* было более выраженным, чем на грамотрицательные *E. coli* и *S. typhimurium*. Предполагается, что грамотрицательные бактерии более устойчивы к воздействию НЧ благодаря наличию наружной мембраны, служащей своеобразным барьером для НЧ.

Следовательно, НЧ Ag могут рассматриваться как перспективные антибактериальные агенты и в будущем способны заменить антибиотики при лечении различных заболеваний.

Библиографические ссылки / References

1. Raghunath A, Perumal E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2017;49(2):137–152. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.011.
2. Singh R, Smitha MS, Singh SP. The role of nanotechnology in combating multi-drug resistant bacteria. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2014;14(7):4745–4756. DOI: 10.1166/jnn.2014.9527.
3. Trchounian A, Gabrielyan L, Mnatsakanyan N. Nanoparticles of various transition metals and their applications as antimicrobial agents. In: Saylor Y, Irby V, editors. *Metal nanoparticles: properties, synthesis and applications*. Hauppauge: Nova Science Publishers; 2018. p. 161–211.
4. Wang L, Hu Ch, Shao L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:1227–1249. DOI: 10.2147/IJN.S121956.
5. Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Fica A, Andronesu E. Biomedical applications of silver nanoparticles: an up-to-date overview. *Nanomaterials*. 2018;8(9):681. DOI: 10.3390/nano8090681.
6. Lee SH, Jun BH. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Science*. 2019;20(4):865. DOI: 10.3390/ijms20040865.
7. Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, Galdiero M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015;20(5):8856–8874. DOI: 10.3390/molecules20058856.
8. Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against gram-negative and gram-positive bacteria. *Nanoscale Research Letters*. 2014;9(1):373. DOI: 10.1186/1556-276X-9-373.
9. Sathyanarayanan MB, Balachandranath R, Srinivasulu YG, Kannaiyan SK, Subbiahdoss G. The effect of gold and iron oxide nanoparticles on biofilm-forming pathogens. *International Scholar Research Notices*. 2013;2013:272086. DOI: 10.1155/2013/272086.
10. Gabrielyan L, Hovhannisyan A, Gevorgyan V, Ananyan M, Trchounian A. Antibacterial effects of iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles: distinguishing concentration-dependent effects with different bacterial cells growth and membrane-associated mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;103(6):2773–2782. DOI: 10.1007/s00253-019-09653-x.
11. Gabrielyan L, Hakobyan L, Hovhannisyan A, Trchounian A. Effects of iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles on *Escherichia coli* antibiotic-resistant strains. *Journal of Applied Microbiology*. 2019;126(4):1108–1116. DOI: 10.1111/jam.14214.
12. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2014;22(1):116–127. DOI: 10.1016/j.jfda.2014.01.010.
13. Arokiyaraj S, Hairul Islam VI, Bharanidharan R, Raveendar S, Lee J, Kim DH, et al. Antibacterial, anti-inflammatory and probiotic potential of *Enterococcus hirae* isolated from the rumen of *Bos primigenius*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30(7):2111–2118. DOI: 10.1007/s11274-014-1625-0.
14. Vardanyan Z, Gevorgyan V, Ananyan M, Vardapetyan H, Trchounian A. Effects of various heavy metal nanoparticles on *Enterococcus hirae* and *Escherichia coli* growth and proton-coupled membrane transport. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015;13(69):1–9. DOI: 10.1186/s12951-015-0131-3.
15. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*. 2012;3(2):71–87. DOI: 10.4161/gmic.19182.
16. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;106(1):1–24. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026.
17. Akbar A, Sadiq MB, Ali I, Muhammad N, Rehman MN, et al. Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019;17:36–42. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.005.
18. Ayala-Núñez NV, Lara Villegas HH, del Carmen Ixtapan Turrent L, Padilla CR. Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nanoscale does matter. *Nanobiotechnology*. 2009;5:2–9. DOI: 10.1007/s12030-009-9029-1.

19. Poladyan A, Avagyan A, Vassilian A, Trchounian A. Oxidative and reductive routes of glycerol and glucose fermentation by *Escherichia coli* batch cultures and their regulation by oxidizing and reducing reagents at different pHs. *Current Microbiology*. 2013; 66(1):49–55. DOI: 10.1007/s00284-012-0240-2.
20. Trchounian A. Mechanisms for hydrogen production by different bacteria during mixed-acid and photofermentation and perspectives of hydrogen production biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2015;35(1):103–113. DOI: 10.3109/07388551.2013.809047.
21. Gabrielyan L, Sargsyan H, Trchounian A. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:131–140. DOI: 10.1186/s12934-015-0324-3.
22. Manoyan J, Gabrielyan L, Kozel N, Trchounian A. Regulation of biohydrogen production by protonophores in novel green microalgae *Parachlorella kessleri*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019;199:111597. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111597.

Статья поступила в редакцию 29.06.2020.
Received by editorial board 29.06.2020.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА УВЕЛИЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ ПЛАЗМОННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ¹

И. В. КОКТЫШ¹⁾, Я. И. МЕЛЬНИКОВА¹⁾,
О. С. КУЛАКОВИЧ²⁾, А. А. РОМАНЕНКО²⁾, С. А. МАСКЕВИЧ¹⁾

¹⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова БГУ,
ул. Долгобродская, 23, корп. 1, 220070, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси,
пр. Независимости, 68, корп. 2, 220072, г. Минск, Беларусь

Изучена зависимость основных параметров взаимодействия компонентов иммунофлуоресцентной тест-системы для количественного определения простатспецифического антигена на основе плазмонных серебряных наночастиц от физико-химической природы различных полиэлектролитов, применяемых при покрытии пленок из наночастиц серебра. Показано, что использование слабозаряженного поликатионного электролита поли-L-лизина позволяет повысить показатели антигенного связывания тест-системы в 2,34 раза, а применение сильнозаряженного поликатионного электролита полидиаллилдиметиламмония хлорида вызывает увеличение параметров аффинности связывания простатспецифического антигена в 5 раз. При разработке различных иммунохимических тест-систем с использованием пленок из наночастиц серебра важное значение имеет выбор полиэлектролита для покрытия нанослоя серебра, так как физико-химические и электростатические свойства полиэлектролита могут оказывать существенное влияние как на сорбционную емкость твердой фазы, так и на конформационное состояние и функциональную активность иммобилизуемых белковых молекул. От этих параметров в значительной степени зависит как специфичность, так и чувствительность иммунохимической тест-системы, а также минимально возможные открываемые концентрации биоаналита.

¹Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

Образец цитирования:

Коктыш ИВ, Мельникова ЯИ, Кулакович ОС, Романенко АА, Маскевич СА. Влияние полиэлектролитов на увеличение чувствительности иммунофлуоресцентного анализа на основе плазмонных серебряных наночастиц. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2020; 3:72–80.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-72-80>

For citation:

Koktysh IV, Mel'nikova YaI, Kulakovich OS, Ramanenka AA, Maskevich SA. Influence of polyelectrolytes on increasing sensitivity of an immunofluorescent analysis based on plasmon silver nanoparticles. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2020;3:72–80. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-72-80>

Авторы:

Ирина Владимировна Коктыш – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией экологической биотехнологии.

Янина Игоревна Мельникова – старший преподаватель кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

Ольга Сергеевна Кулакович – кандидат химических наук; заместитель заведующего центром «Нанопотоника».

Андрей Алексеевич Романенко – научный сотрудник центра «Нанопотоника».

Сергей Александрович Маскевич – доктор физико-математических наук, профессор; директор.

Authors:

Irina V. Koktysh, PhD (biology); head of the laboratory of environmental biotechnology.

drkoktysh@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-3725-8588>

Yanina I. Mel'nikova, senior lecturer at the department of immunology, faculty of environmental medicine.

univer.yanina@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-3887-526X>

Olga S. Kulakovich, PhD (chemistry); deputy head of the Nanophotonics Center.

o.kulakovich@ifanbel.bas-net.by

<https://orcid.org/0000-0001-8618-6771>

Andrei A. Ramanenka, researcher at the Nanophotonics Center.

a.ramanenka@ifanbel.bas-net.by

<https://orcid.org/0000-0002-6336-0578>

Sergey A. Maskevich, doctor of science (physics and mathematics), full professor; director.

sergei.maskevich@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0001-7644-4968>

Ключевые слова: флуоресцентный иммунологический анализ; поли-L-лизин; полидиаллилдиметиламмоний хлорид; флуоресцеин изотиоцианат; наночастицы серебра; плазмоника; простатспецифический антиген.

Благодарность. Работа выполнена в рамках договора Института физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси с Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований № Ф20ПТИ-004 от 4 мая 2020 г. (проект «Исследование механизма плазмонного усиления фотолуминесценции в анизотропных наноструктурах»).

INFLUENCE OF POLYELECTROLYTES ON INCREASING SENSITIVITY OF AN IMMUNOFLUORESCENT ANALYSIS BASED ON PLASMON SILVER NANOPARTICLES

*I. V. KOKTYSH^a, Ya. I. MEL'NIKOVA^a,
O. S. KULAKOVICH^b, A. A. RAMANENKA^b, S. A. MASKEVICH^a*

*^aInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23 Daubhabrodskaia Street, 1 building, Minsk 220070, Belarus*

*^bB. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus,
68 Niezaliežnasci Avenue, 2 building, Minsk 220072, Belarus*

Corresponding author: Ya. I. Mel'nikova (univer.yanina@gmail.com)

It was studied the dependence of the interaction of the components of the immunofluorescence test system for the quantitative determination of prostate specific antigen based on plasmon silver nanoparticles on the physicochemical nature of various polyelectrolytes used to coat films of silver nanoparticles. It has been shown that the use of a weakly charged polycationic polyelectrolyte poly-L-lysine can increase the antigenic binding of the test system by 2.34 times, and the use of a highly charged polycationic polyelectrolyte polydiallyldimethylammonium chloride increases the binding affinity of prostatic specific antigen by 5 times. When developing various immunochemical test systems using films of silver nanoparticles, an important parameter is the choice of a polyelectrolyte for coating a silver nanolayer, since the physicochemical and electrostatic properties of the polyelectrolyte can significantly affect both the sorption capacity of the solid phase and the conformational state functional activity of immobilized protein molecules. Both specificity and sensitivity of the immunochemical test system, as well as the minimum possible detectable concentration of bioanalyte, largely depend on these parameters.

Keywords: fluorescence immunological analysis; polyelectrolytes; poly-L-lysine; polydiallyldimethylammonium chloride; fluorescein isothiocyanate; fluorescence; silver nanoparticles; plasmonics; prostate-specific antigen.

Acknowledgements. The study was conducted within agreement of B. I. Stepanov Institute of Physics, National Academy of Sciences of Belarus, with the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research No. F20PTI-004 dated 2020 May 4 (the project «Investigation of the mechanism of plasmon accumulation of photoluminescence in anisotropic nanostructures»).

Введение

Простатспецифический антиген (ПСА) в норме является компонентом простатического секрета и семенной жидкости и вырабатывается люминальными эпителиальными тканями простаты. Благодаря механизмам межтканевой диффузии некоторая его часть попадает в кровоток, так что среднее содержание этого белка в сыворотке крови у мужчин колеблется от 1 до 4 нг [1–3]. Данное значение может варьироваться в зависимости от возраста, физической нагрузки и индивидуальных физиологических особенностей [4–6].

Кроме этого, ПСА был обнаружен и в непростатических тканях, таких как секреторные эпителиальные клетки трахеи, щитовидной железы, слюнных желез, тощей и подвздошной кишки, поджелудочной железы [7–9]. Достаточно высокое содержание ПСА отмечено и у женщин в тканях эндометрия, плаценты, молочной железы, а также в грудном молоке и амниотической жидкости [10; 11], что свидетельствует о том, что данный белок вовлечен во многие физиологические процессы и его функция в человеческом организме не ограничивается только поддержанием агрегатного состояния спермы у мужчин.

При развитии патологических процессов, особенно неопластического характера, происходит повышение уровня ПСА в сыворотке крови, и это является диагностическим критерием в первую очередь рака предстательной железы у мужчин, а при установленном диагнозе «рак» отражает распространенность и стадийность опухолевого процесса [1–3; 5]. Относительно недавно обнаружено, что ПСА может

экспрессироваться различными солидными образованиями [11]. Присутствие ПСА в тканях было отмечено при почечно-клеточном раке (в том числе и у женщин), немелкоклеточном раке легких у мужчин и женщин, опухолях нервной системы, надпочечников, толстой кишки, слюнных и потовых желез, в онкоцитомах околоушных желез [2; 3; 6; 7; 11]. Наибольший интерес представляют публикации, посвященные исследованиям уровня ПСА при раке молочной железы [6; 9; 11].

Аналитическая биотехнология дает возможность разрабатывать новые экспериментальные подходы к созданию высокочувствительных методов анализа биологически активных соединений, позволяющих достоверно определять нано- и пикограммовые количества вещества в биологических жидкостях или объектах окружающей среды.

Применение спектрального инструментального оборудования обеспечивает эффективную детекцию биоаналитов. В этом случае в качестве метки используются вещества, обладающие люминесцентными, флуоресцентными или иными спектральными свойствами. В роли оптических преобразователей разнообразных биоспецифических взаимодействий выступают наночастицы металлов, таких как золото и серебро, что позволяет сочетать в одной экспериментальной системе явления плазмонного резонанса и флуоресценции.

Иммуноаналитическое количественное определение белковых молекул с применением флуорохромов для конъюгирования с антителами или антигенами обладает чувствительностью на один-два порядка выше, чем при использовании фотометрических меток.

Для исследования возможности применения ПСА в качестве биомаркера непростатических раков требуется увеличение чувствительности существующих иммунохимических тест-систем.

Цель настоящей работы – изучить влияние различных полиэлектролитов на чувствительность иммунофлуоресцентного анализа ПСА на основе плазмонных серебряных наночастиц.

Материалы и методы исследования

Применяемые материалы. В работе использовались следующие химические реактивы: нитрат серебра, цитрат натрия, полиэлектролит полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ), поли-L-лизин гидробромид, флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ, изомер I), хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин (БСА) (все реактивы производства компании *Sigma-Aldrich*, США), буферный раствор Tris-EDTA с pH 7,6 (*Fisher BioReagents*, США), 10 ммоль/л калий-натрий-фосфатный буфер (ФСБ), содержащий 140 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л KCl, 10 ммоль/л NaH_2PO_4 (pH 7,4), и стандарты ПСА, соответствующие концентрациям 0; 1; 2,5; 5; 15 и 30 нг/мл (ООО «АнализМедПром», Беларусь), неконкурирующие моноклональные антитела к ПСА антиПСА-MAT1 и антиПСА-MAT2 (*Abcam*, Великобритания).

Эксперименты проводились в прозрачных 96-луночных полистироловых планшетах для иммуноанализа (ОАО «Медполимер», Россия) с объемом лунки 250 мкл.

Получение конъюгатов моноклональных антител. Синтез конъюгатов моноклональных антител антиПСА-MAT2 и ФИТЦ (далее – антиПСА-ФИТЦ) осуществлялся по стандартной методике [4], концентрация исходного раствора была 2,97 мг/мл с молярным соотношением белка и ФИТЦ 1,0 : 3,9.

Формирование пленки наночастиц серебра. Золь серебра был синтезирован по методу цитратного восстановления нитрата серебра [12; 13]. Электронные снимки полученных серебряных наночастиц были сделаны на сканирующем электронном микроскопе SU 8030 (*Hitachi*, Япония). Образцы для электронной микроскопии готовили путем нанесения капли золя серебра на кремниевую подложку и последующего высушивания на воздухе.

Серебряные наночастицы осаждали в лунки планшета по следующей схеме:

- 1) 150 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) выдерживались в половине лунок планшета в течение 20 мин;
- 2) 150 мкл золя серебра выдерживались в половине лунок планшета в течение 24 ч при комнатной температуре.

Формирование слоев полиэлектролитов на серебряной нанопленке. На поверхность пленки, состоящей из наночастиц серебра, наносили 150 мкл раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) или раствора поли-L-лизина (20 мкг/мл) по отдельности либо чередовали слои этих двух полиэлектролитов. Растворы ПДАДМАХ и поли-L-лизина инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Каждый этап процедуры заканчивался промывкой дистиллированной водой.

Формирование слоев полиэлектролитов на поверхности полистирола. Обработка полистироловых планшетов растворами полиэлектролитов осуществлялась путем инкубирования 150 мкл раствора поли-L-лизина (20 мкг/мл) или раствора ПДАДМАХ (1 г/л в 0,5 моль/л хлорида натрия) на ячейку в течение 20 мин при комнатной температуре. Каждый этап процедуры заканчивался промывкой дистиллированной водой.

Иммобилизация антиПСА-MAT1 на твердой фазе. В лунки полистироловых планшетов (интактных или покрытых комплексами, состоящими из нанопленки серебра и полиэлектролитов в различных сочетаниях) вносили антиПСА-MAT1 в количестве 3 мкг на 1 лунку в 150 мкл 10 ммоль/л калий-натрий-фосфатного буфера (рН 7,4) и инкубировали 16 ч при 4 °С. Затем планшеты промывали тем же буфером и добавляли 1 % раствор БСА в ФСБ. Через 1 ч планшеты промывали ФСБ и использовали в анализе.

Двухцентровый анализ связывания ПСА с моноклональными антителами. В лунки полистироловых планшетов с предварительно иммобилизованным моноклональным антителом антиПСА-MAT1 добавляли возрастающие количества ПСА (от 0 до 30 нг/мл соответственно) в ФСБ-БСА в объеме 150 мкл. Инкубировали в течение 1,5 ч при 37 °С, дважды промывали ФСБ и вносили по 300 нг конъюгата антиПСА-ФИТЦ в объеме 150 мкл. Через 1,5 ч инкубации при 37 °С в темноте лунки промывали ФСБ и измеряли интенсивность флуоресценции (возбуждение 460 нм, эмиссия 518 нм).

Константы взаимодействия конъюгата моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ с комплексом антиПСА-MAT1 – ПСА, фиксированным на полистироле или нанопленках серебра, покрытых различными полиэлектролитами, определяли посредством множественного регрессионного анализа.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета прикладных программ *Statistica 8.0* (StatSoft Inc., США) для Windows с использованием параметрических критериев. При сравнении независимых выборок применяли дисперсионный анализ и *t*-критерий Стьюдента. Для определения вида взаимосвязи признаков использовали множественный регрессионный анализ. В целях выявления статистически значимых различий или взаимосвязи признаков критический уровень значимости *p* нулевой гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Плазмонно-усиленная флуоресценция является одним из наиболее перспективных методов повышения чувствительности флуоресцентного иммунологического анализа. Интенсивность регистрируемого сигнала может быть увеличена в 10–100 раз, если флуоресцентная метка (флуорофор) размещается на определенном расстоянии от металлических наночастиц золота или серебра [12–14]. Большое значение при этом имеет начальный квантовый выход флуоресценции используемого флуорофора [15; 16].

Ранее в работах группы исследователей под руководством академика НАН Беларуси, доктора физико-математических наук, профессора С. В. Гапоненко была продемонстрирована возможность получения усиленной флуоресценции для модельных биомолекул БСА-ФИТЦ (бычьего сывороточного альбумина, меченного флуоресцеином изотиоцианатом) и иммуноглобулина G-ФИТЦ (иммуноглобулина G человека, меченного флуоресцеином изотиоцианатом), осажденных на нанотекстурированную серебряную поверхность [13–15].

Аналогичные эффекты были зарегистрированы и в случае применения пленки из наночастиц серебра в качестве подложки для иммунологической тест-системы, сконструированной в рамках двухцентрового «сэндвич»-анализа с использованием пары неконкурирующих моноклональных антител для определения альфа-фетопroteина и ПСА [13; 14].

При этом наночастицы серебра электростатически осаждались на поверхность лунок полистироловых планшетов с помощью полиэлектролитных слоев. Размер осаждаемых наночастиц, по данным электронной микроскопии, составил от 30 до 80 нм (рис. 1). Фиксация моноклональных антител на поверхности серебряной нанопленки происходила с помощью полиэлектролитов.

В спектре оптической плотности посеребренных лунок планшета регистрировался характерный максимум в области 400 нм, связанный с резонансным плазмонным поглощением наночастицами серебра, а также широкая полоса в области 600–800 нм, связанная с поглощением агрегатами серебряных наночастиц. При этом происходило перекрытие полосы плазмонного резонанса серебряной пленки со спектром поглощения конъюгата антиПСА-ФИТЦ, что обеспечивало эффективное возбуждение флуоресценции ФИТЦ и создавало условия для наблюдения усиленной флуоресценции (рис. 2).

Так как для регистрации плазмонного усиления флуоресценции существенным является расстояние между флуорофором и серебряными наночастицами, толщина полиэлектролитных слоев на поверхности серебряной нанопленки, используемых для адсорбции белковых молекул, не должна превышать 1,4–3,3 нм [12–15]. Это пространственное ограничение связано с наличием в применяемой иммунохимической конструкции двух слоев молекул иммуноглобулинов и слоя молекул ПСА, которые обладают достаточно большими размерами.

На основании этих данных в наших экспериментах для иммобилизации первого компонента иммунохимической тест-системы антиПСА-MAT1 мы использовали поверхности полистирола или серебряной нанопленки, покрытые только одним монослоем полиэлектролита (ПДАДМАХ или поли-L-лизин).

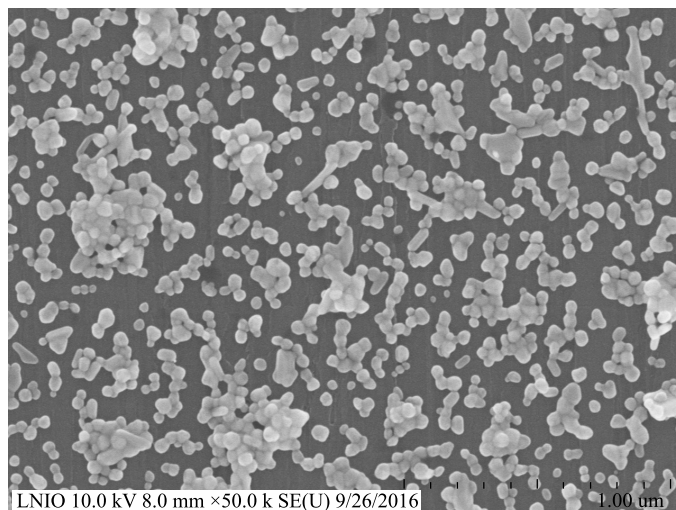


Рис. 1. Изображение серебряных наночастиц, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии

Fig. 1. Image of silver nanoparticles obtained using atomic force scanning electron microscopy

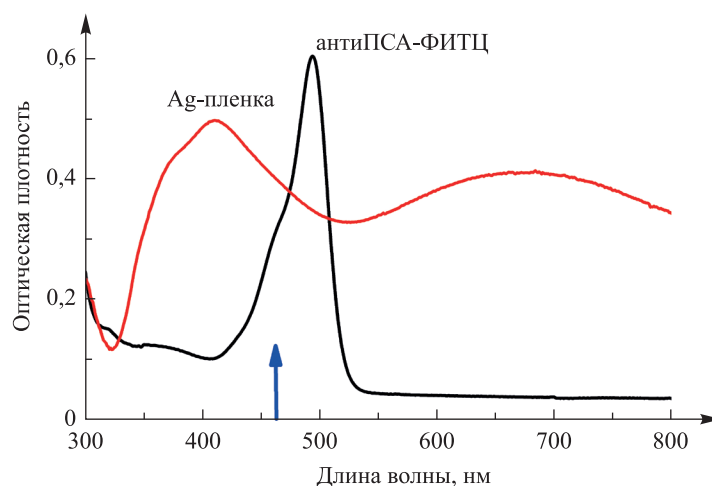


Рис. 2. Спектры оптической плотности пленки серебра и водного раствора антиПСА-ФИТЦ. Стрелкой указана длина волны возбуждающего излучения

Fig. 2. Optical characteristics of an immunochemical test system with plasmon enhancement of PSA-FITC fluorescence by silver nanoparticles. The arrow indicates the wavelength of the exciting radiation

Для изучения вклада монослоя поликатионного электролита в процессы иммобилизации молекул иммуноглобулинов на поверхности полистирола и серебряных нанопленок, а также последующего образования поливалентных иммунных комплексов применялись следующие варианты формирования твердой фазы: полистирол, покрытый поли-L-лизинном; полистирол, покрытый ПДАДМАХ; нанопленка серебра, покрытая поли-L-лизинном; нанопленка серебра, покрытая ПДАДМАХ.

