



ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

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

Выходит три раза в год

1

2021

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

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

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

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 616.37:612.273+612.018

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОРМО- И ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ПОСЛЕ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕРЫВИСТОЙ ГИПОКСИИ И МЕЛАТОНИНА

Р. В. ЯНКО¹⁾, М. И. ЛЕВАШОВ¹⁾

¹⁾Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины,
ул. Богомольца, 4, 01024, г. Киев, Украина

Изучены морфологические изменения поджелудочной железы нормо- и гипертензивных крыс после сочетанного воздействия прерывистой нормобарической гипоксии и мелатонина. Исследование проведено в осенний период на 24 нормотензивных (линия Wistar) и 24 спонтанно-гипертензивных (линия SHR) крысах-самцах. Подопытным животным ежедневно подавали гипоксическую газовую смесь (12 % кислорода в азоте) в прерывистом режиме: 15 мин деоксигенация/15 мин реоксигенация в течение 2 ч. Этим же крысам каждый день в 10 ч утра перорально вводили экзогенный мелатонин в дозе 5 мг на 1 кг массы тела. Продолжительность эксперимента составляла 28 сут. Из ткани поджелудочной железы изготавливали гистологические препараты по стандартной методике. На цифровых изображениях препаратов осуществляли морфометрию с помощью компьютерной программы *ImageJ*. Характер и степень выраженности морфологических изменений поджелудочной железы (гиперплазия

Образец цитирования:

Янко РВ, Левашов МИ. Морфологические отличия поджелудочной железы нормо- и гипертензивных крыс после сочетанного воздействия прерывистой гипоксии и мелатонина. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:3–11.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-3-11>

For citation:

Yanko RV, Levashov MI. Morphological differences in the pancreas of normo- and hypertensive rats after joint exposure of intermittent hypoxia and melatonin. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:3–11. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-3-11>

Авторы:

Роман Васильевич Янко – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник отдела клинической физиологии соединительной ткани.

Михаил Иванович Левашов – доктор медицинских наук; заведующий отделом клинической физиологии соединительной ткани.

Authors:

Roman V. Yanko, PhD (biology); senior researcher at the department of clinical physiology of connective tissue.
biolag@ukr.net

<https://orcid.org/0000-0002-0397-7517>

Mikhail I. Levashov, doctor of science (medicine); head of the department of clinical physiology of connective tissue.
levashov@biph.kiev.ua

<https://orcid.org/0000-0003-1354-2047>

ядрышек в ядрах экзокриноцитов, уменьшение количества соединительной ткани) у спонтанно-гипертензивных крыс подопытной группы говорят о том, что сочетанное воздействие прерывистой нормобарической гипоксии и мелатонина повышает активность экзокринной части поджелудочной железы. Вместе с тем активность эндокринной части железы снижается, о чем свидетельствует уменьшение линейных размеров и площади островков Лангерганса, а также количества содержащихся в них эндокриноцитов. У крыс линии Wistar сочетанное воздействие прерывистой гипоксии и мелатонина приводит к появлению морфологических признаков повышенной активности как экзокринной, так и эндокринной части поджелудочной железы. Таким образом, после продолжительного сочетанного воздействия прерывистой нормобарической гипоксии и мелатонина и у нормотензивных, и у гипертензивных животных отмечаются морфологические признаки повышенной экзокринной активности поджелудочной железы. В то же время активность эндокринной функции железы у подопытных крыс линии Wistar повышается, а у крыс линии SHR, наоборот, снижается.

Ключевые слова: поджелудочная железа; прерывистая гипоксия; мелатонин.

MORPHOLOGICAL DIFFERENCES IN THE PANCREAS OF NORMO- AND HYPERTENSIVE RATS AFTER JOINT EXPOSURE OF INTERMITTENT HYPOXIA AND MELATONIN

R. V. YANKO^a, M. I. LEVASHOV^a

^a*Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine,
4 Bogomoletz Street, Kyiv 01024, Ukraine*

Corresponding author: R. V. Yanko (biolag@ukr.net)

The morphological changes in the pancreas of normo- and hypertensive rats after combined exposure to intermittent normobaric hypoxia and melatonin were studied. The study was conducted in the autumn on 24 normotensive (Wistar line) and 24 spontaneously hypertensive (SHR line) male rats. Experimental rats were daily exposed to hypoxic gas mixture in special sealed chamber. Hypoxic gas mixture (12 % oxygen in nitrogen) was supplied into this chamber from the membrane gas separator element in the intermittent mode: 15 min deoxygenation/15 min reoxygenation for 2 h. Exogenous melatonin was orally administered to experimental animals at 10 h in the morning at a dose of 5 mg/kg once a day. The total duration of the experiment was 28 d. Histological preparations of pancreatic tissue were prepared according to the standard methods. The morphometry of the preparations digital images was performed using the computer program *ImageJ*. The nature and severity of morphological changes in the pancreas of the experimental spontaneously hypertensive rats (hyperplasia of the nucleolus in the nucleus of exocrinocytes, a decrease in the amount of connective tissue) suggests that the combined effect of intermittent normobaric hypoxia and melatonin increases the activity of the exocrine part of the pancreas. At the same time, the activity of the endocrine part of the pancreas decreases, as evidenced by a decrease in the linear dimensions and area of the Langerhans islets, as well as the number of endocrinocytes contained in them. In Wistar rats, the combined effect of intermittent hypoxia and melatonin leads to the appearance of morphological signs of increased activity of both exocrine and endocrine pancreas functions. Thus, after prolonged combined exposure to intermittent normobaric hypoxia and melatonin, morphological signs of increased exocrine pancreas activity appear in both normotensive and hypertensive rats. At the same time, the activity of the endocrine function of the pancreas in experimental Wistar rats increases, while in SHR rats, on the contrary, decreases.

Keywords: pancreas; intermittent hypoxia; melatonin.

Введение

Поджелудочная железа (ПЖ) обладает разнообразной внешней и внутренней секреторной активностью, что определяет ее важную роль в регуляции многочисленных физиологических процессов, протекающих в организме животных и человека. В настоящее время во всем мире отмечается увеличение распространенности таких заболеваний ПЖ, как сахарный диабет, панкреатит и др. Хронические заболевания ПЖ стали одной из важнейших медико-социальных и экономических проблем большинства промышленно развитых государств [1]. Они оказывают существенное влияние на материальное благосостояние, здоровье и качество жизни отдельных индивидуумов и их семей.

Гипертоническая болезнь – одно из наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы человека. В промышленно развитых странах этой патологией страдают до 40 % взрослого населения. Установлена взаимосвязь патологических изменений в ПЖ с развитием артериальной

гипертензии [2]. Как показывает лечебная практика, примерно 70 % случаев артериальной гипертензии так или иначе связаны с нарушениями функции ПЖ. Это обусловлено тем, что ПЖ через калликреин-кининовую систему принимает непосредственное участие в регуляции уровня кровяного давления [3]. С другой стороны, при длительной и стойкой артериальной гипертензии в ПЖ могут возникать необратимые морфологические изменения, приводящие к существенному снижению ее функциональной активности. В связи с этим возрастает актуальность разработки новых эффективных методов профилактики и лечения нарушений функций ПЖ у лиц, страдающих гипертонической болезнью. Считается, что одним из таких методов может быть применение прерывистой нормобарической гипокситерапии и препаратов, содержащих мелатонин.

В настоящее время прерывистую нормобарическую гипоксию (ПНГ) все чаще используют в клинической практике для профилактики, лечения и реабилитации больных с заболеваниями сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной, пищеварительной, иммунной систем, а также для повышения неспецифической резистентности и адаптационных возможностей организма [4]. Мелатонин наиболее известен как важный регулятор метаболических, иммунных и регенеративных процессов, участвующий в механизмах терморегуляции и старения. Он оказывает адаптогенное, седативное, снотворное действие, нормализует циркадные ритмы [5].

Анализ литературы показывает, что большинство авторов изучали раздельное влияние ПНГ и мелатонина на функциональную активность ПЖ. Эти исследования выполнялись на разных видах экспериментальных животных с применением различных дозировок и схем введения мелатонина, а также режимов подачи гипоксической газовой смеси, отличались по продолжительности и сезонности проведения экспериментов, что не позволяет дать однозначную оценку полученным результатам [6; 7]. Работ по изучению совместного воздействия ПНГ и мелатонина на состояние ПЖ мы не нашли, хотя именно сочетанное применение ПНГ и мелатонина может оказать синергический терапевтический эффект, который так важен при лечении большинства наиболее распространенных хронических заболеваний.

Цель данной работы – исследовать и сравнить морфологические изменения ПЖ нормотензивных и спонтанно-гипертензивных крыс при сочетанном воздействии ПНГ и мелатонина.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено в осенний период на 24 нормотензивных (линия Wistar) и 24 спонтанно-гипертензивных (линия SHR (*spontaneously hypertensive rats*)) крысах-самцах, взятых из питомника вивария Института физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины. Возраст крыс на конец эксперимента составлял 4 мес., а масса достигала (270 ± 10) г. Животные были разделены на четыре группы: I и III – контрольные крысы линий Wistar и SHR соответственно, II и IV – нормо- и гипертензивные животные, которых ежедневно подвергали сочетанному воздействию ПНГ и мелатонина. Крысы всех групп находились в унифицированных условиях на стандартном рационе питания. На протяжении всего эксперимента контролировали массу тела животных. Артериальное давление у крыс измеряли в условиях вивария неинвазивным методом на хвостовой артерии с помощью сфигмоманометра S-2 SHE (Германия). В эксперимент брали крыс линии SHR с систолическим давлением не ниже 145 мм рт. ст.

Для проведения ежедневных сеансов гипоксического воздействия животных размещали в герметичной камере, в которую с помощью мембранного газоразделительного элемента подавали гипоксическую газовую смесь (12 % кислорода в азоте) в прерывистом режиме: 15 мин деоксигенация/15 мин реоксигенация в течение 2 ч. Все оставшееся время суток (22 ч) крысы дышали атмосферным воздухом. Подопытным животным также ежедневно в 10 ч утра перорально вводили экзогенный мелатонин фирмы *Unipharm Inc.* (США) в дозе 5 мг на 1 кг массы тела. Продолжительность эксперимента составляла 28 сут. Крыс выводили из эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Работу с лабораторными крысами проводили с соблюдением международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), а также принципов, утвержденных комитетом по биомедицинской этике Института физиологии имени А. А. Богомольца НАН Украины.

После выделения ПЖ осуществляли ее взвешивание с точностью до $\pm 0,01$ г. Для морфологических и морфометрических исследований из ткани ПЖ изготавливали гистологические препараты по стандартной методике: фиксировали в жидкости Буэна, обезживали в спиртах возрастающей концентрации и диоксане, заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином, а для выявления элементов соединительной ткани – методом Ван-Гизона и Массона [8]. С использованием цифровой камеры микропрепараты фотографировали на микроскопе Nikon Eclipse E100 (Япония). На цифровых изображениях препаратов осуществляли морфометрию с помощью компьютерной программы *ImageJ*.

На гистологических срезах ткани ПЖ проводили гистоморфометрический анализ ее экзо- и эндокринной частей. В экзокринной части железы измеряли диаметр и площадь поперечного сечения ацинусов, высоту и площадь экзокриноцитов, их ядер и цитоплазмы, подсчитывали количество ядрышек в ядрах экзокриноцитов и среднее количество клеток в ацинусе. В эндокринной части железы определяли среднее количество панкреатических островков на единицу площади ($0,25 \text{ мм}^2$) и количество эндокриноцитов, измеряли диаметр и площадь поперечного сечения островков, вычисляли плотность расположения клеток. Для определения состояния соединительнотканых элементов в железе измеряли ширину прослоек междольковой и межацинусной соединительной ткани [9; 10]. Методом наложения точечных морфометрических сеток находили относительную площадь экзо- и эндокринной частей, а также стромы в железе.

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью программного обеспечения *Statistica 6.0*. Нормальность распределения цифровых массивов проверяли, используя критерий Пирсона. Все результаты исследований подчинялись закону нормального распределения. Достоверность различий между контрольными и экспериментальными группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

За время проведения эксперимента масса тела контрольных крыс линии Wistar увеличилась на 24 %, а подопытных – на 20 %. Масса крыс линии SHR изменилась в меньшей степени. В контроле она увеличилась на 15 %, в опыте – на 8 %. Масса ПЖ у подопытных животных обеих линий имела тенденцию к снижению: у крыс линии Wistar – на 12 %, а у крыс линии SHR – на 8 % относительно контроля (табл. 1). Более медленные темпы прироста массы тела и меньшую массу ПЖ у подопытных животных (по сравнению с контролем) можно объяснить тем, что ПНГ является мягким стрессогенным фактором. А при любом стрессе, как известно, происходят мобилизация и активация всех функциональных систем организма, направленные на адаптацию к новым условиям существования. В первую очередь это сопровождается уменьшением общей массы тела и органов или замедлением темпов их роста.

Таблица 1

Масса тела и ПЖ, г ($n = 12$, $M \pm m$)

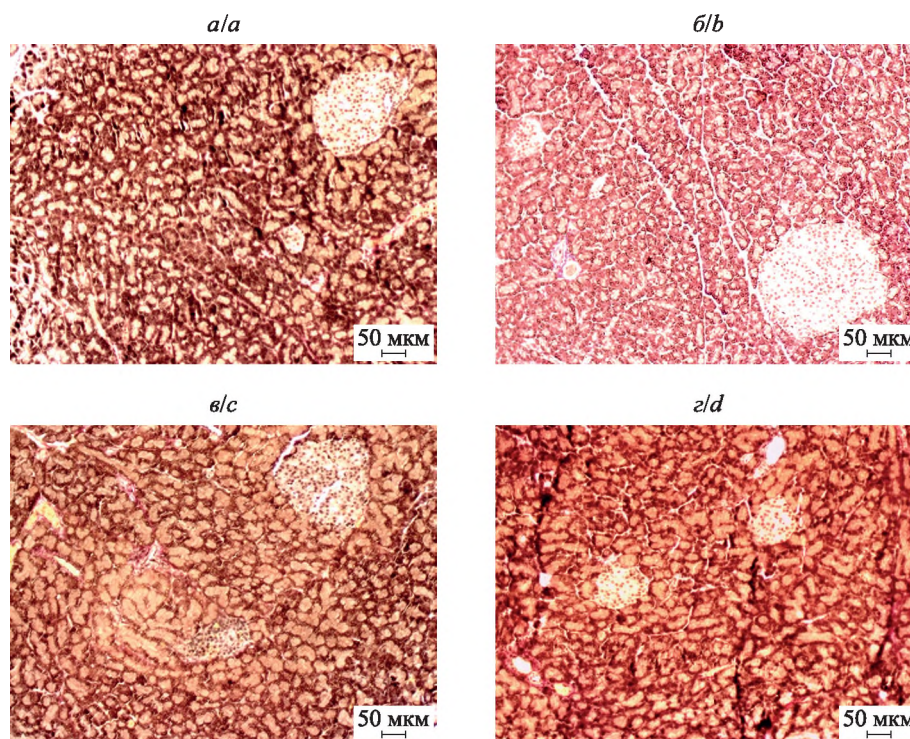
Table 1

Body and pancreas weight, g ($n = 12$, $M \pm m$)

Показатели	Линия Wistar		Линия SHR	
	Контроль	Гипоксия + мелатонин	Контроль	Гипоксия + мелатонин
Масса тела:				
в начале эксперимента	198 ± 5	202 ± 4	239 ± 11	261 ± 7
в конце эксперимента	246 ± 7	243 ± 5	275 ± 10	281 ± 9
Масса ПЖ	$0,43 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,04$

Паренхима ПЖ у крыс обеих линий после сочетанного воздействия ПНГ и мелатонина сохраняла физиологическую структуру, которая визуально разделялась на экзо- и эндокринную части. Форма ацинусов была довольно разнообразной: округлой, овальной, продолговато-удлиненной. Изнутри ацинусы выстланы конусовидными клетками – экзокриноцитами. Более суженным полюсом (верхушка) они направлены к центру ацинуса, а противоположным расширенным (основа) – наружу. Цитоплазма клеток имела хорошо выраженную зернистость особенно по направлению к апикальному полюсу. Ядро размещалось у основания, где зернистость была выражена в меньшей степени, и содержало ядрышки. Ацинусы объединялись в дольки, покрытые снаружи соединительнотканной оболочкой, представлявшей собой рыхлое переплетение тонких пучков эластиновых и коллагеновых волокон (см. рисунок).

Результаты наших исследований свидетельствуют о наличии отчетливо выраженных гистоморфометрических различий в экзокринной части ПЖ нормо- и гипертензивных контрольных крыс. Так, крысы линии SHR имели достоверно бóльшую площадь ядра экзокриноцитов (на 21 %) и показатель ядерно-цитоплазматического соотношения (на 13 %), несколько меньшую ширину прослоек междольковой и межацинусной соединительной ткани по сравнению с крысами линии Wistar (табл. 2). Это говорит о большей активности экзокринной части ПЖ у крыс линии SHR, чем у контрольных животных линии Wistar. Очевидно, что данные морфофункциональные различия в экзокринной части железы являются генетически детерминированными особенностями крыс линии SHR, которые необходимо учитывать при проведении экспериментальных исследований на этих животных. Существенных морфологических различий в эндокринной части ПЖ между контрольными крысами разных линий не выявлено (табл. 3).



Микрофотографии ПЖ контрольных (*a* – линия Wistar; *в* – линия SHR) и подопытных (*б* – линия Wistar, *г* – линия SHR) крыс.

Окраска по методу Ван-Гизона, увеличение $\times 200$

Micrographs of the pancreas of the control (*a* – Wistar line; *в* – SHR line) and experimental (*б* – Wistar line; *г* – SHR line) rats. Van Gieson stain, magnification $\times 200$

Изменения в экзокринной части ПЖ крыс разных линий после сочетанного воздействия ПНГ и мелатонина носили однонаправленный характер. У крыс обеих линий наблюдалось достоверное увеличение количества ядрышек в ядрах экзокриноцитов (линия Wistar – на 13 %, линия SHR – на 18 %) по сравнению с контролем. Это привело к соответствующему росту ядрышко-ядерного соотношения (на 10 % у нормотензивных животных и на 24 % ($p < 0,05$) у гипертензивных крыс). Состояние ядрышкового аппарата является высокоинформативным показателем функциональной активности клеток. Поскольку к основным функциям ядрышек относят синтез рРНК, которая вместе с поступившим из цитоплазмы белком образует субъединицы рибосом, считается, что гиперплазия ядрышек указывает на повышение белоксинтетической активности клеток [11]. Размеры ацинусов, экзокриноцитов и количество клеток в ацинусах подопытных крыс остались на уровне контрольных показателей (см. табл. 2).

Таблица 2

**Морфометрические показатели
экзокринной части ПЖ ($n = 12$, $M \pm m$)**

Table 2

Morphometric parameters of the exocrine pancreas ($n = 12$, $M \pm m$)

Показатели	Линия Wistar		Линия SHR	
	Контроль	Гипоксия + мелатонин	Контроль	Гипоксия + мелатонин
Относительная площадь экзокринной части, %	78,6 $\pm$ 2,1	81,8 $\pm$ 2,3	78,7 $\pm$ 2,4	83,8 $\pm$ 2,5
Диаметр ацинуса, мкм	28,7 $\pm$ 0,4	30,3 $\pm$ 0,6	30,2 $\pm$ 0,5	30,0 $\pm$ 0,8
Площадь ацинуса, мкм ²	761,0 $\pm$ 30,4	792,1 $\pm$ 29,9	788,3 $\pm$ 24,5	782,4 $\pm$ 29,7
Высота эпителия ацинуса, мкм	11,2 $\pm$ 0,4	12,2 $\pm$ 0,2	12,2 $\pm$ 0,2	12,7 $\pm$ 0,2
Площадь, мкм ² : экзокриноцита	108,3 $\pm$ 7,9	102,6 $\pm$ 2,7	114,0 $\pm$ 5,4	116,8 $\pm$ 2,6
ядра	14,6 $\pm$ 0,6	14,8 $\pm$ 0,4	17,6 $\pm$ 0,7**	17,6 $\pm$ 0,5
цитоплазмы	93,7 $\pm$ 4,6	87,8 $\pm$ 2,6	96,4 $\pm$ 4,9	99,2 $\pm$ 2,3

Окончание табл. 2
Ending table 2

Показатели	Линия Wistar		Линия SHR	
	Контроль	Гипоксия + мелатонин	Контроль	Гипоксия + мелатонин
Ядерно-цитоплазматическое соотношение, ед.	0,160 ± 0,003	0,170 ± 0,008	0,180 ± 0,005**	0,181 ± 0,007
Количество экзокриноцитов в ацинусе, шт.	8,0 ± 0,1	8,3 ± 0,2	7,9 ± 0,2	7,6 ± 0,2
Количество ядрышек в ядре экзокриноцита, шт.	1,51 ± 0,03	1,70 ± 0,05*	1,57 ± 0,09	1,85 ± 0,05*
Ядрышко-ядерное соотношение, ед.	0,100 ± 0,005	0,110 ± 0,005	0,089 ± 0,005	0,110 ± 0,006*
Относительная площадь соединительной ткани, %	17,2 ± 1,7	13,2 ± 1,1*	17,5 ± 1,1	13,0 ± 1,0*
Стромально-паренхиматозный индекс, ед.	0,21 ± 0,02	0,15 ± 0,01*	0,21 ± 0,03	0,15 ± 0,01*
Ширина прослоек соединительной ткани, мкм:				
междольковая	2,97 ± 0,14	1,83 ± 0,07*	2,78 ± 0,21	1,62 ± 0,07*
межацинусная	0,83 ± 0,06	0,58 ± 0,01*	0,76 ± 0,03	0,590 ± 0,009*

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

После сочетанного воздействия ПНГ и мелатонина количество элементов соединительной ткани в экзокринной части ПЖ крыс снизилось. Так, у подопытных крыс линии Wistar отмечено достоверное уменьшение относительной площади соединительной ткани (на 23 %), стромально-паренхиматозного индекса (на 29 %), ширины прослоек междольковой и межацинусной соединительной ткани (на 38 и 30 % соответственно) по отношению к контролю. У крыс линии SHR, получавших ПНГ и мелатонин, также отмечены достоверно меньшие относительная площадь соединительной ткани (на 26 %), стромально-паренхиматозный индекс (на 29 %), ширина прослоек междольковой (на 42 %) и межацинусной (на 22 %) соединительной ткани по сравнению с контрольными животными (см. табл. 2). Поскольку соединительная ткань является важнейшим составным компонентом гистогематического барьера, то уменьшение ее количества может рассматриваться как проявление механизма структурной адаптации, обеспечивающей облегчение транспорта кислорода к паренхиматозным элементам ПЖ и улучшение условий для протекания процессов метаболизма.

Эндокринная часть занимала значительно меньшую площадь ткани ПЖ. Она была представлена дисперсно расположенными островками Лангерганса – скоплениями эндокриноцитов, пронизанных густой сетью кровеносных капилляров. Как у контрольных, так и у подопытных животных островки имели преимущественно округлую и овальную форму (см. рисунок) и были отделены от ацинусов тонкой соединительнотканной прослойкой.

Весьма характерным было наличие отчетливых морфологических различий в эндокринной части ПЖ подопытных и контрольных крыс разных линий. Так, у крыс линии Wistar после сочетанного воздействия ПНГ и мелатонина выявлены достоверно большие относительная площадь эндокринной части (на 19 %), количество островков Лангерганса (на 20 %) и входящих в их состав эндокриноцитов (на 13 %) по сравнению с контролем. Вместе с тем линейные размеры островков существенно не изменились. В ПЖ подопытных крыс линии SHR, наоборот, относительная площадь эндокринной части и площадь поперечного сечения островков были достоверно меньше (на 16 и 20 % соответственно), чем у контрольных животных. При этом плотность размещения эндокриноцитов в островке увеличилась на 19 % (табл. 3).

Таблица 3

Морфометрические показатели эндокринной части ПЖ ($n = 12$, $M \pm m$)

Table 3

Morphometric parameters of the endocrine pancreas ($n = 12$, $M \pm m$)

Показатели островков Лангерганса	Линия Wistar		Линия SHR	
	Контроль	Гипоксия + мелатонин	Контроль	Гипоксия + мелатонин
Относительная площадь, %	4,2 ± 0,2	5,0 ± 0,3*	3,8 ± 0,3	3,2 ± 0,2*
Количество (на 0,25 мм ²), шт.	1,25 ± 0,05	1,50 ± 0,04*	1,31 ± 0,09	1,35 ± 0,06

Окончание табл. 3
Ending table 3

Показатели островков Лангерганса	Линия Wistar		Линия SHR	
	Контроль	Гипоксия + мелатонин	Контроль	Гипоксия + мелатонин
Площадь, мкм ²	12 016 ± 198	12 534 ± 217	11 839 ± 191	9420 ± 86*
Диаметр, мкм	104,9 ± 14,6	110,1 ± 7,8	105,1 ± 6,2	94,8 ± 8,7
Количество эндокриноцитов, шт.	117,2 ± 5,1	131,9 ± 5,9*	121,7 ± 6,2	116,1 ± 7,3
Плотность размещения эндокриноцитов, шт. на 100 мкм ²	0,98 ± 0,06	1,05 ± 0,04	1,03 ± 0,02	1,23 ± 0,04*

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

Известно, что к морфологическим признакам активации эндокринной части ПЖ относят гипертрофию и гиперплазию островков Лангерганса, увеличение в них количества эндокриноцитов и др. [9]. Таким образом, сочетанное воздействие ПНГ и мелатонина повышало активность эндокринной функции ПЖ у нормотензивных крыс, а у гипертензивных животных, наоборот, снижало.

Ранее нами проведены гистоморфометрические исследования ПЖ крыс линий Wistar и SHR такого же возраста после раздельного воздействия ПНГ и мелатонина в осенний период. Было установлено, что 28-суточное воздействие ПНГ оказывает положительное влияние на морфофункциональное состояние ПЖ. Однако воздействие прерывистой гипоксии саногенного уровня активирует функцию экзо- и эндокринной частей железы у нормотензивных крыс (линия Wistar) в большей степени, чем у спонтанно-гипертензивных (линия SHR) [10]. Выявлено, что введение мелатонина крысам линии Wistar приводит к снижению активности экзокринной части ПЖ и повышению активности эндокринной части [12]. У крыс линии SHR, получавших мелатонин, наблюдали противоположный эффект – повышение экзокринной и снижение эндокринной активности ПЖ [13].

Данные литературы о влиянии ПНГ на морфофункциональное состояние ПЖ малочисленны. Большинство работ посвящены исследованию воздействия гипоксических газовых смесей на эндокринную часть железы. Показано, что адаптация крыс к прерывистой гипоксии оказывала благоприятное влияние на углеводный обмен, о чем свидетельствовало снижение уровня глюкозы и повышение уровня инсулина в крови при уменьшении продукции глюкагона и соматостатина. Отмечены ингибирование процессов разрушения островков и активация образования новых β -клеток в ацинозной ткани [14]. При исследовании эффекта 8-недельного ежедневного 8-часового воздействия умеренной гипоксии (14–15 % кислорода) обнаружено значительное снижение уровня глюкозы и инсулина в плазме в тесте на толерантность к глюкозе [15]. Установлено, что периодическая гипоксия повышает толерантность организма к глюкозе и чувствительность тканей к инсулину [7; 16]. Показан стимулирующий эффект прерывистой гипоксии на некоторые молекулярные механизмы регуляции функции β -эндокриноцитов. В частности, продемонстрировано, что воздействие прерывистой гипоксии в течение 2 нед. вызывает у крыс увеличение площади панкреатических островков на 56 % и количества β -клеток на 68 % в основном за счет двукратного снижения апоптоза в эндокриноцитах. Выявлен факт пролонгированного действия инсулин-стимулирующего эффекта прерывистой гипоксии после окончания гипоксических тренировок [17]. В механизме стимулирующего действия прерывистой гипоксии на активность островков Лангерганса важная роль отводится индуцируемому гипоксией фактору (HIF). Показано, что пониженное содержание кислорода при культивировании клеток ПЖ способно вызвать их дифференциацию в β -клетки островков с участием HIF-1 α [18]. Обнаружено увеличение численности β -эндокриноцитов в ответ на воздействие интервальной гипоксии [19]. Эти результаты позволяют сделать вывод, что гипоксическая тренировка повышает активность ферментов гликолиза, увеличивает количество митохондрий и уровень транспортера глюкозы, а также улучшает чувствительность к инсулину.

Данные литературы свидетельствуют о том, что мелатонин может оказывать непосредственное влияние на секреторную активность β -клеток островков Лангерганса [20]. В исследованиях ряда авторов было показано, что мелатонин активирует пролиферацию β -клеток, способствует образованию новых островков и повышению уровня инсулина в крови. Так, в работе [21] отмечено, что введение крысам с моделируемой формой сахарного диабета мелатонина в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней восстанавливает морфологическую структуру островков ПЖ, способствует увеличению размеров островков и количества размещенных в них эндокриноцитов. Другие исследователи отводят мелатонину роль ингибитора синтеза и высвобождения инсулина [22]. Например, в статье [23] показано наличие мелатониновых рецепторов на β -клетках панкреатических островков, при участии которых подавляется продукция

инсулина. Некоторые авторы считают, что эффекты мелатонина видоспецифичны: он подавляет функцию β -клеток у грызунов, однако стимулирует их активность у людей [24]. Отдельные исследователи предполагают, что мелатонин обладает способностью регенерировать β -клетки [25; 26]. Кроме того, показано, что введение мелатонина в дозе 3 и 5 мг/кг обеспечивает снижение артериального давления у лиц, страдающих сахарным диабетом и гипертонической болезнью [6].

Заключение

Таким образом, нами получены новые данные, свидетельствующие о том, что 28-суточное сочетанное воздействие ПНГ и мелатонина оказывает положительное влияние на морфофункциональное состояние экзокринной части ПЖ как у крыс линии Wistar, так и у крыс линии SHR. В то же время активность эндокринной функции ПЖ у нормотензивных крыс после такого воздействия повышается, а у спонтанно-гипертензивных животных, наоборот, снижается. Полученные результаты необходимо учитывать при использовании метода сочетанного воздействия ПНГ и мелатонина в комплексном лечении заболеваний ПЖ у лиц с повышенным артериальным давлением.

Библиографические ссылки

1. Степанов ЮМ, Гравировская НГ, Скирда ИЮ, Петипко ОП. Болезни поджелудочной железы как одна из ведущих проблем гастроэнтерологии и абдоминальной хирургии (современная эпидемиология). *Гастроэнтерология*. 2014;3:7–14.
2. Imaoka M, Sayama A, Suzuki T, Jindo T, Sanbuissho A. Effect of hypertension on the occurrence of micro-hemorrhage in the pancreatic islet of dahl salt-sensitive rats. *Journal of Toxicologic Pathology*. 2012;25(2):155–161. DOI: 10.1293/tox.25.155.
3. Kastin AJ, editor. *Handbook of biologically active peptides*. 2nd edition. London: Academic Press; 2013. 2032 p.
4. Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014;307(10):R1181–R1197. DOI: 10.1152/ajpregu.00208.2014.
5. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current Neuropharmacology*. 2017;15(3):434–443. DOI: 10.2174/1570159X14666161228122115.
6. Możdżan Monika, Możdżan Michał, Chalubiński M, Wojdan K, Broncel M. The effect of melatonin on circadian blood pressure in patients with type 2 diabetes and essential hypertension. *Archives of Medical Science*. 2014;10(4):669–675. DOI: 10.5114/aoms.2014.44858.
7. Morishima T, Hasegawa Y, Sasaki H, Kurihara T, Hamaoka T, Goto K. Effects of different periods of hypoxic training on glucose metabolism and insulin sensitivity. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. 2015;35(2):104–109. DOI: 10.1111/cpf.12133.
8. Журавлева СА. *Гистология. Практикум*. Минск: Вышэйшая школа; 2013. 320 с.
9. Adeyemi DO, Komolafe OA, Adewole OS, Obuotor EM, Abiodun AA, Adenowo TK. Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with extracts of *Annona muricata*. *Folia Morphologica*. 2010;69(2):92–100.
10. Янко РВ, Левашов МИ. Морфофункциональное состояние поджелудочной железы нормо- и гипертензивных крыс после воздействия прерывистой нормобарической гипоксии. *Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова*. 2018; 104(5):581–589.
11. Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(7):574–585. DOI: 10.1038/nrm2184.
12. Янко РВ. Морфологічні зміни підшлункової залози після введення мелатоніну у різні сезони року. *Фізіологічний журнал*. 2016;62(6):88–94. DOI: 10.15407/fz62.06.088.
13. Янко РВ, Березовський ВЯ, Левашов МІ, Плотнікова ЛМ, Чака ОГ. Реакція підшлункової залози спонтанно-гіпертензивних шурів на дію екзогенного мелатоніну у весняний та осінній періоди року. *Вісник Дніпропетровського університету. Біологія, медицина*. 2016;7(2):90–95. DOI: 10.15421/021616.
14. Колесник ЮМ, Орестенко ЮМ, Середенко ММ, Абрамов АВ. Вплив періодичного гіпоксичного тренування на ендокринну функцію підшлункової залози у тварин з цукровим діабетом. *Фізіологічний журнал*. 1994;40(5–6):87–95.
15. Chung-Yu Chen, Ying-Lan Tsai, Chung-Lan Kao, Shin-Da Lee, Ming-Chieh Wu, Mallikarjuna K, et al. Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1 α signaling. *Chinese Journal of Physiology*. 2010; 53(1):62–71. DOI: 10.4077/CJP.2010.AMK078.
16. Urdampilleta A, González-Muniesa P, Portillo MP, Martínez JA. Usefulness of combining intermittent hypoxia and physical exercise in the treatment of obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2012;68(2):289–304. DOI: 10.1007/s13105-011-0115-1.
17. Колесник ЮМ, Абрамов АВ, Іваненко ТВ, Жулінський ВО. Особливості експресії білків BCL-2, P53 та проліферативної активності в панкреатичних острівцях під впливом переривчастої гіпоксії за умов експерименту. *Вісник морфології*. 2014;20(2):366–369.
18. Fraker CA, Ricordi C, Inverardi L, Domínguez-Bendala J. Oxygen: a master regulator of pancreatic development? *Biology of the Cell*. 2009;101(8):431–440. DOI: 10.1042/BC20080178.
19. Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Miyaoka T, Fujimura T, et al. Pancreatic β -cell proliferation by intermittent hypoxia via up-regulation of *Reg* family genes and *HGF* gene. *Life Sciences*. 2013;93(18–19):664–672. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.09.001.
20. de Lima LMB, dos Reis LC, de Lima MA. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Revista Brasileira de Biologia*. 2001;61(2):333–340. DOI: 10.1590/s0034-71082001000200018.
21. Кушнір ОЮ, Яремій ІМ. Вплив застосування мелатоніну на острівці Лангерганса підшлункової залози шурів з алоксановим діабетом. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*. 2019;18(2):55–58. DOI: 10.24061/1727-0847.18.2.2019.11.
22. Lyssenko V, Nagorny CLF, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégl P, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature Genetics*. 2009;41(1):82–88. DOI: 10.1038/ng.288.

23. Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic β -cell. *Journal of Pineal Research*. 2006;40(2):184–191. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2005.00297.x.
24. Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Guo Cai Huang, et al. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*. 2008;44(3):273–279. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2007.00523.x.
25. Hajam YA, Rai S, Basheer M, Grosh H, Singh S. Protective role of melatonin in streptozotocin induced pancreatic damages in diabetic Wistar rat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2018;21(9):423–431. DOI: 10.3923/pjbs.2018.423.431.
26. El-Desouki NI, Basyony M, El-Nenaey M, Abdel-Magied R. Histological and cytological studies on the effect of melatonin on experimentally induced pancreatic diabetes in rats. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)*. 2007;3:69–82.

References

1. Stepanov YuM, Gravirovskaya NG, Skirda IYu, Petishko OP. [Pancreatic diseases as one of the leading problems of gastroenterology and abdominal surgery (modern epidemiology)]. *Gastroenterology*. 2014;3:7–14. Russian.
2. Imaoka M, Sayama A, Suzuki T, Jindo T, Sanbuissho A. Effect of hypertension on the occurrence of micro-hemorrhage in the pancreatic islet of dahl salt-sensitive rats. *Journal of Toxicologic Pathology*. 2012;25(2):155–161. DOI: 10.1293/tox.25.155.
3. Kastin AJ, editor. *Handbook of biologically active peptides*. 2nd edition. London: Academic Press; 2013. 2032 p.
4. Navarrete-Opazo A, Mitchell GS. Therapeutic potential of intermittent hypoxia: a matter of dose. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014;307(10):R1181–R1197. DOI: 10.1152/ajpregu.00208.2014.
5. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Current Neuropharmacology*. 2017;15(3):434–443. DOI: 10.2174/1570159X14666161228122115.
6. Możdżan Monika, Możdżan Michał, Chalubiński M, Wojdan K, Broncel M. The effect of melatonin on circadian blood pressure in patients with type 2 diabetes and essential hypertension. *Archives of Medical Science*. 2014;10(4):669–675. DOI: 10.5114/aoms.2014.44858.
7. Morishima T, Hasegawa Y, Sasaki H, Kurihara T, Hamaoka T, Goto K. Effects of different periods of hypoxic training on glucose metabolism and insulin sensitivity. *Clinical Physiology and Functional Imaging*. 2015;35(2):104–109. DOI: 10.1111/cpf.12133.
8. Zhuravleva SA. *Gistologiya. Praktikum* [Histology. Workshop]. Minsk: Vyshhejschaja shkola; 2013. 320 p. Russian.
9. Adeyemi DO, Komolafe OA, Adewole OS, Obuotor EM, Abiodun AA, Adenowo TK. Histomorphological and morphometric studies of the pancreatic islet cells of diabetic rats treated with extracts of *Annona muricata*. *Folia Morphologica*. 2010;69(2):92–100.
10. Yanko RV, Levashov MI. Morphofunctional state of the normo- and hypertensive rats pancreas after the influence of intermittent normobaric hypoxia. *Russian Journal of Physiology*. 2018;104(5):581–589. Russian.
11. Boisvert F-M, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007;8(7):574–585. DOI: 10.1038/nrm2184.
12. Yanko RV. Morphological changes pancreas after of melatonin's effect in different seasons. *Fiziologichnyi zhurnal*. 2016;62(6):88–94. Ukrainian. DOI: 10.15407/fz62.06.088.
13. Yanko RV, Berezovsky VYa, Levashov MI, Plotnikova LM, Chaka OG. Pancreatic response of spontaneously hypertensive rats to the exogenous administration of melatonin in the spring and autumn. *Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, medicine*. 2016;7(2):90–95. Ukrainian. DOI: 10.15421/021616.
14. Kolesnyk JuM, Orestenko JuM, Seredenko MM, Abramov AV. [The effect of intermittent hypoxic training on pancreatic endocrine function in animals with diabetes mellitus]. *Fiziologichnyi zhurnal*. 1994;40(5–6):87–95. Ukrainian.
15. Chung-Yu Chen, Ying-Lan Tsai, Chung-Lan Kao, Shin-Da Lee, Ming-Chieh Wu, Mallikarjuna K, et al. Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1 α signaling. *Chinese Journal of Physiology*. 2010;53(1):62–71. DOI: 10.4077/CJP.2010.AMK078.
16. Urdampilleta A, González-Muniesa P, Portillo MP, Martínez JA. Usefulness of combining intermittent hypoxia and physical exercise in the treatment of obesity. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2012;68(2):289–304. DOI: 10.1007/s13105-011-0115-1.
17. Kolesnyk YM, Abramov AV, Ivanenko TV, Zhulinskyi VO. The features of expression of BCL-2 and P53 proteins and proliferative activity in pancreatic islets under the influence of intermittent hypoxia in experimental conditions. *Reports of morphology*. 2014;20(2):366–369. Ukrainian.
18. Fraker CA, Ricordi C, Inverardi L, Domínguez-Bendala J. Oxygen: a master regulator of pancreatic development? *Biology of the Cell*. 2009;101(8):431–440. DOI: 10.1042/BC20080178.
19. Ota H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Miyaoka T, Fujimura T, et al. Pancreatic β -cell proliferation by intermittent hypoxia via up-regulation of *Reg* family genes and *HGF* gene. *Life Sciences*. 2013;93(18–19):664–672. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.09.001.
20. de Lima LMB, dos Reis LC, de Lima MA. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. *Revista Brasileira de Biologia*. 2001;61(2):333–340. DOI: 10.1590/s0034-71082001000200018.
21. Kushnir OYu, Yaremii IM. Influence of melatonin introduction on condition of the Langergans islets of the pancreas in alloxan diabetic rats. *Klinichna anatomija ta operatyvna hirurgija*. 2019;18(2):55–58. Ukrainian. DOI: 10.24061/1727-0847.18.2.2019.11.
22. Lyssenko V, Nagorny CLF, Erdos MR, Wierup N, Jonsson A, Spégel P, et al. Common variant in MTNR1B associated with increased risk of type 2 diabetes and impaired early insulin secretion. *Nature Genetics*. 2009;41(1):82–88. DOI: 10.1038/ng.288.
23. Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic β -cell. *Journal of Pineal Research*. 2006;40(2):184–191. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2005.00297.x.
24. Ramracheya RD, Muller DS, Squires PE, Brereton H, Sugden D, Guo Cai Huang, et al. Function and expression of melatonin receptors on human pancreatic islets. *Journal of Pineal Research*. 2008;44(3):273–279. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2007.00523.x.
25. Hajam YA, Rai S, Basheer M, Grosh H, Singh S. Protective role of melatonin in streptozotocin induced pancreatic damages in diabetic Wistar rat. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2018;21(9):423–431. DOI: 10.3923/pjbs.2018.423.431.
26. El-Desouki NI, Basyony M, El-Nenaey M, Abdel-Magied R. Histological and cytological studies on the effect of melatonin on experimentally induced pancreatic diabetes in rats. *Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)*. 2007;3:69–82.