Контролем являлось проведение иммуноанализа с иммобилизацией антиПСА-MAT1 на интактной поверхности полистирола в ячейках планшета для микроанализа.

Как видно из представленных результатов (рис. 3), при иммобилизации антиПСА-MAT1 в лунках полистиролового планшета, покрытых поли-L-лизинном, происходит статистически значимое увеличение констант взаимодействия антиПСА-ФИТЦ с антигеном в 1,2 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$), при этом интенсивность флуоресценции возрастает в среднем на 15 % (см. таблицу).

Катионный полиэлектролит поли-L-лизин представляет собой линейный гомополимер, состоящий из последовательно соединенных молекул аминокислоты L-лизина. Наличие множественных катионных групп первичных аминов при иммобилизации данного гомополимера на поверхности полистирола или серебряной нанопленки обеспечивает создание поверхности с неравномерной плотностью электрического заряда. Кроме того, мономеры L-лизина при иммобилизации на твердой фазе в водной

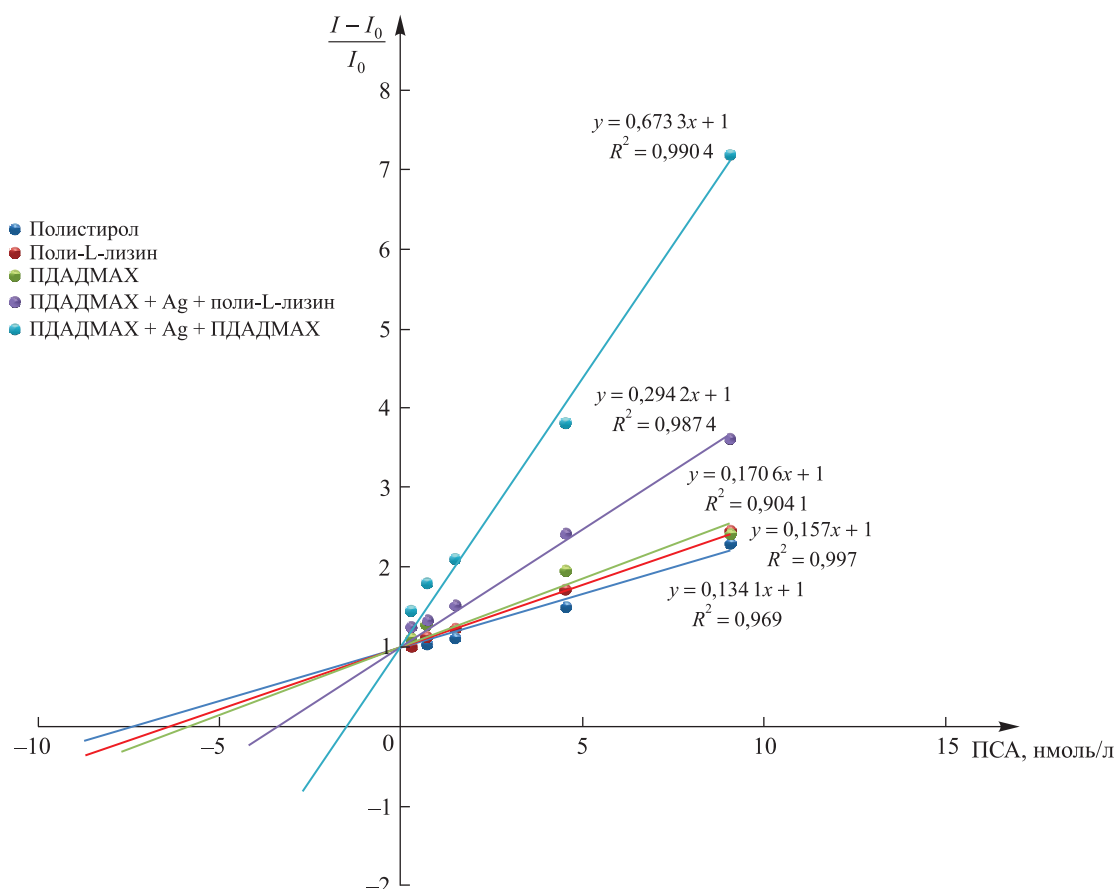


Рис. 3. Определение констант взаимодействия моноклональных антител

Fig. 3. Determination of the interaction constants of monoclonal antibodies

среде формируют вторичные структуры, которые по строению напоминают β -складки и выступают над поверхностью, образуя заряженные «петли» и «хвосты» [17]. Из литературных данных известно, что процесс иммобилизации белковых макромолекул на поликатионной поверхности определяется в основном суммой электростатических взаимодействий на малых расстояниях, образование водородных связей или гидрофобные взаимодействия не играют решающей роли в этом процессе [18; 19]. С одной стороны, это может приводить к росту количества иммобилизованных молекул, а с другой – к стабилизации белковой структуры, способствуя тем самым увеличению регистрируемого сигнала.

Значения констант взаимодействия конъюгата моноклонального антитела антиПСА-ФИТЦ с комплексом антиПСА-MAT1 – ПСА, иммобилизованным на различных подложках

The values of the interaction constants of the conjugate of the anti PSA-FITC monoclonal antibody with the anti PSA-MAT1 – PSA complex immobilized on various surfaces

Вид подложки	Константа взаимодействия, нмоль/л
Полистирол (контроль)	7,5
Полистирол + монослой поли-L-лизина	6,7
Полистирол + монослой ПДАДМАХ	5,8
Нанопленка серебра + монослой поли-L-лизина	3,2
Нанопленка серебра + монослой ПДАДМАХ	1,5

Наши предположения подтвердились результатами экспериментов с иммобилизацией антиПСА-MAT1 на поверхности серебряных нанопленок, покрытых монослоем поли-L-лизина: отмечено статистически значимое возрастание констант взаимодействия конъюгата моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ

с антигеном в 2,34 раза относительно контроля (полистирол) и в 2,1 раза по сравнению с экспериментом ($p < 0,05$), в котором полистирол был покрыт монослоем поли-L-лизина (см. рис. 3, таблицу).

Подобный результат определяется в первую очередь повышением уровня детекции регистрируемого сигнала благодаря наличию плазмонного резонанса серебряной нанопленки со спектром поглощения антиПСА-ФИТЦ. Иммобилизация антиПСА-MAT1 на поликатионной поверхности поли-L-лизина привела к возрастанию количества иммобилизовавшихся молекул как на поверхности полистирола, так и на поверхности серебряной нанопленки. Это повысило общую чувствительность анализа, но не может считаться ведущим фактором в данном процессе.

Использование в качестве подложки для иммобилизации антиПСА-MAT1 поверхности полистирола, покрытого слоем ПДАДМАХ, привело к статистически значимому возрастанию констант взаимодействия в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (см. рис. 3, таблицу).

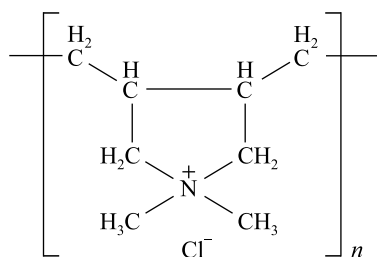


Рис. 4. Структурная организация молекулы ПДАДМАХ

Fig. 4. Structural organization of the PDADMAC molecule

Полиэлектролит ПДАДМАХ представляет собой высокомолекулярный полимер, имеющий пространственно-нелинейный характер и содержащий большое количество заряженных групп благодаря наличию в его структуре пятичленных ароматических колец, включающих четырехвалентный азот (рис. 4).

Согласно литературным данным при средней ионной силе растворителя (что соответствует условиям нашего эксперимента) ПДАДМАХ образует множественные разветвленные антенноподобные цепи и петли, а также формирует структуры, похожие на клубки [20]. При иммобилизации макромолекул ПДАДМАХ на подложке образуется рельефная поверхность с различными выступами, которая обладает высокой плотностью заряда, что создает благоприятные условия для фиксирования молекул иммуноглобулинов (антиПСА-MAT1) [21; 22].

Высокозаряженная поверхность большой площади, с одной стороны, обеспечивает стабильность комплексов ПДАДМАХ – белковая молекула в пространстве, а с другой стороны, может способствовать такому изменению конформации иммобилизованных молекул антител, при котором достигается максимальная аффинность связывания антигенных детерминант в антиген-связывающих центрах антител, что приводит к увеличению значений констант связывания антигена.

Данные теоретические предположения подтверждаются результатами экспериментов, где в качестве твердой фазы была использована серебряная нанопленка, покрытая монослоем ПДАДМАХ. Константа взаимодействия конъюгата антиПСА-ФИТЦ с антигеном статистически значимо возрастает в 5 раз по сравнению с контролем (полистирол) и в 3,9 раза по сравнению с иммобилизацией антиПСА-MAT1 на поверхности полистирола, покрытого монослоем ПДАДМАХ (см. рис. 3, таблицу).

Очевидно, что подобное увеличение значения константы взаимодействия, свидетельствующее о возрастании количества связанных моноклональных антител антиПСА-ФИТЦ с комплексом антиПСА-MAT1 – ПСА на твердой фазе, не только является результатом повышения способности твердой фазы связывать молекулы антител благодаря наличию монослоя ПДАДМАХ, но и отражает влияние сильно-заряженного поликатионного электролита на конформационную динамику молекул антител, находящихся в поливалентном комплексе с антигеном.

Следовательно, наблюдается одновременное протекание двух параллельных процессов: с одной стороны, происходит увеличение поверхностной плотности комплексов антиген – антитело на серебряной нанопленке, что, безусловно, повышает чувствительность данной иммунохимической тест-системы, а с другой стороны, этот эффект становится более выраженным благодаря плазмонному усилению флуоресценции флуорофора антиПСА-ФИТЦ с помощью наночастиц серебра.

Данный результат интересен еще и тем, что при связывании молекул антител на сильнозаряженной поверхности катионного полиэлектролита ПДАДМАХ изменяются их антигенсвязывающие свойства за счет увеличения конформационной подвижности как константных, так и переменных доменов иммуноглобулина, что создает благоприятные условия для формирования пространственно-комплементарных белковых поверхностей комплекса антиген – антитело.

Заключение

При разработке различных иммунохимических тест-систем с использованием пленок из наночастиц серебра важное значение имеет выбор полиэлектролита для покрытия нанослоя серебра, так как физико-химические и электростатические свойства полиэлектролита могут оказывать существенное влияние как на сорбционную емкость твердой фазы, так и на конформационное состояние и функциональную активность иммобилизуемых белковых молекул. От этих параметров в значительной степени

зависит как специфичность, так и чувствительность иммунохимической тест-системы, а также минимально возможные открываемые концентрации биоаналита.

В наших экспериментах наилучшими сорбционными и физико-химическими свойствами обладал комплекс ПДАДМАХ – наночастицы серебра – ПДАДМАХ.

Выяснение молекулярных механизмов взаимодействия полиэлектролит – белок требует дальнейшего исследования и проведения дополнительных экспериментов.

Библиографические ссылки

1. Ахвледиани НД, Алленов СН, Матюхов ИП. Простатспецифический антиген как маркер заболеваний предстательной железы и мишень для лекарственных препаратов (обзор литературы). *Consilium Medicum*. 2017;19(7):35–40. DOI: 10.26442/2075-1753_19.7.35-40.
2. Descotes J-L. Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*. 2019;6(2):129–136. DOI: 10.1016/j.ajur.2018.11.007.
3. Filella X, Foj L. Novel biomarkers for prostate cancer detection and prognosis. In: Schatten H, editor. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*. Cham: Springer; 2018. p. 15–39. (Advances in experimental medicine and biology; volume 1095). DOI: 10.1007/978-3-319-95693-0_2.
4. Filella X, Foj L. Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1784. DOI: 10.3390/ijms17111784.
5. Соловов ВА. Биология простатического специфического антигена и его роль в патогенезе рака простаты. *Вестник Самарского государственного университета. Естественно-научная серия*. 2005;39(5):200–208.
6. Сидоренков АВ, Говоров АВ, Садченко АВ, Пушкарь ДЮ. Диагностическая значимость [-2]proPSA и PHI (обзор литературы). *Онкоурология*. 2014;10(4):87–95. DOI: 10.17650/1726-9776-2014-10-4-87-95.
7. Wu D, Ni J, Beretov J, Cozzi P, Willcox M, Wasinger V, et al. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017;118:15–26. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.002.
8. Salman JW, Schoots IG, Carlsson SV, Jenster G, Roobol MJ. Prostate specific antigen as a tumor marker in prostate cancer: biochemical and clinical aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015;867:93–114. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0_7.
9. Понкратов СВ, Хейфец ВХ, Каган ОФ. Диагностическая ценность простатспецифического антигена с учетом возраста пациентов. *Урологические ведомости*. 2016;6(3):30–39. DOI: 10.17816/uroved6330-39.
10. Чибичян МБ, Черногубова ЕА, Коган МИ. Новые биохимические маркеры рецидива рака предстательной железы после его лечения. *Вестник урологии*. 2013;3:12–19. DOI: 10.21886/2308-6424-2013-0-3-12-19.
11. Сивков АВ, Гурбанов ШШ, Кешишев НГ, Ефремов ГД, Рошин ДА. Внепростатические источники простатического специфического антигена. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2013;3:35–39.
12. Kulakovich O, Strekal N, Artemyev M, Stupak A, Maskevich S, Gaponenko S. Improved method for fluorophore deposition atop a polyelectrolyte spacer for quantitative study of distance-dependent plasmon-assisted luminescence. *Nanotechnology*. 2006;17(20):5201–5206. DOI: 10.1088/0957-4484/17/20/026.
13. Кулакович ОС, Стрекаль НД, Артемьев МВ, Ступак АП, Маскевич СА, Гапоненко СВ. Увеличение чувствительности флуоресцентного анализа с использованием островковых пленок серебра на примере альбумина, меченного ФИТЦ. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2006;73(6):797–800.
14. Guzatov DV, Vaschenko SV, Stankevich VV, Lunevich AY, Glukhov YF, Gaponenko SV. Plasmonic enhancement of molecular fluorescence near silver nanoparticle: theory, modeling, and experiment. *The Journal of Physical Chemistry*. 2012;116(19):10723–10733. DOI: 10.1021/jp301598w.
15. Романенко АА, Ващенко СВ, Станкевич ВВ, Луневич АЯ, Глухов ЮФ, Гапоненко СВ. Плазмонное усиление люминесценции конъюгатов изотиоцианата флуоресцеина и иммуноглобулина человека. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2014;81(2):228–232.
16. Strekal N, Maskevich A, Maskevich S, Jardillier JC, Nabiev I. Selective enhancement of Raman or fluorescence spectra of biomolecules using specifically annealed thick gold films. *Biopolymers*. 2000;57(6):325–328. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)57:6<325::AID-BIP10>3.0.CO;2-7.
17. McGeachy A, Dalchand N, Caudill ER, Li N, Dogangun M, Olenick L, et al. Interfacial electrostatics of poly(vinylamine hydrochloride), poly(diallyldimethylammonium chloride), poly-L-lysine, and poly-L-arginine interacting with lipid bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2018;20(16):10846–10856. DOI: 10.1039/c7cp07353d.
18. Xu X, Angioletti-Uberti S, Lu Y, Dzubiella J, Ballauff M. Interaction of proteins with polyelectrolytes: a comparison between theory and experiment. *Langmuir*. 2019;35(16):5373–5391. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01802.
19. Wang X, Zheng K, Si Y, Guo X, Xu Yi. Protein – polyelectrolyte interaction: thermodynamic analysis based on the titration method. *Polymers*. 2019;11(1):82–100. DOI: 10.3390/polym11010082.
20. Есакова АС, Лаптинская ТВ, Литманович ЕА. Диффузия полидиаллилдиметиламмоний хлорида в водных растворах с добавленной солью. *Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия*. 2010;2:50–56.
21. Semenyuk P, Muronetz P. Protein interaction with charged macromolecules: from model polymers to unfolded proteins and post-translational modifications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1252. DOI: 10.3390/ijms20051252.
22. Gao Sh, Holkar A, Srivastava S. Protein – polyelectrolyte complexes and micellar assemblies. *Polymers*. 2019;11(7):1097. DOI: 10.3390/polym11071097.

References

1. Akhvlediani ND, Allenov SN, Matyukhov IP. Prostate-specific antigen as a marker for prostate diseases and a target for drug therapy (literature review). *Consilium Medicum*. 2017;19(7):35–40. Russian. DOI: 10.26442/2075-1753_19.7.35-40.
2. Descotes J-L. Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*. 2019;6(2):129–136. DOI: 10.1016/j.ajur.2018.11.007.

3. Filella X, Foj L. Novel biomarkers for prostate cancer detection and prognosis. In: Schatten H, editor. *Cell & Molecular Biology of Prostate Cancer*. Cham: Springer; 2018. p. 15–39. (Advances in experimental medicine and biology; volume 1095). DOI: 10.1007/978-3-319-95693-0_2.
4. Filella X, Foj L. Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1784. DOI: 10.3390/ijms17111784.
5. Solovov VA. Biology of prostate-specific antigen. *Vestnik Samarskogo gosudarstvennogo universiteta. Estestvenno-nauchnaya seriya*. 2005;39(5):200–208. Russian.
6. Sidorenkov AV, Govorov AV, Sadchenko AV, Pushkar DYU. Diagnostic value of [-2]proPSA and PHI index (review of literature). *Onkourologiya*. 2014;10(4):87–95. Russian. DOI: 10.17650/1726-9776-2014-10-4-87-95.
7. Wu D, Ni J, Beretov J, Cozzi P, Willcox M, Wasinger V, et al. Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2017;118:15–26. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.002.
8. Salman JW, Schoots IG, Carlsson SV, Jenster G, Roobol MJ. Prostate specific antigen as a tumor marker in prostate cancer: biochemical and clinical aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015;867:93–114. DOI: 10.1007/978-94-017-7215-0_7.
9. Ponkratov SV, Kheyfets VKh, Kagan OF. Diagnostic value of prostate-specific antigen according to age patients. *Urologicheskie vedomosti*. 2016;6(3):30–39. Russian. DOI: 10.17816/uroved6330-39.
10. Chibichyan MB, Chernogubova EA, Kogan MI. New biochemical markers of recurrence of prostate cancer after his treatment. *Vestnik urologii*. 2013;3:12–19. Russian. DOI: 10.21886/2308-6424-2013-0-3-12-19.
11. Sivkov AV, Gurbanov ShSh, Keshishev NG, Efremov GD, Roshin DA. Extraprostatic sources of the prostate specific antigen. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2013;3:35–39. Russian.
12. Kulakovich O, Strekal N, Artemyev M, Stupak A, Maskevich S, Gaponenko S. Improved method for fluorophore deposition atop a polyelectrolyte spacer for quantitative study of distance-dependent plasmon-assisted luminescence. *Nanotechnology*. 2006;17(20):5201–5206. DOI: 10.1088/0957-4484/17/20/026.
13. Kulakovich OS, Strekal' ND, Artem'ev MV, Stupak AP, Maskevich SA, Gaponenko SV. [Improved fluorescent assay sensitivity using silver island films: fluorescein isothiocyanate-labeled albumin as an example]. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2006;73(6):797–800. Russian.
14. Guzatov DV, Vaschenko SV, Stankevich VV, Lunevich AY, Glukhov YF, Gaponenko SV. Plasmonic enhancement of molecular fluorescence near silver nanoparticles: theory, modeling, and experiment. *The Journal of Physical Chemistry*. 2012;116(19):10723–10733. DOI: 10.1021/jp301598w.
15. Ramanenka AA, Vaschenko SV, Stankevich VV, Lunevich AY, Glukhov YF, Gaponenko SV. Plasmonic enhancement of luminescence of conjugates of fluorescein isothiocyanate and human immunoglobulin. *Zhurnal prikladnoi spektroskopii*. 2014;81(2):228–232. Russian.
16. Strekal N, Maskevich A, Maskevich S, Jardillier JC, Nabiev I. Selective enhancement of Raman or fluorescence spectra of biomolecules using specifically annealed thick gold films. *Biopolymers*. 2000;57(6):325–328. DOI: 10.1002/1097-0282(2000)57:6<325::AID-BIP10>3.0.CO;2-7.
17. McGeachy A, Dalchand N, Caudill ER, Li N, Dogangun M, Olenick L, et al. Interfacial electrostatics of poly(vinylamine hydrochloride), poly(diallyldimethylammonium chloride), poly-L-lysine, and poly-L-arginine interacting with lipid bilayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2018;20(16):10846–10856. DOI: 10.1039/c7cp07353d.
18. Xu X, Angioletti-Uberti S, Lu Y, Dzubiella J, Ballauff M. Interaction of proteins with polyelectrolytes: a comparison between theory and experiment. *Langmuir*. 2019;35(16):5373–5391. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b01802.
19. Wang X, Zheng K, Si Y, Guo X, Xu Yi. Protein – polyelectrolyte interaction: thermodynamic analysis based on the titration method. *Polymers*. 2019;11(1):82–100. DOI: 10.3390/polym11010082.
20. Yesakova AS, Laptinskaya TV, Litmanovich EA. DLS study of diffusion of poly(diallyldimethylammonium chloride) in water solutions with added salt. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 3. Fizika. Astronomiya*. 2010;2:50–56. Russian.
21. Semenyuk P, Muronetz P. Protein interaction with charged macromolecules: from model polymers to unfolded proteins and post-translational modifications. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(5):1252. DOI: 10.3390/ijms20051252.
22. Gao Sh, Holkar A, Srivastava S. Protein – polyelectrolyte complexes and micellar assemblies. *Polymers*. 2019;11(7):1097. DOI: 10.3390/polym11071097.

Статья поступила в редколлегию 30.06.2020.
Received by editorial board 30.06.2020.

УДК 595.782(476)

ПЕРВАЯ РЕГИСТРАЦИЯ *PHYLLONORYCTER* *MAESTINGELLA* (MÜLLER, 1764) НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Ф. В. САУТКИН¹⁾, О. В. СИНЧУК¹⁾, С. В. БАРЫШНИКОВА²⁾

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

²⁾Зоологический институт Российской академии наук,
Университетская наб., 1, 199034, г. Санкт-Петербург, Россия

Обследования зеленых насаждений в целях выявления представителей рода *Phyllonorycter* Hübner, 1822 (Lepidoptera: Gracillariidae, Lithocolletinae), повреждающих древесные растения в условиях Беларуси, позволили обнаружить новый для местной фауны вид – буковую моль-пестрянку (*Phyllonorycter maestingella* (Müller, 1764)). Впервые этот специализированный фитофаг буков был отмечен в 2014 г. в Минске (leg. Ф. В. Сауткин). В Беларуси гусеницы *Ph. maestingella* минируют листовые пластинки буков европейского (*Fagus sylvatica* Linnaeus, 1753), крупнолистного (*Fagus grandifolia* Ehrhart, 1788) и восточного (*Fagus orientalis* Lipsky (1898)). Бук крупнолистный в качестве кормового растения буковой моли-пестрянки указывается впервые. Данный вид подсемейства Lithocolletinae является чужеродным для фауны страны, так как все представители рода *Fagus* L. интродуцированы в Беларусь.