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ СИНТЕЗА МИНЕРАЛО- И ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ ЭНДОКРИННЫМ ДИСРАПТОРОМ ДДТ¹

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

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

Влияние персистирующих в природе эндокринных дисрапторов на развитие организма представляет собой актуальную проблему. Недавно было установлено, что низкодозовое воздействие дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) нарушает продукцию гормонов надпочечников. Цель работы – изучение клеточных механизмов нарушения синтеза минерало- и глюкокортикоидов при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза. Исследование проведено на самцах крыс линии Wistar, подвергавшихся воздействию низких доз ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии. Выполнено иммуноферментное определение концентрации альдостерона и кортикостерона в сыворотке крови, гистологическое и электронно-микроскопическое изучение надпочечников крыс в периоде полового созревания (42 сут) и после достижения половой зрелости (70 сут). У крыс, развивавшихся в условиях низкодозового воздействия ДДТ, в периоде полового созревания выявлены пониженный уровень продукции минералокортикоидов и повышенный уровень синтеза глюкокортикоидов. После достижения половой зрелости наметилась тенденция к нормализации уровня обоих гормонов. Морфологическое исследование надпочечников показало меньшую степень развития клубочковой зоны в пубертатном периоде и относительную ее гиперплазию после достижения половой зрелости. В наружной части пучковой зоны отмечены нарушения микроциркуляции и очаги некроза. При исследовании

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:

Яглова НВ, Обернихин СС, Яглов ВВ, Назимова СВ, Тимохина ЕП. Клеточные механизмы нарушения синтеза минерало- и глюкокортикоидов эндокринным дисраптором ДДТ. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:12–19.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-12-19>

For citation:

Yaglova NV, Obernikhin SS, Yaglov VV, Nazimova SV, Timokhina EP. Cellular mechanisms of impaired mineralocorticoid and glucocorticoid production by endocrine disruptor DDT. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:12–19. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-12-19>

Авторы:

Наталья Валентиновна Яглова – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией развития эндокринной системы.
Сергей Станиславович Обернихин – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.
Валентин Васильевич Яглов – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.
Светлана Владимировна Назимова – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.
Екатерина Петровна Тимохина – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории развития эндокринной системы.

Authors:

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>
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>
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>
Svetlana V. Nazimova, PhD (medicine); senior researcher at the laboratory of endocrine system development.
pimka60@list.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5118-7037>
Ekaterina P. Timokhina, PhD (biology); researcher at the laboratory of endocrine system development.
rodich_k@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-0504-1488>

ультраструктуры клеток клубочковой зоны был выявлен ряд отличий, свидетельствующих о пониженной функциональной активности клеток в пубертатном периоде. После наступления половой зрелости не наблюдалось достоверного уменьшения диаметра митохондрий. Общее количество митохондрий в 1 мкм^2 цитоплазмы и доля митохондрий с отеком матрикса были меньше, чем в контрольной группе. В пучковой зоне выявлены признаки повышенной функциональной активности клеток в ее глубоких слоях. Несмотря на то что динамика возрастных изменений в пучковой зоне была такой же, как и в контрольной группе, значения этих показателей оставались на более высоком уровне. Таким образом, клеточными механизмами нарушения синтеза минералокортикоидов надпочечниками крыс, развивавшихся при пренатальном и постнатальном воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, являются нарушения функционирования митохондрий и возрастной реорганизации митохондриального аппарата, происходящей при переходе от пубертатного периода к половой зрелости. Механизмы повышенной продукции глюкокортикоидов также связаны с компенсаторной гиперфункцией митохондрий кортикостероцитов.

Ключевые слова: минералокортикоиды; глюкокортикоиды; митохондрии; эндокринный дисраптор; ДДТ.

Благодарность. Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (рег. № AAAA-A17-117013050048-6).

CELLULAR MECHANISMS OF IMPAIRED MINERALOCORTICOID AND GLUCOCORTICOID PRODUCTION BY ENDOCRINE DISRUPTOR DDT

N. V. YAGLOVA^a, S. S. OBERNIKHIN^a,
V. V. YAGLOV^a, S. V. NAZIMOVA^a, E. P. TIMOKHINA^a

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

Corresponding author: N. V. Yaglova (yaglova@mail.ru)

Developmental exposure to persistent endocrine disruptors is of a great concern. Affection of adrenal hormones production by low-dose exposure to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) has been revealed recently. Objective of the research – investigation of ultrastructural mechanisms of impaired mineralocorticoid and glucocorticoid production after prenatal and postnatal exposure to endocrine disruptor DDT. Male Wistar rats exposed to low doses of DDT during prenatal and postnatal development were studied. Aldosterone and corticosterone levels in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, histological examination and electron microscopy of the adrenals were performed. Pubertal rats, developmentally exposed to low doses of DDT, demonstrated lowered aldosterone and elevated corticosterone serum levels. After puberty the rats showed tendency to normalization of hormones' production. Morphological examination of the adrenals revealed less developed zona glomerulosa in pubertal period and its relative hyperplasia after puberty. Microcirculatory disorders and focal cell death were observed in outer zona fasciculata. Electron microscopy of glomerulosa cells found signs of suppressed secretory activity in pubertal period and no significant reduction of mitochondria size in adult rats. Total number of mitochondria in 1 μm^2 of cytoplasm and percent of mitochondria with swollen matrix were diminished compared to the control. Cells of inner zona fasciculata demonstrated increased functional activity. Age-dependent changes in fine structure of fasciculata cells were similar to the control, but were more pronounced. In this way, cellular mechanism of impaired mineralocorticoid production in rats prenatally and postnatally exposed to low doses of endocrine disruptor DDT, are insufficient mitochondrion function and impaired reorganization of mitochondrial apparatus, which occurs during pubertal period. Mechanisms of elevated glucocorticoid secretion are attributed to enhanced function of mitochondria in fasciculata cells.

Keywords: mineralocorticoids; glucocorticoids; mitochondrion; endocrine disruptor; DDT.

Acknowledgements. The research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (reg. No. AAAA-A17-117013050048-6).

Введение

Влияние эндокринных дисрапторов на организм человека и животных – существенный компонент антропогенной нагрузки [1]. Нарушение стероидогенеза в корковом веществе надпочечников при воздействии эндокринных дисрапторов на развивающийся организм является актуальной медико-социальной проблемой, значимость которой обусловлена глобальностью и перманентностью такого воздействия в последние десятилетия [2]. Среди большого числа эндокринных дисрапторов наиболее опасны для биосферы стойкие персистирующие вещества, к которым относится дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) [3].

ДДТ обладает антиандрогенными, проэстрогенными и антитиреоидными свойствами [4; 5]. Его влияние на развитие и функционирование надпочечников изучено в меньшей степени. В наших предыдущих исследованиях мы показали, что воздействие ДДТ вызывает различные по длительности нарушения секреции альдостерона и кортикостерона [6]. Механизмы, лежащие в основе этих нарушений, неизвестны, что требует проведения комплексных биохимических, молекулярных и морфологических исследований.

Цель работы – изучение ультраструктурных механизмов нарушения продукции минерало- и глюкокортикоидов при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ на развивающийся организм в пренатальном и постнатальном периодах онтогенеза.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на самцах крыс линии Wistar. Пренатальное и постнатальное воздействие эндокринного дисраптора на развивающийся организм осуществлялось путем замены самкам с момента ссаживания с самцами и до окончания подсосного периода у потомства питьевой воды на раствор *o,n*-ДДТ (*Sigma-Aldrich*, США) с концентрацией 20 мкг/л. С 3-недельного возраста потомство ($n = 24$) самостоятельно потребляло аналогичный раствор ДДТ. Суточное потребление ДДТ беременными самками составляло $(2,70 \pm 0,19)$ мкг/кг, во время лактации – $(2,47 \pm 0,11)$ мкг/кг, самостоятельное потребление достигало $(3,30 \pm 0,14)$ мкг/кг в сутки, что соответствует фоновому воздействию ДДТ на организм человека с учетом особенностей его метаболизма у крысы [7]. Контрольной группой служило потомство мужского пола, рожденное интактными самками ($n = 24$). ДДТ, его метаболиты и родственные хлорорганические соединения в потребляемых воде и корме отсутствовали, что было подтверждено методом газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Животных выводили из эксперимента передозировкой золетила на 42-е сутки (пубертатный период) и 70-е сутки (постпубертатный период), когда надпочечник крысы достигает своего максимального развития ($n = 12$ в каждой группе) [8]. Эксперимент одобрен этическим комитетом НИИ морфологии человека и проведен в соответствии с нормами действующего законодательства.

Концентрацию альдостерона и кортикостерона в сыворотке крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов (*Cusabio*, Китай). Гистологическое исследование экваториальных срезов органа, окрашенных гематоксилином и эозином, проводили методом световой микроскопии на микроскопе *Leica DM2500* (*Leica Microsystems*, Германия). Для электронно-микроскопического исследования надпочечники фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида с постфиксацией в 1 % растворе тетраоксида осмия. После стандартной проводки заливали в смесь эпон и аралдита. Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали с помощью ультрамикротомы *PowerTome* (*RMC Boeckeler*, США). Срезы исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе *Libra 120* (*Carl Zeiss*, Германия). Морфометрические и ультраморфометрические исследования проводили с использованием программы *ImageScope* (*Leica Microsystems*).

Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета прикладных программ *Statistica 7.0* (*StatSoft Inc.*, США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приближенно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения ($M \pm m$). Сравнение независимых групп по количественному признаку выполняли с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена о равенстве дисперсий и критерия χ^2 . Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

Результаты и их обсуждение

У крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ, в периоде полового созревания выявлен пониженный уровень продукции альдостерона (см. таблицу).

Гистологическое исследование экваториальных срезов надпочечников выявило меньшую площадь клубочковой зоны по сравнению с контролем (рис. 1; рис. 2, а). Ее клетки имели небольшой размер, слабоокисфильную просветленную цитоплазму и округлые крупные ядра. Электронно-микроскопическое исследование показало, что размеры и количество митохондрий в единице площади цитоплазмы статистически значимо не отличались от значений контрольной группы. Однако процент митохондрий с отеком матрикса и объем липидных включений в цитоплазме были значительно меньше, чем в контроле (рис. 3).

После достижения половой зрелости у крыс контрольной группы отмечалось увеличение продукции альдостерона на фоне уменьшения размеров клубочковой зоны (см. таблицу, рис. 1). В клетках наблюдались значительные ультраструктурные изменения, заключающиеся в увеличении числа митохондрий и уменьшении их размера. Отек матрикса митохондрий встречался реже, чем в пубертатном возрасте. Содержание липидных включений тоже уменьшилось (см. рис. 3).

Концентрация минерало- и глюкокортикоидов в сыворотке крови крыс контрольной группы и крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, в пубертатном периоде (возраст 42 сут) и после достижения половой зрелости (возраст 70 сут) ($M \pm m$)

Serum concentrations of mineralocorticoid and glucocorticoid hormones in pubertal (age 42 d) and postpubertal (age 70 d) control rats and developmentally exposed to endocrine disruptor DDT ($M \pm m$)

Гормоны	Контрольная группа	Группа животных, развивавшихся в условиях низкодозового воздействия ДДТ
Альдостерон, пг/мл: в пубертатном периоде после достижения половой зрелости	138,59 $\pm$ 12,11 264,95 $\pm$ 16,93 [#]	41,50 $\pm$ 2,02* 227,34 $\pm$ 14,33 [#]
Кортикостерон, нг/мл: в пубертатном периоде после достижения половой зрелости	402,47 $\pm$ 27,64 261,63 $\pm$ 20,42 [#]	520,39 $\pm$ 35,64* 289,89 $\pm$ 18,93 [#]

Примечание. * – $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой; [#] – $p < 0,01$ при сравнении с предыдущим сроком исследования.

У крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ, также выявлены повышение продукции альдостерона и тенденция к нормализации его концентрации в сыворотке крови (см. таблицу). Площадь клубочковой зоны увеличилась по сравнению с предыдущим сроком исследования и превысила значения контрольной группы (см. рис. 1). После достижения половой зрелости увеличилось и количество митохондрий в единице площади цитоплазмы, но в гораздо меньшей степени, чем в контроле. При этом размеры митохондрий изменялись незначительно. Процент митохондрий с отеком матрикса, как и в пубертатном периоде, был ниже, чем в контрольной группе. Уменьшилось содержание липидных включений в цитоплазме клеток (см. рис. 3).

Концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс, развивавшихся в условиях воздействия низких доз ДДТ, в пубертатном периоде была повышенной по сравнению с контролем (см. таблицу). Размеры пучковой зоны не отличались от контрольных значений (см. рис. 1), но в ее наружной части отмечались расширение капилляров, обтурация их просветов эритроцитами, очаговые кровоизлияния и гибель клеток (см. рис. 2, б). Ультраструктурные исследования показали, что в более глубоких участках пучковой зоны клетки характеризовались увеличением диаметра и количества митохондрий, а также процента митохондрий с отеком матрикса (рис. 4).

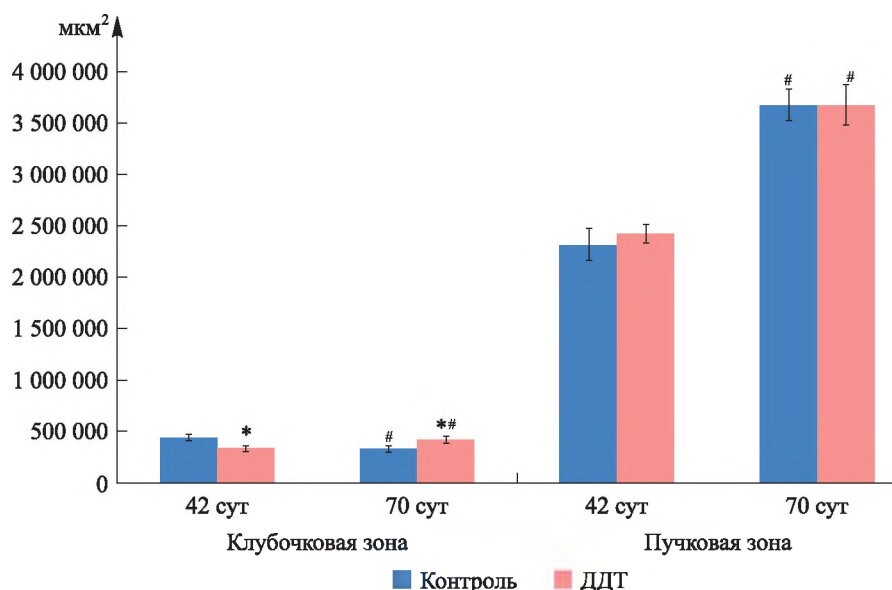


Рис. 1. Отличия возрастных изменений размеров клубочковой и пучковой зон у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ ($M \pm m$; * – $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой; [#] – $p < 0,01$ при сравнении с предыдущим сроком исследования)

Fig. 1. Differences in age-dependent changes in sizes of zona glomerulosa and zona fasciculata in rats developmentally exposed to endocrine disruptor DDT ($M \pm m$; * – $p < 0.01$ compared to control; [#] – $p < 0.01$ compared to the previous term of exposure)

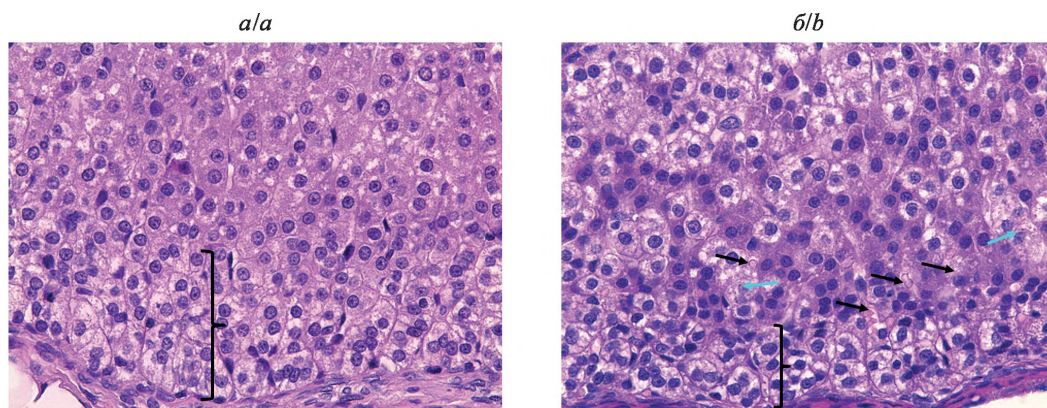


Рис. 2. Структура клубочковой и пучковой зон коркового вещества надпочечников крыс пубертатного возраста, принадлежавших к контрольной группе (а) и развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ (б):
а – клубочковая зона (обозначена черной скобкой) хорошо развита и представлена клетками с округлыми ядрами и слабоокисильной цитоплазмой, пучковая зона состоит из крупных клеток с умеренно окисильной гетерогенной цитоплазмой;
б – клубочковая зона имеет меньшую толщину, ее клетки характеризуются полиморфизмом и гиперхромазией ядер, просветлением цитоплазмы, в наружной части пучковой зоны наблюдаются клетки с гиперхромными ядрами и выраженной окисильностью цитоплазмы, а также группы клеток более крупного размера с просветленной цитоплазмой, слабо окрашенными ядрами с нечетким неровным контуром (указаны голубыми стрелками), сосуды микроциркуляторного русла расширены, их просветы заполнены эритроцитами (указаны черными стрелками).
Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$

Fig. 2. Histology of adrenocortical zona glomerulosa and zona fasciculata in pubertal control rats (a) and rats developmentally exposed to endocrine disruptor DDT (b):
a – zona glomerulosa (black bracket) is well developed and is formed by cells with round-in-shape nuclei and slightly eosinophilic cytoplasm, zona fasciculata cells demonstrate larger size and moderate oxiphilic cytoplasm; b – narrow zona glomerulosa composed of pleomorphic cells with hyperchromatic nuclei and enlightened cytoplasm, the outer zona fasciculata exhibits cells with hyperchromatic nuclei and strong eosinophilic cytoplasm as well as groups of bigger cells with enlightened cytoplasm, irregularly shaped pale nuclei with fuzzy outline (blue arrow), microcirculatory vessels are dilated and erythrocytes-filled (black arrow).
Haematoxylin and eosin staining, magnification $\times 400$

После достижения половой зрелости концентрация кортикостерона в сыворотке крови крыс контрольной группы уменьшилась, несмотря на значительное увеличение размеров пучковой зоны (см. таблицу, рис. 1). Электронно-микроскопическое исследование выявило уменьшение числа митохондрий в клетках наряду с увеличением их размера и снижением процента митохондрий с отеком матрикса (см. рис. 4).

У крыс, подвергавшихся воздействию эндокринного дисраптора, концентрация кортикостерона в сыворотке крови уменьшилась и не отличалась от контрольных значений крыс аналогичного возраста (см. таблицу). Размеры пучковой зоны увеличились по сравнению с предыдущим сроком исследования и соответствовали контролю (см. рис. 1). При электронно-микроскопическом исследовании обнаружены аналогичные ультраструктурные изменения в клетках. Количество митохондрий в единице площади цитоплазмы уменьшилось, но превышало контрольные значения. Размеры митохондрий увеличились и не отличались от таковых в контрольной группе. А процент митохондрий с отеком матрикса не изменился и значительно превышал значения контрольных животных. Отличием было уменьшение липидных включений в цитоплазме (см. рис. 4).

Известно, что действие эндокринных дисрапторов может разобщать функциональную связь между уровнем продукции альдостерона и концентрацией калия, а также ангиотензина II, что обусловлено нарушением транскрипции генов, участвующих в обеспечении регуляции деятельности коркового вещества надпочечников [9; 10]. Это указывает на необходимость изучения не только биохимических, но и цитофизиологических механизмов дисрапторного действия. Настоящее исследование показало, что снижение продукции альдостерона в пубертатном периоде при развитии организма в условиях низкодозового воздействия эндокринного дисраптора ДДТ обусловлено как отставанием в развитии клубочковой зоны, так и пониженной функциональной активностью ее клеток. После достижения половой зрелости в норме происходило усиление функциональной активности клеток клубочковой зоны, что подтверждала реорганизация митохондриального аппарата с увеличением числа митохондрий в цито-

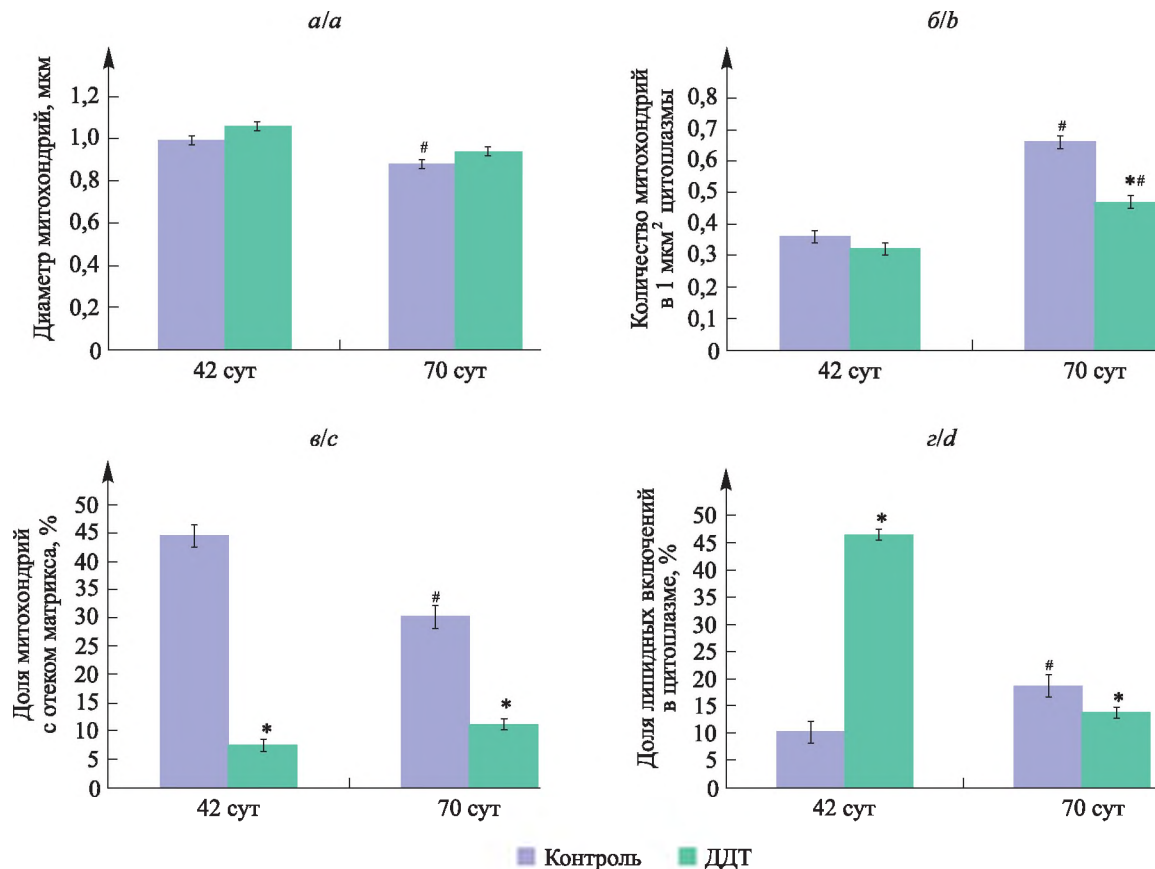


Рис. 3. Отличия в ультраструктуре клеток клубочковой зоны у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ
($M \pm m$; * – $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой;
– $p < 0,01$ при сравнении с предыдущим сроком исследования)

Fig. 3. Differences in glomerulosa cells fine structure in rats developmentally exposed to endocrine disruptor DDT
($M \pm m$; * – $p < 0.01$ compared to control;
– $p < 0.01$ compared to the previous term of exposure)

плазме и одновременным уменьшением их размера. Настоящее исследование выявило подобные изменения в контрольной группе. У животных, развивавшихся при воздействии ДДТ, возрастные изменения ультраструктуры клеток были выражены в меньшей степени, что отражает их незрелость. Митохондрии являются весьма пластичными органеллами, способными к адаптивной перестройке [11]. Вероятно, именно неспособность к перестройке органелл, обеспечивающих секреторный процесс, обусловила гиперплазию клубочковой зоны. В пользу этого предположения свидетельствует то, что, несмотря на большие размеры клубочковой зоны, амплитуда увеличения продукции минералокортикоидов была меньше, чем у крыс контрольной группы. Схожие изменения мы наблюдали и в фолликулярном эпителии щитовидной железы при воздействии низких доз ДДТ, когда нормализация секреторных процессов достигалась за счет повышения пролиферации, а не экспрессии ключевых молекул, ответственных за синтез гормонов, несмотря на повышенный уровень секреции тиреотропного гормона [12]. Эти данные подтверждают нарушения биогенеза митохондрий при развитии организма в условиях низкодозового воздействия ДДТ и указывают на механизм действия эндокринного дисраптора.

Исследование ультраструктуры клеток пучковой зоны показало, что деструктивные изменения в ее наружной части, выявленные в пубертатном периоде, вызвали реактивное усиление стероидогенеза в ее более глубоких участках, что полностью подтверждает повышенный уровень глюкокортикоидов. После достижения половой зрелости изменения ультраструктуры клеток пучковой зоны у крыс контрольной группы были противоположны таковым в клубочковой зоне. Это связано с активным ростом пучковой зоны, т. е. увеличением числа ее клеток, что не требовало перестроек митохондриального аппарата для интенсификации функциональной активности. У крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, структура пучковой зоны после достижения половой зрелости была восстановлена, ее развитие соответствовало контрольным параметрам. Но ультраструктурные характеристики клеток, такие как

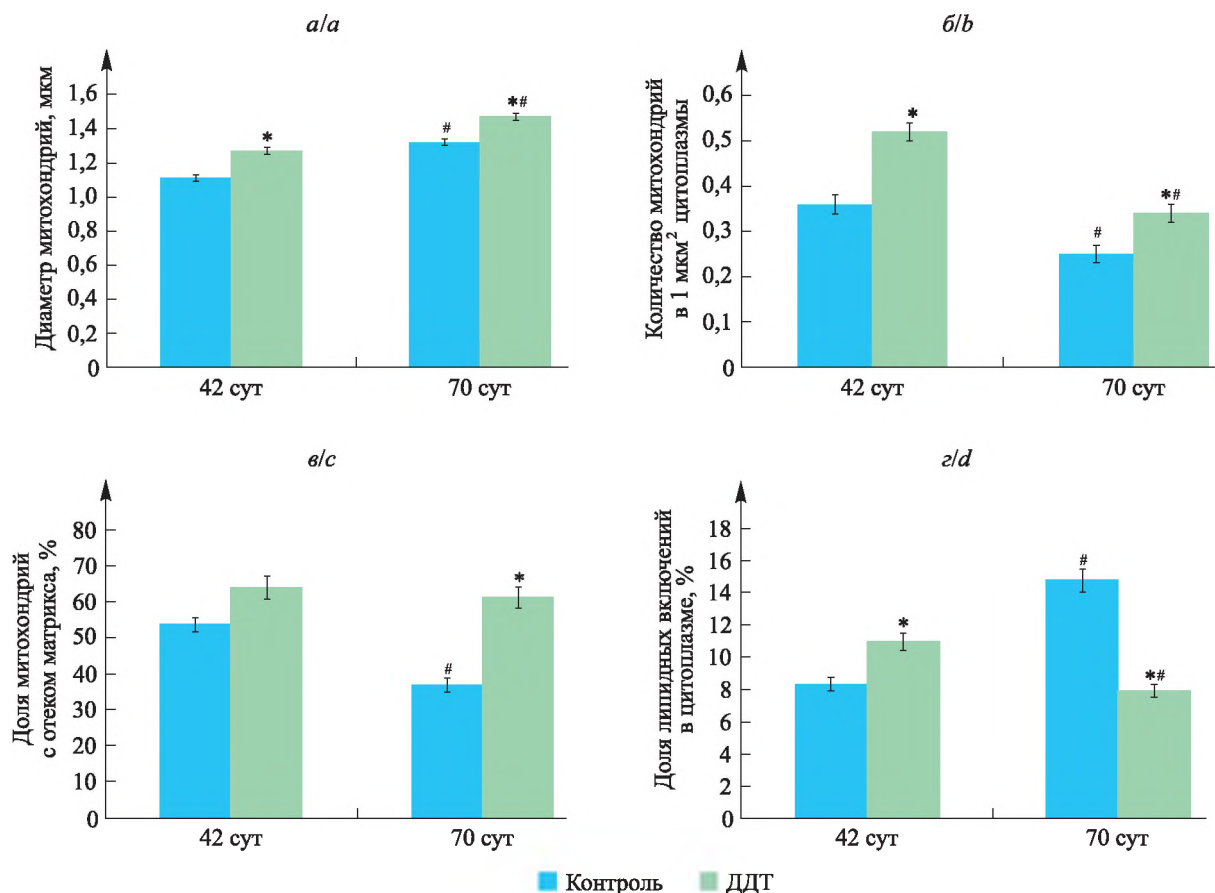


Рис. 4. Отличия в ультраструктуре клеток пучковой зоны у крыс, развивавшихся при воздействии эндокринного дисраптора ДДТ ($M \pm m$; * – $p < 0,01$ при сравнении с контрольной группой; # – $p < 0,01$ при сравнении с предыдущим сроком исследования)

Fig. 4. Differences in fasciculata cells fine structure in rats developmentally exposed to endocrine disruptor DDT ($M \pm m$; * – $p < 0.01$ compared to control; # – $p < 0.01$ compared to the previous term of exposure)

количество митохондрий в единице площади цитоплазмы и процент митохондрий с отеком матрикса, соответствовали таковым у крыс контрольной группы в пубертатном периоде. Больше число митохондрий в цитоплазме клеток, чаще наблюдаемый отек матрикса и меньшее содержание липидных включений по сравнению с возрастным контролем свидетельствуют о необходимости клеток функционировать более активно, что указывает на возможное снижение активности стероидогенных ферментов под воздействием дисраптора как причину ультраструктурных перестроек.

Заключение

Клеточными механизмами нарушения синтеза минералокортикоидов надпочечниками крыс, развивавшихся при пренатальном и постнатальном воздействии эндокринного дисраптора ДДТ, являются нарушения функционирования митохондрий и возрастной перестройки митохондриального аппарата, происходящей при переходе от пубертатного периода к половой зрелости. Механизмы повышенной продукции глюкокортикоидов также связаны с компенсаторной гиперфункцией митохондрий кортикостероцитов.

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. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*. 2015;36(6):E1–E150. DOI: 10.1210/er.2015-1010.

3. Fisher M, Arbuckle TE, Liang CL, LeBlanc A, Gaudreau E, Foster WG, et al. Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. *Environmental Health*. 2016;15(1):59. DOI: 10.1186/s12940-016-0143-y.
4. El-Hefnawy T, Hernandez C, Stabile LP. The endocrine disrupting alkylphenols and 4,4'-DDT interfere with estrogen conversion and clearance by mouse liver cytosol. *Reproductive Biology*. 2017;17(3):185–192. DOI: 10.1016/j.repbio.2017.04.003.
5. Yaglova NV, Yaglov VV. Changes in thyroid status of rats after prolonged exposure to low dose dichlorodiphenyltrichloroethane. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;156(6):760–762. DOI: 10.1007/s10517-014-2443-y.
6. Яглова НВ, Цомартова ДА, Яглов ВВ. Особенности продукции стероидных гормонов надпочечников в пубертатном периоде у крыс, подвергавшихся воздействию низких доз эндокринного дисраптора ДДТ в пренатальном и постнатальном развитии. *Биомедицинская химия*. 2017;63(4):306–311. DOI: 10.18097/PBMC20176304306.
7. Yamazaki H, Takano R, Horiuchi K, Shimizu M, Murayama N, Kitajima M, et al. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Journal of Health Science*. 2010;56(5):566–575. DOI: 10.1248/jhs.56.566.
8. Pignatelli D, Xiao F, Gouveia AM, Ferreira JG, Vinson GP. Adrenarche in the rat. *Journal of Endocrinology*. 2006;191(1):301–308. DOI: 10.1677/joe.1.06972.
9. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Mechanisms mediating environmental chemical-induced endocrine disruption in the adrenal gland. *Frontiers in Endocrinology*. 2015;6:29. DOI: 10.3389/fendo.2015.00029.
10. Romero DG, Plonczynski MW, Welsh BL, Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Gomez-Sanchez EP. Gene expression profile in rat adrenal zona glomerulosa cells stimulated with aldosterone secretagogues. *Physiological Genomics*. 2007;32(1):117–127. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00145.2007.
11. 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.
12. Яглова НВ, Яглов ВВ. Механизмы дисрапторного действия дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на функционирование фолликулярных эпителиоцитов щитовидной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015;160(8):196–199.

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. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*. 2015;36(6):E1–E150. DOI: 10.1210/er.2015-1010.
3. Fisher M, Arbuckle TE, Liang CL, LeBlanc A, Gaudreau E, Foster WG, et al. Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study. *Environmental Health*. 2016;15(1):59. DOI: 10.1186/s12940-016-0143-y.
4. El-Hefnawy T, Hernandez C, Stabile LP. The endocrine disrupting alkylphenols and 4,4'-DDT interfere with estrogen conversion and clearance by mouse liver cytosol. *Reproductive Biology*. 2017;17(3):185–192. DOI: 10.1016/j.repbio.2017.04.003.
5. Yaglova NV, Yaglov VV. Changes in thyroid status of rats after prolonged exposure to low dose dichlorodiphenyltrichloroethane. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2014;156(6):760–762. DOI: 10.1007/s10517-014-2443-y.
6. Yaglova NV, Tsomartova DA, Yaglov VV. Differences in adrenal steroid hormones production in pubertal rats exposed to low doses of endocrine disruptor DDT during prenatal and postnatal development. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2017;63(4):306–311. Russian. DOI: 10.18097/PBMC20176304306.
7. Yamazaki H, Takano R, Horiuchi K, Shimizu M, Murayama N, Kitajima M, et al. Human blood concentrations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) extrapolated from metabolism in rats and humans and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Journal of Health Science*. 2010;56(5):566–575. DOI: 10.1248/jhs.56.566.
8. Pignatelli D, Xiao F, Gouveia AM, Ferreira JG, Vinson GP. Adrenarche in the rat. *Journal of Endocrinology*. 2006;191(1):301–308. DOI: 10.1677/joe.1.06972.
9. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Mechanisms mediating environmental chemical-induced endocrine disruption in the adrenal gland. *Frontiers in Endocrinology*. 2015;6:29. DOI: 10.3389/fendo.2015.00029.
10. Romero DG, Plonczynski MW, Welsh BL, Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Gomez-Sanchez EP. Gene expression profile in rat adrenal zona glomerulosa cells stimulated with aldosterone secretagogues. *Physiological Genomics*. 2007;32(1):117–127. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00145.2007.
11. 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.
12. Yaglova NV, Yaglov VV. [Mechanisms of disruptive action of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) on the function of thyroid follicular epitheliocytes]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2015;160(8):196–199. Russian.

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

БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗИРОВАННОГО СКАФФОЛДА ПЕЧЕНИ В ИССЛЕДОВАНИЯХ *in vitro*¹

М. Ю. ЮРКЕВИЧ¹⁾, А. Д. ДУБКО¹⁾,
Д. Б. НИЖЕГОРОВОДА¹⁾, М. В. ЛОБАЙ¹⁾, М. М. ЗАФРАНСКАЯ¹⁾

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

Создание многокомпонентных тканеинженерных конструкций на основе децеллюляризованного скаффолда – перспективная альтернатива органной трансплантации при терминальной стадии печеночной недостаточности. Представлена технология децеллюляризации печени крыс, заключающаяся в перфузии 0,1 % раствора додецилсульфата натрия через воротную вену. Установлено отсутствие цитотоксического эффекта децеллюляризованного скаффолда на аллогенные культуры спленоцитов и мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки. Полученные скаффолды печени обладают биосовместимостью, подтвержденной в культурах клеток, и соответствуют основным критериям, предъявляемым к клеточным носителям, что позволяет использовать их в тканевой инженерии для создания многоклеточных тканеинженерных конструкций печени.

Ключевые слова: децеллюляризация; перфузионно-детергентный метод; скаффолд печени; биосовместимость; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; спленоциты.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № M19APM-016 от 02.05.2019 г.).

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:

Юркевич МЮ, Дубко АД, Нижегородова ДБ, Лобай МВ, Зафранская ММ. Биосовместимость децеллюляризованного скаффолда печени в исследованиях *in vitro*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1:20–27.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-20-27>

For citation:

Yurkevich MYu, Dubko AD, Nizheharodava DB, Labai MV, Zafranskaya MM. Biocompatibility of a decellularized liver scaffold in studies *in vitro*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;1:20–27. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-20-27>

Авторы:

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

Андрей Дмитриевич Дубко – младший научный сотрудник научно-исследовательского сектора.

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

Марина Валерьевна Лобай – старший преподаватель кафедры иммунологии факультета экологической медицины.

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

Authors:

Mariya Yu. Yurkevich, PhD (biology); associate professor at the department of immunology, faculty of environmental medicine.
marija4567@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-5082-5874>

Andrei D. Dubko, junior researcher at the research sector.
dubko.immun@gmail.com

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

Maryna V. Labai, senior lecturer at the department of immunology, faculty of environmental medicine.
marina.lobai@mail.ru

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

BIOCOMPATIBILITY OF A DECELLULARIZED LIVER SCAFFOLD IN STUDIES *in vitro*

M. Yu. YURKEVICH^a, A. D. DUBKO^a,
D. B. NIZHEHARODAVA^a, M. V. LABAI^a, M. M. ZAFRANSKAYA^a

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

Corresponding author: M. Yu. Yurkevich (marija4567@gmail.com)

The development of multicomponent threedimensional structures based on decellularized tissue is a perspective alternative for organ transplantation in end-stage liver disease. The technology of rat liver decellularization is presented which consist in sequential perfusion of organ through the portal vein and use of 0.1 % sodium dodecyl sulfate as an active solution. The absence of the cytotoxic effect of decellularized scaffolds on allogeneic splenocytes and multipotent mesenchymal stromal cells was established. The obtained liver scaffolds are biocompatible in cells cultures and correspond criteria for cell carriers.

Keywords: decellularization; perfusion-detergent method; liver scaffold; biocompatibility; multipotent mesenchymal stromal cells; splenocytes.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. M19ARM-016 dated 02.05.2019).

Введение

На сегодняшний день использования стандартных терапевтических подходов при терминальной стадии заболеваний печени все еще недостаточно и смертность остается на уровне 80–90 %. Широкое распространение ортотопической и вспомогательной (частичной) пересадки печени ограничено дефицитом донорских органов, отсутствием эффективных методик длительного хранения печени, плохой приживляемостью трансплантата, а также частым развитием осложнений, связанных с отторжением или недостаточным функционированием органа. Использование эфферентных (аппаратных) методов при терминальной печеночной недостаточности обеспечивает лишь временную детоксикацию организма и незначительно стимулирует регенеративные процессы [1; 2]. В связи с этим актуальной задачей выступает поиск альтернативных подходов, одним из которых является клеточная терапия [3–8].

Проведены как экспериментальные, так и клинические исследования трансплантации различных типов клеток (гепатоцитов [5–7], мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) [8] и др.) при острой и хронической печеночной недостаточности [5; 6; 8], наследственных метаболических нарушениях [7]. Однако практически во всех случаях клеточная терапия не обеспечивала стабильный терапевтический эффект: наблюдалась временная нормализация печеночных функций, продолжительность которой варьировалась от нескольких дней до 6–18 мес. Кроме того, отмечался крайне низкий уровень приживляемости клеток (менее 1 % от всех введенных клеток), что связано с отсутствием условий для их прикрепления и контактного взаимодействия с последующим формированием *de novo* анатомически функциональной структуры [1; 5–7].

Современный этап разработок в области терапии заболеваний печени связывают с использованием клеточных культур в составе тканеинженерных конструкций (скаффолдов) [9; 10]. Скаффолды должны обладать рядом свойств, дающих возможность сформировать полноценную ткань: биосовместимостью и отсутствием иммунологического отторжения, адгезивной поверхностью, способствующей прикреплению и пролиферации клеток, пористостью, нетоксичностью [3; 9; 10]. Каркасы из синтетических материалов не позволяют повторить необходимые архитектуру, микро- и наноструктурные особенности и функциональную активность нативных тканей [11]. В связи с этим в регенеративной медицине преимущество отдается биологическим конструкциям, включающим в себя компоненты нативной ткани, полученные различными методами децеллюляризации (экстракция детергентами или ферментами, промывание гипотоническими и гипертоническими растворами, разрушение ультразвуком, механическое давление, чередование циклов замораживание – оттаивание и т. д.) [12–15].

Децеллюляризация целого органа или его части позволяет получить соединительнотканый каркас с сохраненными архитектурой печеночного матрикса и проходимостью сосудистого русла. При этом

в ткани сохраняются внеклеточные элементы (коллаген, фибронектин, ламинин, гликозаминогликаны, протеоглики), выступающие в роли сайтов прикрепления, а также факторы роста, миграции и дифференцировки клеток (эндотелиальный фактор роста сосудов, инсулиноподобный фактор роста, фактор роста гепатоцитов и др.) [13]. Важным показателем децеллюляризованных скаффолдов является их биосовместимость, оцениваемая в культурах клеток и на экспериментальных моделях у лабораторных животных [16].

Цель исследования заключалась в модификации технологии децеллюляризации печени перфузионно-детергентным методом и оценке биосовместимости полученных скаффолдов в аллогенных культурах клеток.

Материалы и методы исследования

Дизайн исследования. Экспериментальное исследование включало следующие этапы: получение скаффолда методом децеллюляризации ткани печени, гистологическое исследование конечного продукта, определение содержания остаточной ДНК, оценку биосовместимости в клеточных культурах ММСК и спленоцитов.

Материалы и оборудование. В работе использовались гепаринат натрия (РУП «Белмедпрепараты», Беларусь), 0,9 % раствор натрия хлорида (РУП «Белмедпрепараты»), вода дистиллированная, подготовленная по требованиям ГОСТ 6709-72, фиколл-верографин (*Sigma*, Германия), коллагеназа типа IV (*Sigma*), эмбриональная телячья сыворотка (*Capricorn Scientific*, Германия), минимальная среда Игла с низким содержанием глюкозы, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM, *Gibco*, США), смесь антибиотиков и антимикотика (бензилпенициллин натрия, стрептомицина сульфат, неомицина сульфат, *Lonza*, США), L-глутамин (*Lonza*), додецилсульфат натрия (SDS, *Sigma*), диметилсульфоксид (*Sigma*), гематоксилин (Россия), спиртовой раствор эозина (Россия), железный гематоксилин Вейгерта (Россия), 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI, *Sigma*), набор Annexin V – FITC Apoptosis Detection Kit (*BD Pharmingen*, США), культуральные чашки Петри, пробирки культуральные на 15 и 50 мл, медицинские инструменты – пинцеты, зажимы, хирургические ножницы, периферический венозный катетер 18G.

Применяемое оборудование: ламинарный бокс класса защиты II (ОДО «Белаквилон», Беларусь), CO₂-инкубатор CO2CELL 50 (*MMM Group*, Германия), перистальтический насос, центрифуга лабораторная Liston C 2201 (ООО «Листон», Россия), инвертированный флуоресцентный микроскоп BS-2036F (*BestScope*, Китай), проточный цитометр CytoFLEX (*Beckman Coulter*, США), дозаторы автоматические (*Thermo Scientific*, Россия).

Лабораторные животные. Экспериментальные исследования проводили на половозрелых лабораторных крысах (масса тела 220–280 г) с соблюдением положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986), и в соответствии с Ветеринарно-санитарными правилами по приему, уходу и вскрытию подопытных животных в вивариях научно-исследовательских институтов, станциях, лабораториях, учебных заведениях, а также в питомниках (утверждены постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 21 мая 2010 г. № 36).

Клеточные культуры. В работе использовались культуры ММСК, полученные согласно стандартному протоколу ферментативной дезагрегации жировой ткани (0,075 % раствор коллагеназы типа IV) [17], а также спленоциты, выделенные путем центрифугирования гомогената селезенки на градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,083 \text{ г/см}^3$).

Децеллюляризация печени крыс. На фоне тиопенталового наркоза (интракардиальное введение 45 мг тиопентала натрия на 1 кг веса) проводили срединную и поперечную лапаротомию лабораторных животных, края раны фиксировали, катетеризировали нижнюю полую и воротную вены, на остальные сосуды накладывали швы. В сосудистую систему печени вводили 2000 ЕД гепарината натрия в охлажденном до 4 °С растворе лактата Рингера. Далее печень отделяли от связочного материала, помещали в емкость с дистиллированной водой и перфузировали 0,1 % раствором SDS. Подачу раствора со скоростью 25 мл/мин осуществляли с помощью перистальтического насоса через катетер воротной вены. Систему отведения подключали к катетеру нижней полой вены. Перфузию останавливали при полной диссоциации клеток печени, которую оценивали эмпирически на основе изменения окраски и прозрачности органа. Для очищения сосудистого русла от децеллюляризирующего раствора и тканевого детрита ткань перфузировали дистиллированной водой, содержащей 1 % смеси антибиотиков и антимикотика.

Анализ содержания ДНК в децеллюляризованном скаффолде. Образцы децеллюляризованного скаффолда лизировали в 1 мл буферного раствора, содержащего 100 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л трис-HCl, 25 ммоль/л ЭДТА, 0,5 % SDS, в течение 16–18 ч при 37 °С в условиях постоянного помешивания. Далее образцы центрифугировали (1 мин, 3000 об/мин) в 1 мл фенол-хлороформной смеси

(фенол, хлороформ и изоамиловый спирт в соотношении 25 : 24 : 1, pH 7,5–8,5). Полученные водные фазы последовательно центрифугировали в 1 мл раствора 8 моль/л ацетата аммония (20 мин, 14 000 об/мин, 4 °C) и 1 мл изопропанола (10 мин, 14 000 об/мин, 4 °C). Осадки ДНК отмывали в 0,7 мл 70 % раствора этилового спирта (10 мин, 14 000 об/мин, 4 °C). После удаления жидкой части и полного высыхания осадка (5–10 мин) к образцам добавляли 0,05 мл деионизированной воды. Измерение концентраций ДНК осуществляли на спектрофотометре серии NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*) при длинах волн 260 и 280 нм.

Исследование биосовместимости скаффолда *in vitro*. На сегменты децеллюляризованного скаффолда размером 10 × 5 мм, помещенные в лунки 24-луночного планшета, вносили ММСК первого пассажа в концентрации $4 \cdot 10^4$ клеток на лунку или суспензию спленоцитов в концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток на лунку. Культивирование осуществлялось 13 дней при условиях 37 °C и 5 % CO₂ в питательной среде DMEM, содержащей 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамин и 1 % смеси антибиотиков и антимикотика.

Оценка жизнеспособности клеток. Жизнеспособность ММСК оценивали методом флуоресцентной микроскопии с использованием 1 мкг/мл DAPI (спектр возбуждения 360–370 нм, диапазон эмиссии 420–470 нм). Спленоциты окрашивали пропидий йодидом и антителами к аннексину V, меченным флуоресцеином, с регистрацией результатов на проточном цитометре на 50 000 событий.

Рецеллюляризация скаффолда печени. Рецеллюляризация скаффолда осуществлялась путем паренхиматозного введения суспензии ММСК жировой ткани первого пассажа в полной питательной среде. Концентрация ММСК составляла $2,5 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл в зависимости от объема используемого сегмента. Рецеллюляризованные скаффолды на 72 ч помещались в среду DMEM (37 °C и 5 % CO₂).

Гистологическое исследование. Образцы децеллюляризованной ткани до и после рецеллюляризации фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине, обезжировали в спиртах восходящей крепости и фиксировали в парафине. Изготовленные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином с последующей микроскопической оценкой результатов. Морфометрическое исследование проводили на микроскопе Leica DMLS (Германия) с цифровой видеокамерой JVC (Япония) (разрешающая способность 7 Мп) с помощью программы для анализа и обработки изображений *Leica QWin* (версия 1.56). Количество клеток подсчитывалось в шести неперекрывающихся полях зрения.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты анализировались с использованием стандартного пакета прикладных программ *Statistica 8.0*. Данные представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (25–75-й процентиля). Для оценки различий между двумя группами использовали непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Процесс децеллюляризации органа направлен на удаление всех антигенных структур (нуклеиновых кислот, клеточных мембран, цитоплазматических структур и т. д.) из ткани без повреждения сети экстрацеллюлярного матрикса и нарушения его целостности. Степень удаления клеточных компонентов варьирует в зависимости от пути доставки перфузионного раствора в ткани, типа используемого детергента и времени его экспозиции [12–15].

В рамках данного исследования образцы печени лабораторных крыс перфузировали 0,1 % раствором SDS через воротную вену, что обеспечивало эффективную доставку анионного детергента к клеткам. При визуальном осмотре децеллюляризованные скаффолды характеризовались прозрачностью и однородностью с визуализирующимися в толще контурами сосудов и сохранной капсулой Глиссона (рис. 1, *а*). Согласно данным гистологического исследования взаимная ориентация волокон внеклеточного матрикса в децеллюляризованной ткани не отличалась от таковой в нативных органах, обнаруживались лишь единичные разрывы, отсутствовали признаки деградации коллагеновых волокон и тканевого отека (см. рис. 1, *б–г*). Сохранность сосудистой сети, наличие целостного внеклеточного матрикса, формирующего естественную клеточную нишу, а также пространственная архитектура ткани скаффолдов позволяют в дальнейшем осуществлять их успешную рецеллюляризацию различными типами клеток (ММСК, гепатоцитами, эндотелиальными клетками, непаренхиматозными клетками печени и др.).

Децеллюляризованные скаффолды не должны содержать клеток, включая клеточные компоненты – цитоплазму и ядра. Их присутствие в матриксе может приводить к нарушению клеточной биосовместимости *in vitro* и вызывать нежелательные реакции в условиях *in vivo*. С. Ф. Бадилак с соавторами (2011) на основе результатов оценки эффективности применения скаффолдов на клеточном и организменном уровнях выделил следующие минимальные критерии для оценки децеллюляризации: содержание

ДНК менее 50 нг в 1 мг сухого веса внеклеточного матрикса; наличие фрагментов ДНК длиной менее 200 пар нуклеотидов; отсутствие видимого ядерного материала в срезах ткани, окрашенных гематоксилином и эозином или другими красителями [15]. Гистологическая оценка не выявила ядерного или цитоплазматического окрашивания в полученных децеллюляризованных образцах (см. рис. 1, б–г) при сохраненной пористой структуре ткани. Концентрация ДНК в скаффолдах соответствовала 0,13 (0,08–0,35) нг/мг, что составляло менее 1 % от количества ДНК в нативной ткани (529,06 (527,03–541,09) нг/мг, $p < 0,01$) (см. рис. 1, д).

При культивировании ММСК жировой ткани на подложке из децеллюляризованной ткани клетки адгезировались к скаффолду в течение 24 ч, что соответствует степени адгезии к лабораторному пластику. Кроме того, ММСК, культивируемые на децеллюляризованных скаффолдах, сохраняли типичную для монослойных культур веретеновидную морфологию, а также характеризовались сходной с нативными клетками пролиферативной активностью (рис. 2). Жизнеспособность ММСК в присутствии скаффолда варьировала от 92 до 99 % (95 (93–99) % по медиане) и не отличалась от аналогичного показателя для нативных культур (96 (92–99) %, $p > 0,05$). Морфологические особенности, высокая жизнеспособность и пролиферативный потенциал сохранялись в ММСК, культивируемых на подложке из децеллюляризованной ткани, на протяжении всего периода наблюдения.

Децеллюляризованная ткань не обладала цитотоксичностью в отношении аллогенных спленоцитов (рис. 3). На 4-й день совместного культивирования количество некротических спленоцитов на сегментах скаффолда составляло 1–2 % (1,2 (0,8–1,6) %), количество апоптотических клеток не превышало 13 % (10,6 (7,5–12,0) %), что соответствовало результатам, полученным в нативных культурах спленоцитов (1,0 (0,5–1,5) и 8,9 (6,3–11,2) % соответственно, $p > 0,05$).

При культивировании ММСК в трехмерных условиях скаффолда также наблюдалось прикрепление клеток к соединительнотканым структурам матрикса (рис. 4). Выход клеток из скаффолда через 72 ч после его заселения путем паренхиматозной инъекции не превышал 10 % (8,0 (5,6–9,1) % по медиане). В гистологических препаратах рецеллюляризованных скаффолдов наблюдалось диффузное расположение клеток, количество которых, по данным морфометрического исследования, варьировалось от 5 до 17 (8 (6–11) ММСК) в поле зрения.

Представленные данные свидетельствуют о биосовместимости полученных перфузионно-детергентным методом децеллюляризованных скаффолдов печени с культурами клеток и указывают на отсутствие у них цитотоксических свойств, что возможно лишь в случае надлежащей элиминации из ткани печени клеточных элементов и детергентов, используемых для перфузии.

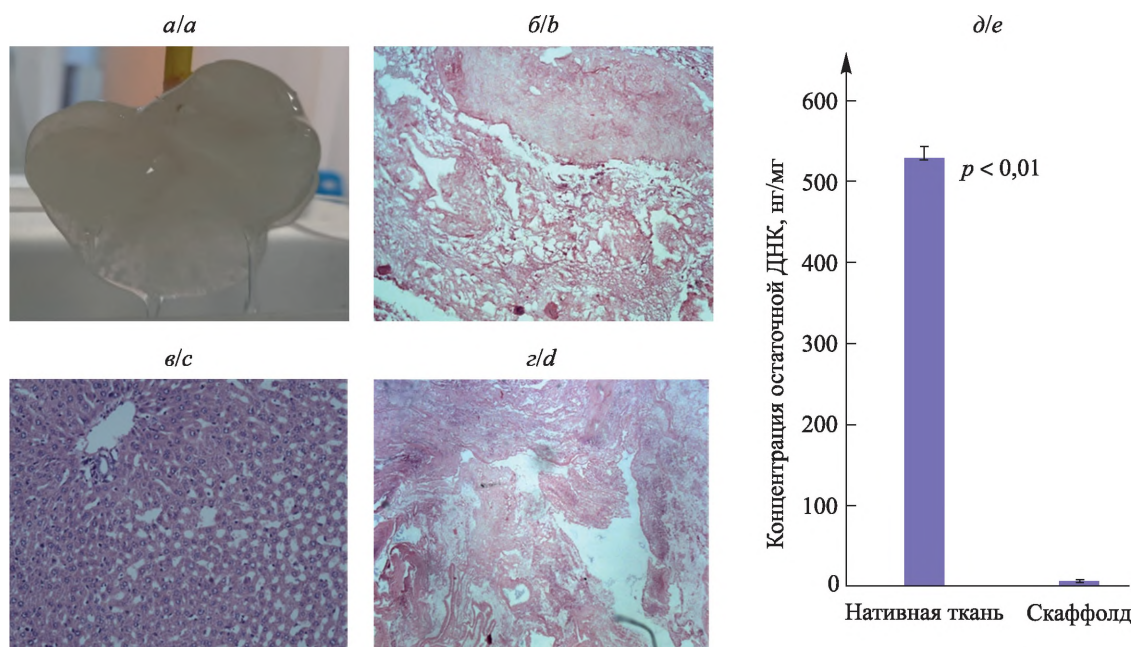


Рис. 1. Внешний вид (а) и гистологическая структура скаффолда (б – нативная ткань, увеличение $\times 20$; в – децеллюляризованная ткань, увеличение $\times 20$; г – децеллюляризованная ткань, увеличение $\times 5$; окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия), содержание остаточной ДНК (д)

Fig. 1. The appearance (a) and the histological structure of the scaffold (b – native tissue, magnification $\times 20$; c – decellularized tissue, magnification $\times 20$; d – decellularized tissue, magnification $\times 5$; hematoxylin eosin staining, light microscopy), residual DNA content (e)

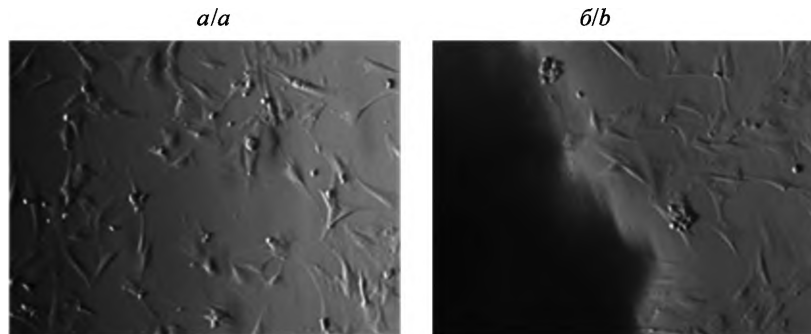


Рис. 2. Морфология ММСК, культивируемых в стандартных условиях в течение 10 дней в отсутствие (а) и в присутствии (б) подложки из децеллюляризованного скаффолда печени. Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 40$

Fig. 2. The morphology of MMSCs in the absence (a) and the presence (b) of a decellularized liver scaffold on the 10th cultivation day under standard conditions. Phase-contrast microscopy, magnification $\times 40$

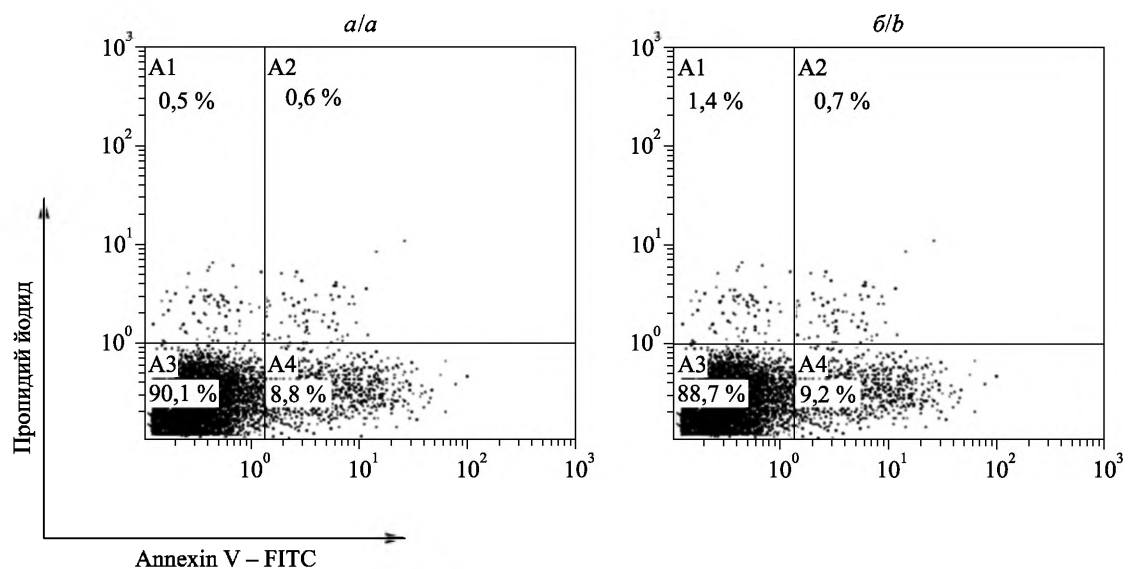


Рис. 3. Репрезентативные диаграммы проточной цитометрии, отражающие экспрессию пропидий йодида и аннексина V в спленocyтaх, культивируемых в отсутствие (а) и в присутствии (б) скаффолда на основе децеллюляризованной ткани печени

Fig. 3. Representative flow cytometry diagrams of propidium iodide and annexin V expression in the absence (a) and the presence (b) of decellularized liver scaffold

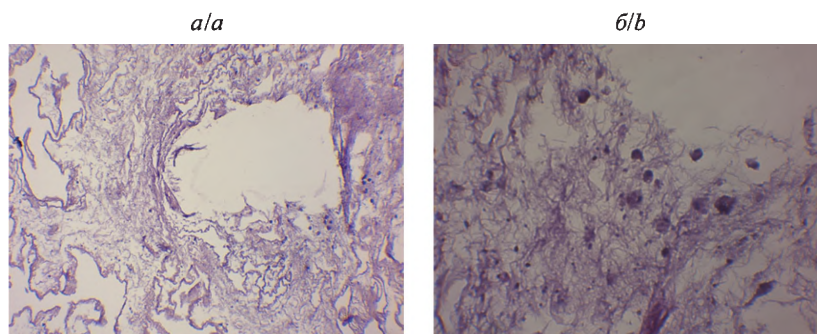


Рис. 4. Структура децеллюляризованного скаффолда печени, заселенного путем паренхиматозного введения аллогенных ММСК жировой ткани: а – увеличение $\times 10$; б – увеличение $\times 40$. Окраска гематоксилином и эозином, световая микроскопия

Fig. 4. The structure of the decellularized liver scaffold populated by parenchymal administration of allogeneic adipose-derived MMSC: a – magnification $\times 10$; b – magnification $\times 40$. Hematoxylin eosin staining, light microscopy

Заклучение

Метод децеллюляризации печени на основе перфузии органа анионным детергентом (SDS) через воротную вену обеспечивает практически полное удаление клеточных компонентов из нативной ткани, максимально сохраняя целостность внеклеточных волокон. Полученные скаффолды печени обладают биосовместимостью, подтвержденной в культурах клеток, и отвечают основным критериям, предъявляемым к клеточным носителям, что дает возможность использовать их в тканевой инженерии для создания многоклеточных тканеинженерных конструкций печени.

Библиографические ссылки

1. Uhl P, Fricker G, Haberkorn U, Mier W. Current status in the therapy of liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(5):7500–7512. DOI: 10.3390/ijms15057500.
2. Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N. Acute liver failure and liver transplantation. *Intractable and Rare Diseases Research*. 2013;2(3):77–87. DOI: 10.5582/irdr.2013.v2.3.77.
3. Гулай ЮС, Крашенинников МЕ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА. Тканевая инженерия печени (современное состояние проблемы по данным зарубежных источников). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014;16(2):103–113. DOI: 10.15825/1995-1191-2014-2-103-113.
4. Heydari Z, Najimi M, Mirzaei H, Shpichka A, Ruoss M, Farzaneh Z, et al. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies. *Cells*. 2020;9(2):304. DOI: 10.3390/cells9020304.
5. Hamooda M. Hepatocyte transplantation in children with liver cell failure. *Electronic Physician*. 2016;8(10):3096–3101. DOI: 10.19082/3096.
6. Wang F, Zhou L, Ma X, Ma W, Wang C, Lu Y, et al. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplantation Proceedings*. 2014;46(1):192–198. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.10.042.
7. Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ. Трансплантация гепатоцитов как метод лечения печеночной недостаточности: экспериментальный и клинический опыт. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2010;12(4):53–60. DOI: 10.15825/1995-1191-2010-4-53-60.
8. Alfaifi M, Eom YW, Newsome PN, Baik SK. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2018;68(6):1272–1285. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.030.
9. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, et al. 3D cultivation techniques for primary human hepatocytes. *Microarrays*. 2015;4(1):64–83. DOI: 10.3390/microarrays4010064.
10. Mazza G, Al-Akkad W, Rombouts K, Pinzani M. Liver tissue engineering: from implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatology Communications*. 2018;2(2):131–141. DOI: 10.1002/hep4.1136.
11. Grant R, Hay D, Callanan A. From scaffold to structure: the synthetic production of cell derived extracellular matrix for liver tissue engineering. *Biomedical Physics and Engineering Express*. 2018;4(6):065015. DOI: 10.1088/2057-1976/aacbe1.
12. Coronado RE, Somarakis-Cormier M, Natesan S, Christy RJ, Ong JL, Half GA. Decellularization and solubilization of porcine liver for use as a substrate for porcine hepatocyte culture: method optimization and comparison. *Cell Transplantation*. 2017;26(12):1840–1854. DOI: 10.1177/0963689717742157.
13. Wang Y, Nicolas CT, Chen HS, Ross JJ, De Lorenzo SB, Nyberg SL. Recent advances in decellularization and recellularization for tissue-engineered liver grafts. *Cells Tissues Organs*. 2017;204:125–136. DOI: 10.1159/000479597.
14. Zhou P, Lessa N, Estrada DC, Severson EB, Lingala S, Zern MA, et al. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transplantation*. 2011;17(4):418–427. DOI: 10.1002/lt.22270.
15. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
16. Hussein KH, Park K-M, Kang K-S, Woo H-M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;67:766–778. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.068.
17. Зафранская ММ, Ламовская НВ, Нижегородова ДБ, Юркевич МЮ, Багатка СС, Мечковский СЮ и др. Морфология, кинетика роста и фенотип мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани человека. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2010;4:86–93.

References

1. Uhl P, Fricker G, Haberkorn U, Mier W. Current status in the therapy of liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(5):7500–7512. DOI: 10.3390/ijms15057500.
2. Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N. Acute liver failure and liver transplantation. *Intractable and Rare Diseases Research*. 2013;2(3):77–87. DOI: 10.5582/irdr.2013.v2.3.77.
3. Gulay YS, Krashennnikov ME, Shagidulin MY, Onishchenko NA. Hepatic tissue engineering (modern state of this problem). *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2014;16(2):103–113. Russian. DOI: 10.15825/1995-1191-2014-2-103-113.
4. Heydari Z, Najimi M, Mirzaei H, Shpichka A, Ruoss M, Farzaneh Z, et al. Tissue engineering in liver regenerative medicine: insights into novel translational technologies. *Cells*. 2020;9(2):304. DOI: 10.3390/cells9020304.
5. Hamooda M. Hepatocyte transplantation in children with liver cell failure. *Electronic Physician*. 2016;8(10):3096–3101. DOI: 10.19082/3096.
6. Wang F, Zhou L, Ma X, Ma W, Wang C, Lu Y, et al. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplantation Proceedings*. 2014;46(1):192–198. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.10.042.

7. Shagidulin MY, Onishchenko NA, Krashennnikov ME. Transplantation of hepatocytes as the method of treatment of liver failure: experimental and clinical experience. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2010;12(4):53–60. Russian. DOI: 10.15825/1995-1191-2010-4-53-60.
8. Alfaifi M, Eom YW, Newsome PN, Baik SK. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *Journal of Hepatology*. 2018; 68(6):1272–1285. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.030.
9. Bachmann A, Moll M, Gottwald E, Nies C, Zantl R, Wagner H, et al. 3D cultivation techniques for primary human hepatocytes. *Microarrays*. 2015;4(1):64–83. DOI: 10.3390/microarrays4010064.
10. Mazza G, Al-Akkad W, Rombouts K, Pinzani M. Liver tissue engineering: from implantable tissue to whole organ engineering. *Hepatology Communications*. 2018;2(2):131–141. DOI: 10.1002/hep4.1136.
11. Grant R, Hay D, Callanan A. From scaffold to structure: the synthetic production of cell derived extracellular matrix for liver tissue engineering. *Biomedical Physics and Engineering Express*. 2018;4(6):065015. DOI: 10.1088/2057-1976/aacbe1.
12. Coronado RE, Somaraki-Cormier M, Natesan S, Christy RJ, Ong JL, Halff GA. Decellularization and solubilization of porcine liver for use as a substrate for porcine hepatocyte culture: method optimization and comparison. *Cell Transplantation*. 2017;26(12): 1840–1854. DOI: 10.1177/0963689717742157.
13. Wang Y, Nicolas CT, Chen HS, Ross JJ, De Lorenzo SB, Nyberg SL. Recent advances in decellularization and recellularization for tissue-engineered liver grafts. *Cells Tissues Organs*. 2017;204:125–136. DOI: 10.1159/000479597.
14. Zhou P, Lessa N, Estrada DC, Severson EB, Lingala S, Zern MA, et al. Decellularized liver matrix as a carrier for the transplantation of human fetal and primary hepatocytes in mice. *Liver Transplantation*. 2011;17(4):418–427. DOI: 10.1002/lt.22270.
15. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32(12):3233–3243. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
16. Hussein KH, Park K-M, Kang K-S, Woo H-M. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;67:766–778. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.068.
17. Zafanskaya MM, Lamouskaya NV, Nizheharodava DB, Yurkevich MYu, Bagatka SS, Mechkovsky SYu, et al. Morphology, growth kinetics and cell phenotype of bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Immunopathology, allergology, infectology*. 2010;4:86–93. Russian.

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

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕРВНЫХ КЛЕТОК *LYMNAEA STAGNALIS*¹

В. Р. ХАРИТОНОВА^{1), 2)}, А. В. СИДОРОВ¹⁾

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

²⁾Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
ул. Фрунзенская, 43, 223053, д. Боровляны, Минский район, Беларусь

С использованием флуоресцентного зонда 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата оценен характер накопления активных форм кислорода (АФК) в первичной культуре (72 и 144 ч) нейронов центральных ганглиев моллюска *Lymnaea stagnalis* в условиях острого, индуцированного окислительного стресса. Установлено, что клетки большего размера накапливают большее количество АФК, тогда как высокие значения относительной (на единицу площади) флуоресценции, свидетельствующие о возрастании количества АФК, приходящихся на единицу внутриклеточного пространства, характерны для более мелких нейронов 72-часовой культуры. Изменения относительной флуоресценции в нейронах 72- и 144-часовой культур с течением времени приобретают отличный друг от друга характер: для более возрастной культуры отмечена отрицательная, статистически достоверная взаимосвязь ($R = -0,31$), а в отношении клеток 72 ч культивирования статистически достоверной корреляции выявлено не было ($R = 0,12$). Предполагается, что обнаруженная взаимосвязь между размером (формой) нейрона и его способностью противостоять накоплению АФК в цитозоле указывает на различия в резистентности нейронов ЦНС к окислительному повреждению в зависимости от их позиции в нейронной сети, обеспечивая тем самым избирательную устойчивость нейронных функций в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: свободные радикалы; нейроны; флуоресцентные красители; клеточные культуры.

Благодарность. Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Конвергенция-2020» (задание 3.10.2).

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:

Харитонова ВР, Сидоров АВ. Особенности накопления активных форм кислорода в первичной культуре нервных клеток *Lymnaea stagnalis*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1:28–38.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-28-38>

For citation:

Haritonova VR, Sidorov AV. Peculiarities of reactive oxygen species accumulation in the primary culture of nerve cells of *Lymnaea stagnalis*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;1:28–38. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-28-38>

Авторы:

Валентина Ренальдовна Харитонова – биолог группы цитогенетики клинико-диагностической лаборатории²⁾.
Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Valentina R. Haritonova, biologist at the group of cytogenetics, clinicodiagnostic laboratory²⁾.
haritonovavalentina20@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4244-1977>
Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
sidorov@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0002-1711-7868>

PECULARITIES OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ACCUMULATION IN THE PRIMARY CULTURE OF NERVE CELLS OF *LYMNAEA STAGNALIS*

V. R. HARITONOVA^{a, b}, A. V. SIDOROV^a

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

^bBelarusian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology,
43 Frunzienskaja Street, Baraŭliany 223053, Minsk district, Belarus

Corresponding author: A. V. Sidorov (sidorov@bsu.by)

A fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate was used to characterize an accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the primary culture (72 and 144 h) of neurons of the central ganglia of the mollusc *Lymnaea stagnalis* under conditions of acute, induced oxidative stress. It was found that larger cells accumulate a greater amount of ROS. High values of the relative (per unit area) fluorescence, indicating an increase in the amount of ROS per unit of intracellular space, are characteristic of smaller neurons of 72-hour culture. Changes in relative fluorescence over time are different from each other in neurons of 72- and 144-hour cultures. For an older culture, a negative, statistically significant relationship was noted ($R = -0.31$), and for cells of 72 h of cultivation, a statistically significant correlation was not found ($R = 0.12$). It is assumed that the discovered relationship between the size (shape) of a neuron and its ability to resist the accumulation of ROS in the cytosol indicates differences in the resistance of CNS neurons to oxidative damage depending on their place and position in the neural network, thereby ensuring the selective stability of neuronal functions under conditions of oxidative stress.

Keywords: free radicals; neurons; fluorescence dyes; cell cultures.

Acknowledgements. This work was supported by state program for scientific research «Convergence-2020» (task 3.10.2).

Введение

Активные формы кислорода (АФК) определяют течение целого спектра физиологических [1] и патофизиологических [2] процессов. Возрастание интенсивности окислительного фосфорилирования в электронтранспортной цепи митохондрий приводит к увеличению внутриклеточной концентрации АФК, являющихся побочным продуктом (супероксид-анион, $\text{O}_2^{\cdot -}$) данного процесса [3]. Высокая скорость потребления кислорода особенно характерна для клеток нервной ткани [4], а благодаря насыщенности синаптических окончаний митохондриями формируются дополнительные сайты, обеспечивающие продукцию АФК [5]. В результате такое широкое присутствие АФК в нейронах позволяет им выступать (в субтоксических концентрациях) в качестве передатчика процессов внутриклеточной сигнализации [6; 7], а с учетом относительно высокой проницаемости для них клеточных мембран – и в качестве агента межклеточной коммуникации [8; 9], модифицируя тем самым функциональную активность нервных клеток [10]. Физиологические эффекты АФК на субклеточном уровне, включая модуляцию экспрессии генов, преимущественно опосредованы Ca^{2+} -зависимыми путями внутриклеточной сигнализации и фосфорилированием белков [7]. Очевидно, что адекватное использование АФК в качестве сигнальных молекул невозможно без развитой системы антиокислительной защиты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидазы, водо- и жирорастворимые низкомолекулярные антиоксиданты), предотвращающей неконтролируемое повышение уровня свободных радикалов в клетке, которое может привести к ее гибели в ходе некроза или апоптоза [11]. Нейроны относительно чувствительны к окислительному стрессу [12], что лишний раз указывает на сигнальную роль АФК в нервной ткани [13]. С другой стороны, такая «уязвимость» к действию достаточно обычного компонента внутренней среды создает комплекс проблем для всего организма, принимая во внимание ведущую роль нервной системы в управлении его функциями и практическую невозможность или, по крайней мере, сильную ограниченность способности нейронов к восстановлению своего исходного числа посредством клеточных делений в ходе взрослого (*adult*) нейрогенеза.

Нервные клетки беспозвоночных характеризуются высокой степенью устойчивости к действию различных химических и физико-химических факторов [14; 15]. Вместе с тем по своим функциональным характеристикам, связанным со способностью к генерации, проведению и интеграции электрических сигналов, они демонстрируют поразительное сходство с нейронами высших позвоночных. Очевидно,

что понимание клеточных механизмов, определяющих такую резистентность, может быть использовано при разработке различных нейропротекторных средств, существенно повышающих вероятность нормального функционирования мозга в условиях стресса различного происхождения, в том числе и окислительного. Кроме того, нейроны беспозвоночных не уступают в разнообразии своих характеристик (морфологических, электрофизиологических, нейромедиаторных и т. п.) нервным клеткам позвоночных [16]. Идентификация (соотнесение той или иной клетки с позицией, занимаемой в нейронной сети, ее химизмом и системой связи с другими клетками) центральных нейронов массово применяется в отношении центральной нервной системы (ЦНС) ряда беспозвоночных, выступающих в роли модельных объектов нейробиологических исследований, включая и пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* (прудовик обыкновенный) [14]. Она также открывает перспективы для анализа взаимосвязи между различными морфофункциональными характеристиками нейронов. В частности, крупные (диаметр сомы свыше 100 мкм) нейроны центрального кольца ганглиев *L. stagnalis* – это в основном вставочные нейроны, в то время как мелкие (40–60 мкм) клетки относятся к двигательным [17], хотя такую зависимость нельзя считать универсальной даже для этого вида. В ганглиях, управляющих работой мышц буккальной массы, обеспечивающей движения радулы при пищедобыче, наиболее крупные клетки представлены мотонейронами [18]. Размеры клеток изменяются и в ходе онтогенеза: одни и те же нейроны у молодых животных характеризуются существенно меньшим диаметром сомы и более низкой степенью ветвления отростков по сравнению с клетками ЦНС более возрастных животных [19]. Однако, в какой степени размеры нейронов связаны с возможностью противостоять окислительному стрессу (и связаны ли вообще), отличается ли характер реакции клеток в условиях окислительного стресса в зависимости от их функциональных свойств, до конца не установлено.