Ключевые слова: чужеродные виды; минирующие чешуекрылые; буковая моль-пестрянка; фитофаги; зеленые насаждения; Gracillariidae; Lithocolletinae.

Благодарность. Работа С. В. Барышниковой выполнена в рамках темы государственного задания № АААА-А19-119020690101-6.

Образец цитирования:

Сауткин ФВ, Синчук ОВ, Барышникова СВ. Первая регистрация *Phyllonorycter maestingella* (Müller, 1764) на территории Беларуси. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:81–87.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-81-87>

For citation:

Sautkin FV, Sinchuk AV, Baryshnikova SV. First record of *Phyllonorycter maestingella* (Müller, 1764) in Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:81–87. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-81-87>

Авторы:

Федор Викторович Сауткин – доцент кафедры зоологии биологического факультета.

Олег Викторович Синчук – заместитель начальника Главного управления науки – начальник отдела организации и сопровождения инновационной деятельности, руководитель студенческой научно-исследовательской лаборатории структуры и динамики биоразнообразия, старший преподаватель кафедры зоологии биологического факультета.

Светлана Владимировна Барышникова – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории систематики насекомых.

Authors:

Fedor V. Sautkin, associate professor at the department of zoology, faculty of biology.

fvsautkin@gmail.com

Aleh V. Sinchuk, deputy head of the General Directorate of Science – head of the department of organization and support of innovation activities and head of the student research laboratory of structure and dynamics of biodiversity and senior lecturer at the department of zoology, faculty of biology.

aleh.sinchuk@gmail.com

Svetlana V. Baryshnikova, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of insect taxonomy.

parornix@zin.ru

FIRST RECORD OF *PHYLLONORYCTER* *MAESTINGELLA* (MÜLLER, 1764) IN BELARUS

F. V. SAUTKIN^a, A. V. SINCHUK^a, S. V. BARYSHNIKOVA^b

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

^bZoological Institute, Russian Academy of Sciences,

1 Universitetskaya Embankment, Saint Petersburg 199034, Russia

Corresponding author: A. V. Sinchuk (aleh.sinchuk@gmail.com)

Inspection of green stands in order to identify representatives of the genus *Phyllonorycter* Hübner, 1822 (Lepidoptera: Gracillariidae, Lithocolletinae), which damage woody plants in Belarus, revealed a new species for the fauna – beech midges (*Phyllonorycter maestingella* (Müller, 1764)). In 2014 we discovered this new invasive insect pest of the beeches (*Fagus* spp.) in Belarus for the first time. During 2014–2018 leaf mines of *Ph. maestingella* were recorded in 2 localities, Minsk and Brest, on 3 hostplant species, *Fagus sylvatica* Linnaeus, 1753, *Fagus grandifolia* Ehrhart, 1788, and *Fagus orientalis* Lipsky (1898). It is important to note that American beech (*F. grandifolia*) is recorded as a new host plant for *Ph. maestingella*. A list of points of registrations is given. This species of Lithocolletinae is alien to the fauna, since all representatives of the genus *Fagus* L. are introduced into Belarus.

Keywords: alien species; leaf miners; Lepidoptera; beech; green areas; Gracillariidae; Lithocolletinae.

Acknowledgements. The research of S. V. Baryshnikova performed in the framework of the theme of state assignment No. AAAA-A19-119020690101-6.

Введение

В настоящее время в Палеарктике зарегистрировано свыше 270 видов рода *Phyllonorycter* Hübner, 1822 (Lepidoptera: Gracillariidae, Lithocolletinae)¹. Для территории Беларуси к настоящему времени известны 38 видов [1–10]. Однако следует отметить, что эти данные, не всегда подтвержденные коллекционным материалом, нуждаются в уточнении.

В 1960-х гг. в стране впервые была обнаружена тополевая моль *Phyllonorycter populifoliella* (Treitschke, 1833) [1]. В каталоге чешуекрылых Беларуси [2, с. 16–17] представлены 7 видов: *Phyllonorycter blancardella* (Fabricius, 1781), *Phyllonorycter corylifoliella* (Hübner, 1796), *Phyllonorycter emberizaepennella* (Bouche, 1834), *Phyllonorycter klemannella* (Fabricius, 1781), *Phyllonorycter quercifoliella* (Zeller, 1839), *Phyllonorycter rajella* (Linnaeus, 1758), *Phyllonorycter sorbi* (Frey, 1855). Еще 1 вид – *Phyllonorycter cavella* (Zeller, 1846) – приведен для Беларуси в справочнике «Насекомые и клещи – вредители сельскохозяйственных культур» [3]. Наиболее полной работой по видовому разнообразию микрочешуекрылых рода *Phyllonorycter* является «Краткий каталог минирующих молей семейства Gracillariidae фауны России и сопредельных стран», где для Беларуси впервые указан еще 21 вид [4]: *Phyllonorycter acaciella* (Duponchel, 1843), *Phyllonorycter acerifoliella* (Zeller, 1839), *Phyllonorycter apparella* (Herrich-Schäffer, 1855), *Phyllonorycter cerasicolella* (Herrich-Schäffer, 1855), *Phyllonorycter coryli* (Nicelli, 1851), *Phyllonorycter cydoniella* ([Denis & Schiffermüller], 1775), *Phyllonorycter insignitella* (Zeller, 1846), *Phyllonorycter junoniella* (Zeller, 1846), *Phyllonorycter kuhlweiniella* (Zeller, 1839), *Phyllonorycter messaniella* (Zeller, 1846), *Phyllonorycter muelleriella* (Zeller, 1839), *Phyllonorycter nicellii* (Stainton, 1851), *Phyllonorycter nigrescentella* (Logan, 1851), *Phyllonorycter oxyacanthae* (Frey, 1855), *Phyllonorycter pastorella* (Zeller, 1846), *Phyllonorycter pyrifoliella* (Gerasimov, 1933), *Phyllonorycter sagitella* (Bjerkander, 1790), *Phyllonorycter salicicolella* (Sircom, 1848), *Phyllonorycter salictella* (Zeller, 1846), *Phyllonorycter spinicolella* (Zeller, 1846), *Phyllonorycter ulmifoliella* (Hübner, 1817). Следует отметить, что в рамках настоящей статьи мы сохранили пока статус самостоятельного вида для *Phyllonorycter pyrifoliella* (Gerasimov, 1933), а также используем название *Phyllonorycter cydoniella* ([Denis & Schiffermüller], 1775) для материала из Беларуси, а не относим его к *Phyllonorycter hostis* Triberti, 2007.

Липовую моль-пестрянку (*Phyllonorycter issikii* (Kumata, 1963)) впервые указали для территории Беларуси Я. Бушко и А. Мазуркевич [5], затем она была приведена в качестве вредителя зеленых насаждений в статье Т. В. Прокопович [6]. В работе С. И. Евдошенко и Ф. В. Сауткина [7] представлены 4 новых для фауны Беларуси вида: *Phyllonorycter comparella* (Duponchel, [1843]), *Phyllonorycter joan-nisi* (Le Marchand, 1936), *Phyllonorycter roboris* (Zeller, 1839), *Phyllonorycter tristrigella* (Haworth, 1828). Ранее входивший в род *Phyllonorycter* вид *Macrosaccus robiniella* (Clemens, 1859) впервые обнаружен

¹de Prins J., de Prins W. Global taxonomic database of Gracillariidae (Lepidoptera) 2006–2019 [Electronic resource]. URL: <http://www.gracillariidae.net> (date of access: 12.10.2017).

в 2011 г. С. И. Евдошенко в окрестностях д. Селяхи (Брестский район, Брестская область) и Ф. В. Сауткиным в г. Гродно [7; 8], а также независимо от них Ю. И. Гниненко в г. Минске [9]. Таким образом, до недавнего времени для Беларуси указывались 35 видов рода *Phyllonorycter* и 1 представитель рода *Macrosaccus* Davis & De Prins, 2011.

В опубликованный в 2019 г. каталог [10], суммировавший информацию о зарегистрированных на территории Беларуси чешуекрылых, включены все вышеупомянутые виды, а также *Phyllonorycter harisella* (Linnaeus, 1761) и *Phyllonorycter strigulatella* (Lienig et Zeller, 1846) на основании старых литературных данных и *Phyllonorycter esperella* (Goeze, 1783), предварительно идентифицированный по повреждениям. Нахождение этих 3 видов вполне вероятно.

На протяжении последнего столетия наблюдается активная экспансия видов подсемейства Lithocolletinae на территории Европы [11]. Основной предпосылкой к их широкому распространению послужили интродукция растений и занос молей-пестрянок на преимагинальных (чаще – гусеницы, реже – куколки) стадиях. В условиях Беларуси 3 вида инвазивных молей-пестрянок данного подсемейства – *Phyllonorycter issikii* (Kumata, 1963), *Macrosaccus robiniella* (Clemens, 1859) и *Cameraria ohridella* Deschka & Dimić, 1986 – сильно вредят зеленым насаждениям и на этом основании включены в издание «Черная книга инвазивных видов животных Беларуси» [12]. При этом *Ph. issikii* и *M. robiniella* происходят из географически удаленных по отношению к территории Беларуси регионов земного шара – Дальнего Востока и Северной Америки соответственно. Вопрос же установления балканского происхождения *C. ohridella* долгое время был предметом научных дискуссий [13; 14]. В связи с этим немаловажным является изучение путей проникновения и расселения новых чужеродных для региональной фауны видов минирующих филлофагов подсемейства Lithocolletinae, в частности видов рода *Phyllonorycter*, что и стало целью данной работы.

Материалы и методы исследования

В основу настоящей статьи легли оригинальные энтомологические и гербарные материалы, полученные в ходе обследований зеленых насаждений в 2014–2018 гг. на территории всех ландшафтно-географических провинций [15], лесорастительных зон [16] и районов интродукции древесных растений [17], а также всех административных областей Республики Беларусь.

В зависимости от климатических условий географических локалитетов сбор материала начинался в апреле – мае и завершался в октябре – ноябре с установлением среднесуточной температуры 0 °С. Поврежденные минирующими филлофагами листовые пластинки коллектировали для дальнейшей камеральной обработки в лабораторных условиях. Для того чтобы исключить быструю потерю влаги и последующее высыхание минированных листовых пластинок, сборы помещали в герметичные полиэтиленовые пакеты с замком типа *zipper* (*zip-lock*). Поврежденный филлофагами материал для определения формы и площади повреждений на каждой стадии развития гусениц фиксировали с использованием принятых в гербарном деле методик [18]. Предварительную видовую идентификацию филлофагов осуществляли по повреждениям растений с помощью соответствующих ключей² [19]. Проверку правильности идентификации вида по повреждениям проводили по выведенным из минированных листовых пластинок экземплярам имаго с применением определительных ключей³ [20; 21]. Спектр кормовых растений инвазивных молей-пестрянок рода *Phyllonorycter* исследовали по листовым пластинкам с видоспецифичными повреждениями. Видовую принадлежность древесных растений устанавливали с использованием соответствующих определительных таблиц [22; 23].

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных исследований впервые в Беларуси была обнаружена буковая моль-пестрянка (*Phyllonorycter maestingella* (Müller, 1764)) (см. рисунок а). Естественный ареал данного вида охватывает юго-запад (Карпаты) и юг европейской части бывшего СССР, Закавказье, Турцию, а также регионы Западной, Центральной и Южной Европы [20; 24] в пределах области произрастания бука [25]. На территории России *Ph. maestingella* отмечается в Калининградской области. Кроме того, буковая моль-пестрянка зарегистрирована в Крыму [20; 26]. Также вид известен для Польши [27], Литвы [28] и Латвии [29]. В 2001 г. он был обнаружен в Финляндии, куда, вероятно, осуществил инвазию [30]. Помимо этого, буковая моль-пестрянка зарегистрирована на западе Канады (Британская Колумбия) [31].

²Ellis W. N. Leafminers and plant galls of Europe [Electronic resource]. URL: <http://www.bladmineerders.nl> (date of access: 12.10.2017); British Leafminers [Electronic resource]. URL: <http://www.leafmines.co.uk> (date of access: 22.10.2017).

³Key to the Lithocolletinae of North-West Europe [Electronic resource]. URL: https://determineren.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/matrixkey/index.php?epi=9 (date of access: 22.10.2017).



Буковая моль-пестрянка (*Phyllonorycter maestingella* (Müller, 1764)):
а – имаго (16.07.2018, г. Брест, Парк культуры и отдыха имени 1 Мая, 52°5'36,9" с. ш., 23°40'32,5" в. д., на *Fagus sylvatica*, leg. О. В. Синчук);
б – мина, т. е. вызываемое личинкой повреждение (23.08.2017, г. Минск, ЦБС НАН Беларуси, 53°54'50,6" с. ш., 27°36'39,9" в. д., на *Fagus sylvatica*, leg. О. В. Синчук)

Fig. 1. *Phyllonorycter maestingella* (Müller, 1764):
а – imago (16.07.2018, Brest, May 1 Park of Culture and Leisure, 52°5'36.9" N, 23°40'32.5" E, on *Fagus sylvatica*, leg. A. V. Sinchuk);
b – mine, i. e. damage caused by the larva (23.08.2017, Minsk, Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 53°54'50.6" N, 27°36'39.9" E, on *Fagus sylvatica*, leg. A. V. Sinchuk)

Первая находка мин *Ph. maestingella* сделана в Минске в 2014 г. (10.07.2014, 53°91'49,2" с. ш., 27°61'22,5" в. д., leg./col./det. Ф. В. Сауткин) в условиях арборетума Центрального ботанического сада (ЦБС) НАН Беларуси на буке европейском (*Fagus sylvatica* Linnaeus, 1753). Повторно данный вид отмечен в ЦБС НАН Беларуси в 2015 г. (28.06.2015, 53°54'50,6" с. ш., 27°36'39,9" в. д., leg./col./det. О. В. Синчук) также на буке европейском. Обследование зеленых насаждений в 2017 г. позволило выявить *Ph. maestingella* в Бресте (13.08.2017, 52°5'36,8" с. ш., 23°40'32,4" в. д., leg./col./det. О. В. Синчук) на буке европейском. Следует отметить, что при проведении целенаправленных исследований на протяжении полевых сезонов 2015–2016 гг. лёта имаго и наносимые гусеницами буковой моли-пестрянки растениям-хозяевам повреждения в условиях Бреста не наблюдались.

Предположительно, вид мог проникнуть на территорию Беларуси ранее. Его инвазия в страну и распространение здесь, по-видимому, происходили с заселенным этим фитофагом посадочным материалом. Самостоятельное расселение буковой моли-пестрянки в регионе затруднено низкой плотностью произрастания различных видов буков (*Fagus* spp.), являющихся кормовыми растениями для его гусениц, к тому же общая площадь буковых насаждений составляет всего 153,5 га [32].

Чаще всего в зеленых насаждениях отмечается бук европейский, который, как и все другие представители рода *Fagus*, в Беларуси является интродуцентом. Впервые *F. sylvatica* указывался для окрестностей Гродно И. Жилибером [33], т. е. уже с XVIII в. он присутствовал в насаждениях населенных пунктов. Однако распространения на территории Беларуси данная древесная порода не получила и к настоящему времени отмечается только в городах и приусадебных парках. Наиболее широко бук представлен в северном регионе [32], где возможно и самостоятельное расселение *Ph. maestingella*. Так, на Витебскую область приходится 48,4 % зарегистрированных мест его произрастания и 66,6 % площади. Чаще здесь встречается бук лесной. Более всего он распространен в Браславском (36 мест произрастания), Глубокском (11) и Докшицком (7) районах, на долю которых приходится 89,3 % площади, занимаемой этим деревом в области. В Минской области зарегистрировано 16 мест произрастания данного вида, 50 % которых расположены в Борисовском районе. В Брестской области вид отмечен в 9 районах, где обнаружено 24 места его произрастания, половина из которых приходятся на Брестский, Ганцевичский и Каменецкий районы. На остальной территории несколько шире бук представлен в Волковысском (10 мест, или 91 % количества буковых деревьев в Гродненской области) и Климовичском (12 мест, или 92,3 % числа буковых деревьев в Могилёвской области) районах [32]. Таким образом, дальнейшее распространение чужеродного вида на территории Беларуси возможно только антропохорным путем, например с посадочным материалом.

В естественно-исторически сложившемся (первичном) ареале буковая моль-пестрянка питается на буках европейском, городчатом (*Fagus crenata* Blume, 1851) и восточном (*Fagus orientalis* Lipsky (1898)) [11]. Также имеются литературные данные о возможности развития личинок *Ph. maestingella* на буке японском (*Fagus sieboldii* Blume)⁴ [34]. Хотя Ф. Гроенен [35] нашел мины на глицинии (*Wisteria*

⁴Key to the Lithocolletinae of North-West Europe [Electronic resource]. URL: https://determineren.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/matrixkey/index.php?epi=9 (date of access: 22.10.2017).

floribunda (Willd.) DC.) и корректность идентификации вида была подтверждена экспериментальным размножением, этот феномен пока представляется случайностью. В определителе насекомых европейской части СССР отмечается питание буковой моли-пестрянки на дубе (*Quercus* sp.) [24], но и для указанного факта пока подтверждений нет.

В условиях Беларуси гусеницы буковой моли-пестрянки зарегистрированы на 3 видах буков: европейском, крупнолистном (*Fagus grandifolia* Ehrhart, 1788) (09.10.2017, ЦБС НАН Беларуси, leg./col./det. О. В. Синчук) и восточном (09.10.2017, ЦБС НАН Беларуси, leg./col./det. О. В. Синчук). Питание на других видах растений в Беларуси не отмечалось. Несмотря на то что имеющий североамериканское происхождение бук крупнолистный давно культивируется в Европе, это первая регистрация данного кормового растения для *Ph. maestingella*.

Личинки буковой моли-пестрянки образуют складчатые повреждения – мины (см. рисунок б) на нижней стороне листовых пластинок. Мины располагаются между боковыми жилками, имеют светло-коричневую окраску и стянуты посередине.

Заключение

Таким образом, в результате выполненных исследований обнаружен новый для фауны Беларуси вид – *Ph. maestingella*. На данный момент этот чужеродный для местной фауны фитофаг отмечен только в Минске и Бресте. Питание личинок буковой моли-пестрянки установлено на 3 видах буков: европейском (*F. sylvatica*), крупнолистном (*F. grandifolia*) и восточном (*F. orientalis*). При этом бук крупнолистный в качестве кормового растения для *Ph. maestingella* указывается впервые. Самостоятельное распространение данного филлофага в Беларуси затруднено, поскольку плотность произрастания кормовых растений невысока. Представляется, что основной предпосылкой к расселению этого минирующего филлофага в регионе выступают транспортировка и посадка заселенного им материала. Исходя из узости трофической специализации и локального характера регистрации в условиях Беларуси, в настоящее время буковая моль-пестрянка не может быть отнесена к числу инвазивных видов, оказывающих существенное влияние на состояние зеленых насаждений, но должна рассматриваться здесь как адвентивный вид. По результатам исследований список представителей рода *Phyllonorycter* пополнился еще 1 видом и на данный момент насчитывает 39 видов.

Библиографические ссылки

1. Горленко СВ, Панько НА. Вредители и болезни интродуцированных растений. Минск: Наука и техника; 1967. 136 с.
2. Мержеевская ОИ, Литвинова АН, Молчанова РВ. Чешуекрылые (Lepidoptera) Белоруссии. Каталог. Минск: Наука и техника; 1976. 132 с.
3. Кузнецов ВИ, редактор. Насекомые и клещи – вредители сельскохозяйственных культур. Том 3. Чешуекрылые. Часть 2. Санкт-Петербург: Наука; 1999. 410 с.
4. Кузнецов ВИ, Барышникова СВ. Краткий каталог минирующих молей сем. Gracillariidae (Lepidoptera) фауны России и сопредельных стран. Труды Зоологического института Российской академии наук. 1998;274:1–60.
5. Buszko J, Mazurkiewicz A. Rapid expansion of *Phyllonorycter issikii* (Mats.) (Lep. Gracillariidae) in Poland. In: Dall'Asta U. The SEL 11th European congress of lepidopterology; 1998 March 22–26; Malle, Belgium. Leiden: Backhuys; 1998. p. 37. (Mémoires de la Société Royale Belge d'Entomologie; volume 38).
6. Прокопович ТВ. О видовом составе вредителей городских зеленых насаждений. Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия 1. Лесное хозяйство. 2008;16:388–391.
7. Евдошенко СИ, Сауткин ФВ. Моли-пестрянки (Lepidoptera: Gracillariidae) – вредители декоративных деревьев и кустарников зеленых насаждений Беларуси. Часть 1. Подсемейство Lithocolletinae. Вестник Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Серыя 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. 2012;3:128–135.
8. Сауткин ФВ, Евдошенко СИ. Современное распространение в условиях Беларуси инвазивных видов минирующих молей (Lepidoptera: Gracillariidae) – филлофагов-минеров белой акации (*Robinia pseudoacacia*). Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География. 2012;1:103–104.
9. Гниненко ЮИ. Белоакациевая нижнесторонняя минирующая моль-пестрянка *Phyllonorycter robiniella* – первая находка в Минске. Земляробства і ахова раслін. 2011;5(78):34–35.
10. Pisanenko A, Švitra G, Piskunov V. Checklist of Lepidoptera recorded from Belarus. Copenhagen: Lepidopterologisk Forening; 2019. 128 p.
11. Šefrová H. Invasions of Lithocolletinae species in Europe – causes, kinds, limits and ecological impact (Lepidoptera, Gracillariidae). Ekológia (Bratislava). 2003;22(2):132–142.
12. Алехнович АВ, Буга СВ, Дробенков СМ, составители; Семенченко ВП, редактор. Черная книга инвазивных видов животных Беларуси. Минск: Беларуская навука; 2016. 105 с.
13. Grabenweger G, Grill R. On the place of origin of *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic (Lepidoptera: Gracillariidae). Beitrage zur Entomofaunistik. 2000;1:9–17.
14. Valade R, Kenis M, Hernandez-Lopez A, Augustin S, Mena NM, Magnoux E, et al. Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). Molecular ecology. 2009;18(6):3458–3470. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04290.x.