Таким образом, целью данной работы было оценить взаимосвязь между морфологическими характеристиками (размером) и возрастом культивируемых нейронов моллюска *L. stagnalis* и их способностью накапливать и сохранять в цитоплазме АФК в условиях индуцированного кратковременного окислительного стресса.

Материалы и методы исследования

В работе использовали моллюсков *L. stagnalis* лабораторного разведения с высотой раковины от 3,5 до 4,0 см и массой ($3,0 \pm 0,5$) г. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре (20 ± 1) °С. Смену воды осуществляли каждую неделю. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*).

Первичная культура нервных клеток. Первоначально удаляли раковину животного и производили разрез стенки тела, края разреза отводили и закрепляли с помощью препаровальных игл, после чего перерезали пищевод и протоки слюнных желез, а также все отходящие от ЦНС нервы и помещали изолированное таким образом центральное кольцо ганглиев в нормальный раствор Рингера (1 ЦНС на 1 мл раствора). Дальнейшие манипуляции с полученными препаратами ЦНС проводили в пределах ламинар-бокса. Сначала каждый препарат 30 с промывали в стерильном растворе Рингера ($\text{NaCl} - 44,0$; $\text{KCl} - 1,7$; $\text{CaCl}_2 - 4,0$; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 1,5$; $\text{HEPES} - 10,0$ ммоль/л, $\text{pH } 7,60 \pm 0,05$) с добавлением антибиотика (смесь пенициллина и стрептомицина, 100 мкг/мл) в 4-кратной повторности, каждый раз используя новые стерильные эппендорфы со свежим раствором и стерилизуя держатель ЦНС (загнутая иголка) в пламени спиртовки. После этого с помощью стерильных пинцетов разрывали соединительнотканную оболочку ганглиев, механически высвобождая содержащиеся в них нейроны, и получали суспензию клеток в стерильном физиологическом растворе объемом 100 мкл (для 1 ЦНС). Полученную суспензию нейронов переносили в содержащие специальную среду чашки Петри и оставляли в темноте при температуре (20 ± 1) °С. Дальнейшие исследования выполнены на клетках 72- или 144-часовой (3 и 6 сут соответственно) культуры.

Подготовка чашек Петри, используемые растворы и среды. Дно стерильных пластиковых чашек Петри размером 35×10 мм (*Sarstedt Group*, Германия) предварительно полностью покрывали 0,1 % раствором поли-L-лизина (*Sigma-Aldrich*, США). По прошествии 24 ч остатки раствора сливали и дважды промывали чашки дистиллированной водой. Затем поверхность дна обрабатывали раствором антибиотика (100 мкг/мл) в течение 1,5 ч, после чего его сливали и дважды промывали чашки дистиллированной водой. Далее чашки оставляли в ламинар-боксе при включенном ультрафиолете на 15 мин, подсушивая покрытую поли-L-лизином поверхность. Подготовленные чашки Петри (по [20] с модификациями) использовали для культивирования клеток не ранее чем через 3 сут после обработки.

Для культивирования клеток нервной системы *L. stagnalis* применяли модифицированную среду следующего состава: 50 % – среда Лейбовица L-15 (L5520 без глутамина, *Sigma-Aldrich*), 25 % –

концентрированный ($\times 4$), за исключением NaCl, нормальный раствор Рингера (NaCl – 79,9; KCl – 6,7; CaCl₂ – 11,02; MgCl₂ · 6H₂O – 6,0; HEPES – 40,0 ммоль/л, pH 7,60 $\pm$ 0,05), 25 % – дистиллированная вода (по [20; 21] с модификациями). Дополнительно в среду добавляли 50 мкг/мл смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин), 300 мг/мл глутамин и 0,3 ммоль/л глюкозы (конечная концентрация). Отсутствие в среде культивирования различных ростовых факторов компенсировали за счет использования кондиционированной среды (по [21] с модификациями). Для ее подготовки выделяли ЦНС по описанной выше методике и помещали их (не разрывая соединительнотканную оболочку ганглиев) в нормальную культуральную жидкость (см. выше) из расчета 4 ЦНС на 5 мл среды (всего 4 пробирки) на срок 72 ч при постоянном перемешивании и комнатной температуре ((20 $\pm$ 1) °C). По окончании инкубации среду пропускали через антибактериальный фильтр, замораживали (–18 °C), используя по мере необходимости. Общий объем культуральной среды на 1 чашку Петри – 2 мл, из которых 1,8 мл приходится на нормальную, а 0,2 мл – на кондиционированную среду.

Оценка накопления АФК, получение и анализ изображений. Для оценки накопления АФК в цитоплазме использовали флуоресцентный краситель 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (DCFDA, λ_{ex} = 501 нм, λ_{em} = 525 нм (максимумы), *Sigma-Aldrich*) в конечной концентрации 10 мкмоль/л. Зонд добавляли непосредственно к культуральной среде в чашки Петри, выдерживая их в темноте в течение 1 ч. По окончании инкубации среду с содержащимся в ней зондом удаляли, а чашки Петри с находящимися на подложке клетками дважды промывали свежим раствором Рингера (2 мл в течение 5 мин), после чего добавляли новую порцию раствора Рингера (2 мл), закрывали чашку металлической фольгой и использовали для последующего микроскопического исследования. Генерацию АФК в среде инкубации инициировали добавлением 1 ммоль/л перекиси водорода (конечная концентрация) к находящемуся в чашке Петри раствору Рингера, в который предварительно (за 15 мин) были добавлены FeSO₄ · 7 H₂O и ЭДТА (оба в конечной концентрации 10 мкмоль/л). Оценку динамики накопления АФК проводили в первые 20 мин наблюдения, до стабилизации уровня флуоресценции. Оценку остаточной флуоресценции осуществляли не ранее чем через 30 мин после добавления пероксида водорода в течение последующих 1–2 ч наблюдения.

Клетки анализировали с помощью инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100F (входящий фильтр λ_{ex} = 450–490 нм, выходящий фильтр λ_{em} = 680 нм, дихроматическое зеркало – 505 нм) при 40-кратном увеличении объектива. Для последующей обработки и анализа полученных изображений использовали программу *ImageJ 1.50i* (*National Institute of Health*, США). Определяли площадь клеток (оптическое изображение), интенсивность флуоресценции (флуоресцентное изображение) оценивали по условному показателю – интенсивности серого цвета, приходящегося на область изображения, соответствующую занимаемому клеткой участку. Ввиду шумовой флуоресценции фона (подложки или раствора со следами зонда) на каждом изображении оценивали интенсивность серого цвета фона для пяти площадок, по площади соответствующих оптическому изображению клетки. Полученное среднее значение вычиталось из оцененной величины интенсивности для флуоресцентного изображения клетки. Относительную флуоресценцию определяли в пересчете на единицу площади клетки (1 мкм²). Калибровку полученных изображений выполняли с помощью объект-микрометра (цена деления 0,1 мм) и специальных возможностей программы *ImageJ*.

Статистическая обработка. Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [22]. Нормальность распределения для каждого ряда экспериментальных данных предварительно оценивали с помощью *W*-теста Шапиро – Уилка. Поскольку для основных исследованных показателей (площадь клеток, интенсивность флуоресценции) нормальность распределения не была подтверждена, использовали непараметрическую статистику. Данные представлены в виде: медиана (верхний; нижний квартили). Для оценки взаимозависимости оцениваемых показателей использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (*R*), для сравнения двух независимых групп применяли *U*-критерий Манна – Уитни (*Mann – Whitney U-test*, *z*), для множественного сравнения зависимых выборок – ранговый дисперсионный анализ (*Friedman ANOVA*). Число наблюдений (*n*) указано для каждой серии опытов отдельно. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0* (*StatSoft Inc.*, США). Достоверными считались результаты при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Динамика изменения относительной флуоресценции нейронов в краткосрочном периоде (20 мин после инициации реакции генерации АФК) представлена на рис. 1, а.

Первоначальное усиление интенсивности флуоресценции приходится на первые минуты после возрастания уровня АФК, а затем отмечается ее снижение, флуоресцентное свечение участков клетки остается практически неизменным на протяжении дальнейшего периода наблюдения (см. рис. 1, б–ж).

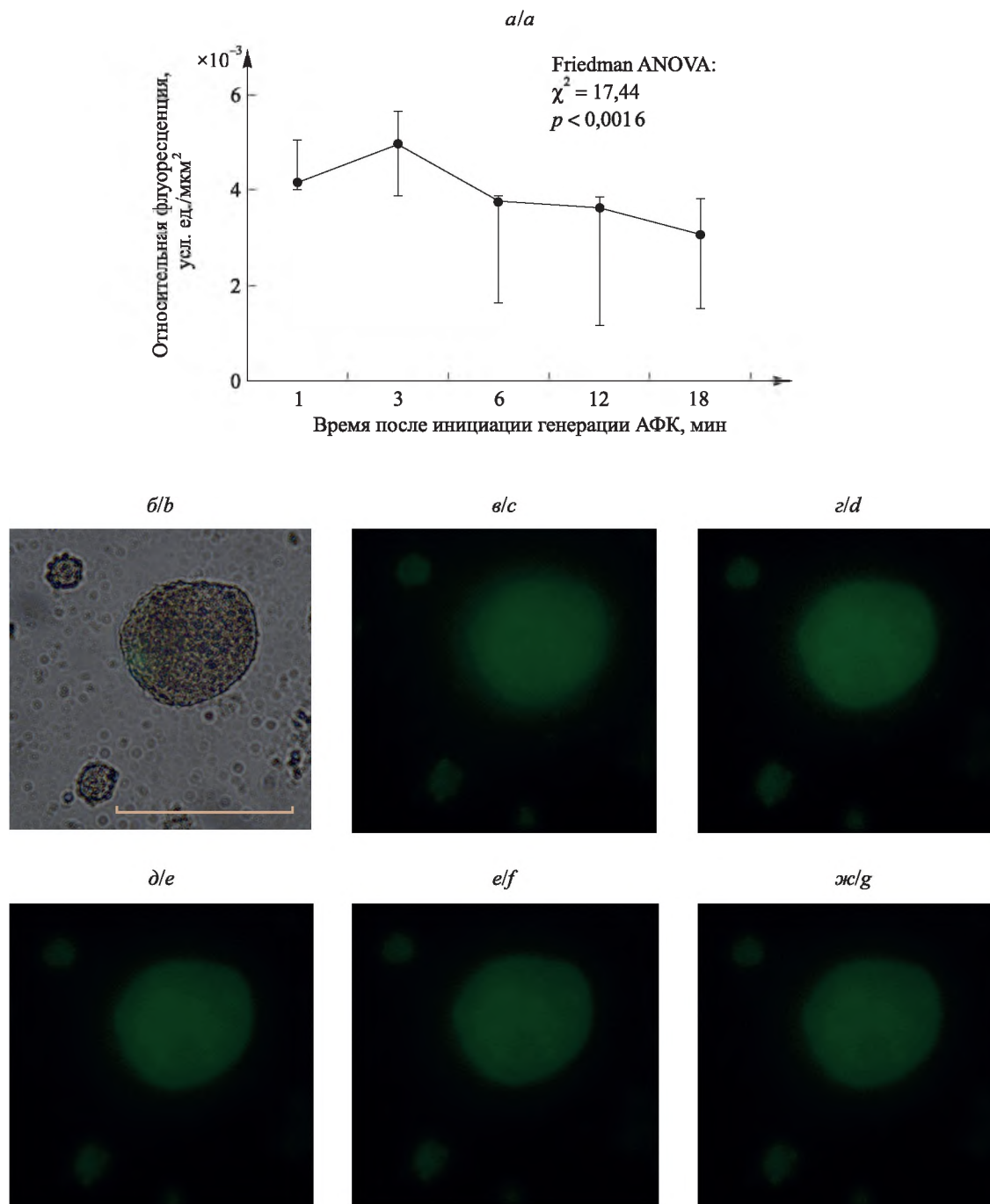


Рис. 1. Изменение флуоресценции культивируемых нейронов *L. stagnalis* после начала генерации АФК во внешней среде:
a – изменение относительной флуоресценции клеток; *б–ж* – пример изменения флуоресценции в отдельных клетках (*б* – оптическое изображение; *в, г, д, е, ж* – флуоресцентное изображение, полученное через 1, 3, 6, 9 и 18 мин после инициации генерации АФК соответственно).
Интенсивность флуоресценции в начальной точке времени (0 мин) условно принимали равной фоновой (не указано на графике). Калибровочная линия – 100 мкм

Fig. 1. Fluorescence in cultured L. stagnalis neurons after initiation of ROS generation:
a – relative fluorescence of neurons; *б–г* – an example of fluorescence change in individual neurons (*б* – optical image; *с, д, е, ф, г* – fluorescent image respectively obtained 1, 3, 6, 9 and 18 min after initiation of ROS generation).

The fluorescence intensity at the initial time point (0 min) was conventionally assumed to be equal to the background one (not indicated in the graph). Calibration bar – 100 μm

Установлено, что более крупные нейроны накапливают большее количество АФК. В частности, проведенный корреляционный анализ (рис. 2, а) выявил наличие относительно небольшой ($R = 0,18$), но статистически достоверной ($p = 0,0216$, $t = 2,32$ при $n = 169$) взаимосвязи между интенсивностью флуоресценции и размером клетки в отношении 72-часовой культуры клеток нервной системы *L. stagnalis*. Схожая тенденция была отмечена и для 144-часовой культуры: значение рангового коэффициента корреляции Спирмена (R) составило $0,31$ ($p = 0,0002$, $t = 3,81$ при $n = 139$). Сравнение значений R для этих двух культур не дает оснований для вывода об их статистически значимых отличиях друг от друга ($p = 0,2318$), что дополнительно подтверждает зависимость интенсивности флуоресценции от размера клеток для культур разного возраста. Вертикальное смещение линии тренда для 144-часовой культуры вверх по отношению к таковой для 72-часовой культуры (см. рис. 2, а) фактически отражает различия в размерах между нейронами этих двух культур и, следовательно, в интенсивности их флуоресценции. В частности, размер клеток 144-часовой культуры почти в 2 раза превышает аналогичный показатель для 72-часовой культуры (рис. 3, а). В то же время различия в интенсивности абсолютной флуоресценции были не столь велики: в 1,6 раза выше у 144-часовой культуры по сравнению с нейронами 72 ч культивирования (см. рис. 3, б).

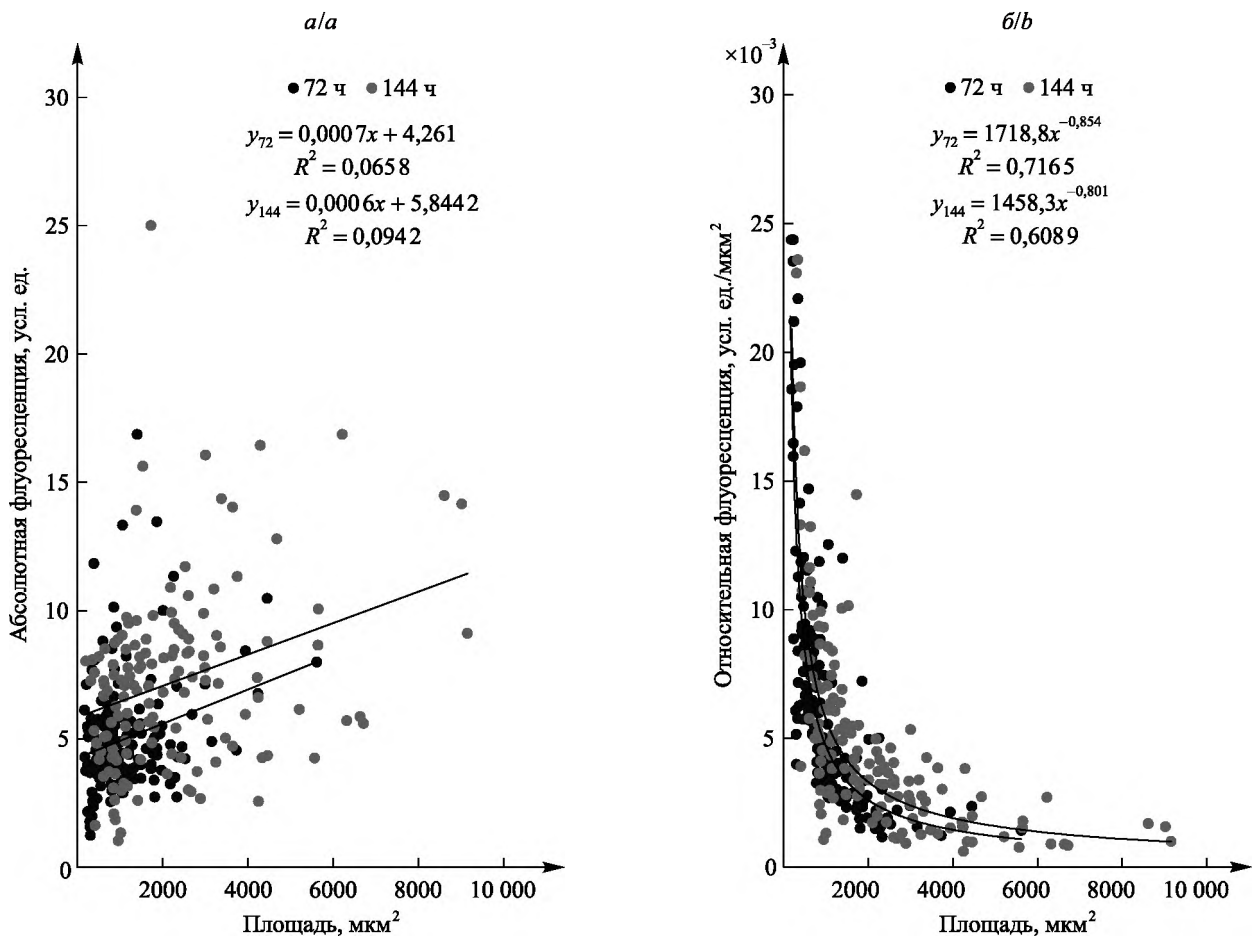


Рис. 2. Зависимость флуоресценции культивируемых нейронов *L. stagnalis* от размера клетки:
а – абсолютная флуоресценция; б – относительная флуоресценция.

Представлены уравнения линий тренда (линейной (а) и степенной (б)) и величина достоверности аппроксимации (R^2)

Fig. 2. Fluorescence of cultured *L. stagnalis* neurons in dependence on cell size:
а – absolute fluorescence; б – relative fluorescence. Equations of trend lines (linear (а) and power-law (б)) and the value of the approximation reliability (R^2) are presented

Отличная ситуация складывается для относительной (на единицу площади) флуоресценции (см. рис. 2, б). Здесь речь идет о ее уменьшении при увеличении площади, занимаемой клеткой. Зависимость носит достоверный характер как для 72-часовой ($R = -0,84$, $p < 0,0001$, $t = 20,01$ при $n = 169$), так и для 144-часовой ($R = -0,76$, $p < 0,0001$, $t = 13,64$ при $n = 139$) культуры при статистически значимой ($p = 0,0497$) разнице между определенными коэффициентами ранговой корреляции (R). Другими словами, речь идет о снижении количества АФК, приходящихся на единицу внутриклеточного пространства,

у крупных клеток (рис. 4, в). При этом зависимость хорошо описывается степенной функцией, на что указывают относительно высокие (60 и более) значения достоверности аппроксимации. Поскольку в пределах 144-часовой культуры отмечается увеличение площади клеток, неудивительно, что значения относительной флуоресценции, определенные для составляющих ее клеток, были в 1,4 раза ниже аналогичного показателя для нейронов 72 ч культивирования (см. рис. 3, в). Однако даже в случае примерно равной площади клеток в нейронах 72-часовой культуры интенсивность флуоресценции была выше (ср. рис. 4, а и б).

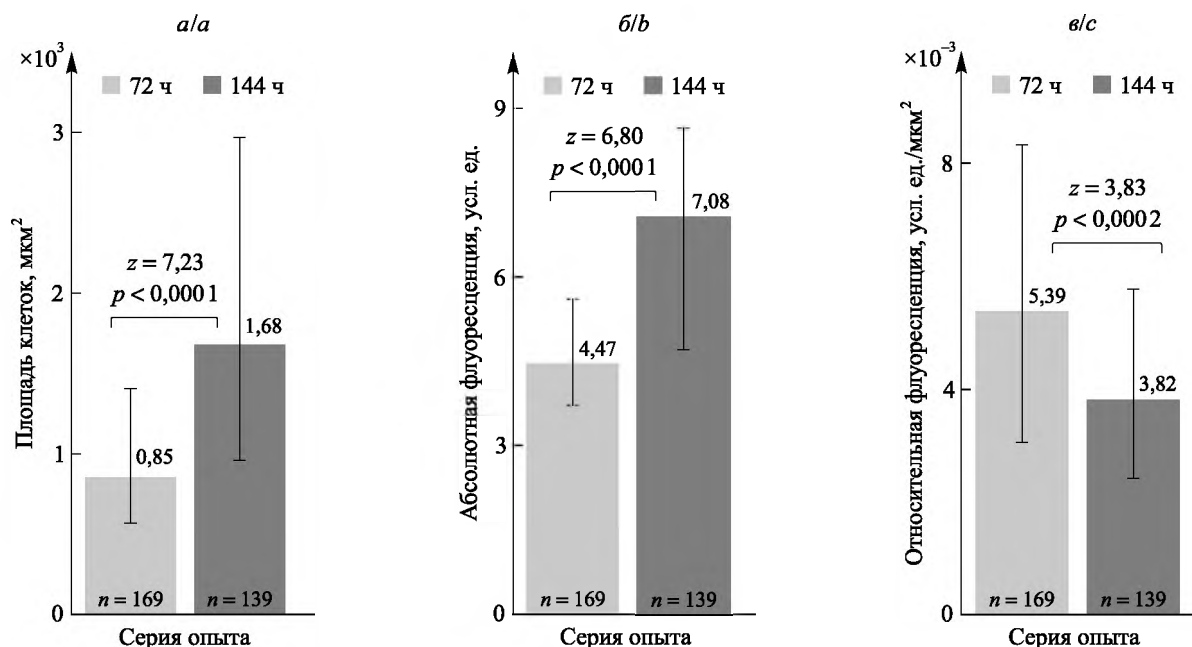


Рис. 3. Площадь клетки (а), абсолютная (б) и относительная (в) флуоресценция в культурах нейронов *L. stagnalis* разного возраста.

Представлено значение показателя – числа рядом со столбиками диаграммы (медиана) и планки погрешностей (интерквартильный размах). Приведены число исследованных нейронов (*n*) для каждой серии опыта, значение *U*-критерия Манна – Уитни (*z*) и соответствующий ему уровень значимости (*p*)

Fig. 3. Cell area (a), absolute (b) and relative (c) fluorescence in cultures of *L. stagnalis* neurons of different ages. Experimental meaning – numbers above the columns (median) and error bars (lower and upper quartiles). Number of observations (*n*) for each experimental group, meaning of Mann – Whitney *U*-test (*z*) and the corresponding significance level (*p*) are presented

Интересно, что изменения относительной флуоресценции с течением времени приобретают отличный (на основании сравнения коэффициентов ранговой корреляции *R* при $p < 0,0001$) друг от друга характер в нейронах 72- и 144-часовой культур (рис. 5). Так, для клеток 72 ч культивирования не было обнаружено статистически достоверной корреляции между указанными показателями: $R = 0,12$, $p = 0,0910$, $t = 1,70$ при $n = 177$ (см. рис. 5, а). В то же время для более возрастной культуры была отмечена отрицательная, статистически достоверная взаимосвязь: $R = -0,31$, $p = 0,0002$, $t = 3,84$ при $n = 142$ (см. рис. 5, б). Такая зависимость может указывать на снижение уровня АФК с течением времени в более зрелых нейронах 144-часовой культуры при относительной сохранности содержания АФК в цитоплазме клеток 72 ч культивирования.

Размер и форма нервных клеток видятся критически значимыми для реализации ими своей важнейшей функции – генерации, передачи и интеграции нервных импульсов. В частности, давно известно, что такие основополагающие характеристики нейрона, как входное электрическое сопротивление и емкость клетки, определяющие значения постоянных времени и длины, зависят от размера и пространственной геометрии нейрона [23]: при одинаковой форме (например, сфера) у более мелких объектов входное сопротивление оказывается выше, а емкость ниже, чем у более крупных клеток. Принцип размера (*size principle*) [24], призванный объяснить различия в функциональных свойствах нейронов, впервые был отмечен в отношении нервных клеток спинного мозга: клетки малых размеров являются более возбудимыми по сравнению с более крупными нейронами. Уже отмечалось, что с возрастом размеры нервных клеток увеличиваются (характерно и для нейронов *L. stagnalis*). Диаметр сомы нейрона R.Pe.D.1 *L. stagnalis* значительно больше у животных старшей возрастной группы [19]. В результате у более мелких нейронов,

характерных для молодых особей, повышается входное сопротивление, но снижаются постоянная времени мембраны и ток реобазы, что и является основанием для утверждения о возрастании их возбудимости [25]. Соответственно, в ходе нормального (физиологического) старения возбудимость клетки снижается.

Наблюдаемые нами различия в занимаемой клетками площади у нейронов 72- и 144-часовой культур могут быть связаны с тем, что при более продолжительном культивировании нейронов они плотнее примыкают к субстрату и, распластываясь, покрывают большую поверхность подложки, т. е. округлая клетка принимает овальную форму при неизменности объема ее цитоплазмы. Однако тот факт, что зависимость интенсивности флуоресценции (абсолютной и относительной) от размера (площади) клетки была выявлена в популяции нейронов как 72-часовой, так и 144-часовой культуры (см. рис. 2), позволяет утверждать, что содержание АФК в цитоплазме (количество и плотность) зависит от линейных размеров нейрона. Интересно, что клетки, обнаруживающие тенденцию к формированию отростков, более интенсивно накапливают АФК (см. рис. 4, *з*). Это может указывать на меньшую устойчивость к свободнорадикальному повреждению у интенсивно пролиферирующих нейронов ЦНС *L. stagnalis* по аналогии с известными фактами в отношении клеток других видов [26; 27]. Модификация формы, в том числе связанная с интенсификацией роста окончаний клетки, в большей мере присуща молодым (менее крупным) нейронам, именно для таких клеток выявлено большее относительное содержание АФК в цитоплазме (см. рис. 3, *б*). Интересно, что для клеток 144-часовой культуры отмечено снижение относительной флуоресценции с увеличением времени, прошедшего после инициации реакции генерации АФК (использованная АФК-генерирующая смесь обеспечивает «пиковую» продукцию, прежде всего гидроксильного радикала, преимущественно в первые 15 мин, утрачивая свои способности по наработке новых порций АФК к 30 мин после запуска), что может указывать на активность систем

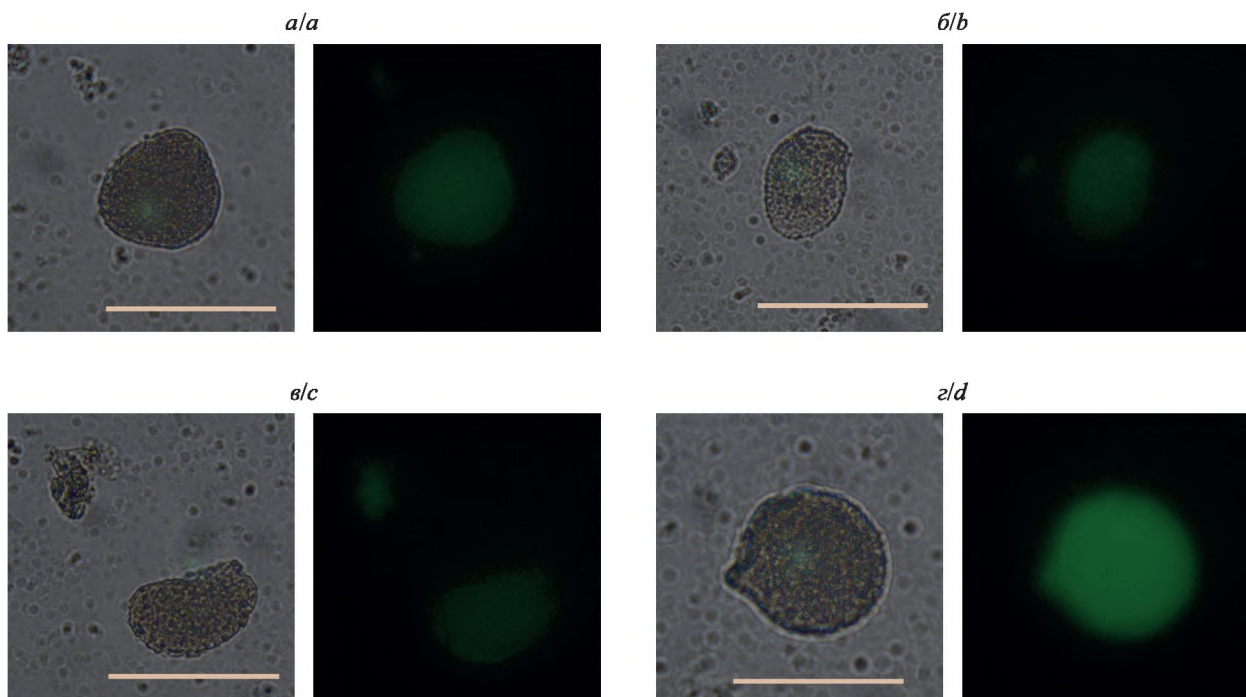


Рис. 4. Примеры флуоресценции клеток в культуре нейронов *L. stagnalis* после инициации генерации АФК во внешней среде: *а* – нейрон (72-часовая культура); *б* – нейрон (144-часовая культура); *в* – нейроны разных размеров (72-часовая культура); *з* – нейрон с формирующимся отростком (144-часовая культура). Все представленные фотографии для флуоресцентного изображения (справа) получены через 30–40 мин после инициации генерации АФК при одинаковом времени экспозиции (350 мс) и последующих одинаковых модификациях исходного изображения (яркость/контраст, насыщенность цвета) средствами графических программ. Калибровочная линия (100 мкм) дана для оптического изображения (слева)

Fig. 4. Examples of cell fluorescence in a culture of *L. stagnalis* neurons after initiation of ROS generation in the external environment: *a* – neuron (72-hour culture); *b* – neuron (144-hour culture); *c* – neurons of different sizes (72-hour culture); *d* – neuron with a developing process (144-hour culture). All fluorescent images (right) were obtained from 30 to 40 min after initiation of ROS generation with the same exposure time (350 ms) and subsequent identical modifications of the original image (brightness/contrast, color saturation) by means of special software. Calibration bar (100 μm) is given for the optical image (left)

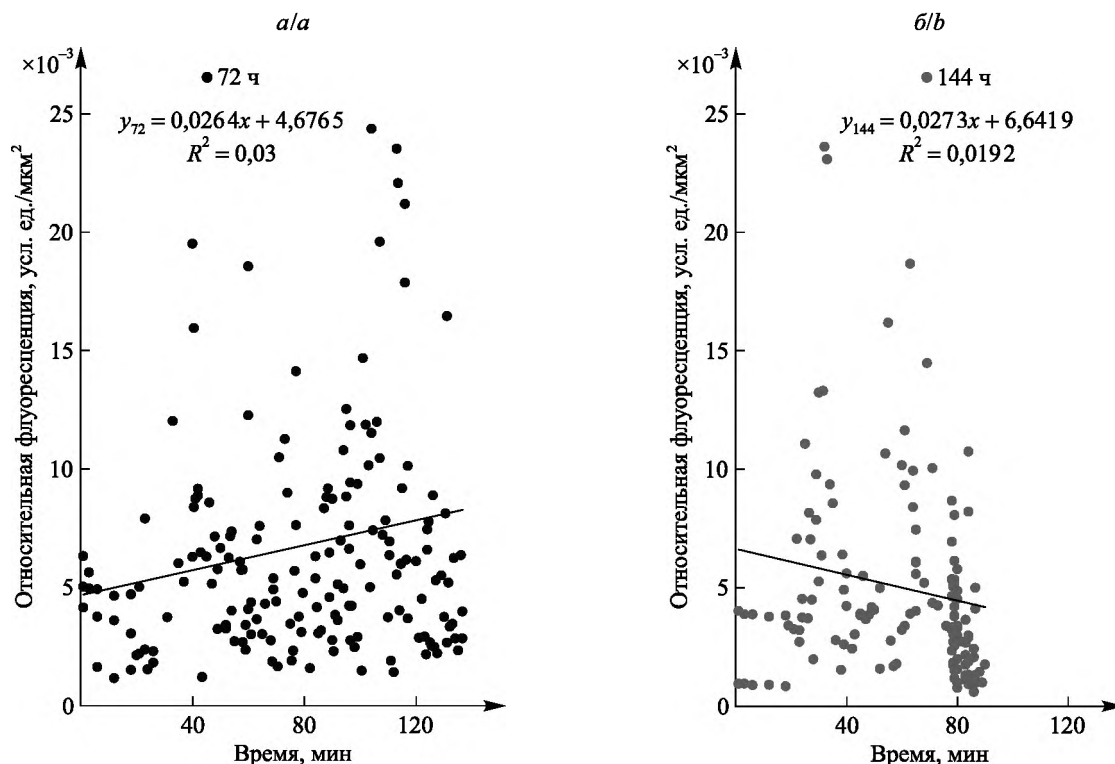


Рис. 5. Зависимость относительной флуоресценции культивируемых нейронов *L. stagnalis* от времени, прошедшего после инициации генерации АФК: а – 72-часовая культура; б – 144-часовая культура. Представлены уравнения линейной линии тренда и величина достоверности аппроксимации (R^2)

Fig. 5. Dependence of the relative fluorescence of cultured *L. stagnalis* neurons on the time elapsed after the initiation of ROS generation: а – 72-hour culture; б – 144-hour culture. Equations of linear trend lines and the value of the approximation reliability (R^2) are presented

антиоксидантной защиты, лучше функционирующих в более зрелых нейронах, как ответ клетки на возрастание базального уровня свободных радикалов. В частности, в отношении гранулярных клеток мозжечка было показано [28], что при увеличении продолжительности культивирования повышается накопление АФК в клетке.

Различия в особенностях накопления и элиминации АФК, источником которых служат процессы, протекающие во внеклеточном пространстве, для клеток разного размера (формы) могут лежать в основе различий в устойчивости нейронов к окислительному стрессу в зависимости от их функциональных свойств. Известно, что в ЦНС *L. stagnalis* крупные интернейроны оказываются более устойчивыми (согласно данным электрофизиологии) к индуцированному окислительному стрессу по сравнению с мелкими мотонейронами [29], для которых характерно образование кластеров клеток [17]. Другими словами, полифункциональные клетки, к которым относятся вставочные нейроны, оказываются более защищенными по сравнению со специализированными двигательными нейронами: даже потеря некоторых из них не будет столь критична для функционирования всей нейронной сети. Кроме того, использование функционально различными нейронами разных нейромедиаторов [16] открывает перспективы для анализа устойчивости нервных клеток к окислительному повреждению в зависимости от их химической природы, что, однако, не входило в непосредственные задачи данной работы.

Таким образом, существует выраженная взаимосвязь между размером (формой) нейрона и его способностью противостоять накоплению АФК в цитозоле, что указывает на различия в резистентности нейронов ЦНС к окислительному повреждению в зависимости от их позиции в нейронной сети, обеспечивая тем самым избирательную устойчивость нейронных функций в условиях окислительного стресса.

Библиографические ссылки

1. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1):47–95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
2. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*. 1995;38(3):357–366. DOI: 10.1002/ana.410380304.

3. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 2003;552(2):335–344. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
4. Гусев ЕИ, Скворцова ВИ. Ишемия головного мозга. Москва: Медицина; 2001. 328 с.
5. Feniouk BA, Skulachev VP. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants. *Current Aging Science*. 2017;10(1):41–48. DOI: 10.2174/1874609809666160921113706.
6. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(2):248–253. DOI: 10.1016/S0955-0674(98)80147-6.
7. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(1–2):269–285. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00275-4.
8. Auerbach JM, Segal M. Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(22):8695–8701. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-22-08695.1997.
9. Sidorov AV. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons. *Invertebrate Neuroscience*. 2012;12(1):63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
10. Sidorov AV. Neuromodulatory effects of hydrogen peroxide on central neurons in the feeding network of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2017;53(6):493–500. DOI: 10.1134/S0022093017060060.
11. Костюк ВА, Потапович АИ. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск: БГУ; 2004. 174 с.
12. Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9(2):233–244. DOI: 10.1089/ars.2007.9.ft-8.
13. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 1992;59(5):1609–1623. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.
14. Сидоров АВ. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск: БГУ; 2011. 247 с.
15. Sidorov AV. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2006;42(1):43–48. DOI: 10.1134/S0022093006010066.
16. S.-Rózsa K. The pharmacology of molluscan neurons. *Progress in Neurobiology*. 1984;23(1–2):79–150. DOI: 10.1016/0301-0082(84)90013-3.
17. Kyriakides M, Mccrohan CR, Slade CT, Syed NI, Winlow W. The morphology and electrophysiology of the neurones of the paired pedal ganglia of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1989;93(4):861–876. DOI: 10.1016/0300-9629(89)90513-6.
18. Benjamin PR, Staras K, Kemenes G. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learning and Memory*. 2000;7(3):124–131. DOI: 10.1101/lm.7.3.124.
19. Klaassen LJ, Janse C, van der Roest M. Multiple synaptic connections of a single neuron change differentially with age. *Neurobiology of Aging*. 1998;19(4):341–349. DOI: 10.1016/S0197-4580(98)00065-7.
20. Yar T, Winlow W. Isolation and characterization of whole-cell calcium channel currents in cultured, identified neurones of *Lymnaea*. *EC Neurology*. 2016;3(5):459–481.
21. Ridgway RL, Syed NI, Lukowiak K, Bulloch AGM. Nerve growth factor (NGF) induces sprouting of specific neurons of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *Developmental Neurobiology*. 1991;22(4):377–390. DOI: 10.1002/neu.480220406.
22. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th edition. New York: McGraw-Hill; 1997. XVI, 473 p.
23. Kandel ER. *Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology*. San Francisco: W. H. Freeman and Company; 1976. XX, 727 p.
24. Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*. 1965;28(3):560–580. DOI: 10.1152/jn.1965.28.3.560.
25. McComb C, Meems R, Syed N, Lukowiak K. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea*. *Journal of Neurophysiology*. 2003;90(2):983–992. DOI: 10.1152/jn.00263.2003.
26. Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007;614(1–2):24–36. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.06.007.
27. Kuhn TB. Oxygen radicals elicit paralysis and collapse of spinal cord neuron growth cones upon exposure to proinflammatory cytokines. *BioMed Research International*. 2014;2014:191767. DOI: 10.1155/2014/191767.
28. Olguín-Albuernie M, Morán J. ROS produced by NOX2 controls *in vitro* development of cerebellar granule neurons development. *ASN Neuro*. 2015;7(2):1759091415578712. DOI: 10.1177/1759091415578712.
29. Moroz LL, Rubakhiin SS, Frolow AA, Kostiuk VA. Free-radical damage of identified neurones in *Lymnaea stagnalis*. *Acta Biologica Hungarica*. 1993;44(1):29–32.

References

1. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1):47–95. DOI: 10.1152/physrev.00018.2001.
2. Beal MF. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology*. 1995;38(3):357–366. DOI: 10.1002/ana.410380304.
3. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 2003;552(2):335–344. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478.
4. Gusev EI, Skvortsova VI. *Ishemiya golovnogo mozga* [Ischemia of the brain]. Moscow: Meditsina; 2001. 328 p. Russian.
5. Feniouk BA, Skulachev VP. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants. *Current Aging Science*. 2017;10(1):41–48. DOI: 10.2174/1874609809666160921113706.
6. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(2):248–253. DOI: 10.1016/S0955-0674(98)80147-6.
7. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(1–2):269–285. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00275-4.
8. Auerbach JM, Segal M. Peroxide modulation of slow onset potentiation in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 1997;17(22):8695–8701. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-22-08695.1997.

9. Sidorov AV. Effect of hydrogen peroxide on electrical coupling between identified *Lymnaea* neurons. *Invertebrate Neuroscience*. 2012;12(1):63–68. DOI: 10.1007/s10158-012-0128-7.
10. Sidorov AV. Neuromodulatory effects of hydrogen peroxide on central neurons in the feeding network of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2017;53(6):493–500. DOI: 10.1134/S0022093017060060.
11. Kostyuk VA, Potapovich AI. *Bioradikaly i bioantioksidanty* [Bioradicals and bioantioxidants]. Minsk: Belarusian State University; 2004. 174 p. Russian.
12. Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2007;9(2):233–244. DOI: 10.1089/ars.2007.9.ft-8.
13. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*. 1992;59(5):1609–1623. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.
14. Sidorov AV. *Funktsional'naya aktivnost' nervnykh tsentrov bespozvonochnykh* [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk: Belarusian State University; 2011. 247 p. Russian.
15. Sidorov AV. Coordination of locomotor activity of mollusc *Lymnaea stagnalis* at nutrition: role of the internal medium acid-base balance (pH). *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2006;42(1):43–48. DOI: 10.1134/S0022093006010066.
16. S.-Rózsa K. The pharmacology of molluscan neurons. *Progress in Neurobiology*. 1984;23(1–2):79–150. DOI: 10.1016/0301-0082(84)90013-3.
17. Kyriakides M, McCrohan CR, Slade CT, Syed NI, Winlow W. The morphology and electrophysiology of the neurones of the paired pedal ganglia of *Lymnaea stagnalis* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1989;93(4):861–876. DOI: 10.1016/0300-9629(89)90513-6.
18. Benjamin PR, Staras K, Kemenes G. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learning and Memory*. 2000;7(3):124–131. DOI: 10.1101/lm.7.3.124.
19. Klaassen LJ, Janse C, van der Roest M. Multiple synaptic connections of a single neuron change differentially with age. *Neurobiology of Aging*. 1998;19(4):341–349. DOI: 10.1016/S0197-4580(98)00065-7.
20. Yar T, Winlow W. Isolation and characterization of whole-cell calcium channel currents in cultured, identified neurones of *Lymnaea*. *EC Neurology*. 2016;3(5):459–481.
21. Ridgway RL, Syed NI, Lukowiak K, Bulloch AGM. Nerve growth factor (NGF) induces sprouting of specific neurons of the snail, *Lymnaea stagnalis*. *Developmental Neurobiology*. 1991;22(4):377–390. DOI: 10.1002/neu.480220406.
22. Glantz SA. *Primer of biostatistics*. 4th edition. New York: McGraw-Hill; 1997. XVI, 473 p.
23. Kandel ER. *Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology*. San Francisco: W. H. Freeman and Company; 1976. XX, 727 p.
24. Henneman E, Somjen G, Carpenter DO. Functional significance of cell size in spinal motoneurons. *Journal of Neurophysiology*. 1965;28(3):560–580. DOI: 10.1152/jn.1965.28.3.560.
25. McComb C, Meems R, Syed N, Lukowiak K. Electrophysiological differences in the CPG aerial respiratory behavior between juvenile and adult *Lymnaea*. *Journal of Neurophysiology*. 2003;90(2):983–992. DOI: 10.1152/jn.00263.2003.
26. Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2007;614(1–2):24–36. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.06.007.
27. Kuhn TB. Oxygen radicals elicit paralysis and collapse of spinal cord neuron growth cones upon exposure to proinflammatory cytokines. *BioMed Research International*. 2014;2014:191767. DOI: 10.1155/2014/191767.
28. Olguín-Albuerné M, Morán J. ROS produced by NOX2 controls *in vitro* development of cerebellar granule neurons development. *ASN Neuro*. 2015;7(2):1759091415578712. DOI: 10.1177/1759091415578712.
29. Moroz LL, Rubakhin SS, Frolov AA, Kostiuk VA. Free-radical damage of identified neurones in *Lymnaea stagnalis*. *Acta Biologica Hungarica*. 1993;44(1):29–32.

Статья поступила в редколлегию 29.01.2021.
Received by editorial board 29.01.2021.

УДК 577.32571.27

In silico АНАЛИЗ ДИМЕРИЗАЦИИ PD-L1, ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕСВЕРАТРОЛОМ¹

В. А. УРБАН¹⁾, А. И. ДАВИДОВСКИЙ¹⁾, В. Г. ВЕРЕСОВ¹⁾

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

Активация Т-клеток через блокаду взаимодействий PD-1 и PD-L1 рассматривается как одна из наиболее перспективных стратегий в лечении рака. Ряд антител, таргетирующих сигнальный путь иммунного чек-пойнта PD-1 и PD-L1, были одобрены для применения после успешных клинических испытаний. Однако использование антител сопряжено с такими недостатками, как низкая проницаемость в ткани и опухоли, плохие биодegradация и оральная биодоступность, высокая стоимость производства. Применение низкомолекулярных соединений может позволить устранить недостатки, имеющие место при использовании антител, ингибирующих иммунные чек-пойнты. В настоящее время более 20 низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия PD-1 и PD-L1, базовая структура которых основывается на замещенных группах бифенила, связанного с ароматическим кольцом посредством бензилэфирной связи, были идентифицированы и запатентованы компанией Бристол – Майерс – Сквибб (США). Структурные исследования показали, что все эти соединения действуют посредством индукции димеризации PD-L1, делая белок PD-L1 некомпетентным для взаимодействия с PD-1. Недавно выявлено, что ресвератрол ингибирует взаимодействие PD-1 и PD-L1, также индуцируя димеризацию PD-L1, однако механизмы

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:

Урбан ВА, Давидовский АИ, Вересов ВГ. *In silico* анализ димеризации PD-L1, индуцированной ресвератролом. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1:39–47 (на англ.).
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-39-47>

For citation:

Urban VA, Davidovskii AI, Veresov VG. *In silico* analysis of resveratrol induced PD-L1 dimerisation. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:39–47.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-39-47>

Авторы:

Виктор Андреевич Урбан – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биофизики.
Александр Игоревич Давидовский – младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биофизики.
Валерий Гаврилович Вересов – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биофизики.

Authors:

Viktor A. Urban, junior researcher at the laboratory of immunology and cell biophysics.
urban@ibp.org.by
Alexander I. Davidovskii, junior researcher at the laboratory of immunology and cell biophysics.
davidovskii@ibp.org.by
Valery G. Veresov, doctor of science (biology); chief researcher at the laboratory of immunology and cell biophysics.
veresov@ibp.org.by

этого остаются неясными. В настоящей работе использованы инструменты вычислительной структурной биологии (построение моделей белок – белок и белок – лиганд в сочетании с методом молекулярной динамики) в целях установления структурных механизмов димеризации PD-L1, индуцированной ресвератролом.

Ключевые слова: PD-1; PD-L1; ресвератрол; вычислительная структурная биология.

Благодарность. Настоящая работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Биотехнологии» (грант № 1.45).

***In silico* ANALYSIS OF RESVERATROL INDUCED PD-L1 DIMERISATION**

V. A. URBAN^a, A. I. DAVIDOVSKII^a, V. G. VERESOV^a

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

Corresponding author: V. G. Veresov (veresov@ibp.org.by)

T-cell activation through the blockade of PD-1 – PD-L1 interactions is recognised at present as one of the most promising strategies in the cancer treatment and a number of antibodies targeting the PD-1 – PD-L1 immune checkpoint pathway have been approved after successful clinical trials. However, the use of antibodies suffers from a number of shortcomings including poor tissue and tumor penetration, long half-life time, poor oral bioavailability, and expensive production costs. Small molecule based therapeutic approaches offer the potential to address the shortcomings of the antibody-based checkpoint inhibitors. At present, more than twenty small molecular inhibitors of the PD-1 – PD-L1 interactions whose scaffold is based on substituted biphenyl group connected to a further aromatic ring through a benzyl ether bond have been identified and patented by Bristol – Myers – Squibb (USA). Structural studies have shown that all these compounds act by inducing the dimerisation of PD-L1 that makes PD-L1 non-competent for forming complex with PD-1. Very recently, the dietary polyphenol resveratrol (RSV) has been reported to inhibit the PD-1 – PD-L1 interactions through the induction of the PD-L1 dimerisation but the mechanisms remain unclear. Here, computational structural biology tools combining protein – protein and protein – ligand docking with molecular dynamics simulations were used to gain structural insights into the mechanisms of the RSV-induced dimerisation of PD-L1.

Keywords: PD-1; PD-L1; resveratrol; computational structural biology.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian state program for biotechnology (grant No. 1.45).

Introduction

Among different therapeutic options, cancer immunotherapy has emerged most recently as a powerful strategy for treating various types of cancers [1–3]. Tumor cells express cancer-specific antigens derived from genetic alterations, and as such have to be targeted by the immune cells. However, cancer cells have adapted to escape this host defense mechanism by exploiting endogenous T-cell immune tolerance pathways, termed immune checkpoints [4; 5]. The major among them is the PD-1 (programmed death 1) and PD-L1 (programmed death ligand 1) immune checkpoint signaling pathway. PD-1 protein suppresses T-cell cytolytic function when bound to its ligand PD-L1 [4; 5]. PD-L1 is upregulated on antigen-presenting cells in most cancer types via induction of PD-L1 expression by γ IFN (secreted from tumor infiltrating T-cells) and by constitutive expression of PD-L1 resulting from oncogene activation [4–6]. Indeed, the presence of PD-L1 in the tumor micro-environment is generally correlated with poor prognosis in multiple cancer types [7]. Therefore, one may expect that antagonising the protein – protein interactions of PD-1 with its ligands (PD-L1 and PD-L2) can revert T-cell phenotypic exhaustion and thus result in the efficient killing of cancer cells. In line with this, antibodies that target PD-1 or its binding to PD-L1 have shown unprecedented rates of durable clinical responses in patients with various cancer types [4]. These antibodies have been successful as single agents in numerous clinical trials and have revolutionised the field of antitumor immunotherapy. However, due to lower production costs, higher stability, improved tumour penetration, amenability for oral administration and elimination of immunogenicity, small-molecular weight inhibitors present a more promising option as compared to antibodies as immune check point inhibitors. Despite these potential advantages of small molecule inhibitors (SMIs), their discovery has greatly lagged behind mABs. This is likely because PD-1 and PD-L1 proteins are predicted to be challenging drug targets for small molecules [8] since the PD-1 – PD-L1 interaction interface is large ($1970 \text{ \AA}^2$) and lacks deep hydrophobic pockets traditionally found in more druggable proteins [9]. In spite of

this, to date, more than twenty small molecule antagonists that directly and selectively disrupt the association between PD-1 and PD-L1 have been identified and disclosed in several patents authored by *Bristol – Mayers – Squibb* (BMS) [10]. The affinities of these compounds towards PD-L1 determined with the use of the homogenous time-resolved fluorescence assay and application of the europium cryptate-labeled anti-Ig were in the range of 0.6 nmol/L up to 20 μ mol/L for IC₅₀ values. Recently, the dietary polyphenol resveratrol, a natural polyphenolic phytoalexin that is present in red wine, red grape skin, berries, peanuts, and other natural sources, has been shown to enhance anti-tumor T-cell immunity, supposedly also by the stabilisation of inactive trimeric structure, including two PD-L1 molecules and small molecular ligand, thus using indirect way of the PD-1 – PD-L1 axis inhibition [11], however the structural insights into this process is absent. Here, computational structural biology tools combining protein – protein and protein – ligand docking with molecular dynamics simulations were used to gain structural insights into the mechanisms of the resveratrol induced dimerisation of PD-L1 as well as the elucidation of structural determinants of its high inhibiting activity.

Materials and methods

Predicting the 3D structures of the PD-L1 – resveratrol complex. First, the coarse-grained model of the PD-L1 dimer – resveratrol structure complex was predicted using the *Glide* program of the protein – ligand docking [12]. In doing so, the protein was considered as rigid, whereas the ligand was treated as flexible. Because the known experimental PD-L1 dimer structures when complexed with different BMS-ligands (PDB codes: 5j8o, 5j89, 5n2d, 5n2f, 5niu, 5nix, 6nm7, 6nm8) differ from one another, all these dimers were preliminary analysed using *Glide* in terms of their interaction with resveratrol, and the lowest-energy configuration including the protein dimer and ligand was selected to be used in subsequent molecular dynamics (MD) simulations. Because BMS-ligands are known to bind to PD-L1 in extracellular environment [12], whereas the membrane parts of PD-L1 monomers are positioned far apart and therefore do not interact, the similar situation was proposed for PD-L1 interaction with resveratrol. Taking this into account and for the sake of simplicity, membrane parts of PD-L1 were omitted from MD simulations. MD simulations were performed using the *GROMACS* software [14] with the CHARMM36 all-atom force field [15]. The protein was solvated using the TIP3P water model [16] in a dodecahedron box of 44 × 37 × 34 Å and counterions were added to keep systems neutral. Periodic boundary conditions were applied and Lennard-Jones interactions were truncated at 12 Å with a force switch smoothing function from 10 to 12 Å. The integration time step was 2.0 fs. The non-bonded interaction lists were generated with a cutoff distance of 16 Å. The V-rescale thermostat [17] was used to maintain the temperature at 300 K and the Parrinello – Rahman barostat for maintaining the pressure at 1 bar [18]. Electrostatic interactions were calculated explicitly at a distance smaller than 1.0 nm, long-range electrostatic interactions were treated by particle mesh Ewald summation at every step [19]. After 500 steps steepest descent minimisation with the protein fixed and another 200 steps without the protein fixed, the systems were first heated to 300 K and then subjected to a 100 ps canonical ensemble (NVT) simulation followed by a 100 ps isothermal – isobaric ensemble (NPT) simulation. After a subsequent 1 ns NPT simulation as equilibration, the production simulations were run for 300 ns in the NVT ensemble with the Verlet leap-frog algorithm coupled with mesh Ewald method for long-range electrostatics and Verlet cut-off with the distance of 1 nm for short-range interactions [20]. GPU-acceleration was used in all MD simulations. The estimation of the binding affinity of resveratrol to PD-L1 or the PD-L1 dimer was carried out using three different metrics: *Glide* score [12], Prodigy-Lig affinity [21] and Kdeep affinity [22]. General characterisation of protein – ligand interactions was carried out using protein – ligand interaction profiler (PLIP) [23].

Modeling PD-L1 – PD-L1 interaction within the PD-L1 dimer – resveratrol complex. The modeling of PD-L1 – PD-L1 interaction was performed in a stepwise fashion using a four-staged computational molecular docking protocol ((PIPER [24] + GRAMM-X [25] + HDock [26]) – RosettaDock [27; 28] – GalaxyRefineComplex [29] – RosettaDock (abbreviated by (P + G + H)R_DG_{RC}R_D)), where PIPER performs exhaustive global rigid-body search of rigid-body docking decoys, GRAMM-X and HDock combine free rigid-body search with the template-based one. Next the top-ranked decoys were first refined by the GalaxyRefineComplex approach during the second stage, followed by the refinement using the RosettaDock approach in the third stage. When employing GalaxyRefineComplex in the second stage of the full protocol of the decoy set generation, the refinement procedure was applied to a set of several top-scored protein complexes that had been obtained at the first stage using the P + G + H combination. To discriminate the near-native complexes among the decoys, the binding affinities together with the RosettaDock energy funnels and the total energy score decrease upon binding were used in consensus manner. We estimated the binding affinities by two different ways: as interface score of RosettaDock [27; 28] and as ΔG provided by the Prodigy server [30]. In addition, we estimated buried surface area (BSA), geometric complementarity (interface van der Waals energy), number of salt bridges and hydrogen bonds as main determinants of binding affinity [31; 32]. The Rosetta3 [33] interface analyser was

used to evaluate BSA, whereas the PPCheck server [34] was used to estimate van der Waals energy, number of salt bridges and hydrogen bonds. All these metrics, which are based on essentially different physical concepts, were used in consensus manner to strengthen the reliability of functional conclusions based on affinity estimates. Since the availability of a low-energy template-based hit upon template-based docking can be viewed as an equivalent of the knowledge of the binding site location, we considered the similarity between the relative positions of proteins-partners in the final model and those in the highest-ranked rigid-body decoy obtained by the template-based docking as an additional and important indication of the successful prediction.

Results and discussion

The evaluation of the affinities between resveratrol and PD-L1 dimers from atomistic complexes of BMS-ligands with PD-L1. To establish the structure of the PD-L1 – resveratrol protein – ligand complex, the structures of the aPD-L1 and bPD-L1 dimers from 5j8o, 5niu, 5nix, 5j89, 6nm7, 6nm8 were subjected to ligand docking by resveratrol using the *Glide* program of the protein – ligand docking [12]. In doing so, the protein was considered as rigid, whereas the ligand was treated as flexible. Next, the affinities of the PD-L1 dimers – resveratrol complexes were estimated using two different metrics: *Glide* score [12], and Prodigy-Lig affinity [21]. The consensus lowest-energy structure was saved to be used in subsequent MD refinements. The results of this preliminary analysis is shown in table 1.

Table 1

Free energy estimates of the interactions between PD-L1 dimers
from 5j8o, 5niu, 5j89, 5n2d, 5n2f, 6nm7, 6nm8, 6r3k atomistic
structures and resveratrol, kcal/mol

PDB code of the PD-L1 dimer structure used	ΔG_{Glide}	ΔG_{Pr}	ΔG_{AB}	$\Delta G_{\text{Pr, trimer}}$
5j8o(1)	-7.95	-13.7	-7.3	-21.0
5j8o(2)	-7.90	-13.8	-7.3	-21.1
5niu(1)	-8.19	-14.0	-7.5	-21.5
5niu(2)	-7.56	-13.9	-7.5	-21.4
5niu(3)	-7.33	-13.9	-7.5	-21.4
5n2d(1)	-7.59	-13.8	-7.1	-20.9
5n2d(2)	-7.55	-13.8	-7.1	-20.9
5n2d(3)	-7.53	-13.8	-7.1	-20.9
5n2f(1)	-8.54	-13.7	-7.6	-21.3
5n2f(2)	-8.46	-13.8	-7.6	-21.4
5n2f(3)	-8.45	-13.7	-7.6	-21.3
6r3k(1)	-7.21	-13.7	-6.4	-20.6
6r3k(2)	-7.15	-13.7	-6.4	-20.6
6r3k(3)	-7.09	-13.7	-6.4	-20.6
5j89(1)	-7.48	-13.9	-7.9	-21.8
5j89(2)	-7.45	-13.9	-7.9	-21.8
5j89(3)	-7.35	-13.9	-7.9	-21.8
5j89(4)	-7.32	-13.8	-7.9	-21.7
6nm7(1)	-8.98	-14.1	-8.0	-22.1
6nm7(2)	-8.81	-14.1	-8.0	-22.1
6nm8(1)	-8.06	-13.8	-7.7	-21.5
6nm8(1)	-8.00	-13.8	-7.7	-21.5

Note. ΔG_{Glide} , ΔG_{Pr} are binding affinities obtained using *Glide* and Prodigy respectively; ΔG_{AB} is the interprotein binding affinities between PD-L1 monomers A and B; $\Delta G_{\text{Pr, trimer}} = \Delta G_{\text{Pr}} + \Delta G_{\text{AB}}$.

From the results that have been obtained the complex of resveratrol with the PD-L1 dimer that was adopted from 6nm7(1) structure was saved to be used in further refinement.

The refinement of the PD-L1 dimer – resveratrol complex using MD simulations. The best-scored PD-L1 dimer – resveratrol structure obtained by *Glide* (with PD-L1 dimer structure adopted from 6nm7) was next subjected to MD simulations as described in the section «Materials and methods». The root mean square deviation (RMSD) and the root mean square fluctuation (RMSF) were employed to characterise the motions of the ligand in respect to the protein and the stabilisation of the trimeric complex. The plots depicting RMSD and RMSF are shown in fig. 1 and 2 respectively.

The plot depicts structural stability, positioning and motion of resveratrol upon the formation of the complex with the PD-L1 dimer.

Our findings show that the systems converged and attained stability early in the production run after 50 ns for the PD-L1 dimer – resveratrol complex. The final structure of the MD simulations was considered as the structure of the complex (fig. 3). A comparison between the predicted structure and that obtained by docking with *Glide* has shown a significant change both in the conformation and orientation of PD-L1 molecules in all cases with RMSD of 1.122 Å. The analysis of the PD-L1 dimer – resveratrol complex structure using the PLIP [23] revealed the formation of 16 hydrophobic contacts and five hydrogen bonds (see fig. 3, table 2).

The analysis of the protein – ligand binding affinity by Prodigy-Lig [21] resulted in binding affinity values between the PD-L1 dimer and resveratrol of –14.2. The most important results of simulations are given in table 3. The modeling has shown a rather high intermolecular shape and polar complementarity in the PD-L1 – PD-L1 – resveratrol complex thus explaining the induction of PD-L1 dimerisation and inhibition of PD-1 – PD-L1 interaction. Of note, ΔG_{Glide} for interaction with resveratrol is higher than that for interaction with BMS-ligands, whereas with ΔG_{Pr} the lowest value takes places namely with resveratrol. Nearly the same value (–9.252 kcal/mol) has been earlier obtained with *AutoDock* [35]. This discrepancy can be explained by more accurate account of van der Waals interactions by Prodigy as compared with *Glide* or *AutoDock* [35].

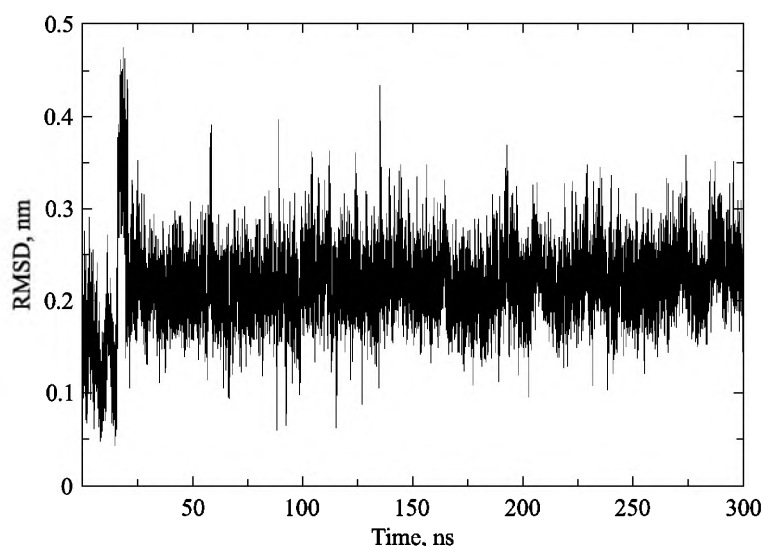


Fig. 1. Resveratrol atoms RMSD during MD simulations

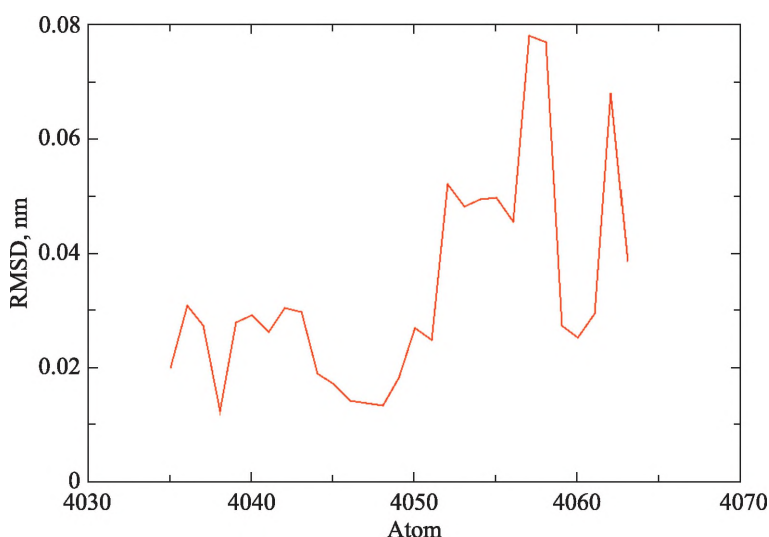


Fig. 2. RMSF of resveratrol atoms upon the formation of complexes with the PD-L1 dimer

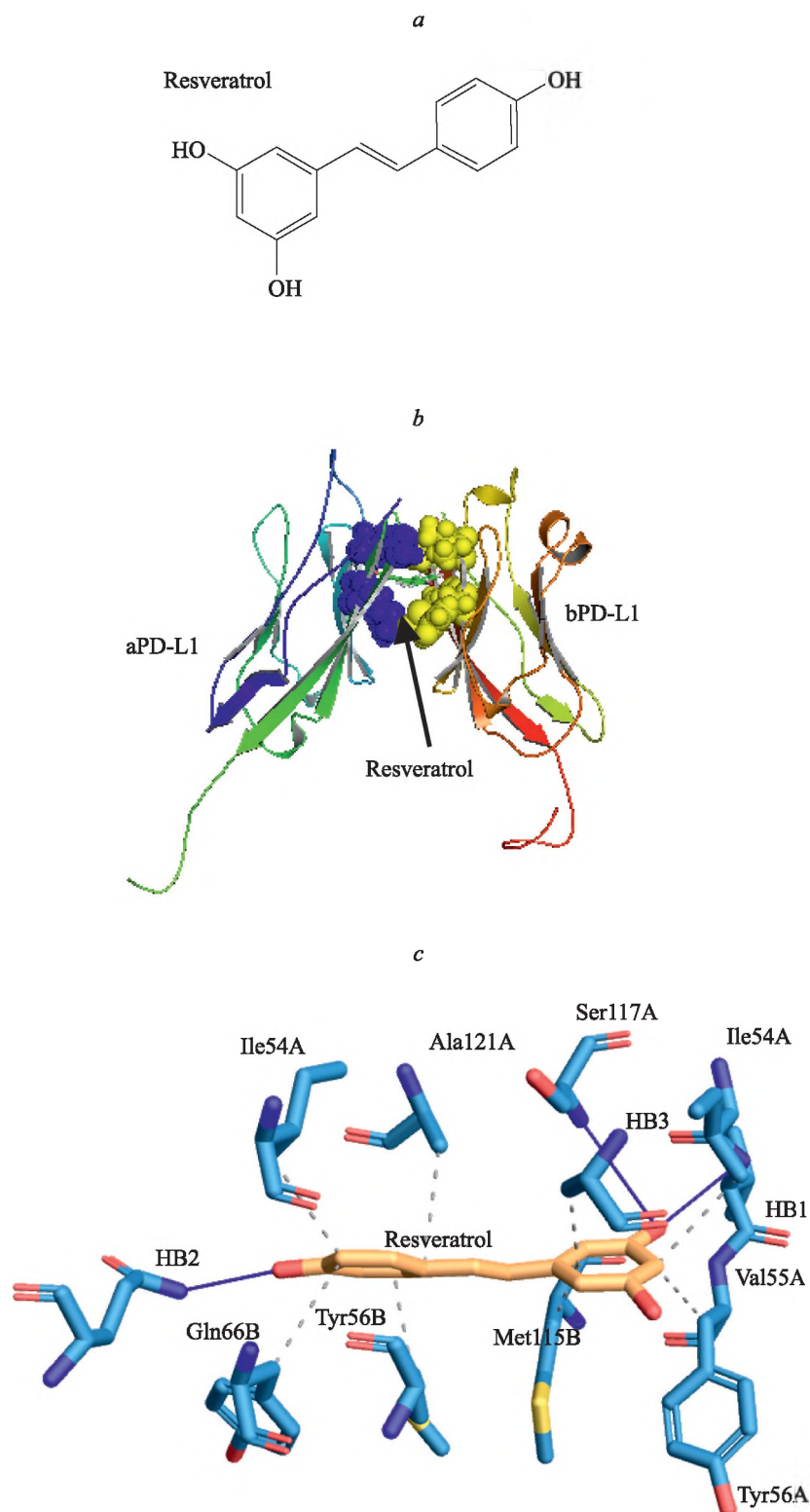


Fig. 3. Structure of the PD-L1 dimer – resveratrol complex:
a – chemical structure of resveratrol; *b* – predicted 3D structure of the extracellular part of PD-L1 dimer in complex with resveratrol after 300 ns MD simulations (resveratrol arrangement between two PD-L1 immunoglobulin domains is shown); *c* – the closer view of the PD-L1 dimer – resveratrol interface. Hydrogen bonds (HB1, HB2 and HB3) are shown as blue lines. The hydrophobic contacts are shown as dotted black lines

Table 2

Hydrophobic and polar contacts between resveratrol and PD-L1 dimer

Index	Residue	AA(atom)	Distance, Å	Ligand atom
<i>Hydrophobic contacts</i>				
1_HPH*	54A	Ile(CD2)	3.55	C11
2_HPH*	54B	Ile(CG2)	3.32	H21
3_HPH	56A	Tyr(CG)	3.33	C13
4_HPH	56B	Tyr(CD1)	2.72	C11
5_HPH	56B	Tyr(CG)	3.28	C6
6_HPH	66A	Gln(HG2)	2.89	H25
7_HPH	115A	Met(CB)	3.59	C9
8_HPH	115B	Met(CB)	3.79	C6
9_HPH	116B	Ile(HG12)	3.71	H25
10_HPH	117A	Ser(HB2)	3.74	H20
11_HPH	117B	Ser(CB)	3.70	H28
12_HPH	121A	Ala(CB)	3.54	C3
13_HPH	121B	Ala(CB)	3.40	C11
14_HPH	122A	Asp(N)	3.52	H24
15_HPH	123B	Tyr(CB)	3.31	H26
16_HPH	122B	Asp(HB2)	3.52	H27
<i>Hydrogen bonds</i>				
1_HB**	56B	Tyr(OH)	3.61	O16
2_HB	66B	Gln(N)	3.43	O7
3_HB	117A	Ser(N)	3.57	O16
4_HB	122B	Asp(H)	3.97	O7
5_HB	123B	Tyr(HB2)	2.32	O16

*HPH stands for hydrophobic contacts. **HB stands for hydrogen bonds.

Table 3

The most important results of interactions between resveratrol, BMS-8, BMS-37, BMS-200, BMS-202, BMS-1001, BMS-1166, BMS-105 and PD-L1 dimer

Protein – ligand complexes	IC ₅₀ , nmol/L	ΔG_{Pr} , kcal/mol	ΔG_{Glide} , kcal/mol	ΔG_{AB} , kcal/mol	$\Delta G_{Pr,tr}$ **, kcal/mol	n_{HPH}	n_{HB}	n_{SB}	$n_{\pi-st}$	PD-L1 dimer RMSD from (PD-L1) ₂ , in complex with BMS-8
PD-L1 dimer – resveratrol	1–10	–14.1	–9.0	–8.0	–22.2	15	5	0	0	1.12
PD-L1 dimer – BMS-8*	146	–10.8	–11.9	–7.2	–18.0	9	0	0	2	0
PD-L1 dimer – BMS-37*	6–100	–11.0	–12.0	–7.1	–18.1	9	0	0	1	0.97
PD-L1 dimer – BMS-105*	6–100	–10.9	–11.8	–7.8	–18.6	6	1	0	1	0.56
PD-L1 dimer – BMS-200*	80	–11.5	–12.7	–7.8	–19.3	6	2	0	1	1.17
PD-L1 dimer – BMS-202*	18	–12.1	–13.5	–7.3	–19.4	8	2	0	1	1.08
PD-L1 dimer – BMS-1001*	2–15	–12.5	–13.9	–7.2	–19.7	9	3	0	0	1.26
PD-L1 dimer – BMS-1166*	1.4	–12.9	–14.2	–6.9	–19.8	9	3	1	1	1.22

Note. $\Delta G_{Pr,trimer} = \Delta G_{Pr} + \Delta G_{AB}$; n_{HPH} – number of hydrophobic contacts; n_{HB} – number of hydrogen bonds; n_{SB} – number of salt bridges; $n_{\pi-st}$ – number of π -stacking pairs; * – complexes of PD-L1 dimer with BMS-8 (PDB code: 5j8o), BMS-37 (PDB code: 5n2d), BMS-105 (PDB codes: 6nmv, 6nmv), BMS-200 (PDB code: 5n2f), BMS-202 (PDB code: 5j89), BMS-1001 (PDB code: 6r3k), BMS-1166 (PDB code: 5niu); ** – $\Delta G_{Pr,tr}$ stands for $\Delta G_{Pr,trimer}$

Small molecules targeting the PD-1 – PD-L1 interaction are actively sought by academic institutions and pharmaceutical companies with the hope of surpassing the success of antibodies due to expected better efficacy of small molecules as compared to antibodies because of their better tumor penetration and oral availability. Although this field is only in its initial stage, several small molecule immunomodulatory compounds at the stage of preclinical development have been reported to date [13]. Whereas atomic-level structures of their complexes with PD-L1 are known for a number of them, high-resolution structures for some of them possessing IC_{50} values in low nanomolar range are not determined to date, thus hampering the rational structure based development of efficient drugs. In the present study, based on known X-ray structures (PDB codes: 5j8o, 5j89, 5n2d, 5n2f, 5niu, 5nix, 6nm7, 6nm8), the prediction of the atomistic 3D structure of PD-L1 dimer with resveratrol was carried out. As in known X-ray structures of PD-L1 – BMS-ligand complexes, PD-L1 interacts simultaneously with two monomers of PD-L1. The analysis of the receptor – ligand complexes allowed the detection of the residues involved in dimer stabilisation. As in all previously characterised structures of the complexes of PD-L1 with BMS-SMIs, resveratrol interacts with same key interaction residues, namely with Ile54A, Tyr56A, Gln66A, Met115A, Ser117A, Ala121A, Asp122A and Ile54B, Tyr56B, Met115B, Ser117B, Ala121B, Tyr123B. Overall, the inhibition of PD-L1 immunosuppressive action occurs through multiple hydrophobic and electrostatic interactions that stabilise the trimeric complex including ligand and two monomers. Our studies show that resveratrol stabilises the $(PD-L1)_2$ – ligand trimeric complex more efficiently than known BMS-ligands and as such can be seen as the promising hit compound for drug design of therapeutics for the suppression of PD-1 – PD-L1 interaction.

Conclusion

Cancer immunomodulation involves the use of synthetic or natural agents capable of activating the immune response to impede tumor cell dissemination. The nutraceutical resveratrol, a natural polyphenolic phytoalexin that is present in red wine, red grape skin, berries, peanuts, and other natural sources, has recently been proposed as a cancer immunomodulatory molecule by either acting on immune cells or by sensitising tumor cells to the cytotoxic effects of immune cells [37]. Our computer-aided simulations combining docking with MD have shown that resveratrol locates at the center of the PD-L1 homodimer, filling a deep hydrophobic pocket that contributes multiple additional interactions between the PD-L1 monomers. Resveratrol almost perfectly duplicate the target space of BMS-SMIs, which have a common scaffold and interact with the cavity formed by two PD-L1 monomers and with key interactions with Ile54, Tyr56, Met115, Ile116, Ala121, and Tyr123, thereby blocking the PD-1 – PD-L1 interaction by inducing PD-L1 dimerisation. Due to its special structure features, very strong binding takes place between PD-L1 monomers and ligands as well as between protein monomers. This results in much higher stabilisation energy of trimeric complex of resveratrol with PD-L1 dimer as compared with the case of BMS-ligands, suggesting resveratrol as a promising hit-candidate for the design of powerful drugs for immunological therapy.

References

1. Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*. 2018;9(10):1773–1781. DOI: 10.7150/jca.24577.
2. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2014;480(7378):480–489. DOI: 10.1038/nature10673.
3. Smyth MJ. Multiple approaches to immunotherapy – the new pillar of cancer treatment. *Immunology & Cell Biology*. 2017;95(4):323–324. DOI: 10.1038/icb.2017.9.
4. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(4):252–264. DOI: 10.1038/nrc3239.
5. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylore EJ, Robert L. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568–571. DOI: 10.1038/nature13954.
6. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2010;236(1):219–242. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
7. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563–567. DOI: 10.1038/nature14011.
8. Mei-Miao Zhan, Xue-Qin Hu, Xiu-Xiu Liu, Ban-Feng Ruan, Jun Xu, Chenzhong Liao. From monoclonal antibodies to small molecules: the development of inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 pathway. *Drug Discovery Today*. 2016;21(6):1027–1036. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.04.011.
9. Zarganes-Tzitzikas T, Konstantinidou M, Gao Y, Krzemien D, Zak K, Dubin G, et al. Inhibitors of programmed cell death 1 (PD-1): a patent review (2010–2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2016;26(9):973–977. DOI: 10.1080/13543776.2016.1206527.
10. Zak KM, Kitel R, Przetocka S, Golik P, Guzik K, Musielak B, et al. Structure of the complex of human programmed death 1, PD-1, and its ligand, PD-L1. *Structure*. 2015;23(12):2341–2348. DOI: 10.1016/j.str.2015.09.010.