15. Марцинкевич ГИ, Клицунова НК, Счастливая ИИ, Якушко ОФ. Теоретические проблемы и результаты комплексного географического районирования территории Беларуси. *Выбранные научные работы Белорусского государственного университета*. 2001;7:333–356.
16. Юркевич ДИ, Голод ДС, Адерихо ВС. *Растительность Белоруссии, ее картографирование, охрана и использование*. Минск: Наука и техника; 1979. 248 с.
17. Нестерович НД. *Интродукционные районы и древесные растения для зеленого строительства в Белорусской ССР*. Минск: Наука и техника; 1982. 109 с.
18. Бридсон Д, Форман Л, редакторы; Еремеева Е, Соколова И, Гельтман ДВ, переводчики. *Гербарное дело. Справочное руководство*. Кью: Королевский ботанический сад; 1995. 360 с.
19. Alford DV. *Pests of ornamental trees, shrubs and flowers. A color handbook*. 2nd edition. Boston: Academic Press; 2012. 480 p. DOI: 10.1016/C2011-0-06146-X.
20. Барышникова СВ. Обзор экологической группировки видов рода *Phyllonorycter* Hübner, [1822] (Lepidoptera, Gracillariidae: Lithocolletinae), связанной с растениями семейства буковых. *Энтомологическое обозрение*. 2012;91(1):106–131.
21. Nel J, Varenne T. *Atlas des Lépidoptères Gracillariidae Lithocolletinae de France*. Perpignan: Association Roussillonnaise d'Entomologie; 2014. 144 p. (Revue Association Roussillonnaise d'Entomologie (R.A.R.E.) supplement; volume 23).
22. Цвелев НН, редактор. *Флора европейской части СССР (Флора Восточной Европы). Том 11. Покрытосеменные: двудольные*. Москва: Товарищество научных изданий КМК; 2004. 536 с.
23. Соколов СЯ. *Деревья и кустарники СССР. Том 2. Покрытосеменные*. Москва: Издательство Академии наук СССР; 1951. 611 с.
24. Кузнецов ВИ. Сем. Gracillariidae (Lithocolletidae) – моли-пестрянки. В: Медведев ГС, редактор. *Определитель насекомых европейской части СССР. Том 4. Чешуекрылые. Часть 2*. Ленинград: Наука; 1981. с. 149–311.
25. Houston Durrant T, de Rigo D, Gaudullo G. *Fagus sylvatica* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayaz J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A, editors. *European atlas of forest tree species*. Luxembourg: Publication Office of the European Union; 2016. p. 94–95.
26. Барышникова СВ. Gracillariidae. В: Синёв СЮ, редактор. *Каталог чешуекрылых (Lepidoptera) России*. 2-е издание. Санкт-Петербург: Зоологический институт РАН; 2019. с. 36–43.
27. Skrzypczyńska M. Wstępne badania gęstości populacji gatunków wywołujących wyrośla i miny na liściach buka pospolitego *Fagus sylvatica* L. w Polsce. *Polskie Pismo Entomologiczne*. 1983;53:425–429.
28. Ivinskis P. *Lepidoptera of Lithuania. Annotated catalogue*. Vilnius: [s. n.]; 2004. 216 p.
29. Savenkov N, Šulcs I. *Latvian Lepidoptera catalogue*. Tallinn: Estonian Lepidopterologists' Society; 2010. 176 p.
30. Mutanen M, Nupponen K. Noteworthy records of Finnish Microlepidoptera (Micropterygidae – Pyralidae) in 2001. *Baptria*. 2003;28(4):6–14.
31. Pohl GR, Cannings RA, Landry J-F, Holden DG, Scudder GGE. *Checklist of the Lepidoptera of British Columbia, Canada. Entomological Society of British Columbia occasional paper No. 3*. [S. l.]: Lulu Publishing Service; 2015. 294 p.
32. Масловский ОМ, Левкович АВ, Сысой ИП, Колесникова МП, Родионов ПА, Чумаков ЛС и др. *Государственный кадастр растительного мира Республики Беларусь. Основы кадастра. Первичное обследование 2002–2017 гг.* Пугачевский АВ, редактор. Минск: Беларуская навука; 2019. 599 с.
33. Севергин ВМ. *Записки путешествия по западным провинциям Российского государства, или Минералогические, хозяйственные и другие примечания, учиненные во время проезда через оные в 1802 г. академиком Василием Севергиным*. Санкт-Петербург: При Императорской Академии наук; 1803. 224 с.
34. Buhr H. Mecklenburgische Minen. III. Lepidopteren-Minen. *Stettiner entomologische Zeitung*. 1935;96(1):131–159.
35. Groenen F. *Wisteria floribunda*, een nieuwe voedselplant voor *Phyllonorycter maestingella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Entomologische Berichten*. 1996;56(3):60.

References

1. Gorlenko SV, Pan'ko NA. *Vrediteli i bolezni introdutsirovannykh rastenii* [Pests and diseases of introduced plants]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1967. 136 p. Russian.
2. Merzheevskaya OI, Litvinova AN, Molchanova RV. *Cheshuekrylye (Lepidoptera) Belorussii. Katalog* [Lepidoptera of Belarus. Catalog]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1976. 132 p. Russian.
3. Kuznetsov VI, editor. *Nasekomye i kleshchi – vrediteli sel'skokhozyaystvennykh kul'tur. Tom 3. Cheshuekrylye. Chast' 2* [Insects and ticks – pests of crops. Volume 3. Lepidoptera. Part 2]. Saint Petersburg: Nauka; 1999. 410 p. Russian.
4. Kuznetsov VI, Baryshnikova SV. [Short catalog of mining moles Gracillariidae (Lepidoptera) fauna of Russia and neighboring countries]. *Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences*. 1998;274:1–60. Russian.
5. Buszko J, Mazurkiewicz A. Rapid expansion of *Phyllonorycter issikii* (Mats.) (Lep. Gracillariidae) in Poland. In: Dall'Asta U. *The SEL 11th European congress of lepidopterology; 1998 March 22–26; Malle, Belgium*. Leiden: Backhuys; 1998. p. 37. (Mémoires de la Société Royale Belge d'Entomologie; volume 38).
6. Prokopovich TV. [On the species composition of pests of urban green spaces]. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya 1. Lesnoe khozyaystvo*. 2008;16:388–391. Russian.
7. Evdoshenko SI, Sautkin FV. [Gracillariidae are pests of ornamental trees and shrubs of green spaces of Belarus. Part 1. Subfamily Lithocolletinae]. *Vesnik Grodzenskaga dzjarzhavnaga wniversiteta imja Janki Kupaly. Seriya 5. Jekonomika. Sacyjalogija. Bijalogija*. 2012;3:128–135. Russian.
8. Sautkin FV, Evdoshenko SI. Invasive species of leaf-mining (Lepidoptera: Gracillariidae) – pests of the black locust (*Robinia pseudoacacia*) and their distribution in Belarus. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2012;1:103–104. Russian.
9. Gninenko YuI. White acacia lower-side mining clearwing moth *Phyllonorycter robiniella* – the first godsend in Minsk. *Agriculture and plant protection*. 2011;5(78):34–35. Russian.
10. Pisanenko A, Švitra G, Piskunov V. *Checklist of Lepidoptera recorded from Belarus*. Copenhagen: Lepidopterologisk Forening; 2019. 128 p.

11. Šefrová H. Invasions of Lithocolletinae species in Europe – causes, kinds, limits and ecological impact (Lepidoptera, Gracillariidae). *Ekológia (Bratislava)*. 2003;22(2):132–142.
12. Alehnovich AV, Buga SV, Drobenkov SM, compilers; Semenchenko VP, editor. *Chernaya kniga invazivnykh vidov zivotnykh Belarusi* [Black book of invasive animal species of Belarus]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2016. 105 p. Russian.
13. Grabenweger G, Grill R. On the place of origin of *Cameraria ohridella* Deschka & Dimic (Lepidoptera: Gracillariidae). *Beiträge zur Entomofaunistik*. 2000;1:9–17.
14. Valade R, Kenis M, Hernandez-Lopez A, Augustin S, Mena NM, Magnoux E, et al. Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Molecular ecology*. 2009;18(6):3458–3470. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04290.x.
15. Martsinkevich GI, Klitsunova NK, Schastnaya II, Yakushko OF. [Theoretical problems and the results of complex geographical zoning of the territory of Belarus]. *Vybranyja navukovyja pracy Belaruskaga dzjarzhawnaga wniversitjeta*. 2001;7:333–356. Russian.
16. Yurkevich DI, Golod DS, Aderikho VS. *Rastitel'nost' Belorussii, ee kartografirovanie, okhrana i ispol'zovanie* [Vegetation of Belarus, its mapping, protection and use]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1979. 248 p. Russian.
17. Nesterovich ND. *Introdukcionnye raiony i drevesnye rastenija dlya zelenogo stroitel'stva v Belorusskoi SSR* [Introduction areas and woody plants for green building in the Byelorussian SSR]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1982. 109 p. Russian.
18. Bridson DM, Forman L, editors. *The herbarium handbook*. Kew: Royal Botanic Gardens; 1989. 214 p.
Russian edition: Bridson D, Forman L, editors; Eremeeva E, Sokolova I, Gel'tman DV, translators. *Gerbarnoe delo. Spravochnoe rukovodstvo*. Kew: Korolevskii botanicheskii sad; 1995. 360 p.
19. Alford DV. *Pests of ornamental trees, shrubs and flowers. A color handbook*. 2nd edition. Boston: Academic Press; 2012. 480 p. DOI: 10.1016/C2011-0-06146-X.
20. Baryshnikova SV. [A review of the ecological grouping of species of the genus *Phyllonorycter* Hübner, [1822] (Lepidoptera, Gracillariidae: Lithocolletinae) associated with plants of the beech family]. *Entomologicheskoe obozrenie*. 2012;91(1):106–131. Russian.
21. Nel J, Varenne T. *Atlas des Lépidoptères Gracillariidae Lithocolletinae de France*. Perpignan: Association Roussillonnaise d'Entomologie; 2014. 144 p. (Revue Association Roussillonnaise d'Entomologie (R.A.R.E.) supplement; volume 23).
22. Tselev NN, editor. *Flora evropeiskoi chasti SSSR (Flora Vostochnoi Evropy). Tom 11. Pokrytosemnyye: dvudol'nye* [Flora of the European part of the USSR (Flora of Eastern Europe). Volume 11. Angiosperms: Dicotyledonous]. Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2004. 536 p. Russian.
23. Sokolov SYa. *Derev'ya i kustarniki SSSR. Tom 2. Pokrytosemnyye* [Trees and shrubs of the USSR. Volume 2. Angiosperms]. Moscow: Izdatel'stvo Akademii nauk SSSR; 1951. 611 p. Russian.
24. Kuznetsov VI. [Gracillariidae (Lithocolletidae) – moth moths]. In: Medvedev GS, editor. *Opredelitel' nasekomykh evropeiskoi chasti SSSR. Tom 4. Cheshuekrylye. Chast' 2* [Keys to insects of the European part of the USSR. Volume 4. Lepidoptera. Part 2]. Leningrad: Nauka; 1981. p. 149–311. Russian.
25. Houston Durrant T, de Rigo D, Gaudullo G. *Fagus sylvatica* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In: San-Miguel-Ayán J, de Rigo D, Caudullo G, Houston Durrant T, Mauri A, editors. *European atlas of forest tree species*. Luxembourg: Publication Office of the European Union; 2016. p. 94–95.
26. Baryshnikova SV. Gracillariidae. In: Sinev SYu, editor. *Katalog cheshuekrylykh (Lepidoptera) Rossii* [Lepidoptera catalog of Russia]. 2nd edition. Saint Petersburg: Zoological Institute of Russian Academy of Sciences; 2019. p. 36–43. Russian.
27. Skrzypczyńska M. Wstępne badania gęstości populacji gatunków wywołujących wyrośla i miny na liściach buka pospolitego *Fagus sylvatica* L. w Polsce. *Polskie Pismo Entomologiczne*. 1983;53:425–429.
28. Ivinskis P. *Lepidoptera of Lithuania. Annotated catalogue*. Vilnius: [s. n.]; 2004. 216 p.
29. Savenkov N, Šulcs I. *Latvian Lepidoptera catalogue*. Tallinn: Estonian Lepidopterologists' Society; 2010. 176 p.
30. Mutanen M, Nupponen K. Noteworthy records of Finnish Microlepidoptera (Micropterygidae – Pyralidae) in 2001. *Baptria*. 2003;28(4):6–14.
31. Pohl GR, Cannings RA, Landry J-F, Holden DG, Scudder GGE. *Checklist of the Lepidoptera of British Columbia, Canada. Entomological Society of British Columbia occasional paper No. 3*. [S. l.]: Lulu Publishing Service; 2015. 294 p.
32. Maslovskii OM, Levkovich AV, Sysoi IP, Kolesnikova MP, Rodionov PA, Chumakov LS, et al. *Gosudarstvennyi kadastr rastitel'nogo mira Respubliki Belarus'. Osnovy kadastra. Pervichnoe obsledovanie 2002–2017 gg.* [State cadastre of the plant world of the Republic of Belarus. Inventory basics. Initial survey 2002–2017]. Pugachevskii AV, editor. Minsk: Belaruskaja navuka; 2019. 599 p. Russian.
33. Severgin VM. *Zapiski puteshestviya po zapadnym provintsiyam Rossiiskogo gosudarstva, ili Mineralogicheskie, khozyaistvennye i drugie primechaniya, uchinennye vo vremya proezda cherez onye v 1802 g. akademikom Vasiliem Severginym* [Travel notes on the western provinces of the Russian state, or Mineralogical, economic and other notes made during travel through these in 1802 by academician Vasily Severgin]. Saint Petersburg: Pri Imperatorskoi Akademii nauk; 1803. 224 p. Russian.
34. Buhr H. Mecklenburgische Minen. III. Lepidopteren-Minen. *Stettiner entomologische Zeitung*. 1935;96(1):131–159.
35. Groenen F. *Wisteria floribunda*, een nieuwe voedselplant voor *Phyllonorycter maestingella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Entomologische Berichten*. 1996;56(3):60.

Статья поступила в редколлегию 23.06.2020.
Received by editorial board 23.06.2020.

УДК 595.763/.768(476)

ПЕРВАЯ РЕГИСТРАЦИЯ В БЕЛАРУСИ ЗИМОВКИ В УЛЬЯХ ПЧЕЛ ИНВАЗИВНОГО ВИДА КОКЦИНЕЛЛИД *HARMONIA AXYRIDIS* (PALLAS, 1773)

О. Ю. КРУГЛОВА¹⁾, О. В. ПРИЩЕПЧИК²⁾

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

²⁾Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

Констатирована первая регистрация в Беларуси зимовки в ульях пчел инвазивного вида кокцинеллид *Harmonia axyridis* в д. Галик (Дрогичинский район, Брестская область). Проанализированы некоторые особенности структуры полученной выборки *H. axyridis*. Соотношение полов оказалось близко к теоретически ожидаемому (1 : 1) – 50,5 % самок и 49,5 % самцов. У имаго выделены три из четырех основных фенотипических классов окраски элитры – *succinea*, *conspicua* и *spectabilis*. С частотой 95,78 % доминировал фенотип *succinea*. Элитральный гребень отсутствовал у 10 % особей.

Ключевые слова: *Harmonia axyridis*; зимовка; ульи пчел; инвазивный вид; полиморфизм; фенотип.

Благодарность. Авторы выражают благодарность В. В. Литвинчуку за возможность работать на его частной пасеке в д. Галик Дрогичинского района (малая родина) и оказанную всестороннюю помощь, в том числе в организации исследования.

THE FIRST REGISTRATION OF THE WINTERING OF INVASIVE SPECIES OF COCCINELLID *HARMONIA AXYRIDIS* (PALLAS, 1773) IN THE BEE HIVES IN BELARUS

O. Yu. KRUGLOVA^a, O. V. PRISCHEPCHIK^b

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

^bScientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources,
27 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: O. Yu. Kruglova (kruglovaoksana@mail.ru)

The first registration in Belarus of an invasive species of coccinellid *Harmonia axyridis* wintering in bee hives in the Galik village (Drogichinsky district, Brest region) has been established. Some structural features of the obtained sample of *H. axyridis* are analyzed. The sex ratio is closed to the theoretically expected (1 : 1) – 50.5 % of females and 49.5 % of males. Three of the four main phenotypic color classes of elytra are distinguished in imago – *succinea*, *conspicua* and *spectabilis*. The *succinea* phenotype is dominated with a frequency of 95.78 %. The elite crest was absent in 10 % of specimens.

Образец цитирования:

Круглова ОЮ, Прищепчик ОВ. Первая регистрация в Беларуси зимовки в ульях пчел инвазивного вида кокцинеллид *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773). Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2020;3:88–96.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-88-96>

For citation:

Kruglova OYu, Prischepchik OV. The first registration of the wintering of invasive species of coccinellid *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) in the bee hives in Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:88–96. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-88-96>

Авторы:

Оксана Юрьевна Круглова – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры зоологии биологического факультета.

Олег Васильевич Прищепчик – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией наземных беспозвоночных животных.

Authors:

Oksana Yu. Kruglova, PhD (biology), docent; associate professor at the department of zoology, faculty of biology.

kruglovaoksana@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0049-412X>

Oleg V. Prischepchik, PhD (biology), docent; head of the laboratory of terrestrial invertebrates.

prischepchik@mail.ru

Keywords: *Harmonia axyridis*; wintering; bee hives; invasive species; polymorphism; phenotype.

Acknowledgements. The authors would like to gratitude to V. V. Litvinchuk for the opportunity to work at his private apiary in the Galik village, Drogichinsky district (small homeland) and for the comprehensive assistance and assistance, including in the organization of the research.

Введение

Harmonia axyridis (азиатская коровка, коровка-арлекин, гармония изменчивая) является одним из самых опасных инвазивных видов насекомых [1]. Естественный ареал *H. axyridis* включает южную часть Сибири, Дальний Восток, северо-восток и юго-восток Казахстана, Китай, Монголию, Корею, Японию и северный Вьетнам [2–4]. С начала прошлого века гармонию изменчивую как высокоэффективного энтомофага пытались интродуцировать в Северной Америке, ряде европейских стран, а также некоторых советских республиках (Украина, Беларусь и др.) в целях биологического контроля численности членистоногих – вредителей сельскохозяйственных растений. Однако акклиматизация не удалась [5; 6]. Тем не менее с 1988 г. в естественных биотопах США стали обнаруживаться первые натурализовавшиеся популяции азиатской коровки¹, и с конца XX в. вид начал глобальную инвазию на разные континенты. На данный момент он зарегистрирован в Северной и Южной Америке, Африке [4], Австралии и Новой Зеландии (Ministry for Primary Industries (2016), NatureWatch NZ (2017) (цит. по [7])), многих странах Западной и Восточной Европы, а также в европейской части России [7–13]. В Беларуси азиатская коровка впервые была обнаружена в 2011 г. в Брестской области [4]. К настоящему времени этот вид образует устойчивые самовоспроизводящиеся группировки практически по всей территории республики [14–16]. Их численность варьируется в разные годы в зависимости от степени благоприятствования погодных условий во время зимовки.

Экспансия азиатской коровки может иметь негативные последствия [16]. Являясь высокоэффективным хищником-энтомофагом с широким спектром потребляемых жертв (разные виды тлей, кокцид, листоблошек и др.) и обладая высокой конкурентной способностью, *H. axyridis* может вытеснять аборигенные виды кокцинеллид, что уже подтверждено рядом исследований [17]. Личинки и имаго коровки-арлекина поедают яйца и личинок других видов насекомых, в том числе и божьих коровок, что может приводить к снижению биологического разнообразия аборигенной энтомофауны. При недостатке животной пищи взрослые жуки переходят к питанию зрелыми плодами, повреждая яблоки, груши, а также виноград, в связи с чем могут наносить ущерб плодоводческим, винодельческим и перерабатывающим хозяйствам. Образуя массовые зимовочные скопления с наружной стороны и внутри зданий, в том числе жилых помещений, имаго азиатских коровок вызывают беспокойство и аллергические реакции (риноконъюнктивиты, бронхиальную астму, аллергические дерматиты) у населения. Известны случаи, когда побеспокоенные жуки кусали людей [17].

Столь быстрому расширению ареала и увеличению численности инвазивных популяций *H. axyridis* на фоне глобального изменения климата способствуют большая плодовитость, способность к активному расселению, экологическая пластичность и высокая степень адаптивности. Последнее связано в том числе и с ярко выраженным морфологическим полиморфизмом, присущим данному виду. Для понимания механизмов, обеспечивающих быстрое распространение инвайдера в условиях нового ареала, и прогноза всплеск численности необходимо изучение структуры инвазивных популяций коровки-арлекина.

В настоящей работе констатируется первая регистрация зимовки в ульях пчел азиатской коровки на территории Беларуси, а также дана характеристика половой и фенотипической структуры полученной выборки *H. axyridis*.

Материалы и методы исследования

Материалом для данного исследования послужили сборы имаго *H. axyridis* из ульев пчел на пасеке в д. Галик Дрогичинского района Брестской области (52°5,278' с. ш., 24°56,315' в. д.) 24 октября 2019 г. Всего было собрано более 3000 экземпляров азиатской коровки, из которых анализу были подвергнуты 1800 жуков. В отдельных ульях жуки были оставлены на зимовку для того, чтобы весной следующего года визуально оценить наличие влияния на пчел. Для каждого экземпляра коровок определялись пол, фенотип рисунка элитр, наличие либо отсутствие элитрального гребня. Определение пола проводилось по окраске головы, поскольку для *H. axyridis* характерен четко выраженный половой диморфизм по этому признаку: у самок, в отличие от самцов, наличник, верхняя губа и лоб (за исключением тре-

¹*Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera, Coccinellidae) / J. B. Chapin, V. A. Brou // Proc. of the Entomol. Soc. of Washington. 1991. Vol. 93, No. 3. P. 630–635 (cited by [3]).

угольного белого пятна в центре) черные [18]. Идентификация фенотипов осуществлялась согласно классификации Тана (1946) [18].

Статистический анализ проводился с использованием показателей фенетического разнообразия [19]. Среднее число морф рисунка элитр μ рассчитывали по формуле

$$\mu = \left(\sqrt{p_1} + \sqrt{p_2} + \dots + \sqrt{p_m} \right)^2,$$

где $p_1, p_2, \dots, p_m$ – частоты морф (фенотипов, генотипов, аллелей, градаций количественного признака и т. д.), выраженные в долях от единицы ($p_1 + p_2 + \dots + p_m = 1$); m – число вариаций признака (фенов, морф), выделенных в данной выборке.

Статистическую ошибку μ вычисляли следующим образом:

$$S_\mu \approx \sqrt{\frac{\mu(m - \mu)}{N}},$$

где N – объем выборки.

Долю редких морф рисунка надкрылий h находили по формуле

$$h = 1 - \frac{\mu}{m}.$$

Статистическую ошибку h определяли как

$$S_h \approx \sqrt{\frac{h(1 - h)}{N}}.$$

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета *Microsoft Office Excel*.

Результаты и их обсуждение

Зимовка *Harmonia axyridis*. Для *H. axyridis* характерна зимовка в состоянии имагинальной диапаузы с образованием зимовочных скоплений на южных склонах гор (в горных районах), на наружных стенах или внутри зданий, в том числе жилых домов (в населенных пунктах) [17]. В некоторых регионах нативного ареала зимовка осуществляется в подстилке². Стимулом для формирования зимовочных скоплений служат изменение фотопериода и снижение температуры до +12 °C [17]. По нашим наблюдениям, в Беларуси это происходит с конца сентября до второй половины – конца октября. Активный лёт имаго к местам зимовки отмечается в солнечные дни.

Ранее мы уже публиковали данные об обнаружении в апреле 2019 г. на пасеке в 6 км от д. Хорск (Столинский район, Брестская область) скоплений азиатских коровок в зимовальном домике, куда на зиму помещают ульи с пчелами [15]. В октябре 2019 г. гармонии были обнаружены уже непосредственно в ульях пчел на пасеке в д. Галик (Дрогичинский район, Брестская область). Коровки находились в верхнем ярусе ульев – между потолочными разделительными досками и утеплительной подушкой, поэтому прямого контакта между ними и пчелами не было (рис. 1–4).