11. Verdura S, Cuyàs E, Cortada E, Brunet J, Lopez-Bonet E, Martin-Castillo B, et al. Resveratrol targets PD-L1 glycosylation and dimerization to enhance antitumor T-cell immunity. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(1):8–34. DOI: 10.18632/aging.102646.
12. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004;47(7):1739–1749. DOI: 10.1021/jm0306430.
13. Guzik K, Tomala M, Muszak D, Konieczny M, Hec A, Błaszkiwicz U, et al. Development of the inhibitors that target the PD-1/PD-L1 interaction – a brief look at progress on small molecules, peptides and macrocycles. *Molecules*. 2019;24(11):2071. DOI: 10.3390/molecules24112071.
14. Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*. 2013;29(7):845–854. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt055.
15. Huang J, MacKerell AD Jr. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*. 2013;34(25):2135–2145. DOI: 10.1002/jcc.23354.
16. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*. 1983;79(2):926–935. DOI: 10.1063/1.445869.
17. Bussi G, Donadio D, Parrinello M. Canonical sampling through velocity rescaling. *Journal of Chemical Physics*. 2007;126(1):014101. DOI: 10.1063/1.2408420.
18. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*. 1981;52(12):7182–7190. DOI: 10.1063/1.328693.
19. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*. 1993;98(12):10089–10092. DOI: 10.1063/1.464397.
20. Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics*. 1995;103(19):8577–8593. DOI: 10.1063/1.470117.
21. Vangone A, Schaarschmidt J, Koukos P, Geng C, Citro N, Trellet ME, et al. Large-scale prediction of binding affinity in protein-small ligand complexes: the Prodigy-Lig web server. *Bioinformatics*. 2019;35(9):1585–1587. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty816.
22. Jiménez J, Škalič M, Martínez-Rosell G, De Fabritiis G. K_{DEEP} : protein – ligand absolute binding affinity prediction via 3D-convolucional neural networks. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2018;58(2):287–296. DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00650.
23. Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, Schroeder M. PLIP: fully automated protein – ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(W1):W443–W447. DOI: 10.1093/nar/gkv315.
24. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhomy D, Yueh C, et al. The ClusPro web server for protein – protein docking. *Nature Protocols*. 2017;12(2):255–278. DOI: 10.1038/nprot.2016.169.
25. Tovchigrechko A, Vakser IA. GRAMM-X public web server for protein – protein docking. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(supplement 2):W310–W314. DOI: 10.1093/nar/gkl206.
26. Yumeng Yan, Di Zhang, Pei Zhou, Botong Li, Sheng-You Huang. HDock: a web server for protein – protein and protein – DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(W1):W365–W373. DOI: 10.1093/nar/gkx407.
27. Lim Heo, Hasup Lee, Chaok Seok. GalaxyRefineComplex: refinement of protein – protein complex model structures driven by interface repacking. *Scientific Reports*. 2016;6(1):32153. DOI: 10.1038/srep32153.
28. Gray JJ, Moughon S, Wang C, Schueler-Furman O, Kuhlman B, Rohl CA, et al. Protein – protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. *Journal of Molecular Biology*. 2003;331(1):281–299. DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00670-3.
29. Lyskov S, Gray JJ. The RosettaDock server for local protein – protein docking. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(supplement 2):W233–W238. DOI: 10.1093/nar/gkn216.
30. Xue LC, Rodrigues JP, Kastritis PL, Bonvin AM, Vangone A. Prodigy: a web server for predicting the binding affinity of protein – protein complexes. *Bioinformatics*. 2016;32(23):3676–3678. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw514.
31. Erijman A, Rosenthal E, Shifman JM. How structure defines affinity in protein – protein interactions. *PLoS One*. 2014;9(10):e110085. DOI: 10.1371/journal.pone.0110085.
32. Nilofer C, Sukhwai A, Mohanapriya A, Kandueane P. Protein – protein interfaces are vdW dominant with selective H-bonds and (or) electrostatics towards broad functional specificity. *Bioinformation*. 2017;13(6):164–173. DOI: 10.6026/97320630013164.
33. Bender BJ, Cisneros A III, Duran AM, Finn JA, Fu D, Lokits AD, et al. Protocols for molecular modeling with Rosetta3 and RosettaScripts. *Biochemistry*. 2016;55(34):4748–4763. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00444.
34. Sukhwai A, Sowdhamini R. PPCheck: a webserver for the quantitative analysis of protein – protein interfaces and prediction of residue hotspots. *Bioinformatics and Biology Insights*. 2015;9:141–151. DOI: 10.4137/BBI.S25928.
35. Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2008;24(1):8.14.1–8.14.40. DOI: 10.1002/0471250953.bi0814s24.
36. Andrei SA, Sijbesma E, Hann M, Davis J, O'Mahony G, Perry MWD, et al. Stabilization of protein – protein interactions in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2017;12(9):925–940. DOI: 10.1080/17460441.2017.1346608.
37. Trung LQ, An DTT. Is resveratrol a cancer immunomodulatory molecule? *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1255. DOI: 10.3389/fphar.2018.01255.

Received by editorial board 30.06.2020.

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 619+577.112:578.224+579+663.18

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА КАПСИДА ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2-го ТИПА В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

А. Д. ТИТОВА¹⁾, К. В. КУДИН¹⁾, В. А. ПРОКУЛЕВИЧ¹⁾

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

Для улучшения экспрессии белка капсида цирковируса свиней 2-го типа (ЦВС-2) в клетках *E. coli* проведена оптимизация соответствующего гена и сконструированы два варианта открытой рамки считывания, которые кодировали полноразмерный и укороченный белки капсида в составе вектора экспрессии. При этом заменены редко встречающиеся кодоны, а в случае укороченного гена удален участок, соответствующий N-концевому домену белка. Установлено, что наибольший уровень экспрессии в бактериальных клетках достигается при одновременной оптимизации кодонов и удалении начального (N-концевого) участка гена размером 108 пар нуклеотидов (п. н.), содержащего сигнал ядерной локализации.

Ключевые слова: цирковирус свиней 2-го типа; открытая рамка считывания; белок капсида; сигнал ядерной локализации; N-концевой участок белка; синонимические кодоны; оптимизация кодонов; гетерологичный хозяин; экспрессия гена; индекс адаптации кодонов.

Образец цитирования:

Титова АД, Кудин КВ, Прокулевич ВА. Особенности экспрессии белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в бактериальных клетках. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:48–57.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-48-57>

For citation:

Titova AD, Kudzin KV, Prokulevich VA. Properties of expression of protein capsid porcine circovirus type 2 in bacterial cells. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021; 1:48–57. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-48-57>

Авторы:

Анастасия Дмитриевна Титова – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.
Кирилл Валерьевич Кудин – кандидат биологических наук; младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биотехнологии кафедры микробиологии биологического факультета.
Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета.

Authors:

Anastasia D. Titova, junior researcher at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.
titovaad@gmail.com
Kirill V. Kudzin, PhD (biology); junior researcher at the laboratory of biotechnology, department of microbiology, faculty of biology.
kudzinkv@bsu.by
Vladimir A. Prokulevich, doctor of science (biology), full professor; head of the department of microbiology, faculty of biology.
prokulevich@mail.ru

PROPERTIES OF EXPRESSION OF PROTEIN CAPSID PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 IN BACTERIAL CELLS

A. D. TITOVA^a, K. V. KUDZIN^a, V. A. PROKULEVICH^a

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

Corresponding author: A. D. Titova (titovaad@gmail.com)

To improve expression of the porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid protein in *E. coli* cells, the corresponding gene was optimized and two variants of the open reading frame were constructed, which encoded the full-sized and shortened capsid proteins as part of the expression vector. Rare codons were replaced, and in the case of a shortened version of the gene, the region corresponding to the N-terminal domain of the protein was deleted. A comparison was made of the expression level of the studied proteins. It was established that the highest level of expression in bacterial cells is achieved by simultaneously optimizing the codons and removing the initial (N-terminal) 108 base pair (bp) portion of the gene, which contains the nuclear localization signal.

Keywords: porcine circovirus type 2; open reading frame; capsid protein; nuclear localization signal; N-terminal portion of the protein; synonymous codons; codon optimization; heterologous host; gene expression; codon adaptation index.

Введение

Цирковир свиней 2-го типа (ЦВС-2) – это небольшой икосаэдрический безоболочечный вирус [1], принадлежащий к роду *Circovirus* семейства *Circoviridae* [2]. ЦВС-2 является возбудителем целого ряда синдромов, клинические проявления которых обозначаются общим термином «цирковирозные болезни свиней» (ЦВБС). К ЦВБС относятся синдром послеотъемного мультисистемного истощения (СПМИ), синдром дерматита и нефропатии свиней (СДНС), связанные с ЦВС пневмония, энтерит и репродуктивная дисфункция [3]. Данные заболевания наносят значительный ущерб свиноводству [4]. Наиболее эффективным средством борьбы с ЦВС-2 являются вакцины [5]. Все известные современные вакцинные препараты основаны на антигенных свойствах капсидного белка вируса генотипа ЦВС-2a [6] и не всегда способны обеспечить достаточный уровень защиты при эпизоотиях, вызванных другими штаммами вируса [7]. В связи с этим необходима разработка вакцин на основе превалирующих на сегодняшний день штаммов подвида ЦВС-2b [8].

Геном ЦВС-2 представлен ковалентно замкнутой кольцевой одноцепочечной ДНК размером 1767 нуклеотидов [1] и имеет по крайней мере три открытые рамки считывания (ОРС) с известными функциями. ОРС2 длиной 702 нуклеотида кодирует единственный белок капсидной оболочки вируса [9]. Размер белка капсида составляет 233 аминокислоты, масса – около 27,8 кДа [9–11]. При разработке генно-инженерных вакцин против цирковируса именно этот белок используется в качестве антигена [12; 13]. В различных исследованиях идентифицированы антигенные детерминанты капсидного белка, важные для распознавания иммунной системой. Они находятся в пределах 47–62; 65–87; 113–147; 157–183; 165–200; 193–207 и 230–233 аминокислотных остатков (а. о.) [14; 15]. N-концевой участок размером 29 а. о. (координаты 12–41 а. о.) белка капсида обуславливает сигнал ядерной локализации [16].

Эффективная продукция гетерологичных белков в клетках бактерий, как правило, требует модификации экспрессируемого гена. Наличие редких синонимических кодонов зачастую является препятствием для успешной экспрессии гена в гетерологичном хозяине, вследствие чего может быть необходимо изменение нуклеотидного состава гена [17]. Подобные затруднения возникают и с экспрессией гена белка капсида цирковируса, в связи с чем проводятся эксперименты по оптимизации данного гена, в частности изменение или удаление фрагмента гена, кодирующего N-концевой домен данного белка [18–20].

Цель настоящей работы – создание оптимизированных вариантов гена белка капсида ЦВС-2 для повышения уровня его экспрессии в клетках *E. coli*.

Материалы и методика исследования

Бактериальные штаммы и плазмиды. В работе использовали плазмиду pET-24b(+) (Novagen[®]) и плазмиду pET-TP3 из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета БГУ, включающую укороченный ген белка капсида штамма ЦВС-2b M1 [20]. Клонирование рекомбинантных плазмид проводили в клетках штамма *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)*]) из коллекции кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ. Продукентами рекомбинантных белков служили бактерии штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*E. coli* B F[–] *ompT hsdS(r_B[–] m_B[–]) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]) фирмы Stratagene (США).*

Генно-инженерные методики и ферменты. Конструирование, выделение, рестрикцию, Ca^{2+} -зависимую трансформацию и электрофорез ДНК осуществляли в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами [21]. Нуклеотидные последовательности генов согласно разработанному дизайну синтезированы фирмой *Integrated DNA Technologies Inc.* (США), а специфические праймеры для амплификации – ОДО «Праймтех» (Беларусь). Плазмидную ДНК выделяли с помощью наборов реактивов QIAquick® Gel Extraction Kit и QIAprep® Spin Miniprep Kit UAB (*Qiagen*, Германия). В работе использовали ферменты и буферные системы фирмы *Thermo Fisher Scientific Inc.* (США): рестриктазы XhoI и HindIII с 10-кратным буфером FastDigest; ДНК-лигазу T4 с соответствующим 10-кратным буфером; ДНК-полимеразы Pfu и Taq с 10-кратными Pfu- и Taq-буферами соответственно, смесью дНТФ и деионизированной водой в концентрациях, указанных производителем; маркер длины ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix. Для определения молекулярной массы полученных белков применяли маркер Protein Marker VI (10–245) prestained от компании *ITW Reagents* (Испания).

ПЦР проводили в смеси стандартного состава [22] с использованием программируемого амплификатора Veriti™ фирмы *Applied Biosystems* (США). Параметры циклов амплификации: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С, затем 30 циклов, включавших в себя такие операции, как денатурация – 30 с при 94 °С, отжиг праймеров – 30 с (температура для каждой пары праймеров рассчитывалась как минимальная температура отжига из пары минус 5 °С), элонгация – 72 °С (время элонгации определялось из расчета 1 мин на 1000 пар нуклеотидов (п. н.) для Taq-полимеразы и 1 мин на 500 п. н. для Pfu-полимеразы), заключительная полимеризация – 7 мин при 72 °С.

Индукцию экспрессии рекомбинантных белков в клетках штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL проводили по методу автоиндукции Стюдера [23]. В качестве отрицательного контроля выступали клетки BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL без плазмиды. Результаты экспрессии оценивали путем электрофореза белков в полиакриламидном геле по Лэммли [21]. Денситометрические изображения окрашенных полиакриламидных гелей анализировали с помощью программного пакета *ImageJ 1.46r* [24]. Статистический анализ (сравнение уровня экспрессии и вычисление стандартной ошибки среднего) проводили в программе *SOFA Statistics* (версия 1.5.3).

Результаты и их обсуждение

Анализ и оптимизация полноразмерной кодирующей последовательности гена капсида ЦВС-2. Анализ кодирующей последовательности ДНК структурной части гена белка капсида показал, что первичная структура вирусного гена насыщена редкими кодонами, которые практически не читаемы в бактериальных клетках. Один из участков ДНК (координаты 555–588 п. н.) содержит подряд 11 трудно-читаемых кодонов (рис. 1). Имеется большое количество кодонов, нехарактерных для тРНК прокариот¹ [25] (например, кодоны для аргинина (AGG – 8 триплетов, AGA – 9 триплетов), пролина (CCC – 12 триплетов), лейцина (СТА – 3 триплета) и изолейцина (АТА – 2 триплета)). Подобный нуклеотидный состав затрудняет экспрессию целевого продукта в бактериях. Интактная ДНК гена белка капсида ЦВС-2 даже при наличии эффективного прокариотического промотора обуславливает крайне низкий уровень экспрессии целевого белка после индукции клонированного гена [20].

С целью увеличить продукцию целевого белка последовательность ДНК структурной части гена капсида ЦВС-2 в процессе синтеза модифицировали для оптимизации экспрессии в клетках прокариот, при этом замены нуклеотидов в гене не привели к изменениям в последовательности аминокислот в соответствующем белке (см. рис. 1). Анализ последовательности в программе *JCat* [26; 27] выявил, что индекс адаптации кодонов для *E. coli* у исходной, неоптимизированной последовательности [28] равен 0,1961, тогда как для оптимизированной полноразмерной последовательности он составляет 0,7098.

Создание генетической конструкции для экспрессии полноразмерного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Полноразмерную модифицированную рамку считывания амплифицировали с помощью праймеров CapsP1 и CapsP2 (см. таблицу). Соответствующий ампликон (717 п. н.) введен в вектор pET-24b(+) по сайтам рестрикции XhoI и HindIII. Полученная генетическая конструкция названа pET-LOR (рис. 2). Исследуемый ген, кроме кодирующей последовательности гена белка капсида, содержит последовательности N-концевой Т7-метки и С-концевой 6-His-метки для более удобного обнаружения и очистки белка. Молекулярная масса предполагаемого белкового продукта, названного LOR, составляет 31,23 кДа.

Экспрессия полноразмерного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Полноразмерный ген капсида в составе плазмиды pET-LOR демонстрирует индуцибельную экспрессию после передачи плазмиды в клетки штамма *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, о чем свидетельствуют результаты электрофореза белков в полиакриламидном геле (рис. 3). Анализ изображений окрашенных полиакриламидных гелей показал, что оптимизированный полноразмерный белок LOR вырабатывается в клетках в пропорции $(13,01 \pm 0,75) \%$ ($n = 22$) по отношению к общей массе синтезируемого белка.

¹Codon usage database [Electronic resource]. URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (date of access: 16.12.2013).

ORIP	atg acg tat aca gga gga cgt tac cgg gga gga gga cac cgc gga gga cgc agc cat ctt ggc cag atc ctc cgc cgc	75
LOP	atg acg tat acc cgt cgt cgt tac cgc cgt cgt cgt cat cgc cgc cgc agc cat ctt ggc cag atc ctc cgc cgc	
CapsP	M T Y T R R R Y R R R R H R P R S H L G Q I L R R	
ORIP	cgc aca tgg ctc gtc cac aca cgc cac cgt tac cgc tgg gga gga aaa aat ggc atc ttc aac acc cgc ctc tcc	150
LOP	cgc cgc tgg ctc gtc cat cgc cgc cat cgt tac cgc tgg cgt cgt aaa aac ggc atc ttc aac acc cgc ctc tcc	
CapsP	R P W L V H P R H R Y R W R R K N G I F N T R L S	
ORIP	cgc acc ttc gga tat act atc aag cga acc aca gtc aaa acg gga gga tcc tgg cgc gtc gac atg atg gga gga ttc aat	225
LOP	cgc acc ttc ggc tat acc atc aag cgt acc acc gtc aaa acc cgc tcc tgg cgc gtc gat atg atg cgt ttc aac	
CapsP	R T F G Y T I K R T T V K T P S W A V D M M R F N	
ORIP	att aat gac ttt ctt ccc cca gga ggg ggc tca aac ccc cgc tct gtc ccc ttt gaa tac tac gga gga aag	300
LOP	att aac gat ttc ctc cgc cgc ggc ggc tca aac cgc cgt tct gtc cgc ttc gaa tac tac cgt atc cgt aaa	
CapsP	I N D F L P P G G G S N P R S V P F E Y Y R I R K	
ORIP	gtt aag gtt gaa ttc tgg tgc tgc tcc cgc atc acc cag ggt gac gga gga gtc ggc tcc agt gct gtt att gga gga	375
LOP	gtt aaa gtt gaa ttc tgg cgc tgc tcc cgc atc acc cag ggc gat cgt ggc gtc ggc tcc agc cgc gtt att ctc	
CapsP	V K V E F W P C S P I T Q G D R G V G S S A V I L	
ORIP	gat gat aac ttt gta aca aag gcc aca gcc ctc acc tat gac ccc tat gta aac tac tcc tcc cgc cat acc gga gga	450
LOP	gat gat aac ttc gtc acc aaa gcc acc gcc ctc acc tat gat cgc tat gtc aac tac tcc tcc cgt cat acc atc	
CapsP	D D N F V T K A T A L T Y D P Y V N Y S S R H T I	
ORIP	acc cag ccc ttc tcc tac cac tcc cgc tac ttt acc gga gga aaa cct gtc gga gga gat tcc act att gat tac ttc gga gga	525
LOP	acc cag cgc ttc tcc tac cat tcc cgc tac ttc acc cgc aaa cgc gtc ctc gat tcc acc atc gat tac ttc cag	
CapsP	T Q P F S Y H S R Y F T P K P V L D S T I D Y F Q	
ORIP	cca aac aac aaa gga gga aat cag ctc tgg ctc gga gga cca act act gga aat gta gac cac gta ggc ctc ggc act	600
LOP	cgc aac aac aaa cgt aac cag ctc tgg ctc cgt ctc cag acc acc ggc aac gtc gat cat gtc ggc ctc ggc acc	
CapsP	P N N K R N Q L W L R L Q T T G N V D H V G L G T	
ORIP	gcg ttc gaa aac agt ata tac gac cag gaa tac aat atc cgt gta acc atg tat gta caa ttc gga gga gaa ttt aat	675
LOP	gcg ttc gaa aac agc atc tac gat cag gaa tac aac atc cgt gtc acc atg tat gtc cag ttc cgt gaa ttc aac	
CapsP	A F E N S I Y D Q E Y N I R V T M Y V Q F R E F N	
ORIP	ctt aaa gac cca cca ctt atc cct taa	
LOP	ctg aaa gat cgc cgc ctc atc cgc	
CapsP	L K D P P L I P *	

Рис. 1. Сравнение оригинальной (ORIP) и оптимизированной (LOP) нуклеотидных последовательностей. Указана последовательность белка капсида ЦВС-2 (CapsP). Серым цветом выделены измененные при оптимизации кодоны, темно-серым – редкие кодоны для аргинина, лейцина, изолейцина и пролина в оригинальной последовательности. Рамкой обозначены отсутствующие в укороченной последовательности кодоны (см. ниже)

Fig. 1. Comparison of the original (ORIP) and the optimized (LOP) nucleotide sequences. The sequence of the protein capsid PCV2 (CapsP) is shown. The codons changed during optimization are highlighted in gray. Rare codons for arginine, leucine, isoleucine and proline in the original sequence are highlighted in dark gray. The codons removed from the truncated sequence are framed (see below)

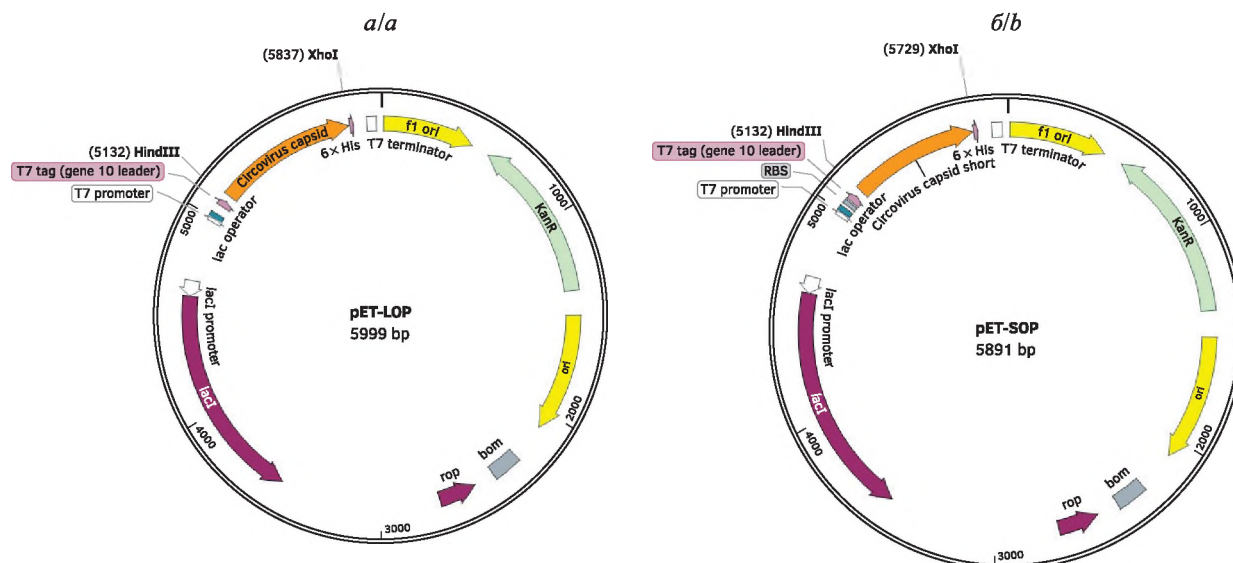


Рис. 2. Карты плазмид, полученных в работе:
а – pET-LOP (плазмида для экспрессии полноразмерного белка капсида);
б – pET-SOP (плазмида для экспрессии укороченного белка капсида (см. ниже))

Fig. 2. Maps of plasmids obtained in the work:
а – pET-LOP (plasmid for expressing the full-length capsid protein);
б – pET-SOP (plasmid for expression of the truncated capsid protein (see below))

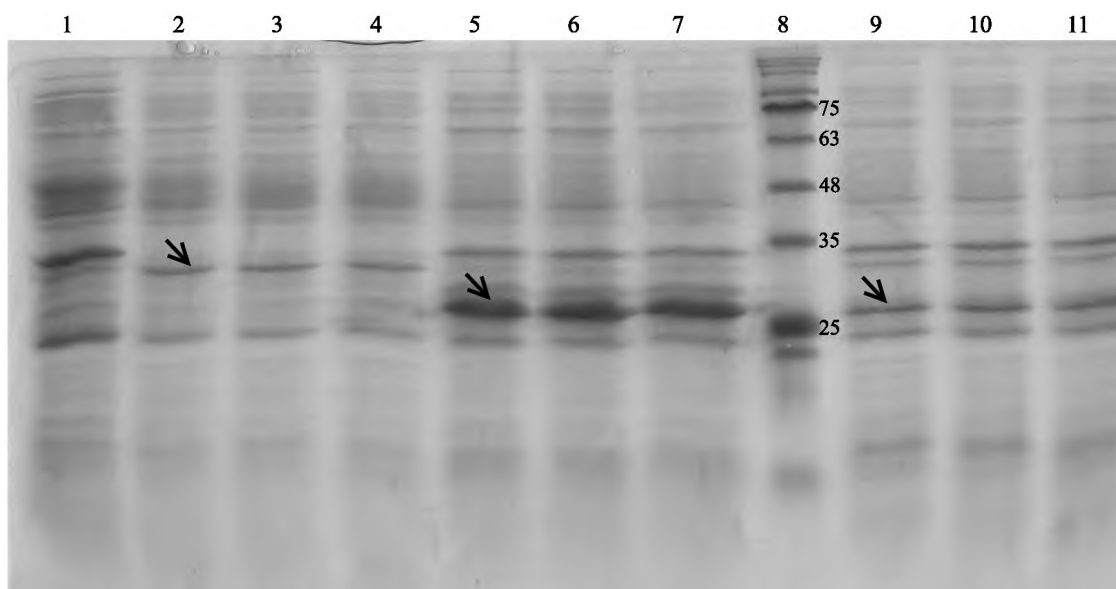


Рис. 3. Результаты ПААГ-электрофореза:
1 – отрицательный контроль; 2–4 – LOP (полноразмерный белок капсида, 31,23 кДа);
5–7 – SOP (укороченный белок капсида, 26,35 кДа (см. ниже));
8 – маркер молекулярной массы с указанием размеров белков;
9–11 – TP (укороченный неоптимизированный белок, 25 кДа).
Стрелками показаны целевые белки

Fig. 3. Results of PAGE electrophoresis:
1 – negative control; 2–4 – LOP (full-length capsid protein, 31.23 kDa);
5–7 – SOP (truncated capsid protein, 26.35 kDa (see below));
8 – molecular weight marker with protein sizes;
9–11 – TP (truncated unoptimized protein, 25 kDa).
Arrows indicate the target proteins

Последовательности праймеров, использованных в работе
Sequences of primers used in the work

Праймер	Сиквенс 5' → 3'	Рестриктазы	Размер, п. н.	Температура плавления, °C	GC-состав, %
CapsPshort	AAAAAGCTTATGTGGCGTCGTA AAA	HindIII	25	56,0	36
CapsP1	AAAAAGCTTATGACGTATACCCGTC	HindIII	25	55,1	40
CapsP2	TTTCTCGAGCGGGATCAGCG	XhoI	20	59,8	60

Примечание. Подчеркнуты сайты для указанных рестриктаз.

Создание генетической конструкции для экспрессии укороченного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Ранее установлено, что присутствие нуклеотидной последовательности N-концевого домена белка капсида затрудняет нормальную трансляцию белка капсида в бактериальных клетках [19]. В целях повышения уровня экспрессии сконструирована укороченная оптимизированная последовательность гена. Удаленный участок из 108 п. н. (см. рис. 1) соответствует N-концевому домену белка и не затрагивает его основные антигенные эпитопы [14; 15]. Индекс адаптации кодонов для укороченной и оптимизированной последовательностей равен 0,736 8 [26], что на 3,8 % превышает таковой для полноценного гена.

Укороченная генетическая последовательность амплифицирована из последовательности полно-размерного оптимизированного гена с помощью праймеров CapsP2 и CapsPshort (см. таблицу, рис. 4). Ампликон размером 609 п. н. клонирован в вектор pET-24b(+) по сайтам рестрикции XhoI и HindIII. Полученная конструкция названа pET-SOP (см. рис. 2). Ожидаемая молекулярная масса белкового продукта, названного SOP, составляет 26,35 кДа.

Экспрессия укороченного оптимизированного гена белка капсида ЦВС-2. Анализ результатов электрофореза белков в полиакриламидном геле (см. рис. 3) показал, что укороченный оптимизированный белок SOP составляет $(28,98 \pm 0,70) \%$ ($n = 21$) от общей массы клеточного белка.

Сравнение экспрессии различных вариантов модифицированных генов белка капсида ЦВС-2. Чтобы определить влияние оптимизации редких кодонов и удаления начального участка гена на уровень экспрессии, было проведено сравнение содержания вышеописанных белковых продуктов и белка TP, экспрессируемого с конструкции pET-TP3 [20]. Анализ результатов электрофореза показал, что укороченный неоптимизированный белок TP составлял $(20,49 \pm 1,05) \%$ ($n = 19$) от общей массы белка в клетке. Тест для парных сравнений (*U*-критерий Манна – Уитни) установил статистически значимую разницу в экспрессии исследуемых генов. Укороченный белок SOP нарабатывается в 2,23 раза эффективнее по сравнению с LOP ($p < 0,01$) и в 1,41 раза эффективнее, чем укороченный, но неоптимизированный белок TP ($p < 0,01$). Сравнение уровня экспрессии различных модифицированных вариантов белка капсида ЦВС-2 наглядно представлено в виде диаграммы на рис. 5. Таким образом, и оптимизация кодонов, и удаление N-участка положительно влияют на экспрессию гена белка капсида ЦВС-2, причем для достижения наиболее высокого уровня экспрессии следует использовать оба метода.

Значение полученных результатов и перспектива дальнейших исследований. Уровень экспрессии немодифицированного гена белка капсида относительно невысок для генно-инженерных штаммов – продуцентов целевых рекомбинантных белков [18; 20], в связи с чем необходим поиск эффективных методов оптимизации. Другими авторами проводились эксперименты по замене редких кодонов [20; 29; 30] и удалению 5'-концевого участка гена белка капсида цирковируса [18–20; 30]. Однако изучение экспрессии укороченной и оптимизированной версии гена белка капсида белорусского штамма вируса ранее не выполнялось, к тому же обычно осуществлялась замена относительно небольшого числа редких кодонов [20; 29]. Именно этот пробел и заполняет данная работа. Полученные конструкции демонстрируют статистически значимое повышение уровня экспрессии модифицированного гена белка капсида, что является важным этапом в создании улучшенной вакцины против отечественного варианта ЦВС-2.

В дальнейшем, помимо уровня экспрессии белка в клетке, необходимо изучить и другие факторы. Хотя удаленный фрагмент в укороченном варианте гена белка SOP и не затрагивает его основных антигенных доменов, следует учитывать потенциальное влияние данного участка на образование правильной конформации белка и сборку вирусных частиц, что, в свою очередь, может влиять на иммунизацию хозяина. Так, показано, что N-концевой участок белка капсида необходим для димеризации этого белка и сборки вирусоподобных частиц, похожих по структуре на частицы интактного вируса [31]. В связи с этим требуются дальнейшие исследования различных вариантов модифицированного гена в целях установления их влияния на иммунизацию свиней и выявления наиболее подходящего кандидата для создания вакцины против наиболее распространенных в Беларуси штаммов ЦВС-2.

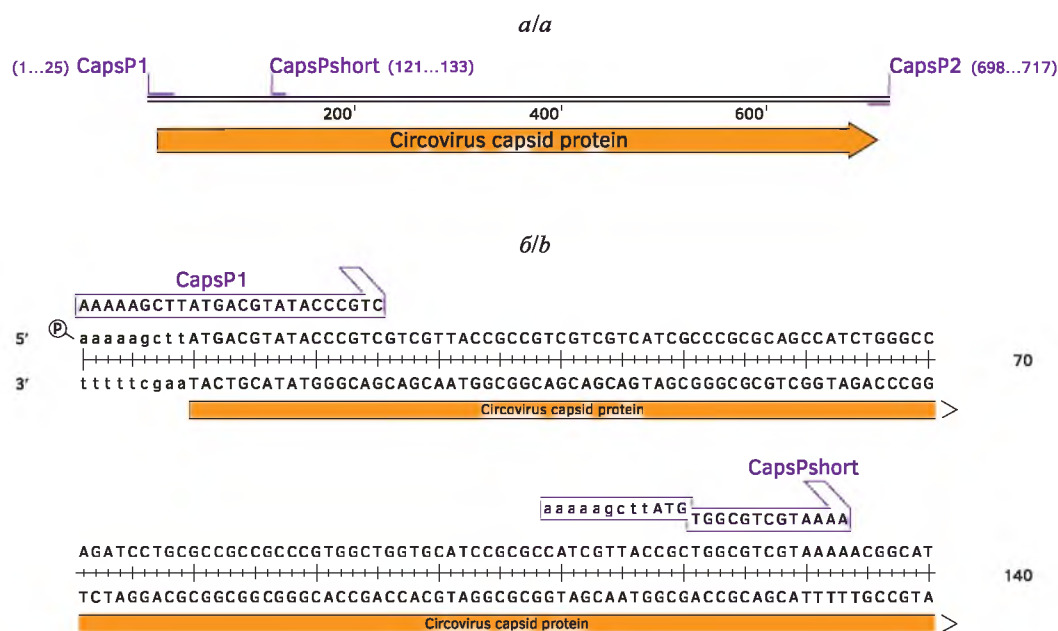


Рис. 4. Открытая рамка считывания оптимизированного гена белка капсида цирковируса. Показаны праймеры, которыми проводилась амплификация:
a – схематичное изображение последовательности;
b – 5'-конец генетической последовательности с праймерами для полноразмерного и укороченного гена

Fig. 4. Open reading frame of the optimized circovirus capsid protein gene. The primers used for amplification are shown: *a* – schematic representation of the sequence; *b* – 5'-end of the genetic sequence with primers for the full-length and the truncated gene

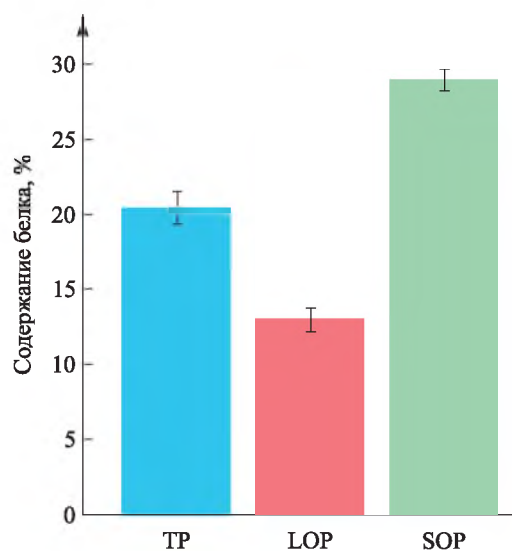


Рис. 5. Сравнение уровня экспрессии исследуемых белков. Высота столбцов соответствует среднему уровню экспрессии; усы показывают стандартную ошибку среднего
Fig. 5. Comparison of the expression level of the studied proteins. The height of the columns indicates the average level of expression; the whiskers show the standard error of the mean

Заключение

Таким образом, показано, что для эффективной экспрессии вирусного белка в клетках *E. coli*, помимо удаления N-концевого домена белка капсида, необходимо дополнительное повышение уровня продукции этого гетерологичного белка за счет оптимизации кодирующей последовательности гена.

Библиографические ссылки

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*. 1998;79(9):2171–2179. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2171.
2. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*. 2017;98(8):1997–1998. DOI: 10.1099/jgv.0.000871.
3. Opriessnig T, McKeown NE, Zhou E-M, Meng X-J, Halbur PG. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 2006;87(10):2923–2932. DOI: 10.1099/vir.0.82099-0.
4. Alarcon P, Rushton J, Wieland B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 sub-clinical infection in England – an economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013;110(2):88–102. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.02.010.
5. Segalés J. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Review of Vaccines*. 2015;14(3):473–487. DOI: 10.1586/14760584.2015.983084.
6. Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal*. 2012;194(2):151–157. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.06.031.
7. Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park S-J, et al. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Archives of Virology*. 2014;159(11):3107–3111. DOI: 10.1007/s00705-014-2164-6.
8. Beach NM, Meng X-J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*. 2012;164(1–2):33–42. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.041.
9. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*. 2000;81(9):2281–2287. DOI: 10.1099/0022-1317-81-9-2281.
10. Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzendorfer P, Mueller B, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*. 2004;98(2):81–88. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.10.014.
11. Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*. 2005;79(13):8262–8274. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8262-8274.2005.
12. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*. 2004;78(12):6297–6303. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6297-6303.2004.
13. Matzinger SR, Opriessnig T, Xiao C-T, Catanzaro N, Beach NM, Slade DE, et al. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*. 2016;498:82–93. DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.011.
14. Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*. 2000;81(7):1815–1824. DOI: 10.1099/0022-1317-81-7-1815.
15. Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, Thangthumnyom N, Wajjwalku W, Meng XJ. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*. 2004;78(15):8135–8145. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8135-8145.2004.
16. Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*. 2001;285(1):91–99. DOI: 10.1006/viro.2001.0922.
17. Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peiró S, Menzella HG. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:21. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00021.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Zhou J-Y, Shang S-B, Gong H, Chen Q-X, Wu J-X, Shen H-G, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
20. Прокулевич ВА, Кудин КВ. Экспрессия открытой рамки трансляции белка капсида ЦВС-2 в клетках *E. coli*. В: Пручковская ОН, редактор. *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 5*. Минск: Беларуская навука; 2013. с. 131–141.
21. Sambrook JF, Russell DW, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. [2100 p.].
22. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 4648 p.
23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. 2005;41(1):207–234. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
25. Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995;6(5):494–500. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80082-4.

26. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. *JCat*: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(suppl_2):W526–W531. DOI: 10.1093/nar/gki376.
27. Sharp PM, Wen-Hsiung Li. The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*. 1987;15(3):1281–1295. DOI: 10.1093/nar/15.3.1281.
28. Кудин КВ, Прокулевич ВА. Клонирование гена белка капсида белорусского штамма цирковируса свиней 2 типа. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2011;2:37–41.
29. Wentao Kong, Jian Kong, Shumin Hu, Wenwei Lu, Ke Wang, Mingjie Ji. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27(3):651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
30. Marceková Z, Psikal I, Kosinova E, Benada O, Sebo P, Bumba L. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *Journal of Virological Methods*. 2009;162(1–2):133–141. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.07.028.
31. Pei-Ching Wu, Wei-Li Lin, Chi-Ming Wu, Jiun-Ni Chi, Maw-Sheng Chien, Chienjin Huang. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;95(6):1501–1507. DOI: 10.1007/s00253-012-4015-2.

References

1. Meehan BM, McNeilly F, Todd D, Kennedy S, Jewhurst VA, Ellis JA, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. *Journal of General Virology*. 1998;79(9):2171–2179. DOI: 10.1099/0022-1317-79-9-2171.
2. Breitbart M, Delwart E, Rosario K, Segalés J, Varsani A, ICTV Report Consortium. ICTV virus taxonomy profile: Circoviridae. *Journal of General Virology*. 2017;98(8):1997–1998. DOI: 10.1099/jgv.0.000871.
3. Opriessnig T, McKeown NE, Zhou E-M, Meng X-J, Halbur PG. Genetic and experimental comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from cases with and without PCV2-associated lesions provides evidence for differences in virulence. *Journal of General Virology*. 2006;87(10):2923–2932. DOI: 10.1099/vir.0.82099-0.
4. Alarcon P, Rushton J, Wieland B. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 sub-clinical infection in England – an economic disease model. *Preventive Veterinary Medicine*. 2013;110(2):88–102. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2013.02.010.
5. Segalés J. Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Review of Vaccines*. 2015;14(3):473–487. DOI: 10.1586/14760584.2015.983084.
6. Chae C. Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *The Veterinary Journal*. 2012;194(2):151–157. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.06.031.
7. Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park S-J, et al. Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea. *Archives of Virology*. 2014;159(11):3107–3111. DOI: 10.1007/s00705-014-2164-6.
8. Beach NM, Meng X-J. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*. 2012;164(1–2):33–42. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.09.041.
9. Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *Journal of General Virology*. 2000;81(9):2281–2287. DOI: 10.1099/0022-1317-81-9-2281.
10. Mankertz A, Caliskan R, Hattermann K, Hillenbrand B, Kurzenoerfer P, Mueller B, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication. *Veterinary Microbiology*. 2004;98(2):81–88. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.10.014.
11. Liu J, Chen I, Kwang J. Characterization of a previously unidentified viral protein in porcine circovirus type 2-infected cells and its role in virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*. 2005;79(13):8262–8274. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8262-8274.2005.
12. Fenaux M, Opriessnig T, Halbur PG, Elvinger F, Meng XJ. A chimeric porcine circovirus (PCV) with the immunogenic capsid gene of the pathogenic PCV type 2 (PCV2) cloned into the genomic backbone of the nonpathogenic PCV1 induces protective immunity against PCV2 infection in pigs. *Journal of Virology*. 2004;78(12):6297–6303. DOI: 10.1128/JVI.78.12.6297-6303.2004.
13. Matzinger SR, Opriessnig T, Xiao C-T, Catanzaro N, Beach NM, Slade DE, et al. A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*. 2016;498:82–93. DOI: 10.1016/j.virol.2016.08.011.
14. Mahé D, Blanchard P, Truong C, Arnauld C, Le Cann P, Cariolet R, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology*. 2000;81(7):1815–1824. DOI: 10.1099/0022-1317-81-7-1815.
15. Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul PS, Thangthumnyom N, Wajjwalku W, Meng XJ. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *Journal of Virology*. 2004;78(15):8135–8145. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8135-8145.2004.
16. Liu Q, Tikoo SK, Babiuk LA. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology*. 2001;285(1):91–99. DOI: 10.1006/viro.2001.0922.
17. Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peiró S, Menzella HG. Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:21. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00021.
18. Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes*. 2007;34(2):199–204. DOI: 10.1007/s11262-006-0043-2.
19. Zhou J-Y, Shang S-B, Gong H, Chen Q-X, Wu J-X, Shen H-G, et al. *In vitro* expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *Journal of Biotechnology*. 2005;118(2):201–211. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.02.017.
20. Prokulevich UA, Kudzin KV. [Expression of the open reading frame of PCV2 capsid protein in *E. coli* cells]. In: Pruchkovskaya ON, editor. *Mikrobynye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Tom 5* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 5]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2013; p. 131–141. Russian.

21. Sambrook JF, Russell DW, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. [2100 p.].
22. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons; 2003. 4648 p.
23. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*. 2005; 41(1):207–234. DOI: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. *NIH Image to ImageJ*: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
25. Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1995;6(5):494–500. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80082-4.
26. Grote A, Hiller K, Scheer M, Münch R, Nörtemann B, Hempel DC, et al. *JCat*: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(suppl_2):W526–W531. DOI: 10.1093/nar/gki376.
27. Sharp PM, Wen-Hsiung Li. The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Research*. 1987;15(3):1281–1295. DOI: 10.1093/nar/15.3.1281.
28. Kudin KV, Prokulevich VA. [Cloning of the capsid gene of the Belarusian porcine circovirus type 2 strain]. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya*. 2011;2:37–41. Russian.
29. Wentao Kong, Jian Kong, Shumin Hu, Wenwei Lu, Ke Wang, Mingjie Ji. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27(3):651–657. DOI: 10.1007/s11274-010-0503-7.
30. Marcekova Z, Psikal I, Kosinova E, Benada O, Sebo P, Bumba L. Heterologous expression of full-length capsid protein of porcine circovirus 2 in *Escherichia coli* and its potential use for detection of antibodies. *Journal of Virological Methods*. 2009;162(1–2): 133–141. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.07.028.
31. Pei-Ching Wu, Wei-Li Lin, Chi-Ming Wu, Jiun-Ni Chi, Maw-Sheng Chien, Chienjin Huang. Characterization of porcine circovirus type 2 (PCV2) capsid particle assembly and its application to virus-like particle vaccine development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;95(6):1501–1507. DOI: 10.1007/s00253-012-4015-2.

Статья поступила в редакцию 18.06.2020.
Received by editorial board 18.06.2020.

ВЛИЯНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПИГМЕНТНЫЙ СОСТАВ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*¹

Е. И. ПЕЧЕНКИНА¹*, Т. В. САМОВИЧ¹*, Н. В. КОЗЕЛ¹

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

Установлена стимуляция синтеза астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis* светом высокой интенсивности в сочетании с действием фотосенсибилизатора бенгальского розового. Выявлено, что при использовании бенгальского розового в качестве дополнительного индуктора каротиногенеза на свету высокой интенсивности происходит увеличение сухого веса гематококка, а также диаметра клеток в суспензии по сравнению с эффектом действия на клетки водоросли только света высокой интенсивности. Наблюдаемые приросты сухого веса существенны: превышение над контролем достигает 40 %. Высказано предположение, что увеличение сухого веса, диаметра клеток гематококка и выхода астаксантина при добавлении в среду инкубации *H. pluvialis* фотосенсибилизатора на фоне действия света высокой интенсивности связано не с усилением стрессового воздействия (так как использованные концентрации бенгальского розового слишком малы для индукции фотоокислительного стресса), а с сигнальными свойствами генерируемого бенгальским розовым синглетного кислорода, который может являться первичным агентом в трансдукции сигнала, запускающего повышенный синтез астаксантина в клетках *H. pluvialis*.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*; каротиногенез; астаксантин; окислительный стресс; активные формы кислорода; бенгальский розовый; синглетный кислород.

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:

Печенкина ЕИ, Самович ТВ, Козел НВ. Влияние фотосенсибилизатора бенгальского розового на продуктивность и пигментный состав *Haematococcus pluvialis*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1: 58–69.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-58-69>

For citation:

Pechenkina EI, Samovich TV, Kozel NV. The influence of Rose Bengal photosensitizer on the productivity and pigment composition of *Haematococcus pluvialis*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;1:58–69. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-58-69>

Авторы:

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

Татьяна Викторовна Самович – 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:

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>

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>

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

kozel.mikalai@gmail.com

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

THE INFLUENCE OF ROSE BENGAL PHOTSENSITIZER ON THE PRODUCTIVITY AND PIGMENT COMPOSITION OF *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

E. I. PECHENKINA^a, T. V. SAMOVICH^a, N. V. KOZEL^a

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

Corresponding author: N. V. Kozel (kozel.mikalai@gmail.com)

The stimulation of astaxanthin synthesis in *Haematococcus pluvialis* cells under high-intensity light in the combined action of Rose Bengal photosensitizer has been established. It was revealed that when Rose Bengal was used as an additional inducer of carotenogenesis in high-intensity light, the dry weight of the *Haematococcus* and the diameter of the cells in suspension increase compared to the action of only high-intensity light on algae cells. The observed increases in dry weight are significant and reach 40 % excess over control. We suggest that the increase in dry weight, *Haematococcus* cell diameter and astaxanthin yield when *H. pluvialis* photosensitizer is added to the incubation medium against the background of high-intensity light is not associated with increased stress (since the used concentrations of Rose Bengal are too small to induce photo-oxidative stress), but the signaling properties of the generated Rose Bengal singlet oxygen, which may be the primary agent in the transduction of a signal that triggers increased synthesis of astaxanthin in *H. pluvialis* cells.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*; carotenogenesis; astaxanthin; oxidative stress; reactive oxygen species; Rose Bengal; singlet oxygen.

Введение

Микроводоросль *Haematococcus pluvialis* является одним из наиболее перспективных натуральных источников кетокаротиноида астаксантина (3,3'-дигидрокси-β,β-каротин-4,4'-диона) – красного пигмента, широко используемого в сельском хозяйстве, пищевой и фармакологической промышленности, а также косметологии благодаря его чрезвычайно высокой антиоксидантной активности [1; 2]. Содержание астаксантина в клетках *H. pluvialis* составляет 2–5 % от сухой массы водоросли [3; 4]. Химически синтезированный астаксантин, представляющий собой смесь трех стереоизомеров, отличается от натурального структурно и обладает гораздо меньшей биоактивностью, чем природный пигмент [5–7]. Значительно возросший в последние годы интерес к *H. pluvialis* связан с его промышленным производством, поиском способов увеличения общей продуктивности и выхода астаксантина, а также с желанием познать природу механизмов, контролирующих эти процессы.

Астаксантин, один из наиболее эффективных среди известных на сегодняшний день природных антиоксидантов, относится к каротиноидам. Установлено, что антиоксидантная активность астаксантина в определенных условиях на порядок выше, чем у β-каротина и α-токоферола [2; 8; 9]. В отличие от β-каротина астаксантин не является провитамином А, поэтому норму его суточного потребления по медицинским показаниям можно увеличивать до 20 мг без угрозы побочных эффектов, характерных для высоких концентраций витамина А [2; 10; 11]. Кроме того, астаксантин обладает ярко выраженным противовоспалительным действием, а также способностью проникать через гематоэнцефалический барьер, что определяет его эффективность при профилактике и лечении заболеваний центральной нервной системы [2].

В нормальных условиях клетки гематококка имеют зеленую окраску и являются достаточно подвижными. Однако при попадании в неблагоприятные, стрессовые условия они прекращают рост, превращаясь в неподвижные цисты, и начинают накапливать астаксантин для защиты от повышения внутриклеточного окислительного потенциала, которое обусловлено индуцированным стрессом. При этом клетки водоросли приобретают насыщенно-красный цвет. В нормальных условиях астаксантин накапливается в хлоропластах, в стрессовых условиях – в липидных везикулах в цитозоле.

Наиболее важной проблемой при культивировании гематококка в промышленных масштабах является повышение эффективности продукции клетками микроводоросли астаксантина. Есть два основных подхода к решению этой проблемы – изменение клеточного метаболизма путем генетической модификации (чаще всего речь идет о мутагенезе), а также увеличение выхода астаксантина за счет оптимизации условий культивирования водоросли с применением определенных химических агентов. Первый способ хотя и более эффективен, но крайне трудоемок и длителен, поэтому в своем исследовании

мы обратились к регуляции метаболизма клеток гематококка путем внесения в культуральную среду красителя-фотосенсибилизатора бенгальского розового (БР или RB), способного на свету генерировать молекулярный синглетный кислород [12] и тем самым вызывать накопление в клетках водоросли астаксантина [13]. Исследование этого процесса, а именно влияния фотосенсибилизатора БР на накопление астаксантина в клетках микроводоросли *H. pluvialis*, стало целью данной работы.

Материалы и методы исследования

Объектом исследований служила альгологически чистая культура одноклеточной зеленой жгутиковой микроводоросли *H. pluvialis* (штамм IBCE H-17) из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [14]. Культуру гематококка стерильно пересевали на чашки Петри с твердой питательной средой BBM [15]. Чашки выносили на свет, подращивали культуру гематококка в течение 5–7 дней при температуре $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$. После этого клетки водоросли смывали с чашек Петри стерильной средой Рудика [16] объемом 250–300 мл, выращивали в накопительном режиме при освещении светодиодными лампами белого дневного света (цветовая температура 4000 К) с интенсивностью 20 микромолей квантов на квадратный метр за секунду (далее – $\text{мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и фотопериодом 14 ч света/10 ч темноты в течение суток. Температура в световом периоде $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$. Культуру гематококка барботировали (продували воздухом) с помощью компрессора для аквариумов АСО-9903 (*Hailea*, Китай), подающего 4,2 л воздуха в минуту. Через 4–5 сут выращивания суспензию гематококка, находящуюся в стадии активного роста и содержащую около 80 % подвижных клеток, использовали в экспериментах. Для подсчета количества клеток гематококка в суспензии использовали камеру Горяева. Продуктивность *H. pluvialis* определяли по изменению биомассы, которую оценивали по поглощению и светорассеянию суспензий водоросли в красной области спектра при 680 и 750 нм на спектрофотометре Solar PB 2201 (ЗАО «Солар», Беларусь). Поглощение при 680 нм соответствует максимуму поглощения хлорофиллов, а поглощение при 750 нм определяется в основном светорассеянием на клетках *H. pluvialis*. Для количественного расчета сухой массы *H. pluvialis* (в миллиграммах на миллилитр) использовали формулу, описанную Т. Кацудой (Т. Katsuda) с соавторами в работе [17]:

$$\text{Сухой вес} = (3,04 \cdot \frac{\text{ОП}_{750} - \text{ОП}_{680}}{\text{ОП}_{680}} + 1,4) \cdot \text{ОП}_{680},$$

где ОП_{680} и ОП_{750} – оптическая плотность при 680 и 750 нм соответственно.

Отметим, что нами была проведена оценка корректности применения этой формулы для исследуемого штамма *H. pluvialis* и спектрофотометра Solar PB 2201, заключавшаяся в сопоставлении расчетных величин и фактических значений сухой массы *H. pluvialis* после высушивания водоросли. Проведенный анализ подтвердил высокую точность расчета сухого веса водоросли согласно такому подходу. Диаметр клеток гематококка определяли на персональном компьютере программным методом с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 с камерой Nikon DS-Fi2 (после проведения предварительной калибровки), используя программное обеспечение *NIS-Elements v.4.40* (Nikon, Япония). Для получения статистически достоверных значений устанавливали диаметр не менее 50 клеток, после чего рассчитывали среднее арифметическое и стандартное отклонение среднего арифметического.

Пигментный состав клеток *H. pluvialis* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ или HPLC), модифицированным в лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси согласно работам [17–21].

При проведении ВЭЖХ использовали следующие реактивы и растворы: 100 % ацетон; раствор А, содержащий 90 % ацетонитрила, 9,9 % фильтрованной дистиллированной воды (фильтр – нейлоновая мембрана с диаметром пор $d = 0,45 \text{ мкм}$), 0,1 % триэтиламина; раствор В, представляющий собой 100 % этилацетат. ВЭЖХ осуществляли с помощью хроматографа серии LC-20 Prominence (*Shimadzu*, Япония), используя хроматографическую колонку типа C18 Nucleodur C18 Gravity (размер частиц 5 мкм, длина колонки 15 см) производства компании *Macherey-Nagel* (Германия).

Для извлечения фотосинтетических пигментов клетки *H. pluvialis* осаждали 10 мин при 17 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17 (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, США). Осадок помещали в охлажденные (4°C) фарфоровые ступки, добавляли 100 мг кварцевого песка, приливали 0,5 мл 100 % ацетона и растирали до гомогената. Полученный гомогенат переносили в эппендорфы объемом 2 мл. Ступки смывали 1,5 мл 100 % ацетона. Если объем супернатанта был менее 2 мл, то его доводили до 2 мл 100 % ацетоном. Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 17 000 g. Супернатант переносили в мерные пробирки. Осадок ресуспендировали с ацетоном и центрифугировали 10 мин при 17 000 g. Процедуру повторяли до получения бесцветного супернатанта и осадка. Фиксировали конечный объем раствора пигментов.

Для извлечения астаксантина клетки *H. phuvialis* осаждали 10 мин при 17 000 g на центрифуге Heraeus Pico 17. Осадок ресуспендировали с добавлением кварцевого песка и 2 мл метанола в течение 5 мин, после чего центрифугировали 10 мин при 17 000 g. Процедуру повторяли до получения бесцветного супернатанта и осадка. Фиксировали конечный объем раствора пигментов. Астаксантин с жирными кислотами образует большое количество эфиров, в связи с чем для количественного определения пигмента требуется проведение процедуры сапонификации. После сапонификации жирные кислоты отщепляются и астаксантин выходит в виде нескольких стереоизомеров, среди которых преобладает *транс*-астаксантин [22]. Для сапонификации к 1,0 мл суммарного экстракта добавляли 20 мкл 1 моль/л КОН и оставляли в темноте на 6 ч при комнатной температуре. Полученный экстракт использовали для хроматографии.

В вials для хроматографии вносили по 0,5 мл супернатанта и помещали их в камеру хроматографа. Объем инъекции составлял 50 мкл. Разделение пигментов в колонке проводили с использованием растворов А и В с потоком 0,5 мл/мин согласно программе (табл. 1).

Таблица 1

Программа изменения концентрации растворителей
для разделения фотосинтетических пигментов
на хроматографической колонке Nucleodur C18 Gravity

Table 1

The program for changing of the concentration
of solvents for separation of photosynthetic pigments
on a Nucleodur C18 Gravity chromatographic column

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	Раствор А, %	Раствор В, %	Режим
0,01	0,5	100	0	Линейный градиент
15,0	0,5	0	100	Изократический режим
18,0	0,5	0	100	Линейный градиент
19,0	0,5	100	0	Изократический режим
25,0	0,5	100	0	Остановка

Пигменты регистрировали спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей SPD-M20A (Shimadzu) в диапазоне 200–800 нм. Для визуализации профиля хроматограммы выделяли спектр поглощения при 440 и 650 нм (для фотосинтетических пигментов), а также 475 нм (для астаксантина). Для количественного определения пигментов применяли стандарты пигментов неоксантина, виолаксантина, лютеина, астаксантина, β -каротина, хлорофилла *a* и хлорофилла *b*.

В работе 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 производства Sigma-Aldrich (Германия). В ходе обработки экспериментальных данных вычисляли среднее, стандартное отклонение среднего. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента для принятого уровня значимости ($p \leq 0,05$) и соответствующего числа степеней свободы. Представлены результаты 3 опытов в 3-кратной биологической повторности. При проведении морфометрических исследований и определении сухого веса количество независимых повторностей было больше десяти. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакеты программ Excel 2019, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [23].

Результаты и их обсуждение

Как известно, БР имеет один из самых высоких квантовых выходов генерации синглетного кислорода среди существующих фотосенсибилизаторов и при этом наиболее благоприятный с точки зрения индукции фотоокислительного стресса в растительных системах спектр поглощения с максимумом в зеленой области. Однако в предварительных экспериментах по индукции каротиногенеза этим фотосенсибилизатором было установлено, что высокие концентрации БР в среде инкубации водоросли, вызывающие фотоокислительный стресс, приводят не только к индукции синтеза астаксантина в клетках гематококка, но и к существенному уменьшению количества клеток. Такая стимуляция каротиногенеза оказалась менее эффективной по сравнению с наиболее распространенным способом – действием

света высокой интенсивности (более $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$). Однако нами было также выявлено, что использование малых концентраций фотосенсибилизатора на фоне действия света высокой интенсивности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) приводит к увеличению продукции астаксантина гематококком, что видно по интенсивности окраски суспензии водоросли (рис. 1). В последующих экспериментах исследовали именно такой способ запуска синтеза астаксантина в клетках гематококка, выдвинув предположение, что стимуляция накопления каротиноидов связана не с фототоксичными свойствами БР, а с сигнальной функцией синглетного кислорода, который эффективно генерируется на свету в присутствии фотосенсибилизатора.

Для индукции накопления астаксантина в клетках гематококка мы использовали схему, состоящую из двух этапов. На первом этапе добивались максимального прироста биомассы водоросли при нормальных условиях культивирования с последующим переходом клеток в неподвижное состояние (стадия активного роста). На втором этапе выносили полученную культуру на свет высокой интенсивности для индукции накопления астаксантина в клетках водоросли. Фотосенсибилизатор вводили непосредственно в суспензию перед помещением культуры на свет высокой интенсивности. Контролем служила культура с фотосенсибилизатором или без него, находившаяся под нормальным освещением, либо культура без фотосенсибилизатора, выращенная на свету высокой интенсивности.

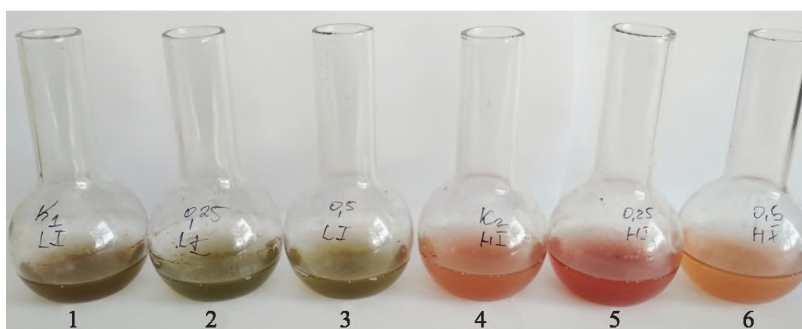


Рис. 1. Суспензия *H. pluvialis* после инкубации на свету высокой интенсивности ($120 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, варианты 4–6) и при нормальном освещении (варианты 1–3) с предварительным добавлением в культуральную среду фотосенсибилизатора БР в разной концентрации: варианты 1 и 4 – 0 мкмоль/л (контроль); варианты 2 и 5 – $0,25 \text{ мкмоль/л}$; варианты 3 и 6 – $0,5 \text{ мкмоль/л}$

Fig. 1. Suspension of *H. pluvialis* after incubation under high-intensity light ($120 \text{ μmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, options 4–6) and under normal lighting (options 1–3) with preliminary addition of RB photosensitizer in different concentrations to the culture medium: options 1 and 4 – 0 μmol/L (control); options 2 and 5 – 0.25 μmol/L ; options 3 and 6 – 0.5 μmol/L

Далее при исследовании действия БР как индуктора накопления астаксантина в клетках гематококка определяли количество и размер клеток *H. pluvialis*, а также сухой вес водоросли. Экспериментальные данные представлены в табл. 2. Выявлено увеличение сухого веса гематококка при использовании фотосенсибилизатора БР в качестве дополнительного к свету высокой интенсивности индуктора каротиногенеза. Превышение над контролем варьировало в зависимости от концентрации фотосенсибилизатора и количества клеток в исходной суспензии от 21 до 41 % (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние БР на продуктивность,
диаметр и количество клеток микроводоросли *H. pluvialis*

Table 2

The effect of RB on the productivity,
diameter and number of cells of the microalgae *H. pluvialis*

Варианты опыта	Интенсивность света	Концентрация БР, мкмоль/л	Сухой вес, мг/мл	Количество клеток, тыс. ед./мл	Диаметр клеток, мкм
Начало эксперимента	Низкая	–	0,47	$491,89 \pm 39,76$	$17,97 \pm 0,37$
1	Низкая	0 (контроль)	$0,37 \pm 0,02$	$320,95 \pm 17,27$	$24,74 \pm 0,34$
2	Низкая	0,25	$0,37 \pm 0,01$ (100)	$314,33 \pm 21,03$ (98)	$22,63 \pm 0,29^*$ (92)
3	Низкая	0,5	$0,36 \pm 0,04$ (97)	$335,65 \pm 50,72$ (105)	$24,34 \pm 0,32$ (98)

Окончание табл. 2
Ending table 2

Варианты опыта	Интенсивность света	Концентрация БР, мкмоль/л	Сухой вес, мг/мл	Количество клеток, тыс. ед./мл	Диаметр клеток, мкм
4	Высокая	0 (контроль)	$0,24 \pm 0,03$	$249,33 \pm 35,28$	$26,44 \pm 0,42$
5	Высокая	0,25	$0,34 \pm 0,03^*$ (141)	$235,17 \pm 14,90$ (94)	$27,34 \pm 0,44^*$ (103)
6	Высокая	0,5	$0,29 \pm 0,05^*$ (121)	$225,28 \pm 31,99$ (90)	$24,18 \pm 0,30^*$ (92)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$. В скобках указан процент к контролю.

Установлено увеличение размера клеток *H. pluvialis* в процессе культивирования как при низкой, так и при высокой освещенности, что указывает на переход их в стадию образования цист. Из особенностей стоит отметить несколько меньшие размеры клеток водоросли при использовании БР на свету низкой интенсивности относительно соответствующего контроля и разнонаправленное изменение диаметра клеток для разных концентраций фотосенсибилизатора на свету высокой интенсивности (добавление 0,25 мкмоль/л БР приводило к достоверному увеличению диаметра клеток, а 0,5 мкмоль/л – к уменьшению (см. табл. 1)). Достоверного изменения количества клеток в опытных вариантах по сравнению с контролем не установлено (см. табл. 1).

Таким образом, исследование влияния БР на сухой вес и морфометрические показатели клеток водоросли дает основания считать целесообразным использование данного фотосенсибилизатора для повышения продукции астаксантина клетками гематококка. Об этом свидетельствует увеличение под действием БР сухого веса и диаметра клеток в суспензии. Отметим, что наблюдаемый при добавлении фотосенсибилизатора на свету высокой интенсивности эффект указывает не на усиление стрессового воздействия через индукцию БР фотоокислительного стресса, а на сигнальные свойства синглетного кислорода, который, видимо, является первичным агентом в трансдукции сигнала, запускающего защитные механизмы в клетках водоросли.

Далее из клеток в полученных суспензиях извлекли фотосинтетические пигменты, разделили последние с помощью ВЭЖХ и определили их содержание. Анализ пигментных экстрактов позволил выявить в клетках исходной культуры *H. pluvialis* наличие пигментов, участвующих в фотосинтезе, – неоксантина, виолаксантина, лютеина, хлорофиллов *a* и *b*, β -каротина. На рис. 2 представлена хроматограмма экстракта пигментов суспензии *H. pluvialis*, выращенной в нормальных условиях освещения без добавления фотосенсибилизатора, с ярко выраженными пиками неоксантина (пик 1), виолаксантина (пик 2), лютеина (пик 3), хлорофилла *b* (пик 4), хлорофилла *a* (пик 5) и β -каротина (пик 6).

На рис. 3 представлены нормированные на единицу спектры выделенных пигментов, зарегистрированные спектрофотометрическим детектором с диодной матрицей.

Хроматограммы экстрактов пигментов из клеток гематококка, накопивших астаксантин, существенно отличаются от таковых для исходной культуры как до сапонификации (рис. 4), так и после нее (рис. 5). Исходя из первой хроматограммы, до сапонификации пики, принадлежащие эфирам астаксантина, накладываются на пики хлорофилловых пигментов. На второй хроматограмме видны две формы астаксантина (*транс*-, *цис*-) и β -каротин.

Для более точного определения содержания хлорофиллов *a* и *b* в условиях повышенного накопления астаксантина, эфиры которого экранируют хлорофилл, дополнительно проводили визуализацию пиков хроматограммы при 650 нм, исключая таким образом из профиля хроматограммы каротиноиды, которые в этой области не поглощают свет (рис. 6). На рис. 6 видны только две полосы, принадлежащие хлорофиллу *b* (время удержания 7,90 мин) и хлорофиллу *a* (время удержания 8,55 мин). Пигменты были идентифицированы по спектрам поглощения (см. рис. 3).

Анализ содержания фотосинтетических пигментов в клетках гематококка показал, что на свету низкой интенсивности добавление БР в концентрации 0,25 и 0,5 мкмоль/л (в среде инкубации) приводит к увеличению содержания практически всех фотосинтетических пигментов – хлорофилла и каротиноидов (табл. 3). Однако на свету высокой интенсивности мы наблюдали противоположный результат: введение БР в среду инкубации вызывало существенное снижение количества хлорофилла и каротиноидов (см. табл. 3). Причем наибольшее (для некоторых пигментов 3-кратное) снижение мы наблюдали при использовании БР в концентрации 0,25 мкмоль/л. В литературе есть многочисленные сведения, указывающие на редукцию фотосинтетических пигментов, таких как хлорофилл, ксантофилловые каротиноиды неоксантин, виолаксантин и лютеин, а также β -каротин, в ответ на запуск сверхпродукции клетками водоросли астаксантина. Поэтому далее мы проанализировали содержание в экспериментальных образцах разных изомеров астаксантина.

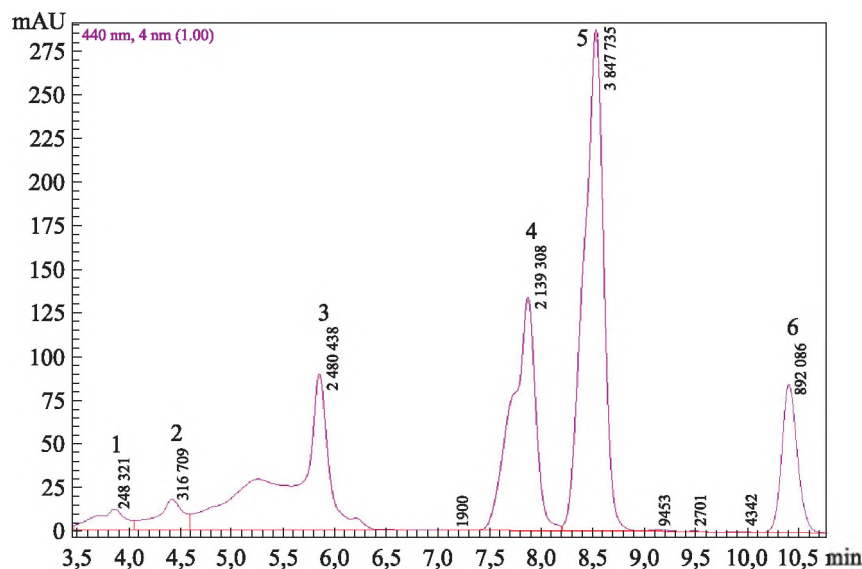


Рис. 2. Хроматограмма экстракта пигментов суспензии *H. pluvialis* (исходная культура):
пик 1 – неоксантин (время удержания 3,90 мин); пик 2 – виолаксантин (время удержания 4,45 мин);
пик 3 – лютеин (время удержания 5,90 мин); пик 4 – хлорофилл *b* (время удержания 7,90 мин);
пик 5 – хлорофилл *a* (время удержания 8,55 мин); пик 6 – β -каротин (время удержания 10,45 мин)

Fig. 2. Chromatogram an extract of pigments of a suspension of *H. pluvialis* (source culture):
peak 1 – neoxanthin (retention time 3.90 min); peak 2 – violaxanthin (retention time 4.45 min);
peak 3 – lutein (retention time 5.90 min); peak 4 – chlorophyll *b* (retention time 7.90 min);
peak 5 – chlorophyll *a* (retention time 8.55 min); peak 6 – β -carotene (retention time 10.45 min)

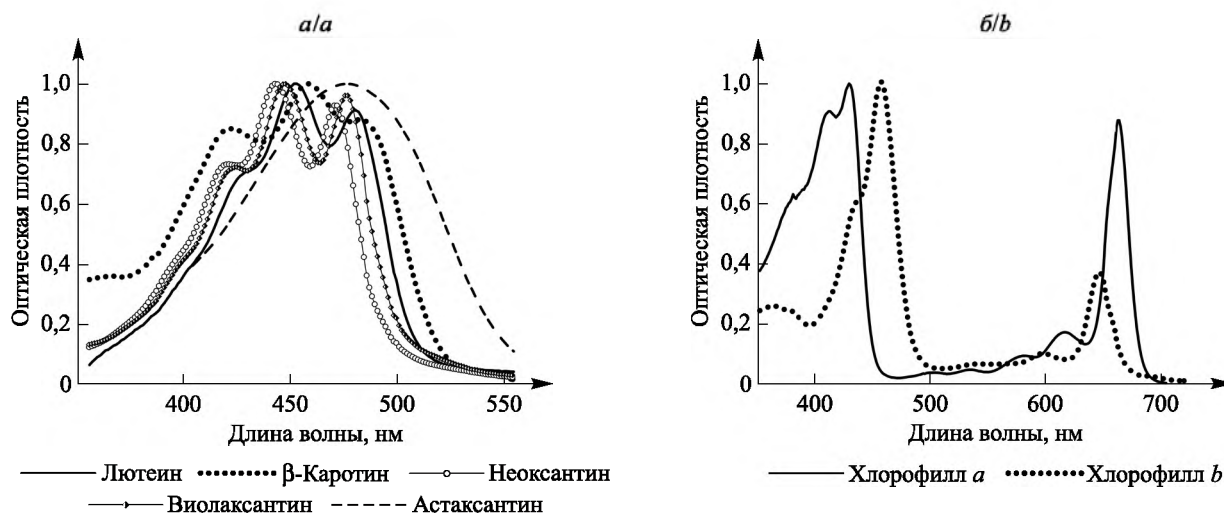


Рис. 3. Спектры поглощения пигментов, выделенных из клеток *H. pluvialis* (спектры нормированы на единицу по основному максимуму поглощения)

Fig. 3. Absorption spectra of pigments extracted from *H. pluvialis* cells (the spectra are normalized according to the main absorption maximum)

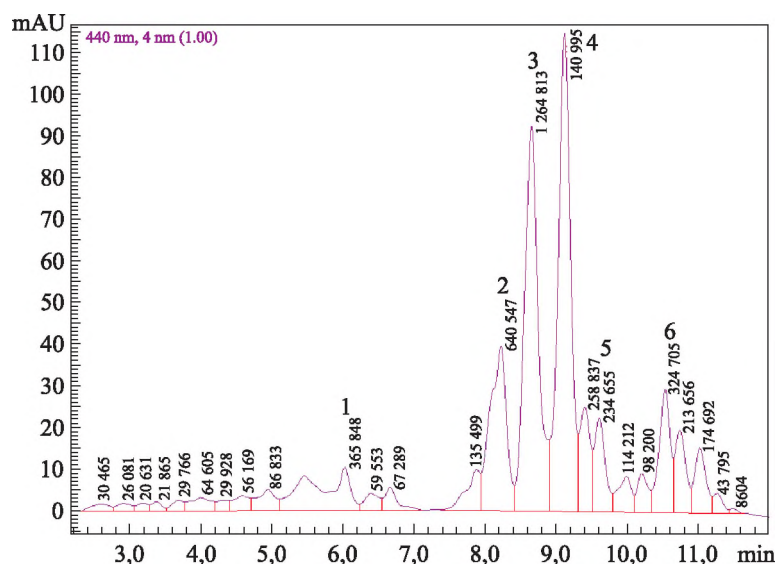


Рис. 4. Хроматограмма экстракта пигментов из клеток *H. phuvialis* до сапонификации:
пик 1 – лютеин (время удержания 5,90 мин); пик 2 – хлорофилл *b* (время удержания 7,90 мин);
пик 3 – хлорофилл *a* (время удержания 8,55 мин); пики 4–6 – эфиры астаксантина
Fig. 4. Chromatogram of the extract of pigments from *H. phuvialis* cells before saponification:
peak 1 – lutein (retention time 5.90 min); peak 2 – chlorophyll *b* (retention time 7.90 min),
peak 3 – chlorophyll *a* (retention time 8.55 min); peaks 4–6 – astaxanthin esters

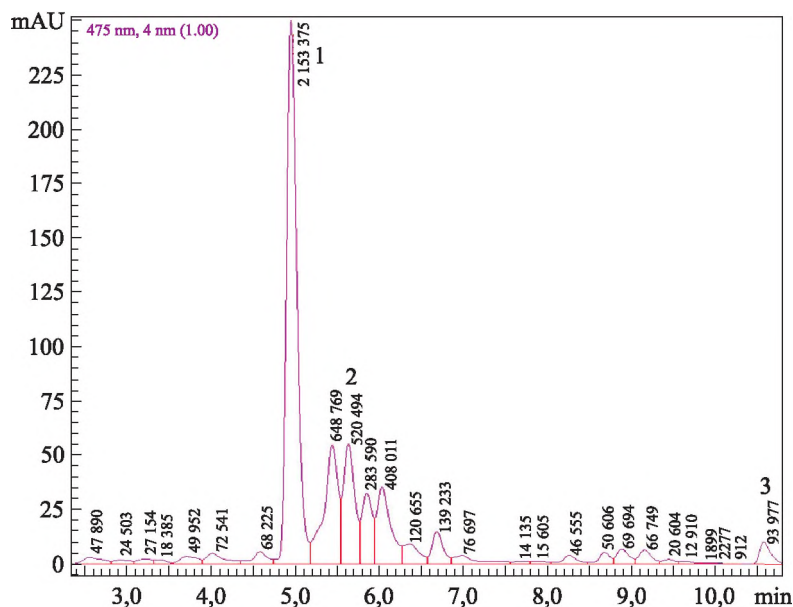


Рис. 5. Хроматограмма экстракта пигментов из клеток *H. phuvialis* после сапонификации:
пик 1 – *транс*-астаксантин (время удержания 4,95 мин);
пик 2 – *цис*-астаксантин (время удержания 5,45; 5,65; 5,85 и 6,10 мин);
пик 3 – β -каротин (время удержания 10,45 мин)
Fig. 5. Chromatogram of the extract of pigments from *H. phuvialis* cells after saponification:
peak 1 – *trans*-astaxanthin (retention time 4.95 min);
peak 2 – *cis*-astaxanthin (retention time 5.45; 5.65; 5.85 and 6.10 min);
peak 3 – β -carotene (retention time 10.45 min)

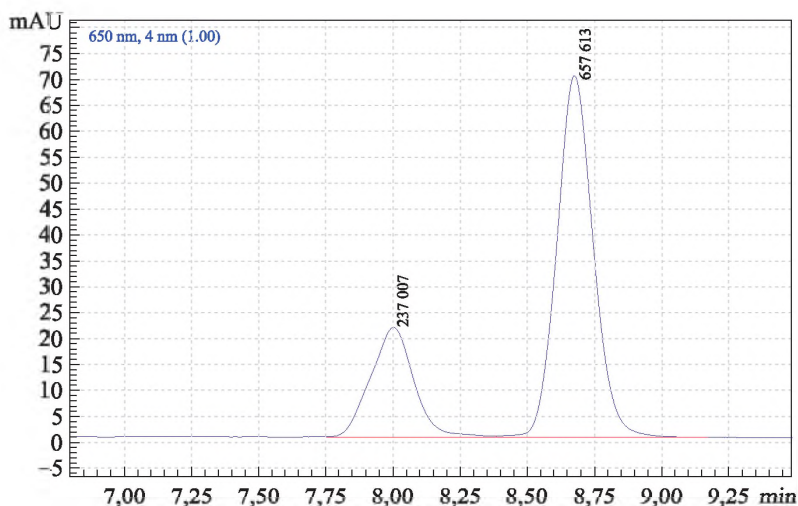


Рис. 6. Хроматограмма экстракта пигментов из клеток *H. pluvialis* до сапонификации, визуализированная при 650 нм

Fig. 6. Chromatogram of the extract of pigments from *H. pluvialis* cells before saponification, visualized at 650 nm

Таблица 3

Влияние БР на содержание фотосинтетических пигментов в клетках *H. pluvialis*

Table 3

Effect of RB on the content of photosynthetic pigments in *H. pluvialis* cells

Пигменты	Содержание в опытных образцах, мкг/мл					
	Свет низкой интенсивности			Свет высокой интенсивности		
	0 мкмоль/л БР (контроль)	0,25 мкмоль/л БР	0,5 мкмоль/л БР	0 мкмоль/л БР (контроль)	0,25 мкмоль/л БР	0,5 мкмоль/л БР
Неоксантин	0,011 ± 0,004	0,051 ± 0,012* (464)	0,046 ± 0,011* (418)	0,017 ± 0,001	Н. о.	Н. о.
Виолаксантин	0,010 ± 0,005	0,039 ± 0,009* (390)	0,026 ± 0,007* (260)	0,017 ± 0,003	Н. о.	Н. о.
Лютеин	0,258 ± 0,061	0,340 ± 0,017* (132)	0,430 ± 0,021* (167)	0,245 ± 0,061	0,112 ± 0,018* (46)	0,227 ± 0,100 (93)
Хлорофилл <i>b</i>	0,374 ± 0,054	0,482 ± 0,022* (129)	0,626 ± 0,034* (167)	0,313 ± 0,038	0,111 ± 0,002* (32)	0,266 ± 0,101 (85)
Хлорофилл <i>a</i>	1,248 ± 0,201	1,632 ± 0,218* (131)	1,985 ± 0,166* (159)	1,133 ± 0,111	0,381 ± 0,018* (36)	0,950 ± 0,344 (84)
β-Каротин	0,266 ± 0,053	0,217 ± 0,044 (82)	0,390 ± 0,032* (146)	0,313 ± 0,031	0,162 ± 0,076* (52)	0,248 ± 0,104 (73)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$; н. о. – не обнаружено. В скобках указан процент к контролю.