По устному сообщению пасечника В. В. Литвинчука, в поведении пчел и функционировании семей из ульев с зимующими коровками и без них весной 2020 г. не обнаружено никаких визуальных отличий. Зимовка в обеих группах ульев прошла успешно, без негативных последствий для пчел. Весной при повышении температуры коровки покинули ульи и назад в них уже не возвращались. Д. М. Карон (1996) в своей работе также указывал на факты зимовки *H. axyridis* в ульях пчел в США. Однако, по его мнению, азиатские коровки скорее вызывают беспокойство у пчеловодов, нежели наносят вред пчелам³.

Соотношение полов в анализируемой группировке *Harmonia axyridis*. В поддержании оптимальной численности и интенсивности размножения в популяциях животных важную роль играет соотношение полов. На этот показатель оказывают влияние различные факторы, в числе которых в популяциях насекомых – воздействие репродуктивных симбионтов. Для *H. axyridis* характерно заражение бактериями, относящимися к трем родам – *Spiroplasma*, *Rickettsia* и *Wolbachia* [17; 20]. Бактерии рода *Spiroplasma* вызывают андрогинидифференцированную смертность эмбрионов мужского пола. Доля самок, инфицированных этими бактериями, в разных популяциях азиатской коровки из нативного ареала варьируется от 26 до 49 % [17; 20]. В таких популяциях отмечается сдвиг в соотношении полов в сторону самок. Однако в инвазивных группировках *H. axyridis* спироплазмы по невыясненным пока причинам не были выявлены.

²Күзнецов В. Н. Интродукция и акклиматизация кокцинелл в СССР // Интродукция и применение полезных членистоногих в защите растений : тр. симп. (Батуми, 5–9 сент. 1988 г.). Л., 1989. С. 67–73 (цит. по [13]).

³Caron D. M. Multicolored Asian lady beetles: a «new» honey bee pest // Amer. Bee J. 1996. No. 136. P. 728–729 (cited by [17]).



Рис. 1. Скопление *Harmonia axyridis* внутри улья (фото О. В. Прищепчика)

Fig. 1. The cluster of *Harmonia axyridis* inside the hive (the photo by O. V. Prischechik)



Рис. 2. Скопление *Harmonia axyridis* между потолочными досками и утеплительной подушкой внутри улья (фото О. В. Прищепчика)

Fig. 2. The cluster of *Harmonia axyridis* between the ceiling boards and the insulation cushion inside the hive (photo by O. V. Prischechik)

Для кокцинеллид характерен хромосомный механизм детерминации пола, обеспечивающий появление в каждом поколении одинакового количества особей разного пола [21]. Нами была проведена оценка соотношения полов в полученной выборке азиатских коровок. Оно оказалось близко к теоретически ожидаемому (1 : 1) – 909 ♀ : 891 ♂ (или 50,5 % самок и 49,5 % самцов соответственно), что может быть свидетельством отсутствия в данной группировке самок, инфицированных бактериями рода *Spiroplasma*. Для сравнения: среди имаго *H. axyridis*, собранных в зимовальном домике для пчел на пасеке вблизи д. Хорск (Столинский район, Брестская область), наблюдаемое соотношение полов было 104 ♀ : 69 ♂, что достоверно отличалось от теоретически ожидаемого ($\chi^2 = 9,72$ при $p < 0,01$) (опубликованные данные [15]).

Фенотипическая структура анализируемой группировки *Harmonia axyridis*. Рисунок элитр *H. axyridis* детерминируется серией множественных аллелей одного гена. Наиболее распространенными являются четыре аллели, которые в ряду иерархии доминирования располагаются следующим образом: *conspicua* > *spectabilis* > *axyridis* > *succinea*⁴. У жуков в анализируемой выборке мы выделили три из четырех основных фенотипических классов рисунка элитр – *succinea*, *spectabilis* и *conspicua* (см. таблицу, рис. 3). Фенотип *succinea* (желтые, оранжевые или красные элитры с варьирующимся от 0 до 19 числом черных пятен) имели 95,78 % особей. Доля меланистов с фенотипами *conspicua* и *spectabilis*, а также гетерози-

⁴Tan C. C. Mosaic dominance in the inheritance of color patterns in the lady-bird beetle, *Harmonia axyridis* // Genetics. 1946. Vol. 31, No. 2. P. 195–210 (cited by [17]).

готными фенотипами по аллелям *conspicua/succinea* (h^C/h^S) и *spectabilis/succinea* (h^S/h^S) была невысока (см. таблицу, рис. 3). Доминирование (вплоть до мономорфных популяций) жуков с фенотипом *succinea* характерно для подавляющего большинства инвазивных популяций азиатской коровки (см., например, [10; 17; 20; 22–28]), в том числе и в Беларуси [14–16].

Мы провели сравнительный анализ фенотипической структуры полученной выборки и уже упоминавшейся ранее группировки с пасеки вблизи д. Хорск (опубликованные данные [15]). Как видно из данных таблицы, сравниваемые выборки имеют существенное сходство как по составу, так и по структуре фенетического разнообразия. Это подтверждают и близкие значения μ (среднего числа морф) и h (доли редких морф), свидетельствующие об относительно невысоком фенетическом разнообразии и неравномерном распределении частот фенотипов (частоты гетерозиготных форм были объединены с частотами соответствующих гомозиготных доминантных фенотипов – *spectabilis* и *conspicua*).

Фенотипический состав группировок *Harmonia axyridis* по рисунку элитр
Phenotypic composition of *Harmonia axyridis* groups according to the pattern of elytra

Регион	Частоты фенотипов, %					Среднее число морф, $\mu \pm S_\mu$	Доля редких морф, $h \pm S_h$
	<i>Succinea</i>	<i>Spectabilis</i>	<i>Conspicua</i>	h^S/h^S	h^C/h^S		
Деревня Галик	95,78	1,94	0,33	1,67	0,28	$1,555 \pm 0,036$	$0,482 \pm 0,010$
Окрестности д. Хорск*	95,37	1,16	0,58	0,58	2,30	$1,732 \pm 0,113$	$0,423 \pm 0,079$

*Опубликованные данные [15].



Рис. 3. Фенотипы рисунка элитр *Harmonia axyridis* (фото Д. Л. Петрова):
а – *conspicua*; б – гетерозиготный фенотип по аллелям *conspicua/succinea* (h^C/h^S);
в – *spectabilis*; г – гетерозиготный фенотип по аллелям *spectabilis/succinea* (h^S/h^S); д – *succinea*
Fig. 3. Phenotypes of elytra pattern of *Harmonia axyridis* (photo by D. L. Petrov):
а – *conspicua*; б – heterozygous phenotype for *conspicua/succinea* alleles (h^C/h^S); в – *spectabilis*;
г – heterozygous phenotype for *spectabilis/succinea* alleles (h^S/h^S); д – *succinea*

Для фенотипа *succinea* характерна модификационная изменчивость, проявляющаяся в различии числа, размеров и степени слияния черных пятен на светлом фоне в зависимости от температуры в период развития преимагинальных стадий. Она является важной адаптацией к существованию в гетерогенной среде обитания с резко меняющимися погодными условиями⁵ [28]. Анализ спектра модификационной изменчивости в изученной выборке показал, что в ней преобладали варианты рисунка со слабой и средней степенью меланизации (см. рис. 4, *a–в*). «Темные» формы рисунка с крупными пятнами, сливающимися в разных сочетаниях (см. рис. 4, *г–е*), встречались реже. Наблюдаемое соотношение вариантов рисунка является следствием того, что развитие данной генерации азиатской коровки проходило при относительно благоприятных температурных условиях (с 12 по 20 октября 2019 г. средняя дневная температура воздуха на территории Брестской области составляла от +19 до +20 °C)⁶.

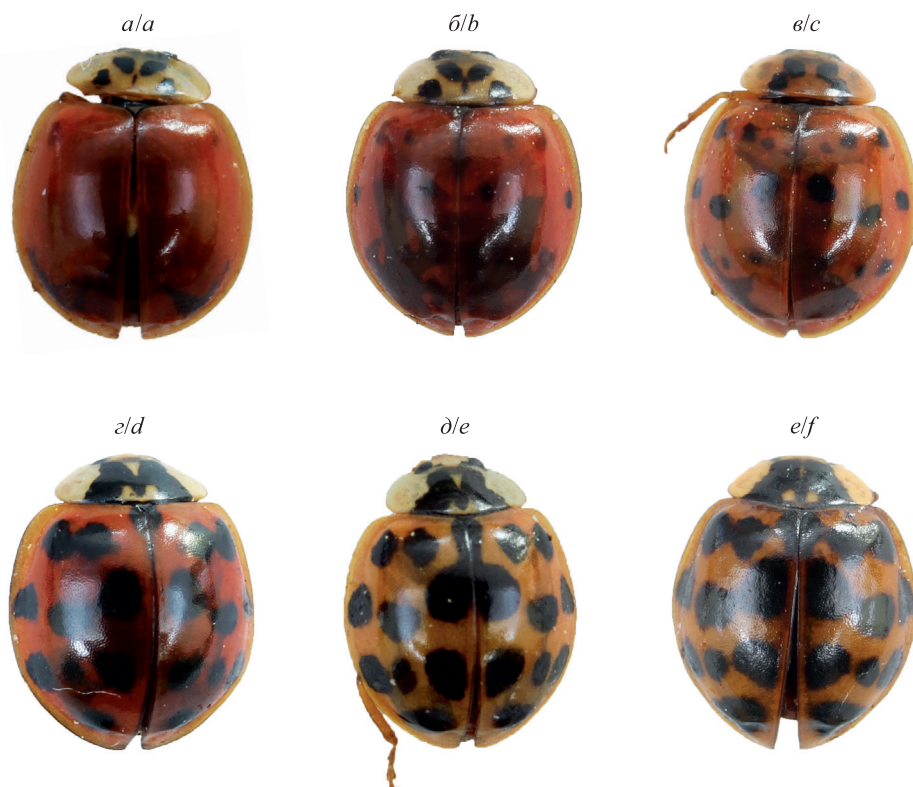


Рис. 4. Различные варианты рисунка элитр фенотипа *succinea* *Harmonia axyridis* (фото Д. Л. Петрова)

Fig. 4. Different variants of the pattern of elytra of the *succinea* phenotype *Harmonia axyridis* (photo by D. L. Petrov)

Один из таксономических признаков *H. axyridis* – элитральный гребень, представляющий собой поперечный хитиновый валик у вершины надкрылий. Его наличие является доминантным признаком и контролируется аутосомным диаллельным геном (цит. по [18]). Как показал анализ, элитральный гребень отсутствовал у 10 % обследованных жуков. Для сравнения: доля рецессивных гомозигот по этому признаку в выборке из окрестностей д. Хорск была в 2 раза ниже [15]. В разных группировках азиатской коровки из Беларуси она варьируется от 3,60 до 18,64 % [14–16], что, по-видимому, можно объяснить эффектом основателя.

Заключение

В результате проведенного исследования представляется возможным сделать следующие выводы.

1. В Дрогичинском районе Брестской области (д. Галик) констатирована первая регистрация зимовки *H. axyridis* в ульях пчел на территории Беларуси.

⁵Komai T. Genetics of ladybeetles // Adv. in Genet. 1956. Vol. 8. P. 155–188 ; The effect of temperature and other factors on the expression of elytral pattern in lady beetle, *Harmonia axyridis* Pallas / T. Sakai [et al.] // Bull. of the Fac. of Agriculture, Tamagawa Univ. 1974. No. 14. P. 33–39 (cited by [13]).

⁶World-Weather [Electronic resource]. URL: <https://world-weather.ru/pogoda/belarus/brest/october-2019/> (date of access: 19.08.2020).

2. Соотношение полов среди имаго, извлеченных из ульев осенью, было близко к теоретически ожидаемому (1 : 1) и составило 909 ♀ : 891 ♂. Это может служить свидетельством отсутствия в анализируемой группировке самок, инфицированных бактериями *Spiroplasma*, вызывающими андроцидифференцированную смертность эмбрионов мужского пола.

3. У имаго в исследуемой выборке выделено три из четырех основных фенотипических классов рисунка надкрылий – *succinea*, *conspicua* и *spectabilis*, а также гетерозиготные по определяющим их аллелям фенотипы. Частота рецессивной формы *succinea* составила 95,78 %. У жуков с этим фенотипом преобладали варианты рисунка со средней степенью меланизации, что может быть связано с теплой погодой, установившейся в Брестской области в период развития преимагинальных стадий данного поколения. Элитральный гребень отсутствовал у 10 % особей.

4. Сравнение полученной выборки с выборкой из группировки *H. axyridis*, обитающей в Столинском районе Брестской области, выявило большое сходство их фенотипической структуры по набору и частотам фенотипов рисунка элитр. Отличия связаны лишь с долей жуков без элитрального гребня, что можно объяснить эффектом основателя.

Библиографические ссылки

1. Hulme PE, editor. Handbook of alien species in Europe. Dordrecht: Springer; 2009. 369 p. (Invading nature – Springer series in invasion ecology; volume 3).
2. Кузнецов ВН, составитель. Сем. Coccinellidae – Божьи коровки. В: Лера ПА, редактор. *Определитель насекомых Дальнего Востока СССР. Том 3. Жесткокрылые, или Жуки. Часть 2*. Санкт-Петербург: Наука; 1992. с. 333–376.
3. Orlova-Bienkowskaja MJ, Ukrainsky AS, Brown PMJ. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Asia: a re-examination of the native range and invasion to southeastern Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Biological Invasions*. 2015;17(7):1941–1948. DOI: 10.1007/s10530-015-0848-9.
4. Roy HE, Brown PMJ, Adriaens T, Berkvens N, Borges I, Clusella-Trullas S, et al. The harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*: global perspectives on invasion history and ecology. *Biological Invasions*. 2016;18(4):997–1044. DOI: 10.1007/s10530-016-1077-6.
5. Воронин КЕ. Аклиматизация дальневосточного хищника тлей хармонии (*Harmonia axyridis* Pall.) в Предкарпатье. *Труды Всесоюзного научно-исследовательского института защиты растений*. 1968;31:234–243.
6. Сиднярев ВИ, Воронин КЕ. Опыт использования гармонии в теплицах. *Защита растений*. 1973;6:24.
7. Barševskis A. Multicoloured Asian lady beetle (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773)) (Coleoptera: Coccinellidae) for the first time in the fauna of Latvia. *Baltic Journal of Coleopterology*. 2009;9(2):135–138.
8. Nagrockaitė R, Tamutė B, Tamutis V. New and rare beetles (Coleoptera) species from Curonian Spit (Lithuania). *New and Rare for Lithuania Insect Species*. 2011;23:34–38.
9. Iazlovetchii I, Sumencova V. New invasive species in the Republic of Moldova: multicolored Asian ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). In: Toderas I, editor. *Actual problems of protection and sustainable use of the animal world diversity. VIII International conference of Zoologists; 2013 October 10–12; Chisinau, Moldova*. Chisinau: Academy of Sciences of Moldova; 2013. p. 136–137.
10. Верижников ИВ, Шилова ЕА. Последствия интродукции энтомофага *Harmonia axyridis* Pall. (Coleoptera, Coccinellidae) и прогнозируемый ареал его акклиматизации в Украине. В: Черных НА, редактор. *Актуальные проблемы экологии и природопользования. Выпуск 15*. Москва: Российский университет дружбы народов; 2013. с. 65–68.
11. Орлова-Беньковская МЯ. Опасный инвазионный вид божьих коровок *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) в европейской России. *Российский журнал биологических инвазий*. 2013;1:75–82.
12. Ukrainsky AS, Orlova-Bienkowskaja MJ. Expansion of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) to European Russia and adjacent regions. *Biological Invasions*. 2014;16(5):1003–1008. DOI: 10.1007/s10530-013-0571-3.
13. Андрианов БВ, Блехман АВ, Горячева ИИ, Захаров-Гезехус ИА, Романов ДА. *Азиатская божья коровка Harmonia axyridis: глобальная инвазия*. Москва: Товарищество научных изданий КМК; 2018. 144 с.
14. Круглова ОЮ, Синчук ОВ. Изменчивость инвазивного вида кокцинеллид *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) по комплексу полиморфных признаков в условиях Беларуси. В: Бородин ОИ, Цинкевич ВА, редакторы. *Современные проблемы энтомологии Восточной Европы. Сборник статей II Международной научно-практической конференции; 6–8 сентября 2017 г.; Минск, Беларусь*. Минск: А. Н. Вараксин; 2017. с. 249–264.
15. Круглова ОЮ, Антонова АВ. Сравнительный анализ фенотипической структуры отдельных группировок азиатской коровки (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773)) из Беларуси. В: Дерунков АВ, Кулак АВ, Прищепчик ОВ, редакторы. *Итоги и перспективы развития энтомологии в Восточной Европе. Сборник статей III Международной научно-практической конференции; 19–21 ноября 2019 г.; Минск, Беларусь*. Минск: А. Н. Вараксин; 2019. с. 197–202.
16. Круглова ОЮ, Антонова АВ, Клышейко ЮИ, Силина АИ. Мониторинг фенотипического состава инвазивных группировок *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) в Беларуси. В: Гусев АП, Ковалева ОВ, Карпенко АФ, Павловский АИ, Тимофеева ТА, Шпилевская НС и др., редакторы. *Трансграничное сотрудничество в области экологической безопасности и охраны окружающей среды. V Международная научно-практическая конференция; 4–5 июня 2020 г.; Гомель, Беларусь* [Интернет]. Гомель: Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины; 2020 [протитировано 20 августа 2020 г.]. с. 167–174. Доступно по: <http://conference.gsu.by/ru/node/181>.
17. Koch RL. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*. 2003;3(32):1–16. DOI: 10.1673/031.003.3201.
18. Балужева ЕН. Фенотипическая изменчивость кокцинеллиды *Harmonia axyridis* Pall. по рисунку надкрылий и наличию элитрального гребня. *Естественные науки*. 2009;3(28):8–15.

19. Животовский ЛА. Показатель популяционной изменчивости по полиморфным признакам. В: Яблоков АВ, редактор. *Фенетика популяций*. Москва: Наука; 1982. с. 38–44.
20. Горячева ИИ, Блехман АВ, Андрианов БВ, Романов ДА, Захаров ИА. *Spiroplasma* – цитоплазматический симбионт *Harmonia axyridis* Pallas – разнообразие и вовлеченность в глобальную инвазию. В: Политов ДВ, Белоконов ММ, Мудрик ЕА, Курбатова ОЛ, Салменкова ЕА, редакторы. *Генетика популяций: прогресс и перспективы. Материалы Международной научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения академика Ю. П. Алтухова (1936–2006) и 45-летию основания лаборатории популяционной генетики им. Ю. П. Алтухова ИОГен РАН; 17–21 апреля 2017 г.; Москва, Россия*. Москва: Ваш формат; 2017. с. 78–79.
21. Захаров ИА, Зинкевич НС, Шайкевич ЕВ, Высоцкая ЛВ, Доржу ЧМ, Межерес МЕН. Соотношение полов и явление бессамцовости в сибирских популяциях *Harmonia axyridis* (Pall.). *Генетика*. 1999;35(6):771–776.
22. Brown PMJ, Adriaens T, Bathon H, Cuppen J, Goldarazena A, Hägg T, et al. *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. *BioControl*. 2008;53(1):5–21. DOI: 10.1007/s10526-007-9132-y.
23. Nedvěd O, Steenberg T, Harding S. Spread of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* in the Czech Republic and Denmark. In: *XXIII International congress of entomology; 2008 July 6–12; Durban, South Africa*. [S. l.]: [s. n.]; 2008. p. 1.
24. Захаров ИА, Романов ДА. Распространение и некоторые биологические особенности инвазивного вида *Harmonia axyridis* на Крымском полуострове. *Российский журнал биологических инвазий*. 2017;4:54–56.
25. Круглова ОЮ, Рогинский АС, Синчук ОВ. Регистрация инвазивного вида кокцинеллид *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) в Брянской области. *Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. 2015;10(1):389–392.
26. Некрасова ОД, Титар ВМ. Распространение, фенооблик и сезонные особенности инвазивного вида *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) на территории Украины. *Известия Харьковского энтомологического общества*. 2016;24(1):22–30.
27. Калашян МЮ, Креджян ТЛ, Караган ГА. Экспансия божьей коровки арлекин *Harmonia axyridis* Pall. (Coleoptera, Coccinellidae) в Армении. *Российский журнал биологических инвазий*. 2019;1:56–60.
28. Michie LJ, Mallard F, Majerus MEN, Jiggins FM. Melanic through nature or nurture: genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis*. *Journal of Evolutionary Biology*. 2010;23(8):1699–1707. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2010.02043.x.

References

1. Hulme PE, editor. Handbook of alien species in Europe. Dordrecht: Springer; 2009. 369 p. (Invading nature – Springer series in invasion ecology; volume 3).
2. Kuznetsov VN, compiler. [Family Coccinellidae – ladybirds]. In: Lera PA, editor. *Opredelitel' nasekomykh Dal'nego Vostoka SSSR. Tom 3. Zhestkokrylye, ili Zhuki. Chast' 2* [Key to insects of the Far East of USSR. Volume 3. Coleoptera, or beetles. Issue 2]. Saint Petersburg: Nauka; 1992. p. 333–376. Russian.
3. Orlova-Bienkowskaja MJ, Ukrainsky AS, Brown PMJ. *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in Asia: a re-examination of the native range and invasion to southeastern Kazakhstan and Kyrgyzstan. *Biological Invasions*. 2015;17(7):1941–1948. DOI: 10.1007/s10530-015-0848-9.
4. Roy HE, Brown PMJ, Adriaens T, Berkvens N, Borges I, Clusella-Trullas S, et al. The harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*: global perspectives on invasion history and ecology. *Biological Invasions*. 2016;18(4):997–1044. DOI: 10.1007/s10530-016-1077-6.
5. Voronin KE. [Acclimatization of aphid predator *Harmonia* (*Harmonia axyridis* Pall.) from Far Eastern in Precarpathians]. *Trudy Vsesoyuznogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zashchity rastenii*. 1968;31:234–243. Russian.
6. Sidnyarevich VI, Voronin KE. [Experience in using of *Harmonia* in greenhouses]. *Zashchita rastenii*. 1973;6:24. Russian.
7. Barševskis A. Multicoloured Asian lady beetle (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773)) (Coleoptera: Coccinellidae) for the first time in the fauna of Latvia. *Baltic Journal of Coleopterology*. 2009;9(2):135–138.
8. Nagrockaitė R, Tamutė B, Tamutis V. New and rare beetles (Coleoptera) species from Curonian Spit (Lithuania). *New and Rare for Lithuania Insect Species*. 2011;23:34–38.
9. Iazlovetchii I, Sumencova V. New invasive species in the Republic of Moldova: multicolored Asian ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). In: Toderas I, editor. *Actual problems of protection and sustainable use of the animal world diversity. VIII International conference of Zoologists; 2013 October 10–12; Chisinau, Moldova*. Chisinau: Academy of Sciences of Moldova; 2013. p. 136–137.
10. Verizhnikova IV, Shylova KA. Consequences of entomophage *Harmonia axyridis* Pall. (Coleoptera, Coccinellidae) introduction and its predicted area of acclimatization. In: Chernykh NA, editor. *The urgent ecological and environmental management problems. Issue 15*. Moscow: RUDN University; 2013. p. 65–68. Russian.
11. Orlova-Bienkowskaja MJ. The dangerous invasive harlequin ladybird *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) in European Russia. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii*. 2013;1:75–82. Russian.
12. Ukrainsky AS, Orlova-Bienkowskaja MJ. Expansion of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) to European Russia and adjacent regions. *Biological Invasions*. 2014;16(5):1003–1008. DOI: 10.1007/s10530-013-0571-3.
13. Andrianov BV, Blekhman AV, Goryacheva II, Zakharov-Gezekhus IA, Romanov DA. *Aziatskaya bozh'ya korovka Harmonia axyridis: global'naya invaziya* [Asian ladybird *Harmonia axyridis*: global invasion]. Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2018. 144 p. Russian.
14. Kруглова ОЮ, Синчук АВ. Variability of different groups of polymorphic characters of the invasive species *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera, Coccinellidae) in Belarus. In: Borodin OI, Tsinkevich VA, editors. *Sovremennye problemy entomologii Vostochnoi Evropy. Sbornik statei II Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 6–8 sentyabrya 2017 g.; Minsk, Belarus'* [Modern problems of entomology in Eastern Europe. Collection of articles of the II International scientific and practical conference; 2017 September 6–8; Minsk, Belarus]. Minsk: A. N. Varaksin; 2017. p. 249–264. Russian.
15. Kруглова ОЮ, Антонова АВ. Comparative analysis of the phenotypic structure of individual groups of Asian ladybugs (*Harmonia axyridis* (Pallas, 1773)) from Belarus. In: Derunkov AV, Kulak AV, Prischepchik OV, editors. *Itogi i perspektivy razvitiya entomologii v Vostochnoi Evrope. Sbornik statei III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 19–21 noyabrya 2019 g.; Minsk*,

Belarus' [Results and prospects for the development of entomology in Eastern Europe. Collection of articles of the III International scientific and practical conference; 2019 November 19–21; Minsk, Belarus]. Minsk: A. N. Varaksin; 2019. p. 197–202. Russian.

16. Kruglova OYu, Antonova AV, Klysheiko YuI, Silina AI. [Monitoring of the phenotypic composition of invasive groups of *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) in Belarus]. In: Gusev AP, Kovaleva OV, Karpenko AF, Pavlovskii AI, Timofeeva TA, Shpilevskaya NS, et al., editors. *Transgranichnoe sotrudnichestvo v oblasti ekologicheskoi bezopasnosti i okhrany okruzhayushchei sredy. V Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya; 4–5 iyunya 2020 g.; Gomel', Belarus'* [Transboundary cooperation in the field of ecological safety and environmental protection. V International scientific and practical conference of scientists, students, undergraduates and graduate students; 2020 June 4–5; Gomel, Belarus] [Internet]. Gomel: Francisk Skorina Gomel State University; 2020 [cited 2020 August 20]. p. 167–174. Available from: <http://conference.gsu.by/ru/node/181>. Russian.

17. Koch RL. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science*. 2003;3(32):1–16. DOI: 10.1673/031.003.3201.

18. Balueva EN. Phenotypical variability of coccinellid *Harmonia axyridis* according to wing patterns and elytral comb. *Estestvennye nauki*. 2009;3(28):8–15. Russian.

19. Zhivotovskii LA. [The indicator of population variability in polymorphic traits]. In: Yablokov AV, editor. *Fenetika populyatsii* [Phenetics of populations]. Moscow: Nauka; 1982. p. 38–44. Russian.

20. Goryacheva II, Blekhman AV, Andrianov BV, Romanov DA, Zakharov IA. *Spiroplasma* – cytoplasmic symbiont of *Harmonia axyridis* Pallas – diversity and involvement in global invasion. In: Politov DV, Belokon MM, Mudrik EA, Kurbatova OL, Salmenkova EA, editors. *Genetics of populations: progress and perspectives. Proceedings of the International scientific conference commemorating the 80th birthday of Academician Yuri P. Altukhov (1936–2006) and dedicated to the 45th anniversary of the Laboratory of population genetics VIGG RAS named after Yu. P. Altukhov; 2017 April 17–21; Moscow, Russia*. Moscow: Vash Format; 2017. p. 78–79. Russian.

21. Zakharov IA, Zinkevich NS, Shaikevich EV, Vysotskaya LV, Dorzhu ChM, Mezheres MEN. [Sex ratio and male killing in Siberian populations of *Harmonia axyridis* Pall.]. *Genetika*. 1999;35(6):771–776. Russian.

22. Brown PMJ, Adriaens T, Bathon H, Cuppen J, Goldarazena A, Hägg T, et al. *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. *BioControl*. 2008;53(1):5–21. DOI: 10.1007/s10526-007-9132-y.

23. Nedvěd O, Steenberg T, Harding S. Spread of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* in the Czech Republic and Denmark. In: *XXIII International congress of entomology; 2008 July 6–12; Durban, South Africa*. [S. l.]: [s. n.]; 2008. p. 1.

24. Zakharov IA, Romanov DA. Distribution and some biological features of invasive species *Harmonia axyridis* in the Crimea. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii*. 2017;4:54–56. Russian.

25. Kruglova OYu, Roginskii AS, Sinchuk OV. [Registration of invasive ladybird beetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera, Coccinellidae) in Bryansk region]. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Fiziologicheskie, biokhimicheskie i molekulyarnye osnovy funktsionirovaniya biosistem*. 2015;10(1):389–392. Russian.

26. Nekrasova OD, Tytar VM. [The expansion, phene pool and seasonal peculiarities of the invasive species *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) (Coleoptera: Coccinellidae) in Ukraine]. *Izvestiya Khar'kovskogo entomologicheskogo obshchestva*. 2016;24(1):22–30. Russian.

27. Kalashian MYu, Ghrejyan TL, Karagyan GH. Expansion of harlequin ladybird *Harmonia axyridis* Pall. (Coleoptera, Coccinellidae) in Armenia. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii*. 2019;1:56–60. Russian.

28. Michie LJ, Mallard F, Majerus MEN, Jiggins FM. Melanic through nature or nurture: genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis*. *Journal of Evolutionary Biology*. 2010;23(8):1699–1707. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2010.02043.x.

Статья поступила в редколлегию 08.09.2020.
Received by editorial board 08.09.2020.

УДК 593.17

БИОРАЗНООБРАЗИЕ СВОБОДНОЖИВУЩИХ ИНФУЗОРИЙ БАСЕЙНА РЕКИ КУРЫ (В ПРЕДЕЛАХ АЗЕРБАЙДЖАНА)

И. Х. АЛЕКПЕРОВ¹⁾, Э. Н. ТАГИРОВА¹⁾

¹⁾Институт зоологии НАН Азербайджана,
ул. А. Аббасзаде, 1128-й квартал, 504-й проезд, AZ1073, г. Баку, Азербайджан

Приведены сведения по видовому разнообразию инфузорий 8 точек сбора вдоль всего течения р. Куры в пределах Азербайджана – от государственной границы с Грузией до дельты и места впадения в Каспийское море. В общей сложности в ходе многолетних исследований свободноживущих инфузорий бассейна р. Куры зарегистрировано 308 видов. Согласно полученным результатам видовое разнообразие пресноводных инфузорий значительно меняется в зависимости от расположения и экологических условий точек сбора. Наибольшее видовое богатство пресноводных инфузорий было отмечено в Мингечаурском и Варваринском водохранилищах (128 и 140 видов соответственно), что, по мнению авторов, обусловлено разнообразием имеющихся здесь биотопов и обилием кормовых организмов. Анализ встречаемости инфузорий (доля проб, в которых найден вид, от их общего числа) показал, что к группе доминантов (присутствовали в более чем 80 % проб) относятся 10,71 % видового состава, к группе регулярных видов (встречаемость менее 80, но более 50 %) – 13,60 %, к группе нерегулярных видов (встречаемость от 30 до 50 %) – 71,47 %, а к группе случайных (встречаемость менее 30 %) – 4,22 % всех видов. Установлено, что самая большая группа нерегулярных видов в основном складывается из инфузорий, приуроченных к определенному сезону года – главным образом весне и осени. В то же время обнаружены представители группы нерегулярных видов, появляющиеся в сообществах только летом.

Ключевые слова: инфузории; видовое разнообразие; бассейн р. Куры; Азербайджан.

Образец цитирования:

Алекперов ИХ, Тагирова ЭН. Биоразнообразие свободноживущих инфузорий бассейна реки Куры (в пределах Азербайджана). *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2020;3:97–113.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-97-113>

For citation:

Alekperov IKh, Tahirova EN. Biodiversity of free-living ciliates of the Kura River basin (within Azerbaijan). *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2020;3:97–113. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2020-3-97-113>

Авторы:

Ильхам Хайям-оглы Алекперов – член-корреспондент НАН Азербайджана, доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией протозоологии.
Эльяна Наиль-гзы Тагирова – научный сотрудник лаборатории протозоологии.

Authors:

Ilham Kh. Alekperov, corresponding member of the National Academy of Sciences of Azerbaijan, doctor of science (biology), full professor; head of the laboratory of protozoology.
i_alekperov@yahoo.com
<https://orcid.org/0000-0003-0070-3286>
Elyana N. Tahirova, researcher at the laboratory of protozoology.
tahirovaelyane@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9559-9527>

BIODIVERSITY OF FREE-LIVING CILIATES OF THE KURA RIVER BASIN (WITHIN AZERBAIJAN)

I. Kh. ALEKPEROV^a, E. N. TAHIROVA^a

^a*Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Azerbaijan,
A. Abbaszadeh Street, 1128th quarter, 504th passage, Baku AZ1073, Azerbaijan*

Corresponding author: E. N. Tahirova (tahirovaelyane@mail.ru)

As a result of long term free-living ciliates investigation of the Kura River basin, in all 308 species have been noted. The article provides information on the ciliates species diversity of 8 sample points, across the Kura River within Azerbaijan – from Georgian state border to the delta. The freshwater ciliates species diversity varies considerably depending on location and environment sample points. The greatest diversity of freshwater ciliates noted in Mingechevir and Varvara reservoirs (128 and 140 species respectively), which in our opinion, is related with a variety of biotopes in these reservoirs and an abundance of food organisms. The analysis on the occurrence of ciliates showed that the group of dominants (noted in more than 80 % of all samples) includes 10.71 % of the total species diversity, and the group of regular ones (occurrence less than 80, but more than 50 %) 13.60 % of the entire species composition, 71.47 % belong to the largest group of irregular ones (occurrence from 30 to 50 % in samples), and 4.22 % of the total species diversity to the group of random species (occurrence less than 30 % of all samples). It has been established that the largest group of irregular species is consist ciliates, confined to a certain time of the year – mainly in spring and fall. At the same time, part of this group species appeared in the communities only in the summer.

Keywords: ciliates; species diversity; Kura River basin; Azerbaijan.

Введение

Роль свободноживущих простейших и в первую очередь инфузорий в биологических процессах земных и водных экосистем огромна [1–6]. Как известно, они участвуют в процессах синтеза и разрушения органического вещества в морских и пресных водах. Будучи активными бактериофагами и гистофагами, свободноживущие инфузории как первичные консументы являются важным звеном в процессах самоочищения водоемов. Таким образом, при исследовании морских и пресных вод необходимо обязательно учитывать и эту группу свободноживущих простейших.

Первые сведения о свободноживущих инфузориях Азербайджана относятся к 1930-м гг. и получены на основании общих гидробиологических сборов С. Я. Вейсига [7–10] и А. Н. Ализаде [11–14]. Обобщая результаты этих авторов, следует отметить, что до начала современного периода исследований в стране было известно около 70 видов инфузорий.

Современное изучение пресноводных свободноживущих инфузорий в Азербайджане, в том числе и на водоемах бассейна р. Куры, с применением новейших методов импрегнирования кинетома нитратом и протеинатом серебра систематически проводится нами с 1970-х гг.

Результаты этих исследований показали высокую степень биоразнообразия данной группы в регионе. В настоящее время общее биоразнообразие свободноживущих инфузорий вод и почв Азербайджана представлено 757 видами [15], из которых 308 были обнаружены в пресных водах бассейна крупнейшей реки Азербайджана – Куры.

Следует отметить и достаточно большое своеобразие общей фауны свободноживущих инфузорий нашей страны, на что указывают найденные за эти годы и впервые для науки описанные 2 семейства, 8 родов и более 90 видов [16].

В данной статье приведены обобщенные результаты многолетних исследований видового разнообразия и встречаемости отдельных видов инфузорий по участкам бассейна самой важной водной артерии Азербайджана – р. Куры.

Материал и методы исследования

Кура – самая крупная река всего Южного Кавказа. Она проходит по территории сразу трех государств: берет начало в Турции, далее протекает через Грузию, а начиная со Средней Куры, – по территории Азербайджана и, образуя дельту ниже г. Нефтчала, впадает в Каспийское море (рис. 1). Общая длина реки составляет 1551 км. Она имеет большое значение как для орошения, так и для снабжения населения Азербайджана питьевой водой и играет важную роль в экономической жизни страны. На ней построено несколько гидроэлектростанций.



Рис. 1. Точки сбора проб на водоемах бассейна р. Куры

Fig. 1. Sample points on the ponds of the Kura River basin

За время многолетнего изучения инфузорий нами были исследованы водоемы бассейна р. Куры от государственной границы с Грузией, включая несколько водохранилищ, в том числе и самое крупное – Мингечаурское, а также бассейн рек, наиболее полноводные среди которых – Гянджачай, Кюрекчай, Товузчай, Ахинчай и Шамкирчай (см. рис. 1).

Пробы планктона, бентоса и перифитона в зарослях водной растительности (фитоцелиоценозы) отбирались в разные годы в прибрежной зоне водоемов. Как правило, пробы собирались в полиэтиленовые флаконы и по возможности в кратчайший срок доставлялись в лабораторию. Свободноживущие инфузории просматривались *in vivo*, а затем фиксировались для дальнейшего приготовления тотальных препаратов, импрегнированных нитратом [17] и протеинатом серебра [18]. В настоящей работе использована система типа Ciliophora, предложенная А. В. Янковским (2007) и опубликованная во втором томе издания «Протисты» [19].

Количественный анализ численности инфузорий проводился по общепринятой методике в камере Богорова с последующим пересчетом на 1 л воды или 1 дм² грунта. Встречаемость видов (*R*) определяли, как долю проб, в которых найден вид, от общего числа проб.

Если *R* составляет 80 % и более, вид считается константным (доминантным), если величина данного коэффициента менее 80, но более 50 %, – регулярным. При значениях встречаемости от 30 до 50 % вид относится к нерегулярным, а при *R* меньше 30 % – к случайным.

Все измерения и вычисления проводились с использованием компьютерной программы *Biodiversity Professional 2.0*.

Полученные результаты и их обсуждение

Всего за время многолетних исследований свободноживущих инфузорий пресных вод бассейна р. Куры было отмечено 308 видов. Их распределение по участкам приведено в таблице.

Распределение видового разнообразия свободноживущих инфузорий водоемов бассейна р. Куры

Distribution of the species diversity of free-living ciliates in the Kura River basin

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Тип Ciliophora Doflein, 1901								
Класс Karyorelictea Corliss, 1974								
Отряд Loxodida Jankowski, 1980								
Семейство Loxodidae Bütschli, 1889								
<i>Loxodes rostrum</i> (Müller, 1773)	+	+				+	+	+

Продолжение таблицы
Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>L. kahli</i> Dragesco et Njine, 1971					+			
<i>L. vorax</i> Stokes, 1887				+		+	+	
<i>L. penardi</i> Dragesco, 1960					+		+	
<i>L. striatus</i> (Engelmann, 1862)			+	+		+		+
Отряд Heterotrichida Stein, 1859								
Семейство Blepharismidae Jankowski in Small et Lynn, 1985								
<i>Blepharisma vestitum</i> Kahl, 1928	+		+		+		+	
<i>B. coerulea</i> Gajewskaja, 1933				+		+	+	+
Семейство Spirostomatidae Stein, 1867								
<i>Spirostomum minus</i> Roux, 1901	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. loxodes</i> Stokes, 1885				+		+	+	
<i>S. teres</i> Claparede et Lachmann, 1859			+	+	+		+	+
Семейство Climacostomidae Repak, 1972								
<i>Climacostomum virens</i> (Ehrenberg, 1833)			+		+			+
<i>C. minimum</i> Foissner, 1980				+		+		
Семейство Stentoridae Carus, 1863								
<i>Stentor amethystinus</i> Leidy, 1880			+		+			+
<i>S. gallinulus</i> Penard, 1922				+		+		+
<i>S. mulleri</i> Ehrenberg, 1831			+	+		+	+	
<i>S. coeruleus</i> Ehrenberg, 1830		+		+		+	+	+
<i>S. polymorphus</i> (Müller, 1773)	+		+	+			+	+
Класс Spirotrichea Butschli, 1889								
Отряд Stichotrichida Fauré-Fremiet, 1961								
Семейство Amphisiellidae Jankowski, 1979								
<i>Amphiziella vitiphila</i> (Foissner, 1987)			+	+			+	
<i>A. marioni</i> Wicklow, 1982		+				+		
<i>Paragastrostyla lanceolata</i> Hemberger, 1985			+				+	
<i>Pseudouroleptus caudatus</i> Hemberger, 1985	+				+		+	+
<i>P. terrestris</i> Hemberger, 1985				+		+		
Семейство Oxytrichidae Ehrenberg, 1838								
<i>Stylonychia bifaria</i> (Stokes, 1887)			+			+		
<i>S. vorax</i> Stokes, 1885	+	+				+		+
<i>S. quadrinucleata</i> Alekperov et Musaev, 1988				+			+	
<i>Histiculus similis</i> (Quennerstedt, 1867)			+					
<i>H. vorax</i> (Stokes, 1891)				+		+		
<i>H. complanatus</i> (Stokes, 1887)			+				+	
<i>Paraurostyla weissei</i> (Stein, 1859)	+			+	+		+	+
<i>P. granulifera</i> Berger et Foissner, 1989				+			+	
<i>P. polynucleata</i> Alekperov, 1993			+				+	
<i>Sterkiella tricirrata</i> (Buitkamp, 1977)				+				+

Продолжение таблицы
Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Oxytricha aeruginosa</i> Wrzesniovski, 1870	+			+		+		+
<i>O. fallax</i> Stein, 1859			+	+	+			+
<i>O. balladina</i> Song et Wilbert, 1989		+	+					
<i>O. gibba</i> (Müller, 1786)	+		+	+				
<i>O. halophila</i> Kahl, 1932					+			+
Отряд Urostylida Jankowski, 1979								
Семейство Urostylidae Bütschli, 1889								
<i>Urostyla chlorelligera</i> Foissner, 1980	+	+		+				
<i>U. grandis</i> Ehrenberg, 1830	+		+		+			+
<i>U. dispar</i> Kahl, 1932			+			+		+
<i>U. hologama</i> Heckmann, 1963		+					+	
<i>Metaurostyla polonica</i> (Borror, 1972)		+					+	
<i>M. raikovi</i> (Aleksperov, 1987)		+				+		+
<i>Pseudourostyla laevis</i> Takahashi, 1973				+			+	
<i>Pseudoamphisiella alveolata</i> (Kahl, 1932)				+			+	
<i>Paruroleptus notabilis</i> Berger et Foissner, 1987								+
<i>Holosticha heterofoissneri</i> Hu et Song, 2001				+			+	
<i>H. foissneri</i> Petz, Song et Wilbert, 1995					+			
<i>Anteholosticha monilata</i> (Kahl, 1928)		+						+
<i>A. adami</i> (Foissner, 1982)					+		+	
<i>A. pulchra</i> (Kahl, 1932)		+				+		
Отряд Euplotida Jankowski, 1980								
Семейство Euplotidae Ehrenberg, 1838								
<i>Euplotes raikovi</i> Agamaliev, 1966			+	+			+	
<i>E. trisulcatus</i> Kahl, 1932			+	+			+	+
<i>E. patella</i> (Müller, 1773)	+	+	+	+	+		+	+
<i>E. harpa</i> Stein, 1859	+	+	+	+				+
<i>E. balteatus</i> Dujardin, 1842	+		+	+				+
<i>E. eurytomus</i> Wrzesniovski, 1870		+	+	+	+			+
<i>E. gracilis</i> Kahl, 1932				+			+	+
<i>E. vannus</i> (Müller, 1786)					+			+
<i>E. trisulcatus</i> Kahl, 1932			+			+	+	
<i>E. minuta</i> Yocom, 1930					+			
<i>E. kurekchayi</i> Aliev, 1987				+				
<i>E. ogusi</i> Aliev, 1987				+			+	
Семейство Aspidiscidae Ehrenberg, 1838								
<i>Aspidisca fusca</i> Kahl, 1928		+		+				+
<i>A. polystyla</i> Stein, 1859			+		+			+
<i>A. mutans</i> Kahl, 1932		+		+				
<i>A. cicada</i> Müller, 1786				+				+
<i>A. magna</i> Kahl, 1930			+			+		

Продолжение таблицы
Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A. turrita</i> (Ehrenberg, 1838)	+			+				
<i>A. steini</i> Buddenbrock, 1920	+	+		+		+		+
Класс Oligotrichea Butschli, 1887								
Отряд Halteriida Jankowski, 2007								
Семейство Halteriidae Claparede et Lachmann, 1858								
<i>Halteria bifurcata</i> Tamar, 1968				+			+	
<i>H. oviformis</i> Gelei, 1950			+					
<i>H. grandinella</i> (Müller, 1786)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pelagohalteria viridis</i> (Fromentel, 1876)			+	+				
<i>P. cirrifera</i> (Kahl, 1932)		+	+				+	+
Отряд Strombidiida Jankowski, 1980								
Семейство Strombidiidae Fauré-Fremiet, 1970								
<i>Spirostrombidium coronatum</i> (Sauerbrey, 1928)			+	+			+	
<i>S. cinctum</i> Kahl, 1932	+			+				
<i>S. kahli</i> Bock, 1952			+					+
<i>Heterostrombidium faurei</i> (Dragesco, 1960)			+	+				+
<i>H. calkinsi</i> Fauré-Fremiet, 1932			+				+	
<i>H. fourneti</i> (Dragesco, 1960)	+	+		+	+			
<i>Pelagostrombidium mirabile</i> (Krainer, 1991)				+				+
<i>Limnostrombidium pelagicum</i> (Krainer, 1991)				+				
<i>L. viride</i> (Stein, 1867)			+		+			
<i>Strombidinopsis claparedi</i> Kent, 1881		+						+
<i>S. spinifera</i> (Leegaard, 1915)			+					+
Класс Armophorea Lynn, 2002								
Отряд Metopida Jankowski, 1980								
Семейство Metopidae Kahl, 1927								
<i>Metopus acidiferus</i> Kahl, 1935		+				+		
<i>M. caucasicus</i> Alekperov, 1984				+				+
<i>M. fuscoides</i> Alekperov, 1984						+		
<i>M. halophilus</i> Kahl, 1932	+			+	+	+		+
<i>M. es</i> (Müller, 1786)	+	+	+					
<i>M. vestitus</i> Kahl, 1935					+	+		
<i>M. contortus</i> (Quennerstedt, 1867)	+			+				
<i>M. propagatus</i> Kahl, 1927	+	+						
<i>Brachonella caduca</i> (Kahl, 1927)				+		+	+	
<i>B. mitriformis</i> Alekperov, 1984				+			+	
<i>B. darwini</i> (Kahl, 1927)		+						+
<i>B. spiralis</i> (Smith, 1897)				+		+		
Отряд Armophorida Jankowski, 1964								
Семейство Caenomorphidae Poche, 1913								
<i>Caenomorpha medusula</i> Perty, 1852		+				+		+

Продолжение таблицы
Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>C. lauterborni</i> Kahl, 1927				+				+
<i>C. corlissi</i> Jankowski, 1964				+				
Отряд Odontostomatida Sawaya, 1940								
Семейство Epalxellidae Corliss, 1960								
<i>Saprodinium dentatum</i> Lauterborn, 1908				+		+		+
<i>S. halophilum</i> Kahl, 1932		+		+			+	
<i>S. mimeticum</i> (Penard, 1922)				+				+
<i>Pelodinium rotundum</i> Kahl, 1926					+			+
<i>Epalxella mirabilis</i> (Roux, 1899)				+			+	
<i>E. antiquorum</i> (Penard, 1922)				+		+		
<i>E. triangula</i> (Kahl, 1932)						+		+
Класс Litostomatea Small et Lynn, 1981								
Отряд Haptorida Corliss, 1974								
Семейство Fuscheriidae Foissner, Agatha et Berger, 2002								
<i>Fuscheria nodosa</i> Foissner, 1983	+				+		+	
Семейство Enchelyidae Ehrenberg, 1838								
<i>Encheliodon tratzi</i> Foissner, 1987		+		+			+	
<i>Papillorhabdos multinucleatus</i> Foissner, 1984			+					+
<i>Lagynophrya mutans</i> Kahl, 1927		+			+		+	
Семейство Trachelophyllidae Kent, 1882								
<i>Trachelophyllum triangularum</i> Tucolesco, 1962	+	+						+
<i>T. attenuatum</i> Tucolesco, 1962	+					+		+
Семейство Lacrymariidae Fromentel, 1876								
<i>Pelagolacrymaria moserae</i> Foissner, Berger et Schaumburg, 1999			+	+				+
<i>P. rostrata</i> Kahl, 1935		+						+
<i>Phialina pupula</i> (Müller, 1773)	+	+		+	+	+	+	+
<i>P. vermicularis</i> (Müller, 1773)	+			+		+	+	
<i>P. vertens</i> (Stokes, 1885)			+					+
<i>P. decussata</i> (Tucolesco, 1962)					+	+		
Семейство Spathidiidae Kahl, 1929								
<i>Spathidium porculus</i> Penard, 1922	+	+					+	
<i>S. chlorelligerum</i> Kahl, 1930						+		+
<i>S. procerum</i> Kahl, 1930	+	+					+	
<i>S. moniliforme</i> Bhatia, 1920			+					+
<i>S. deforme</i> (Kahl, 1928)					+			
<i>S. cetiforme</i> Alekperov, 1984			+					
<i>S. meloforme</i> Alekperov, 1983			+		+	+		
<i>S. fossicola</i> Kahl, 1933	+							
<i>S. binucleatum</i> Lepsi, 1964				+		+		+
<i>S. seppelti</i> Petz et Foissner, 1997				+				

Продолжение таблицы
Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Supraspathidium armatum</i> Foissner, Agatha et Berger, 2002						+	+	+
<i>S. teres</i> (Stokes, 1886)			+					+
<i>S. latissimum</i> (Lepsi, 1964)	+		+					
<i>Protospathidium muscicola</i> Dragesco et Dragesco-Kerneis, 1979		+				+		
<i>Perispira ovum</i> Stein, 1859		+			+			
<i>P. strephostoma</i> Stokes, 1886				+				+
Семейство Didiniidae Poche, 1913								
<i>Monodinium balbianii</i> Fabre-Domergue, 1888	+	+	+	+		+	+	+
<i>M. perrieri</i> Delphy, 1925			+	+				+
<i>M. alveolatum</i> Kahl, 1930				+				
<i>M. chlorelligerum</i> Krainer, 1995			+	+				
<i>Didinium nasutum</i> (Müller, 1773)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>D. chlorelligerum</i> Kahl, 1935			+				+	
Семейство Trachelidae Ehrenberg, 1838								
<i>Dileptus mucronatus</i> Penard, 1922		+					+	
<i>D. breviroboscis</i> Foissner, 1981			+				+	
<i>D. cygnus</i> (Claparede et Lachmann, 1859)	+			+				+
<i>Pelagodileptus trachelioides</i> (Zacharias, 1894)		+		+				+
<i>Paradileptus elephantinus</i> (Svec, 1897)		+		+				+
<i>P. conicus</i> Wenrich, 1929	+		+	+				
<i>Trachelius ovum</i> Ehrenberg, 1831			+	+				
Отряд Cyclotrichida Jankowski, 1980								
Семейство Mesodiniidae Jankowski, 1980								
<i>Askenasia elegans</i> (Fauré-Fremiet, 1924)		+		+				+
<i>A. chlorelligera</i> Krainer et Foissner, 1990			+				+	+
<i>A. volvox</i> (Eichwald, 1852)	+	+					+	
<i>A. stellaris</i> (Leegaard, 1920)	+			+			+	
Семейство Cyclotrichiidae Jankowski, 1980								
<i>Cyclotrichium inflatum</i> Alekperov, 1984			+	+				+
<i>C. ovatum</i> Fauré-Fremiet, 1924					+		+	
Отряд Pleurostomatida Schewiakoff, 1896								
Семейство Amphileptidae Butschli, 1889								
<i>Amphileptus claparedii</i> Stein, 1867	+	+				+		
<i>A. punctatus</i> (Kahl, 1926)				+				+
<i>A. falcatus</i> Song et Wilbert, 1989			+				+	
<i>A. procerus</i> (Penard, 1922)		+		+				
<i>Litonotus anguilla</i> Kahl, 1931	+				+			
<i>L. uninucleatus</i> (Kahl, 1931)			+				+	
<i>L. triqueter</i> Penard, 1922	+						+	
<i>L. obtusus</i> Maupas, 1888	+							

Продолжение таблицы
 Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Loxophyllum meleagris</i> (Müller, 1773)	+	+				+		
<i>L. vorax</i> Stokes, 1886		+						+
<i>L. helus</i> Stokes, 1884	+			+			+	
Класс Phyllopharyngea Puytorac et al., 1974								
Отряд Chlamidodontida Deroux, 1976								
Семейство Chilodonellidae Deroux, 1970								
<i>Chilodonella aplanata</i> Kahl, 1932			+		+			
<i>C. uncinata</i> (Ehrenberg, 1838)			+				+	
<i>C. capucina</i> (Penard, 1922)		+				+	+	
<i>Trithigmostoma steini</i> (Blochmann, 1895)	+		+				+	+
<i>T. cucullulus</i> (Müller, 1786)	+	+	+				+	+
<i>Alinostoma multivacuolatum</i> Alekperov, 1993				+			+	
Семейство Gastronautidae Deroux, 1994								
<i>Gastronauta membranaceus</i> Engelmann Bütschli, 1889				+		+		
Семейство Chlamydodontidae Stein, 1859								
<i>Cyrtophoron poljanskyi</i> Aliev, 1991		+						+
Класс Nassophorea Small et Lynn, 1981								
Отряд Synhymeniida Puytorac et al., 1974								
Семейство Orthodonellidae Jankowski, 1968								
<i>Chilidontopsis depressa</i> (Perty, 1852)		+		+		+		
<i>C. kurensis</i> Alekperov, 1985			+					+
<i>C. vermiformis</i> Deroux, 1978			+				+	
<i>Zosterodasy debilis</i> Alekperov, 1984	+			+			+	
<i>Z. fluviatilis</i> Fernandez-Leborans et Alekperov, 1995			+					+
<i>Z. vorax</i> (Stokes, 1887)		+					+	
<i>Z. azerbaijanicus</i> Aliev, 1990	+	+						
<i>Z. kurensis</i> Aliev, 1990			+					
<i>Z. kasymovi</i> Aliev, 1990			+					
<i>Z. jankowski</i> Aliev, 1990		+						
<i>Z. alizadei</i> Aliev, 1990					+		+	
Отряд Nassulida Jankowski, 1968								
Семейство Nassulopsidae Deroux in Corliss, 1979								
<i>Nassulopsis elegans</i> (Ehrenberg, 1833)				+			+	
<i>N. lagenula</i> Fauré-Fremiet, 1959			+					
Семейство Furgasoniidae Corliss, 1979								
<i>Furgasonia tricirrata</i> (Gelei, 1932)				+			+	
<i>F. rubens</i> (Perty, 1849)				+				+
Семейство Nassulidae Fromentel, 1874								
<i>Nassula ornata</i> Ehrenberg, 1834			+				+	
<i>N. parva</i> Kahl, 1928				+				
<i>N. tumida</i> Maskell, 1887				+				+

Продолжение таблицы
Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>N. argentula</i> Biernacka, 1963				+				
<i>Obertruria regina</i> (Aleksperov, 1984)		+	+					
<i>O. aurea</i> (Ehrenberg, 1834)				+		+		
<i>O. gracilis</i> (Kahl, 1931)			+				+	
Отряд Microthoracida Jankowski, 1967								
Семейство Pseudomicrothoracidae Jankowski, 1967								
<i>Pseudomicrothorax agilis</i> Mermod, 1914		+				+		
<i>P. dubius</i> Maupas, 1883				+		+		
Семейство Microthoracidae Wrzesniowski, 1870								
<i>Trochiliopsis opaca</i> Penard, 1922				+			+	
<i>Drepanomonas dentata</i> Fresenius, 1858				+				+
<i>Microthorax leptopharyngiformis</i> Foissner, 1985			+			+		
<i>M. ovinucleatus</i> Sramek-Husek, 1957			+				+	
Класс Colpodea Small et Lynn, 1981								
Отряд Colpodida Puytorac et al., 1974								
Семейство Colpodidae Bory de St. Vincent, 1826								
<i>Colpoda inflata</i> (Stokes, 1884)	+		+		+	+	+	+
<i>C. taupasii</i> Enriques, 1908	+			+		+	+	
<i>C. aspera</i> Kahl, 1926	+			+		+		
<i>C. cucullus</i> (Müller, 1773)	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. magna</i> (Gruber, 1879)				+				
<i>C. colpodiopsis</i> Kahl, 1931			+		+			
<i>C. oblonga</i> Dragesco, 1972			+	+				
<i>Bresslaia vorax</i> Kahl, 1931			+	+				
<i>B. insidiatrix</i> Claff, Dewey et Kidder, 1941			+	+		+		
Семейство Hausmanniellidae Foissner, 1987								
<i>Hausmaniella discoidea</i> (Gellert, 1956)				+	+	+		
<i>H. patella</i> (Kahl, 1931)			+			+		
<i>H. quinquecirrata</i> (Gellert, 1955)					+			
<i>Avestina acuta</i> (Buitkamp, 1977)	+				+			+
Отряд Bursariomorphida Fernandez-Galiano, 1978								
Семейство Bursariidae Foissner, 1993								
<i>Bursaria truncatella</i> Müller, 1773		+	+	+				
Отряд Bryophryida Puytorac, Perez-Paniagua et Perez-Silva, 1979								
Семейство Bryophryidae Puytorac, Perez-Paniagua et Perez-Silva, 1979								
<i>Bryophrya bavariensis</i> Kahl, 1931			+		+			
<i>B. rubescens</i> (Penard, 1922)				+				
Отряд Cyrtolophosidida Foissner, 1978								
Семейство Cyrtolophosididae Stokes, 1888								
<i>Cyrtolophosis bivacuolata</i> Vuxanovici, 1963	+				+			

Продолжение таблицы
 Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>C. minor</i> Vuxanovici, 1963		+						
<i>C. acuta</i> Kahl, 1926	+				+			+
Семейство Woodruffiidae Gelei, 1954								
<i>Woodruffia rostrata</i> Kahl, 1931			+					
Класс Prostomatea Small et Lynn, 1985								
Отряд Prorodontida Corliss, 1974								
Семейство Colepidae Nitzsch, 1827								
<i>Coleps bicuspis</i> Noland, 1925	+	+					+	+
<i>C. lacustris</i> Fauré-Fremiet, 1924			+			+	+	
<i>C. elongatus</i> Ehrenberg, 1833		+			+	+	+	
<i>C. hirtus</i> Nitzsch, 1921	+		+		+		+	+
Семейство Holophryidae Perty, 1852								
<i>Holophrya saginata</i> Penard, 1922	+					+		
<i>H. nigricans</i> Lauterborn, 1894		+				+		+
<i>H. carchesii</i> Canella, 1964			+					
<i>H. africana</i> Dragesco, 1965			+					
<i>H. spirogyrophaga</i> (Leipe, 1989)		+						
Класс Plagiopylea Small et Lynn, 1985								
Отряд Plagiopylida Jankowski, 1978								
Семейство Plagiocampidae Kahl, 1926								
<i>Plagiocampa mutabile</i> Schewiakoff, 1893		+	+		+			
<i>P. kurensis</i> Alekperov, 2005			+	+				+
<i>P. atra</i> Grandori, 1934	+			+				
<i>P. caudata</i> Alekperov, 1984			+				+	
<i>P. difficilis</i> Foissner, 1981	+		+				+	
<i>Prorodon pluvialis</i> Dragesco, 1962				+			+	
<i>P. laurenti</i> Dragesco, 1966	+	+		+			+	
<i>P. lucens</i> Alekperov, 1985			+			+		
<i>P. mimeticus</i> Kahl, 1932				+		+		
Семейство Urotrichidae Small et Lynn, 1985								
<i>Rhagadostoma completum</i> Kahl, 1926	+			+				
<i>Urotricha sphaerica</i> Groliere, 1977		+		+				+
<i>U. armata</i> Kahl, 1927	+				+			+
<i>U. discolor</i> Kahl, 1931			+			+		
<i>U. baltica</i> Czapik et Jordan, 1977				+		+		
<i>U. pelagica</i> Kahl, 1932		+		+	+			+
Семейство Plagiopylidae Schewiakoff, 1896								
<i>Plagiopyla nasuta</i> Stein, 1860				+				
Класс Oligohymenophora Puytorac et al., 1974								
Отряд Peniculida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956								
Семейство Frontoniidae Kahl, 1926								
<i>Frontonia azerbaijanica</i> Alekperov, 1983		+	+		+			

Продолжение таблицы
Continuation table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>F. arenaria</i> Kahl, 1933			+					+
<i>F. elliptica</i> Beardsley, 1902		+						
<i>F. algivora</i> Kahl, 1931			+		+			
<i>Disematostoma butschlii</i> Lauterborn, 1894			+			+		
<i>Stokesia vernalis</i> (Wang, 1928)			+					
Семейство Lembadionidae Jankowski in Corliss, 1979								
<i>Lembadion bullinum</i> Perty, 1849	+				+		+	
<i>L. magnum</i> (Stokes, 1887)			+				+	
<i>L. lucens</i> (Maskell, 1887)			+		+		+	+
Семейство Urocentridae Claparede et Lachmann, 1859								
<i>Urocentrum turbo</i> (Müller, 1786)	+		+		+			+
Семейство Parameciidae Dujardin, 1840								
<i>Paramecium caudatum</i> Ehrenberg, 1832	+	+	+		+		+	+
<i>P. woodruffi</i> Wenrich, 1928	+	+	+		+		+	+
<i>P. bursaria</i> (Ehrenberg, 1832)			+		+		+	+
<i>P. putrinum</i> Claparede et Lachmann, 1858		+			+		+	
Отряд Tetrahymenida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956								
Семейство Tetrahymenidae Corliss, 1952								
<i>Tetrahymena pyriformis</i> (Ehrenberg, 1830)	+			+				
Семейство Turaniellidae Didier, 1971								
<i>Colpidium colpoda</i> (Losana, 1829)	+		+		+			+
<i>C. singulare</i> Vuxanovici, 1962		+		+				
<i>C. striatum</i> Stokes, 1886		+		+				
Семейство Spirozonidae Kahl, 1926								
<i>Stegochilum fusiforme</i> Schewiakoff, 1893			+		+			
Семейство Glaucoidae Corliss, 1971								
<i>Epenardia myriophyllii</i> Corliss, 1971			+					+
<i>Glaucoma scintillans</i> Ehrenberg, 1830		+			+			+
Семейство Ophryoglenidae Kent, 1881								
<i>Ophryoglena atra</i> Ehrenberg, 1838	+			+				+
<i>O. acuminata</i> Ehrenberg, 1838			+					
<i>O. catenula</i> Savoie, 1965		+						
<i>O. flava</i> (Ehrenberg, 1838)			+	+				
Отряд Scuticociliatida Small, 1967								
Семейство Loxocephalidae Jankowski, 1964								
<i>Loxocephalus luridus</i> Eberhard, 1862	+				+			
<i>Sathrophilus granulatus</i> Czapik, 1968				+				+
<i>Platynematum hyalinum</i> (Kahl, 1931)				+				
<i>Cinetochilum margaritaceum</i> Ehrenberg, 1831				+				+

Окончание таблицы
Ending table

Свободноживущие инфузории	Точки сбора							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Отряд Philasterida Small, 1967								
Семейство Cyclidiidae Ehrenberg, 1838								
<i>Cristigera vestita</i> Kahl, 1928	+		+	+			+	+
<i>C. fusiformis</i> Penard, 1922			+				+	
<i>C. media</i> Kahl, 1928		+					+	
<i>Cyclidium citrullus</i> Cohn, 1865	+		+	+	+	+	+	+
<i>C. glaucoma</i> Müller, 1786	+	+	+	+	+	+		+
Семейство Uronematidae Thompson, 1964								
<i>Uronema marinum</i> Dujardin, 1841	+	+		+	+		+	+
<i>U. nigricans</i> (Müller, 1786)		+	+			+	+	
<i>U. elegans</i> (Maupas, 1883)			+			+	+	
<i>U. acutum</i> Buddenbrock, 1920	+	+	+		+		+	+
Отряд Parastomatida Jankowski, 2007								
Семейство Pleuronematidae Kent, 1881								
<i>Pleuronema marinum</i> Dujardin, 1841	+		+					
<i>P. coronatum</i> Kent, 1881			+	+				+
<i>P. crassum</i> Dujardin, 1841	+		+					+
Отряд Sessilida Kahl, 1933								
Семейство Epistylidae Kahl, 1933								
<i>Epistylis procumbens</i> (Zacharias, 1897)		+		+				
<i>E. plicatilis</i> Ehrenberg, 1830			+				+	
<i>E. nymphaeum</i> Engelmann, 1862			+					+
<i>E. procumbens</i> (Zacharias, 1897)	+			+				
<i>E. rotatorium</i> Kahl, 1935				+			+	
<i>E. anastatica</i> (Linne, 1767)			+					+
<i>E. cyclopi</i> Banina, 1977				+				
<i>E. dafniae</i> Fauré-Fremiet, 1905		+						
Семейство Vorticellidae Ehrenberg, 1838								
<i>Vorticella spuripicta</i> Song et Wilbert, 1889		+					+	+
<i>V. alba</i> Fromentel, 1874	+		+					+
<i>V. octava</i> Stokes, 1885		+					+	+
<i>Carchesium aselli</i> Engelmann, 1862			+					
<i>C. prechti</i> Banina, 1977				+				
<i>Zoothamnium arbuscula</i> Ehrenberg, 1831		+		+			+	+
<i>Z. alternans</i> Claparede et Lachmann, 1859		+		+				+
<i>Z. plumosum</i> Wright, 1860			+				+	
<i>Z. adamsi</i> Stokes, 1885						+		
<i>Z. haplocaulis</i> Stiller, 1953			+				+	+
<i>Z. astacicolae</i> Shubernetzky, 1978			+	+				
<i>Z. balticum</i> Biernacka, 1963		+		+				
Всего	80	89	128	140	68	74	109	119

Как следует из таблицы, видовое разнообразие пресноводных инфузорий значительно меняется в зависимости от расположения и экологических условий точек сбора. Так, например, в точке сбора 1, возле государственной границы с Грузией, видовое разнообразие пресноводных инфузорий относительно невелико (80 видов). Это объясняется высокой загрязненностью на данном участке р. Куры, а также сильным течением и слабым развитием водной растительности, служащей для многих видов инфузорий и их кормовых организмов субстратом для поселения. Характерно, что в точке сбора 1 были отмечены только единичные особи всего 1 вида кругоресничных инфузорий, нуждающихся в субстрате для прикрепления.

Видовое разнообразие пресноводных инфузорий в точке сбора 2 (Шамкирское водохранилище и близлежащие водоемы) незначительно выше (89 видов). Точки 3 и 4 соответствуют Мингечаурскому и Варваринскому водохранилищам. Первое из них является крупнейшим водохранилищем страны, а второе представляет собой мелководный (2–5 м) водоем, сильно заросший водорослями и высшей водной растительностью. На наш взгляд, наибольшее видовое богатство пресноводных инфузорий в этих двух точках сбора обусловлено разнообразием имеющихся здесь биотопов и обилием кормовых объектов. В Мингечаурском водохранилище, максимальная глубина которого достигает более 70 м, хорошо развито планктонное сообщество инфузорий. Кроме того, на мелководных участках с водной растительностью присутствуют и песок, и илистые грунты, населенные типичными бентическими видами.

Илистые грунты полностью преобладают в Варваринском водохранилище, где в бентосе и прибрежных фитоцелиоценозах развиваются характерные сообщества пресноводных инфузорий.

Точки сбора 5 и 6 расположены непосредственно на р. Куры в ее нижнем течении. Обе точки характеризуются сильным течением, заиленным песком грунта и отсутствием водных растений. По мнению авторов, данные факторы и обуславливают минимальное видовое разнообразие пресноводных инфузорий именно на этих исследованных нами участках бассейна р. Куры (68 и 74 вида соответственно).

Наконец, в точках сбора 7 и 8, расположенных в нижнем течении и дельте р. Куры, нами было обнаружено 109 и 119 видов свободноживущих инфузорий соответственно. Большинство отмеченных здесь видов были найдены в дельте р. Куры в небольших тихих мелководных заливах с зарослями *Chara* sp.

На рис. 2 представлено процентное соотношение различных групп инфузорий по встречаемости в их общем видовом разнообразии пресных вод бассейна р. Куры. Как следует из рис. 2, на долю видов-доминантов (обнаружены в более чем 80 % собранных проб) приходится 10,71 % от общего числа найденных видов. Среди них можно отметить *Spirostomum minus*, *S. teres*, *Stentor coeruleus*, *Oxytricha fallax*, *Urostyla grandis*, ряд представителей рода *Euplotes* (*E. patella*, *E. harpa*, *E. balteatus*, *E. eurystomus*, *E. trisulcatus*), *Halteria grandinella*, *Phialina pupula*, *P. vermicularis*, *Monodinium balbianii*, *Didinium nasutum*, *Trithigmostoma cucullulus*, а также некоторые виды родов *Colpoda* (*C. inflata*, *C. maupasii*, *C. aspera*, *C. cucullus*), *Paramecium* (*P. caudatum*, *P. woodruffi*, *P. bursaria*) и *Uronema* (*U. marinum*, *U. nigricans*, *U. elegans*, *U. acutum*). Несмотря на то что группа видов-доминантов присутствует в сообществах практически круглогодично, высокой численности эти инфузории, как правило, не достигают и представлены в пробах преимущественно единичными особями.

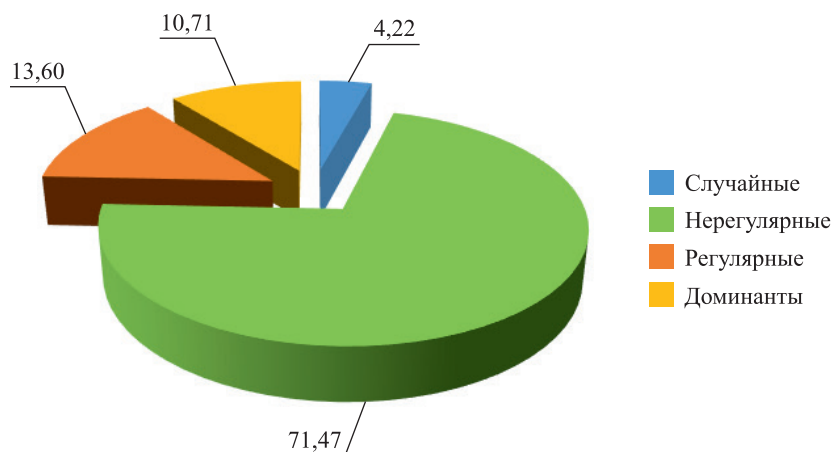


Рис. 2. Соотношение различных групп инфузорий в общем видовом разнообразии бассейна р. Куры, %

Fig. 2. The ratio of different groups of ciliates in the total species diversity of the Kura River basin, %

Группа регулярных видов (встречаемость менее 80, но более 50 %) составила 13,60 % от общего числа обнаруженных видов. Среди них следует отметить *Loxodes rostrum*, *L. striatus*, *Blepharisma vestitum*, *B. coerulea*, *Paraurostyla weissei*, *Oxytricha aeruginosa*, *Aspidisca fusca*, *Brachonella caduca*, *Caenomorpha medusula*, *Saprodinium halophilum*, *Supraspathidium armatum*, *Dileptus cygnus*, *Askenasia volvox*, *A. stellaris*, *Trithigmostoma steini*, *Zosterodasys debilis*, *Avestina acuta*, представителей рода *Coleps* (*C. hirtus*, *C. elongatus*, *C. lacustris*, *C. bicuspis*), а также *Urocentrum turbo*, *Glaucoma scintillans*, *Cristigera vestita*, *Pleuronema coronatum*, *P. crassum* и 3 вида рода *Vorticella* (*V. alba*, *V. octava*, *V. spuripicta*). Для этой группы инфузорий характерно заметное увеличение численности отдельных видов в теплое время года – до 55–120 экз./л в планктоне (*Urocentrum turbo*, *Askenasia volvox*, *A. stellaris* и др.), а иногда до 180–315 экз./дм² в бентосе (*Loxodes rostrum*, *Coleps hirtus*, *C. bicuspis*, *Trithigmostoma steini*).

Как следует из рис. 2, самой многочисленной является группа нерегулярных видов (встречаемость от 30 до 50 %). На долю этой группы приходится 71,47 % от общего количества найденных видов свободноживущих инфузорий. Характерная особенность видов данной группы – сезонность их присутствия в сообществах. Например, такие виды, как *Loxodes kahli*, *L. vorax*, *Paragastrostyla lanceolata*, *Stylonychia bifaria*, *Histriculus complanatus*, *Anteholosticha pulchra*, *Sterkiella tricirrata* и многие другие представители брюхоресничных инфузорий, появляются в пробах только ранней весной, порой достигая общей численности в бентосе 250–380 экз./дм², и выпадают из сообществ с прогревом воды выше 18–21 °С.

Отдельные виды этой группы, наоборот, присутствуют в пробах только в теплое летнее время. Сюда относятся некоторые представители рода *Frontonia* (*F. azerbaijanica*, *F. algivora*, *F. elliptica*), группа видов-сапропелебионтов (*Metopus acidiferus*, *M. caucasicus*, *M. fuscoides*, *Brachonella mitriformis*, *B. darwini*, *B. spiralis*), а также представители кругоресничных инфузорий (*Epistylis procumbens*, *E. plicatilis*, *Zoothamnium arbuscula*, *Z. alternans*, *Z. plumosum* и *Z. adamsi*). Летом суммарная численность таких видов, как *Frontonia azerbaijanica*, *Metopus acidiferus*, *M. caucasicus* и *Brachonella mitriformis*, может достигать в бентосе на черном или сапропелевом иле до 850–1270 экз./дм².

Наконец, на долю самой небольшой группы случайных видов (встречаемость менее 30 %) приходится 4,22 % от общего видового разнообразия инфузорий. Представители этой группы обычно отмечались в сообществах спорадически и присутствовали в них крайне недолго. Наиболее яркий пример – появление в планктоне Мингечаурского водохранилища в апреле вида *Woodruffia rostrata*, который массово развивается в небольшом Ханабадском заливе примерно 10–15 дней, достигая максимума развития (до 12 тыс. экз./л), а затем в течение нескольких дней активно инцистируется и выпадает из сообщества до следующей весны. Эта закономерность наблюдалась нами несколько лет подряд. Следовательно, можно предположить, что данные инфузории являются стенобионтами и их оптимум условий существования ограничен узкими рамками.

Выводы

1. В результате многолетних исследований видового разнообразия свободноживущих инфузорий пресных водоемов бассейна р. Куры были обнаружены 308 видов, относящихся к 60 семействам.

2. Видовое разнообразие пресноводных инфузорий значительно меняется в зависимости от расположения и экологических условий точек сбора. Наибольшее видовое богатство пресноводных инфузорий было отмечено в Мингечаурском и Варваринском водохранилищах (128 и 140 видов соответственно), что, на наш взгляд, обусловлено разнообразием имеющихся здесь биотопов и обилием кормовых организмов.

3. Анализ встречаемости инфузорий показал, что к группе видов-доминантов (отмечены в более чем 80 % всех проб) относятся 10,71 % от общего видового разнообразия, к группе регулярных видов (встречаемость менее 80, но более 50 %) – 13,60 %, к самой большой группе нерегулярных видов (встречаемость от 30 до 50 %) – 71,47 %, а к группе случайных видов (встречаемость менее 30 %) – 4,22 % от общего видового разнообразия.

4. Установлено, что самая многочисленная группа нерегулярных видов главным образом состоит из инфузорий, приуроченных к определенному времени года – преимущественно весне и осени. Однако отмечена и часть нерегулярных видов, появляющихся в сообществах только летом. Именно представители группы нерегулярных видов в основном обуславливают кратковременные сезонные максимумы (обычно весной и осенью) качественного и количественного развития общего видового разнообразия пресноводных свободноживущих инфузорий.

Библиографические ссылки

1. Алекперов ИХ. *Свободноживущие инфузории Азербайджана (экология, зоогеография, практическое значение)*. Баку: Элм; 2012. 519 с.
2. Corliss JO. Biodiversity and Biocomplexity of the Protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. *Acta Protozoologica*. 2002;41(3):199–219.
3. Foissner W. Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodiversity and Conservation*. 2008;17:235–242. DOI: 10.1007/s10531-007-9248-5.
4. Foissner W. *Terrestrial and Semiterrestrial Ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Venezuela and Galápagos*. [Austria]: [s. n.]; 2016. 912 p. (Denisia; volume 35).
5. Foissner W, Berger H. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*. 1996;35(2):375–482. DOI: 10.1111/j.1365-2427.1996.tb01775.x.
6. Witzany G, Nowacki M, editors. *Biocommunication of ciliates*. 1st edition. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. 372 p. DOI: 10.1007/978-3-319-32211-7.
7. Вейсиг СЯ. Фауна Шолларских родников. *Известия Азербайджанского государственного университета. Отделение естественных и медицинских наук*. 1930;9:173–185.
8. Вейсиг СЯ. *Озеро Гек-Гель: гидробиологический очерк*. Баку: Азербайджанский государственный научно-исследовательский институт; 1931. 46 с.
9. Вейсиг СЯ. Материалы по гидробиологии рисовых полей. *Труды Зоологического института Азербайджанского филиала Академии наук СССР*. 1939;X:25–42.
10. Вейсиг СЯ. Материалы по микроскопической гидрофауне Кавказа и ее зоогеографическому анализу [диссертация]. Баку: Азербайджанский педагогический институт имени В. И. Ленина; 1940. 336 с.
11. Ализаде АН. Гидрофауна Апшеронского полуострова. *Труды Зоологического сектора Азербайджанского филиала Академии наук СССР*. 1934;VII:20–26.
12. Ализаде АН. Материалы к гидрофауне Нахичеванской АССР. *Труды Зоологического института Азербайджанского филиала Академии наук СССР*. 1938;VIII(42):155–161.
13. Ализаде АН. Гидробиологическая экскурсия по восточной оконечности Большого Кавказа. *Труды Зоологического института Азербайджанского филиала Академии наук СССР*. 1939;X:3–24.
14. Ализаде АН. Планктон рыбных кормовых прудов. *Известия Азербайджанского филиала Академии наук СССР*. 1942;9:74–87.
15. Alekperov IKh, Snegovaya NYu, Tahirova EN. The cadastre of free-living ciliates and testate amoebae of Azerbaijan. *Protistology*. 2017;11(2):57–129. DOI: 10.21685/1680-0826-2017-11-2-1.
16. Алекперов ИХ. *Атлас свободноживущих инфузорий (классы Kinetofragminophora, Colpodea, Olygohymenophora, Polyhymenophora)*. Баку: Борчалы; 2005. 310 с.
17. Chatton E, Lwoff A. Impregnation, par diffusion argentique, de l'infraction ciliature des Ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessiccation. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*. 1930;104(2):834–836.
18. Алекперов ИХ. Новая модификация импрегнации кинетомы инфузорий протеином серебра. *Зоологический журнал*. 1992;2:130–133.
19. Алимов А. *Протисты. Руководство по зоологии. Часть 2*. Санкт-Петербург: Наука; 2007. 1144 с.

References

1. Alekperov IKh. *Svobodnozhivushchie infuzorii Azerbaidzhana (ekologiya, zoogeografiya, prakticheskoe znachenie)* [Free-living ciliates of Azerbaijan (ecology, zoogeography, practical significance)]. Baku: Elm; 2012. 519 p. Russian.
2. Corliss JO. Biodiversity and Biocomplexity of the Protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. *Acta Protozoologica*. 2002;41(3):199–219.
3. Foissner W. Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodiversity and Conservation*. 2008;17:235–242. DOI: 10.1007/s10531-007-9248-5.
4. Foissner W. *Terrestrial and Semiterrestrial Ciliates (Protozoa, Ciliophora) from Venezuela and Galápagos*. [Austria]: [s. n.]; 2016. 912 p. (Denisia; volume 35).
5. Foissner W, Berger H. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology*. 1996;35(2):375–482. DOI: 10.1111/j.1365-2427.1996.tb01775.x.
6. Witzany G, Nowacki M, editors. *Biocommunication of ciliates*. 1st edition. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. 372 p. DOI: 10.1007/978-3-319-32211-7.
7. Veysig SY. [The fauna of the Shollar springs]. *Izvestiya Azerbaidzhanskogo gosudarstvennogo universiteta. Otdelenie estestvennykh i meditsinskikh nauk*. 1930;9:173–185. Russian.
8. Veysig SY. *Ozero Gek-Gel': gidrobiologicheskii ocherk* [Lake Goy Gol: hydrobiological essay]. Baku: Azerbaidzhanskii gosudarstvennyi nauchno-issledovatel'skii institut; 1931. 46 p. Russian.
9. Veysig SY. Materials on the hydrobiology of rice fields. *Trudy Zoologicheskogo instituta Azerbaidzhanskogo filiala Akademii nauk SSSR*. 1939;X:25–42. Russian.
10. Veysig SY. [Materials on the microscopic hydrofauna of the Caucasus and its zoogeographical analysis] [dissertation]. Baku: Azerbaidzhanskii pedagogicheskii institut imeni V. I. Lenina; 1940. 336 p. Russian.
11. Alizade AN. [Hydrofauna of the Absheron peninsula]. *Trudy Zoologicheskogo sektora Azerbaidzhanskogo filiala Akademii nauk SSSR*. 1934;VII:20–26. Russian.
12. Alizade AN. [Materials for the hydrofauna of the Nakhichevan Autonomous Soviet Socialist Republic]. *Trudy Zoologicheskogo instituta Azerbaidzhanskogo filiala Akademii nauk SSSR*. 1938;VIII(42):155–161. Russian.

13. Alizade AN. [Hydrobiological excursion on the eastern end of the Greater Caucasus]. *Trudy Zoologicheskogo instituta Azerbaidzhanskogo filiala Akademii nauk SSSR*. 1939;X:3–24. Russian.
14. Alizade AN. [Plankton fish feed ponds]. *Bulletin of the Azerbaijan filiation of the Academy of Sciences of the USSR*. 1942;9: 74–87. Russian.
15. Alekperov IKh, Snegovaya NYu, Tahirova EN. The cadastre of free-living ciliates and testate amoebae of Azerbaijan. *Protistology*. 2017;11(2):57–129. DOI: 10.21685/1680-0826-2017-11-2-1.
16. Alekperov IKh. *Atlas svobodnozhivushchikh infuzorii (klassy Kinetofragminophora, Colpodea, Olygohymenophora, Polyhymenophora)* [Atlas of free-living ciliates (classes *Kinetofragminophora*, *Colpodea*, *Olygohymenophora*, *Polyhymenophora*)]. Baku: Borchaly; 2005. 310 p. Russian.
17. Chatton E, Lwoff A. Impregnation, par diffusion argentique, de l'infraciliature des Ciliés marins et d'eau douce, après fixation cytologique et sans dessiccation. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*. 1930;104(2):834–836.
18. Alekperov IKh. [A new modification of the impregnation of kinetoma of ciliates with silver proteinate]. *Zoologicheskii zhurnal*. 1992;2:130–133. Russian.
19. Alimov A. *Protisty. Rukovodstvo po zoologii. Chast' 2* [Protista: Handbook on zoology. Part 2]. Saint Petersburg: Nauka; 2007. 1144 p. Russian.

Статья поступила в редколлегию 10.06.2020.
Received by editorial board 10.06.2020.

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 633.8(075.8)+615.32(075.8)

Поликсенова В. Д. Лекарственные растения [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», специализации: 1-31 01 01-01 02 «Ботаника», 1-31 01 01-02 02 «Ботаника» / В. Д. Поликсенова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 101 с. Библиогр.: с. 100–101. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/244815>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 01.07.2020, № 007301072020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)» (специализации 1-31 01 01-01 02 «Ботаника» и 1-31 01 01-02 02 «Ботаника»).

ЭУМК включает конспект лекций, освещающий историю исследований лекарственных растений, вопросы охраны растительных ресурсов и источников лекарственного сырья, требования к лекарственному сырью, общие представления о химическом составе лекарственных растений. Характеризуются лекарственные растения различных мест обитания, лекарственные свойства грибов, лишайников и водорослей, применение в медицине, основные лекарственные препараты. Приведен перечень мероприятий для контроля самостоятельной работы, возможная тематика курсовых и дипломных работ, список литературы и электронных ресурсов.

УДК 615.9(075.8)

Основы токсикологии [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 02 «Биохимия» / БГУ ; сост. Т. А. Кукулянская. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 87 с. : табл. Библиогр.: с. 86–87. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/246466>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 22.07.2020, № 009622072020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 «Биохимия» биологического факультета Белорусского государственного университета. Содержание ЭУМК предполагает изучение следующих вопросов: характеристики токсического процесса, классификации и физико-химической характеристики токсических веществ, токсикокинетики и токсикодинамики, параметров токсикометрии, коэргизма действия токсикантов, а также принципов действия и разнообразия антидотов.

УДК 576.385(075.8)

Глушен С. В. Патология клетки [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)» / С. В. Глушен ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 51 с. : ил., табл. Библиогр.: с. 51. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/246570>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 24.07.2020, № 009824072020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) по учебной дисциплине «Патология клетки» предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)». Содержание ЭУМК предусматривает изучение патологических процессов на уровне клетки под действием вирусов, молекулярно-генетических механизмов гибели клеток, закономерностей опухолевой патологии клеток. В него включены также методики, широко используемые для тестирования жизнеспособности клеток и определения типа их гибели.

УДК 578(075.8)

Неклеточные инфекционные агенты микроорганизмов, животных и человека [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для студентов магистратуры спец. 1-31 80 12 «Микробиология», профилизация «Фундаментальная и прикладная микробиология» / А. Н. Евтушенко [и др.] ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 88 с. : ил. Библиогр.: с. 87–88. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/250119>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 26.10.2020, № 013526102020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов II ступени получения высшего образования специальности 1-31 80 12 «Микробиология» (профилизация «Фундаментальная и прикладная микробиология»). Содержание ЭУМК направлено на углубление знаний студентов магистратуры об основных группах вирусов, бактерий, животных и человека, рассмотрение основных направлений и перспектив практического использования неклеточных инфекционных агентов.

УДК 577.121(075.8)

Логвина А. О. Биохимия вторичных метаболитов [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 80 11 «Биохимия», профилизация «Фундаментальная и прикладная биохимия» / А. О. Логвина ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 65 с. : ил. Библиогр.: с. 64–65. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/250163>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 27.10.2020, № 013627102020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов II ступени высшего образования специальности 1-31 80 11 «Биохимия» (профилизация «Фундаментальная и прикладная биохимия»). Содержание ЭУМК посвящено формированию представлений о закономерностях вторичного синтеза и его значении для организмов, продуцирующих вторичные метаболиты (растения, морские животные, грибы, бактерии); рассмотрению подходов к классификации, структурных особенностей и биохимических характеристик основных групп вторичных метаболитов, путей их биосинтеза, взаимосвязи с первичным синтезом, ферментативной регуляции; ознакомлению с современными методами разделения, качественного и количественного исследования соединений вторичной природы и стратегией разработки схем биохимического исследования вторичных метаболитов.

УДК 631.524.84(075.8)+606:631.52(075.8)

Молчан О. В. Молекулярные и клеточные основы регуляции продуктивности культурных растений [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», направление спец. 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)» / О. В. Молчан, С. Н. Филиппова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 64 с. : ил. Библиогр.: с. 62–64. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/250167>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 27.10.2020, № 013727102020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов I ступени высшего образования специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)». Содержание ЭУМК посвящено рассмотрению основных достижений клеточной биологии и биоинженерии растений в разработке подходов к повышению продуктивности растений и качества продукции растениеводства.

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Обернихин С. С., Яглова Н. В., Назимова С. В., Яглов В. В. Изменения продукции мембранных белков, обеспечивающих йодаккумуляторную функцию щитовидной железы, при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ	3
Тимохина Е. П., Яглов В. В., Обернихин С. С., Яглова Н. В., Назимова С. В., Цомартова Д. А. Роль структурной реорганизации митохондриального аппарата в возрастных изменениях функционирования коркового вещества надпочечников	13
Нижегородова Д. Б., Ксендзова Г. А., Сыса А. Г., Юркевич М. Ю., Лобай М. В., Шадыро О. И., Зафранская М. М. Эффекты производных 2-амино-4,6-ди- <i>трет</i> -бутилфенола на жизнеспособность и функциональное состояние лимфоцитов периферической крови человека	19
Дуж Е. В., Гончаров А. Е. Функциональные свойства иммунных клеток под действием экстрактов грибов <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Boletus edulis</i>	29
Самович Т. В., Гончарик Р. Г., Печенкина Е. И., Вязов Е. В., Козел Н. В. Накопление астаксантина в клетках <i>Haematococcus pluvialis</i> , индуцированное дефицитом азота и светом высокой интенсивности	37
Каляга Т. Г., Козел Н. В. Влияние почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в растениях ячменя сорта Бровар	46
Кулик Е. В., Шукина М. А., Евтушенко А. Н. Белорусский изолят <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> КК-1: факторы патогенности и чувствительность к гербициду глифосату	54

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Габриелян Л. С., Трчунян А. А. Антибактериальные свойства наночастиц серебра и мембранотропные механизмы их действия	64
Коктыш И. В., Мельникова Я. И., Кулакович О. С., Романенко А. А., Маскевич С. А. Влияние полиэлектролитов на увеличение чувствительности иммунофлуоресцентного анализа на основе плазмонных серебряных наночастиц	72

ЗООЛОГИЯ

Сауткин Ф. В., Синчук О. В., Барышникова С. В. Первая регистрация <i>Phyllonorycter taestingella</i> (Müller, 1764) на территории Беларуси	81
Круглова О. Ю., Прищепчик О. В. Первая регистрация в Беларуси зимовки в ульях пчел инвазивного вида кокцинеллид <i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	88

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

Алекперов И. Х., Тагирова Э. Н. Биоразнообразие свободноживущих инфузорий бассейна реки Куры (в пределах Азербайджана)	97
Аннотации депонированных в БГУ работ	114

CONTENTS

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

<i>Obernikhin S. S., Yaglova N. V., Nazimova S. V., Yaglov V. V.</i> Altered production of membrane-associated proteins, providing iodine accumulation by thyroid gland, after exposure to endocrine disruptor DDT	3
<i>Timokhina E. P., Yaglov V. V., Obernikhin S. S., Yaglova N. V., Nazimova S. V., Tsomartova D. A.</i> Role of reorganization of mitochondria structure in age-dependent changes of adrenal cortex function	13
<i>Nizheharodava D. B., Ksendzova G. A., Sysa A. G., Yurkevich M. Yu., Labai M. V., Shadyro O. I., Zafranskaya M. M.</i> Effects of 2-amino-4,6-di- <i>tert</i> -butylphenol derivatives on the viability and functional state of human peripheral blood lymphocytes	19
<i>Duzh E. V., Hancharou A. Y.</i> Functional properties of immune cells under the influence of extracts of mushrooms <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Boletus edulis</i>	29
<i>Samovich T. V., Goncharik R. G., Pechenkina E. I., Viazau Ya. V., Kozel N. V.</i> Astaxanthin accumulation in <i>Haematococcus pluvialis</i> cells induced by nitrogen deficiency and high light intensity	37
<i>Kaliaha T. G., Kozel N. V.</i> The effect of soil drought on the content of photosynthetic pigments in barley plants of the Brovar variety	46
<i>Kulik A. V., Shukshina M. A., Evtushenkov A. N.</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KK-1 isolate from Belarus: pathogenicity factors and glyphosate sensitivity	54

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Gabrielyan L. S., Trchounian A. A.</i> Antibacterial properties of silver nanoparticles and their membranotropic action	64
<i>Koktysh I. V., Mel'nikova Ya. I., Kulakovich O. S., Ramanenka A. A., Maskevich S. A.</i> Influence of polyelectrolytes on increasing sensitivity of an immunofluorescent analysis based on plasmon silver nanoparticles	72

ZOOLOGY

<i>Sautkin F. V., Sinchuk A. V., Baryshnikova S. V.</i> First record of <i>Phyllonorycter maestingella</i> (Müller, 1764) in Belarus	81
<i>Kruglova O. Yu., Prischepchik O. V.</i> The first registration of the wintering of invasive species of coccinellid <i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773) in the bee hives in Belarus	88

BIODIVERSITY

<i>Alekperov I. Kh., Tahirova E. N.</i> Biodiversity of free-living ciliates of the Kura River basin (within Azerbaijan)	97
Indicative abstracts of the papers deposited in BSU	114

*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.
№ 3. 2020**

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

URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология» издается с января 1969 г.
До 2017 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»
(ISSN 2308-9164).

Редакторы *О. А. Семенец, М. А. Подголина*
Технический редактор *В. В. Пишкова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 31.12.2020.
Тираж 110 экз. Заказ 506.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
ЛП № 02330/89 от 03.03.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

© БГУ, 2020

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 3. 2020**

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

URL: <https://journals.bsu.by/index.php/biology>

«Journal of the Belarusian State University. Biology»
published since January, 1969.
Until 2017 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»
(ISSN 2308-9164).

Editors *O. A. Semenets, M. A. Podgolina*
Technical editor *V. V. Pishkova*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 31.12.2020.
Edition 110 copies. Order number 506.

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, 2020