Анализ содержания астаксантина в клетках *H. pluvialis* показал существенное увеличение количества этого пигмента только при использовании света высокой интенсивности. Установлено, что в данном случае добавление фотосенсибилизатора БР обеспечивает повышение продукции астаксантина клетками гематококка примерно на 20 %. В то время как применение БР на свету низкой интенсивности лишь уменьшало содержание этого каротиноида в клетках водоросли относительно контроля (суспензия без БР), что соответствует увеличению в них хлорофилла и других фотосинтетических пигментов и подтверждает предположение об отсутствии токсичного действия БР в используемых концентрациях на клетки *H. pluvialis*. Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты проведения ВЭЖХ пигментов *H. phuvialis* после воздействия на клетки водоросли света высокой интенсивности в присутствии фотосенсибилизатора БР и без него (контроль)

Table 4

The results of the HPLC of *H. phuvialis* pigments after exposure to light algae cells of high intensity in the presence of RB photosensitizer and without RB (control)

Концентрация БР, мкмоль/л	Содержание пигментов, мкг/мл			
	<i>транс</i> -Астаксантин	<i>цис</i> -Астаксантин	Суммарный астаксантин	β-Каротин
0 (контроль)	3,99 ± 0,15 (100)	1,09 ± 0,06 (100)	5,08 ± 0,21 (100)	0,033 ± 0,002 (100)
0,25	5,00 ± 0,21* (125,2)	1,23 ± 0,02* (113,0)	6,23 ± 0,23* (122,6)	0,041 ± 0,005* (122,8)
0,5	4,36 ± 0,12* (109,3)	1,14 ± 0,03 (105,3)	5,51 ± 0,15* (108,4)	0,044 ± 0,006* (133,3)

Примечание. * – достоверные различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$. В скобках указан процент к контролю.

Закключение

Таким образом, установлена 20 % стимуляция синтеза астаксантина в клетках *H. phuvialis* штамма IBCE H-17 светом высокой интенсивности в сочетании с действием фотосенсибилизатора БР. Выявлено, что при использовании БР в качестве дополнительного индуктора каротиногенеза на свету высокой интенсивности происходит увеличение сухого веса гематококка, а также диаметра клеток в суспензии по сравнению с результатом воздействия на клетки водоросли только света высокой интенсивности. Наблюдаемые приросты сухого веса существенны и достигают 40 % по отношению к контролю. Мы предполагаем, что увеличение сухого веса, диаметра клеток гематококка, а также выхода астаксантина при добавлении в среду инкубации *H. phuvialis* фотосенсибилизатора на фоне действия света высокой интенсивности связано не с усилением стрессового воздействия (так как использованные концентрации БР слишком малы для индукции фотоокислительного стресса), а с сигнальными свойствами генерируемого БР синглетного кислорода, который может являться первичным агентом в трансдукции сигнала, запускающего повышенный синтез астаксантина в клетках *H. phuvialis*.

Библиографические ссылки

1. 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.
2. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*. 2006;69(3):443–449. DOI: 10.1021/np050354+.
3. Johnson EA, Schroeder WA. Microbial carotenoids. In: Fiechter A, editor. *Downstream processing biosurfactants/carotenoids*. Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 119–178. (Advances in biochemical engineering/biotechnology; volume 53). DOI: 10.1007/BFb0102327.
4. Krishna KB, Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 1998; 57(2):51–63.
5. 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.
6. Higuera-Ciupara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006;46(2):185–196. DOI: 10.1080/10408690590957188.
7. 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.
8. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(4):160–167. DOI: 10.1016/s0167-7799(00)01433-5.
9. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000; 48(4):1150–1154. DOI: 10.1021/jf991106k.
10. Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(6):1163–1174. DOI: 10.1007/s00253-007-0844-9.
11. Spiller GA, Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus phuvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *Journal of Medicinal Food*. 2003;6(1):51–56. DOI: 10.1089/109662003765184741.

12. Gandin E, Lion Y, Van de Vorst A. Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. *Photochemistry and Photobiology*. 1983;37(3):271–278. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x.
13. Козел НВ. Исследование возможности использования фотосенсибилизатора бенгальского розового в качестве индуктора накопления астаксантина в клетках *Haematococcus pluvialis*. В: Волотовский ИД, редактор. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международная научная конференция, Тринадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: тезисы докладов; 27–29 июня 2018 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2018. с. 116.
14. Мельников СС, Мананкина ЕЕ, Будакова ЕА, Шалыго НВ. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей*. Минск: Беларуская навука; 2011. 101 с.
15. Nichols HW, Bold HC. *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*. 1965;1(1):34–38. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x.
16. Rudic V, Dudnicenco T, inventors; Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of Moldova, Moldova State University, assignees. Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). Moldova patent a 2000 0154. 2000 September 28.
17. Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, Yamagami K, Ranjbar R, Katoh S. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;102(5):442–446. DOI: 10.1263/jbb.102.442.
18. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 63 p. (HarvestPlus technical monograph; 2).
19. 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.
20. Forni E, Ghezzi M, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatographia*. 1988;26(1):120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
21. 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.
22. 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.
23. Рокицкий ПФ. *Биологическая статистика*. 3-е издание. Минск: Вышэйшая школа; 1973. 320 с.

References

1. 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.
2. Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *Journal of Natural Products*. 2006;69(3):443–449. DOI: 10.1021/np050354+.
3. Johnson EA, Schroeder WA. Microbial carotenoids. In: Fiechter A, editor. *Downstream processing biosurfactants/carotenoids*. Berlin: Springer-Verlag; 1996. p. 119–178. (Advances in biochemical engineering/biotechnology; volume 53). DOI: 10.1007/BFb0102327.
4. Krishna KB, Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 1998;57(2):51–63.
5. 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.
6. Higuera-Ciupara I, Félix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2006;46(2):185–196. DOI: 10.1080/10408690590957188.
7. 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.
8. Lorenz RT, Cysewski GR. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(4):160–167. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)01433-5.
9. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(4):1150–1154. DOI: 10.1021/jf991106k.
10. Del Campo JA, García-González M, Guerrero MG. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(6):1163–1174. DOI: 10.1007/s00253-007-0844-9.
11. Spiller GA, Dewell A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. *Journal of Medicinal Food*. 2003;6(1):51–56. DOI: 10.1089/109662003765184741.
12. Gandin E, Lion Y, Van de Vorst A. Quantum yield of singlet oxygen production by xanthene derivatives. *Photochemistry and Photobiology*. 1983;37(3):271–278. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1983.tb04472.x.
13. Kozel NV. [Investigation of the possibility of using Rose Bengal photosensitizer as an inducer of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* cells]. In: Volotovskii ID, editor. *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Международная научная конференция, Тринадцатый съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: тезисы докладов; 27–29 июня 2018 г.; Минск, Беларусь* [Molecular, membrane and cellular foundations of the functioning of biosystems. International scientific conference, Thirteenth congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists: abstracts; 2018 June 27–29; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2018. p. 116. Russian.
14. Mel'nikov SS, Manankina EE, Budakova EA, Shalygo NV. *Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей* [Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2011. 101 p. Russian.
15. Nichols HW, Bold HC. *Trichosarcina polymorpha* Gen. et Sp. Nov. *Journal of Phycology*. 1965;1(1):34–38. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x.
16. Rudic V, Dudnicenco T, inventors; Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of Moldova, Moldova State University, assignees. Process for cultivation of green alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow). Moldova patent a 2000 0154. 2000 September 28.

17. Katsuda T, Shimahara K, Shiraishi H, Yamagami K, Ranjbar R, Katoh S. Effect of flashing light from blue light emitting diodes on cell growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;102(5): 442–446. DOI: 10.1263/jbb.102.442.
18. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: HarvestPlus; 2004. 63 p. (HarvestPlus technical monograph; 2).
19. 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.
20. Forni E, Ghezzi M, Polesello A. HPLC separation and fluorimetric estimation of chlorophylls and pheophytins in fresh and frozen peas. *Chromatographia*. 1988;26(1):120–124. DOI: 10.1007/BF02268135.
21. 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.
22. 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.
23. Rokitskii PF. *Biologicheskaya statistika* [Biological statistics]. Minsk: Vyshejskaja shkola; 1973. 320 p. Russian.

Статья поступила в редколлегию 31.08.2020.
Received by editorial board 31.08.2020.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОТХОДОВ АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В ФОТОВЫДЕЛЕНИИ ВОДОРОДА ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИЕЙ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*¹

Л. С. ГАБРИЕЛЯН¹⁾

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

В настоящее время рассматриваются возможности использования различных промышленных отходов при производстве биотоплива, что не только обеспечит новые, эффективные и дешевые источники молекулярного водорода (H₂), но и поможет решить проблему утилизации отходов. Исследованы перспективы применения отходов алкогольной промышленности, таких как пивная дробина и зерновая барда, для получения H₂ из пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522. Представленные данные указывают на возможность использования зерновой барды и пивной дробины в качестве источников углерода для производства H₂. Продемонстрировано, что предварительная обработка отходов, их разведение и нейтрализация необходимы для обеспечения эффективного роста и выделения H₂ у *R. sphaeroides*. Скорость роста и выход H₂ при выращивании бактерий на разбавленной в 2 раза зерновой барде увеличивались в 2 и 4 раза соответственно по сравнению с таковыми у культуры, выращенной на стандартной среде Ормерода. Тогда как скорость роста и фотовыделение H₂ при использовании разбавленной в 10 раз пивной дробины превышали в 2 раза рост и выход H₂ в контрольном образце. Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что данные отходы алкогольной промышленности могут служить перспективными субстратами для получения биоводорода.

Ключевые слова: *Rhodobacter sphaeroides*; фотоброжение; биоводород; отходы алкогольной промышленности.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Комитета по науке Министерства образования, науки, культуры и спорта Республики Армения (научный проект № 18T-1F045).

THE PROSPECTS OF ALCOHOL INDUSTRY WASTES APPLICATION IN PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN BY THE PURPLE BACTERIA *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

L. S. GABRIELIAN^a

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

The possibilities of using various industrial wastes to produce biofuel are currently being considered. It will provide not only novel, efficient and cheap sources of hydrogen (H₂), but will also help to solve the problem of waste disposal.

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. Перспективы применения отходов алкогольной промышленности в фотовыделении водорода пурпурной бактерией *Rhodobacter sphaeroides*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1: 70–77.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-70-77>

For citation:

Gabrielyan LS. The prospects of alcohol industry wastes application in photoproduction of hydrogen by the purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;1:70–77. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-70-77>

Автор:

Лилит Сергеевна Габриелян – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета.

Author:

Lilit S. Gabrielyan, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology.
lgabrielyan@ysu.am

The current work presents the prospects of application of alcohol industry wastes, such as distillers grains and brewery spent grains, for production of H_2 by the purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522. The data obtained showed the possibility of using distillers grains and brewery spent grains as effective carbon sources for producing H_2 . It was shown that pre-treatment of wastes, their dilution and neutralization are necessary to ensure the effective bacterial growth and H_2 production by *R. sphaeroides*. The growth rate and H_2 yield during the cultivation of bacteria on a 2-fold diluted distillers grains medium increased 2- and 4-fold, respectively, compared with a culture, grown on standard Ormerod medium. At the same time, the growth rate and photoproduction of H_2 on a 10-fold diluted brewery spent grains medium were 2-fold higher, in comparison with the control. Thus, the results obtained indicate that these alcohol industry wastes can be used as promising substrates for biohydrogen production.

Keywords: *Rhodobacter sphaeroides*; photofermentation; biohydrogen; alcohol industry wastes.

Acknowledgements. This study was supported by research grants from the Science Committee, Ministry of Education, Science, Culture and Sport of the Republic of Armenia (scientific project No.18T-1F045).

Введение

Пурпурные несерные бактерии имеют весьма разнообразный метаболизм, поскольку способны расти как анаэробно при освещении (фототрофия), так и аэробно в темноте (хемотрофия), используя или органические соединения (гетеротрофия), или CO_2 (автотрофия) в качестве источника углерода [1–4]. Не менее сложен и многообразен водородный метаболизм пурпурных бактерий: одновременно в них протекают различные реакции с поглощением или выделением водорода (H_2) [2; 4; 5]. Водородный метаболизм пурпурных несерных бактерий обусловлен деятельностью двух ферментов – нитрогеназы и гидрогеназы [2; 4–6].

В последнее время возрос интерес к пурпурным несерным бактериям как эффективным продуцентам H_2 , являющегося перспективным видом экологически чистого биотоплива [2; 4–7]. Пурпурные бактерии выделяют H_2 в результате фотоброжения (*photofermentation*) органических соединений в процессе аноксигенного фотосинтеза [5–8].

Ранее нами было показано, что пурпурные несерные бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, выделенные из минеральных источников Армении, способны к фотовыделению H_2 в анаэробных условиях [8; 9]. При этом выход H_2 может стимулироваться добавлением экзогенных органических источников углерода, азота и микроэлементов [10–13].

Одним из актуальных направлений водородной биотехнологии является создание оптимальных условий для более эффективного производства биоводорода. Выбор источника углерода – ключевой фактор для данного процесса. Крайне важно подобрать такие субстраты, которые могут эффективно усваиваться бактериями и обеспечивать высокие выход и продолжительность производства H_2 , являясь при этом экономически выгодными. Не менее важно определить их оптимальные концентрации и необходимость предварительной обработки.

В настоящее время рассматриваются возможности использования различных промышленных отходов для получения биотоплива, что, с одной стороны, обеспечит новые, эффективные и недорогие источники H_2 , а с другой – поможет решить проблему утилизации отходов [4; 14; 15]. Главные отходы алкогольной промышленности – зерновая барда (отход производства этанола) и пивная дробина (основной отход пивоварения) – являются экономически выгодными источниками белков, углеводов, органических и жирных кислот, аминокислот, а также витаминов [16–19]. Элементный состав указанных отходов отличается высоким содержанием важных микроэлементов (фосфора, калия, магния, кальция, натрия, железа).

Отходы спиртового и пивоваренного производства в мире составляют около 30 и 40 млн т в год соответственно (в Армении – в сумме около 5 млн т в год), из которых, по разным данным, перерабатывается примерно 10–15 % [14; 15]. При этом единственным практическим направлением переработки, например, зерновой барды является производство кормовых добавок из твердой фазы, а жидкая фаза (около 80–90 %) остается невостребованной и сбрасывается в окружающую среду, загрязняя ее вследствие содержания лабильных веществ, таких как белки, аминокислоты, сахара и углеводы, которые в разбавленной водной среде могут подвергаться процессам окисления, брожения и гниения [20]. Такой подход к использованию сырья, безусловно, нельзя считать рациональным.

В данной работе исследованы перспективы применения зерновой барды и пивной дробины для получения H_2 из пурпурной бактерии *R. sphaeroides* MDC6522.

Материалы и методы исследования

Штамм, условия культивирования и характеристика роста. В работе использовали пурпурную бактерию *R. sphaeroides* MDC6522 (Центр депонирования микробов Национальной академии наук Республики Армения, WDCM803), выделенную из минерального источника Джермук в Армении [8; 9]. Бактерии *R. sphaeroides* выращивались в анаэробных условиях в термостате типа ТПС-3 при температуре $(30,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ и освещении 2000 лк (50 Вт/м^2) в течение 96 ч на жидкой питательной среде Орме-рода, содержащей KH_2PO_4 (0,9 г/л), K_2HPO_4 (0,6 г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 г/л), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,075 г/л), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,012 г/л), ЭДТА (0,02 г/л), сукцинат (30 ммоль/л) в качестве источника углерода, дрожжевой экстракт (2 г/л) в качестве источника азота и витаминов, а также микроэлементы [8–10]. Для освещения использовали галогеновые лампы (мощность 60 Вт). Интенсивность света измеряли люксметром LM37 (*Carl Roth*, Германия) [9; 10].

За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности (ОП) суспензии с помощью спектрофотометра Spectro UV-Vis Auto (*Labomed*, США) при длине волны 660 нм (ОП_{660}) [8–10]. Удельную скорость роста (μ) определяли как частное от деления $0,693 (\ln 2)$ на время удвоения ОП (τ) в интервале, когда изменение ОП во времени носило линейный характер, и выражали в часах в минус первой степени:

$\mu = \frac{0,693}{\tau}$ [8; 10]. Для получения спектров поглощения бактериальной суспензии в диапазоне длин волн

400–1000 нм использовали тот же спектрофотометр [9]. Величину pH определяли с помощью pH-метра селективным электродом типа HJ1131B (*Hanna Instruments*, Португалия). Начальное значение pH ростовой среды поддерживали на уровне $7,5 \pm 0,1$ [8–10].

Определение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) среды и выделения H_2 . Величину ОВП определяли с помощью цифровых иономеров И-160МП (ОАО «Гомельский завод измерительных приборов», Беларусь) с использованием платинового электрода ЭПВ-01, как описано ранее [10; 14; 15]. Потенциал данного электрода (относительно электрода сравнения) в контрольном растворе, содержащем смесь ферро- и феррицианидов калия, составлял $(254 \pm 5) \text{ мВ}$ при температуре 25°C . После стабилизации показаний платинового электрода рассчитывали выход H_2 на основе изменения величины ОВП и выражали в миллимолях на литр, как описано ранее [8; 9].

Характеристики зерновой барды и пивной дробины, предварительная обработка отходов. Барда из обыкновенной (хлебной) пшеницы *Triticum aestivum* L. была предоставлена ликеро-водочным заводом «Алекс Григ» (Армения). Зерновая барда – полидисперсная система желто-коричневого цвета с дрожжевым ароматом, в которой компоненты растворены и суспендированы. Она получается при производстве этанола с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Необработанную барду фильтровали через вату и бумажный фильтр. Поскольку pH барды составлял $\sim 3,5$, до автоклавирования его уровень доводили до $7,5 \pm 0,1$ с помощью NaOH. Затем фильтрат стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 20 мин и использовали во время экспериментов [15].

Пивная дробина была предоставлена ЗАО «Ереванское пиво» (Армения). Первый этап обработки пивной дробины включал кислотный гидролиз содержащейся в ней лигноцеллюлозы с использованием 0,7 % раствора серной кислоты и автоклавирование при 121°C , после чего гидролизат фильтровали, доводили уровень pH до $7,5 \pm 0,1$ и снова стерилизовали [14]. В работе использовались отходы, разбавленные в 2, 5, 10 и 20 раз.

Использованные реактивы и статистический анализ. При проведении исследования применяли реактивы аналитической чистоты производства компаний *Carl Roth* (Германия) и *Sigma-Aldrich* (США). Статистическую обработку опытных данных выполняли с помощью компьютерной программы *Excel*. В статье приводятся средние арифметические значения из не менее 4 независимых экспериментов со среднеквадратическим отклонением результатов измерений и критерием достоверности Стьюдента для разницы результатов различных серий экспериментов [8; 10]. Данные считаются достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Использование отходов спиртового и пивоваренного производства в биотехнологии микроорганизмов экономически более выгодно, чем применение дорогостоящих источников углерода и азота. Зерновая барда и пивная дробина содержат необходимые для роста бактерий органические кислоты, углеводы, аминокислоты и витамины [16–19]. Возможность использования данных отходов для получения H_2 из пурпурных бактерий обеспечит дешевые источники H_2 и поможет решить проблему утилизации промышленных отходов.

Рост *R. sphaeroides* MDC6522 контролировали в средах, содержащих зерновую барду, разбавленную в 2 и 5 раз, и пивную дробину, разбавленную в 5 и 10 раз. В качестве контроля использовали культуру бактерий, выращенных на стандартной среде Ормерода с сукцинатом (30 ммоль/л) в качестве источника углерода. Сукцинат является одним из самых перспективных источников углерода для пурпурных бактерий [10; 12; 13]. Он присутствует в различных органических отходах, и анализ их утилизации может объяснить применение отходов при производстве H_2 [16–18].

Как видно из рис. 1, удельная скорость роста *R. sphaeroides*, выращенной на зерновой барде и пивной дробине, примерно в 1,5 раза превышала скорость роста контрольных клеток бактерии, выращенной на стандартной среде Ормерода. Максимальный рост бактерий был зафиксирован в среде, содержащей барду, разбавленную в 2 раза, и дробину, разбавленную в 10 раз. На неразбавленных отходах роста бактерий не наблюдалось, что может быть связано с высокой концентрацией органических кислот и сахаров [16; 17; 19]. Как известно, высокое содержание сахаров может подавлять рост бактерий и образование H_2 [21]. Таким образом, разбавление отходов необходимо для оптимизации концентрации органических соединений и обеспечения роста бактерий.

Известно, что в процессе фототрофного роста пурпурных бактерий происходит синтез фотосинтетического аппарата, который представлен двумя светособирающими комплексами – B800–850 и B875 [9]. В состав этих комплексов входят фотосинтетические пигменты (бактериохлорофилл *a* (Бхл *a*) и каротиноиды). В работе были получены спектры поглощения клеточных суспензий *R. sphaeroides* MDC6522, выращенных на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности (рис. 2). Как видно из рис. 2, во всех спектрах поглощения в диапазоне длин волн 400–1000 нм наблюдаются несколько максимумов, типичных для пурпурных бактерий [9]. Эти максимумы указывают на наличие Бхл *a* (590; 800; 850 и 875 нм) и каротиноидов (450; 478 и 510 нм) соответственно. При культивировании бактерии на разбавленной в 2 раза барде и разбавленной в 10 раз дробине отмечается рост максимумов поглощения, типичных для каротиноидов, и уровня комплекса B800–850 (см. рис. 2). Данный комплекс участвует в аккумуляции и передаче световой энергии реакционному центру, тем самым и способствуя синтезу водорода [9].

Как известно, ОВП является важным параметром, определяющим рост бактерий. В работе была исследована кинетика ОВП при анаэробном росте *R. sphaeroides* MDC6522 на различных средах. Рост контрольных клеток *R. sphaeroides* на среде Ормерода сопровождался падением величины ОВП от положительных значений $(+(130 \pm 10) \text{ мВ})$ в начале лаг-фазы до низких отрицательных значений $(-(550 \pm 10) \text{ мВ})$ по истечении 72 ч (рис. 3). При росте бактерии на отходах наблюдалось более резкое

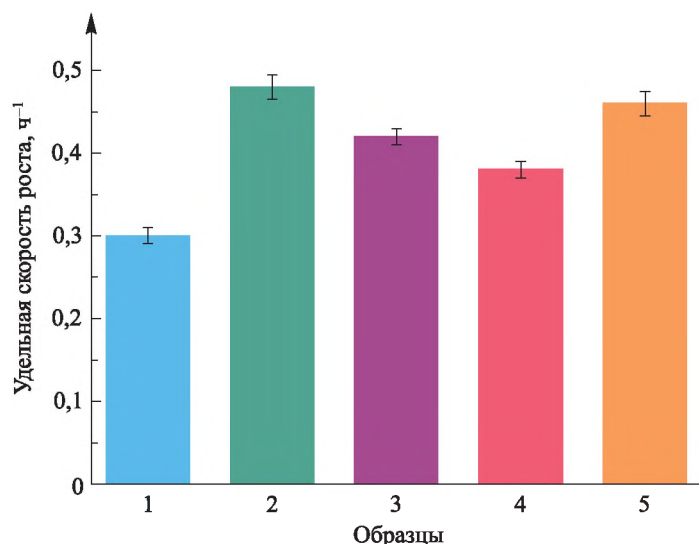


Рис. 1. Удельная скорость роста *R. sphaeroides* MDC6522 при культивировании на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности.

Здесь и далее: образец 1 – контроль (стандартная среда Ормерода);
образец 2 – разбавленная в 2 раза зерновая барда; образец 3 – разбавленная в 5 раз зерновая барда;
образец 4 – разбавленная в 5 раз пивная дробина; образец 5 – разбавленная в 10 раз пивная дробина

Fig. 1. The specific growth rate of *R. sphaeroides* MDC6522 cultivated on alcohol industry wastes containing media.

Here and after: sample 1 – control (standard Ormerod medium);
sample 2 – 2-fold diluted distillers grains medium; sample 3 – 5-fold diluted distillers grains medium;
sample 4 – 5-fold diluted brewery spent grains medium; sample 5 – 10-fold diluted brewery spent grains medium

снижение ОВП. Максимальное падение ОВП (до $-(715 \pm 20)$ мВ) было зарегистрировано при выращивании бактерий на разбавленной в 2 раза барде (см. рис. 3). Такое падение ОВП свидетельствует об усилении восстановительных процессов, что характерно для бактериального метаболизма в анаэробных условиях, а также о выделении H_2 [8; 10; 14].

В нашей лаборатории установлена связь между падением ОВП и выделением H_2 у *R. sphaeroides* [8–10]. Как известно, пурпурные бактерии выделяют H_2 при участии нитрогеназы, тогда как гидрогеназа ответственна за поглощение (окисление) H_2 [2]. Согласно полученным результатам, несмотря на то что сукцинат является наиболее эффективным источником углерода при производстве биоводорода, выход H_2 на разбавленной в 2 раза барде превышал в 4 раза выход H_2 в *R. sphaeroides* MDC6522, выращенной на среде Ормерода (рис. 4). Выделение H_2 при использовании разбавленной в 10 раз пивной дробины возрастало в 2,5 раза по сравнению с контрольным образцом. При остальных разбавлениях отходов выход H_2 был значительно ниже, чем у бактерии, выращенной на среде Ормерода (не показано).

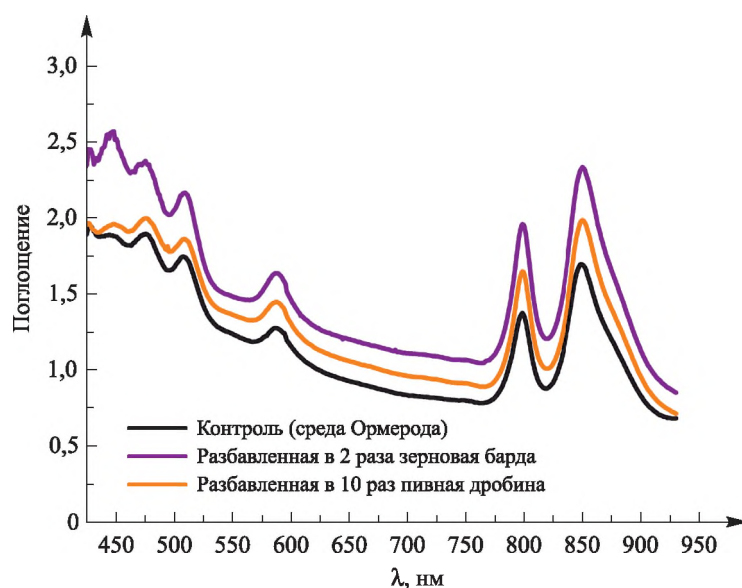


Рис. 2. Спектры поглощения *R. sphaeroides* MDC6522, выращенной на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности.

Контроль – культура бактерий, выращенных на стандартной среде Ормерода

Fig. 2. Absorption spectra of *R. sphaeroides* MDC6522 grown on alcohol industry wastes containing media. Control was bacteria grown on standard Ormerod medium

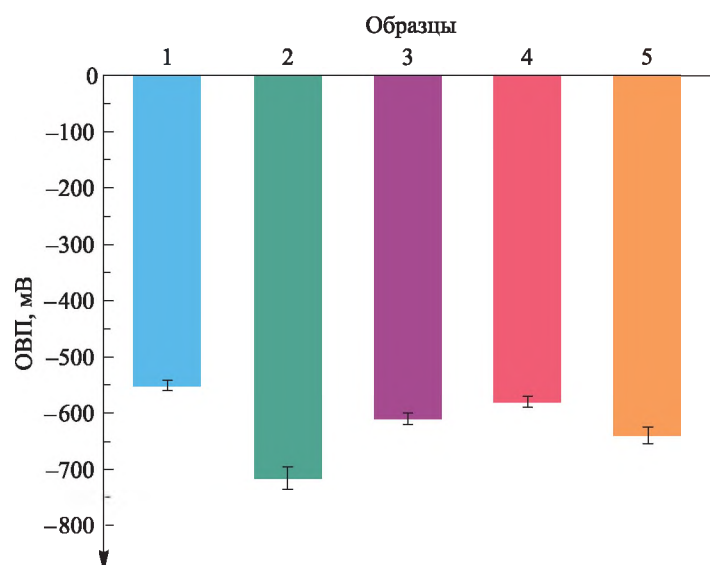


Рис. 3. Изменение ОВП среды при росте *R. sphaeroides* MDC6522

Fig. 3. Changes of medium redox potential during growth of *R. sphaeroides* MDC6522

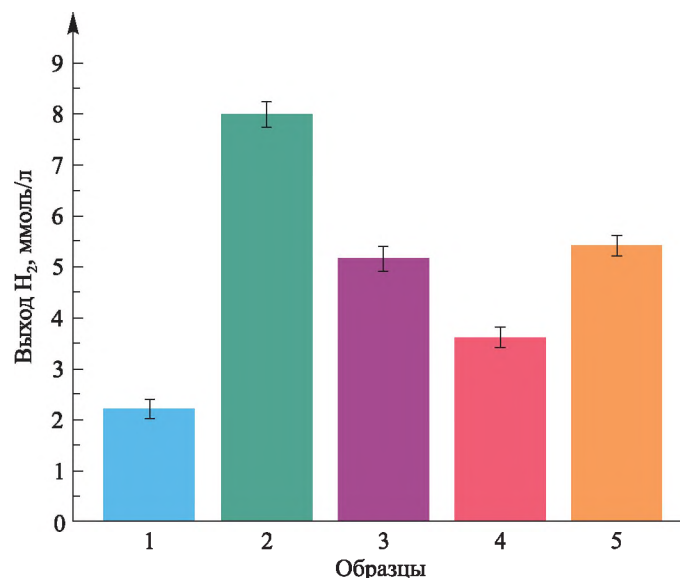


Рис. 4. Выход H₂ в *R. sphaeroides* MDC6522 при росте на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности

Fig. 4. H₂ yield in *R. sphaeroides* MDC6522 grown on alcohol industry wastes containing media

Увеличение выхода H₂ может быть связано с активацией различных метаболических путей, что приводит к усиленному росту бактерий и выделению H₂. Отходы алкогольной промышленности, кроме сахаров и органических кислот, содержат значительное количество аминокислот, которые являются источниками азота, необходимого в производстве H₂, и могут влиять на активность нитрогеназы – ключевого фермента, катализирующего выделение H₂ пурпурными бактериями [2; 5; 8].

Закключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что отходы алкогольной промышленности могут служить перспективными субстратами для получения биоводорода. Это не только обеспечит эффективные и дешевые источники H₂, но и поможет решить проблему утилизации отходов. Проблема производства H₂ является комплексной, но при разработке новых подходов и использовании промышленных отходов она может получить принципиально новые решения, важные как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Библиографические ссылки

1. Петушкова ЕП, Цыганков АА. Метаболизм ацетата у пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus*. *Биохимия*. 2017;82(5):786–807.
2. Пыганков АА, Хуснутдинова АН. Участие H₂ в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования. *Микробиология*. 2015;84(1):3–26. DOI: 10.7868/S0026365615010152.
3. Willison JC. Biochemical genetics revisited: the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993;10(1–2):1–38. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05862.x.
4. Dinesh GH, Nguyen DD, Ravindran B, Chang SW, Vo DVN, Bach Q-V, et al. Simultaneous biohydrogen (H₂) and bioplastic (poly-β-hydroxybutyrate-PHB) productions under dark, photo, and subsequent dark and photo fermentation utilizing various wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020;45(10):5840–5853. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.09.036.
5. Androga DD, Özgür E, Eroglu I, Gündüz U, Yücel M. Photofermentative hydrogen production in outdoor conditions. In: Minić D, editor. *Hydrogen energy – challenges and perspectives*. London: IntechOpen; 2012. p. 77–120. DOI: 10.5772/50390.
6. Morsy FM, Elbahloul Y, Elbadry M. Photoheterotrophic growth of purple non-sulfur bacteria on tris acetate phosphate yeast extract (TAPY) medium and its hydrogen productivity in light under nitrogen deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(18):9282–9290. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.02.086.
7. Hu C, Choy S-Y, Giannis A. Evaluation of lighting systems, carbon sources, and bacteria cultures on photofermentative hydrogen production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018;185(1):257–269. DOI: 10.1007/s12010-017-2655-5.
8. 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(1):131. DOI: 10.1186/s12934-015-0324-3.

9. Sargsyan H, Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A. Light-dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015;40(11):4084–4091. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.01.163.
10. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* during photo-fermentation: mixed vs sole carbon sources enhance bacterial growth and H₂ production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(2):674–679. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.11.082.
11. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen production and the F₀F₁-ATPase activity of *Rhodobacter sphaeroides*: effects of various heavy metal ions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(23):17794–17800. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.09.091.
12. Feng J, Yang H, Guo L. The photosynthetic hydrogen production performance of a newly isolated *Rhodobacter capsulatus* JL1 with various carbon sources. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2018;43(30):13860–13868. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.03.144.
13. Han H, Liu B, Yang H, Shen J. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(17):12167–12174. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.03.134.
14. Poladyan A, Trchounian K, Vassilian A, Trchounian A. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. *Renewable Energy*. 2018;115:931–936. DOI: 10.1016/j.renene.2017.09.022.
15. Sargsyan H, Gabrielyan L, Trchounian A. The distillers grains with solubles as a perspective substrate for obtaining biomass and producing biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biomass and Bioenergy*. 2016;90:90–94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.03.042.
16. Кайшев АПШ, Кайшева НШ. Биологически активные вещества отходов спиртового производства. *Фармация и фармакология*. 2014;2(4):3–22. DOI: 10.19163/2307-9266-2014-2-4(5).
17. Liu K. Chemical composition of distillers grains, a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(5):1508–1526. DOI: 10.1021/jf103512z.
18. Mussatto SI. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(7):1264–1275. DOI: 10.1002/jsfa.6486.
19. Muthusamy N. Chemical composition of brewers spent grain – a review. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2014;3(6):2109–2112.
20. Кайшева НШ, Кайшев АПШ, Микелов ВА, Саморядова АБ. Обеспечение безопасности послеспиртовой зерновой барды для окружающей среды. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2017;19(5, часть 2):260–263.
21. Trchounian K, Trchounian A. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*. 2015;156:174–184. DOI: 10.1016/j.apenergy.2015.07.009.

References

1. Petushkova EP, Tsygankov AA. Acetate metabolism in the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biokhimiya*. 2017;82(5):786–807. Russian.
2. Tsygankov AA, Khusnutdinova AN. Hydrogen in metabolism of purple bacteria and prospects of practical application. *Mikrobiologiya*. 2015;84(1):3–26. Russian. DOI: 10.7868/S0026365615010152.
3. Willison JC. Biochemical genetics revisited: the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993;10(1–2):1–38. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05862.x.
4. Dinesh GH, Nguyen DD, Ravindran B, Chang SW, Vo DVN, Bach Q-V, et al. Simultaneous biohydrogen (H₂) and bioplastic (poly-β-hydroxybutyrate-PHB) productions under dark, photo, and subsequent dark and photo fermentation utilizing various wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020;45(10):5840–5853. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.09.036.
5. Androga DD, Özgür E, Eroglu I, Gündüz U, Yücel M. Photofermentative hydrogen production in outdoor conditions. In: Minić D, editor. *Hydrogen energy – challenges and perspectives*. London: IntechOpen; 2012. p. 77–120. DOI: 10.5772/50390.
6. Morsy FM, Elbahloul Y, Elbadry M. Photoheterotrophic growth of purple non-sulfur bacteria on tris acetate phosphate yeast extract (TAPY) medium and its hydrogen productivity in light under nitrogen deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(18):9282–9290. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.02.086.
7. Hu C, Choy S-Y, Giannis A. Evaluation of lighting systems, carbon sources, and bacteria cultures on photofermentative hydrogen production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018;185(1):257–269. DOI: 10.1007/s12010-017-2655-5.
8. 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(1):131. DOI: 10.1186/s12934-015-0324-3.
9. Sargsyan H, Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A. Light-dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015;40(11):4084–4091. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.01.163.
10. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* during photo-fermentation: mixed vs sole carbon sources enhance bacterial growth and H₂ production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(2):674–679. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.11.082.
11. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen production and the F₀F₁-ATPase activity of *Rhodobacter sphaeroides*: effects of various heavy metal ions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(23):17794–17800. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.09.091.
12. Feng J, Yang H, Guo L. The photosynthetic hydrogen production performance of a newly isolated *Rhodobacter capsulatus* JL1 with various carbon sources. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2018;43(30):13860–13868. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.03.144.
13. Han H, Liu B, Yang H, Shen J. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(17):12167–12174. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.03.134.
14. Poladyan A, Trchounian K, Vassilian A, Trchounian A. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. *Renewable Energy*. 2018;115:931–936. DOI: 10.1016/j.renene.2017.09.022.
15. Sargsyan H, Gabrielyan L, Trchounian A. The distillers grains with solubles as a perspective substrate for obtaining biomass and producing biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biomass and Bioenergy*. 2016;90:90–94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.03.042.

16. Kayshev AS, Kaysheva NS. Biologically active substances of spirit production waste. *Farmatsiya i farmakologiya*. 2014;2(4): 3–22. Russian. DOI: 10.19163/2307-9266-2014-2-4(5).
17. Liu K. Chemical composition of distillers grains, a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(5):1508–1526. DOI: 10.1021/jf103512z.
18. Mussatto SI. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(7):1264–1275. DOI: 10.1002/jsfa.6486.
19. Muthusamy N. Chemical composition of brewers spent grain – a review. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2014;3(6):2109–2112.
20. Kaisheva NSh, Kaishev ASh, Mikelov VA, Samoryadova AB. Ensuring the safety of the after-surge grain bard for the environment. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*. 2017;19(5, part 2):260–263. Russian.
21. Trchounian K, Trchounian A. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*. 2015;156:174–184. DOI: 10.1016/j.apenergy.2015.07.009.

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

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 575.13:575.17:630*165

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ *PICEA ABIES* (L.) KARST. НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

В. Е. ПАДУТОВ¹⁾

¹⁾Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, 246001, г. Гомель, Беларусь

Одним из основных лесообразующих древесных видов Беларуси является ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst.), формирование популяционно-генетической структуры которой происходило под влиянием миграционных потоков из разных рефугиумов в постледниковый период. Для геногеографического исследования *P. abies* использованы 25 изоферментных генов (*Aat-1*, *Aat-2*, *Adh*, *Gdh*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Skdh*, *6-Pgd-1*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Sdh*, *Gpi*, *Hk*, *Me*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Dia-4*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Fl-Est*) ядерной ДНК (анализ проведен в 10 популяциях), 3 микросателлитных локуса (Pt63718, Pt26081, Pt71936) хлоропластной ДНК (рассмотрены 57 популяций) и 1 микросателлитный локус (mt15-D02) митохондриальной ДНК (изучены 56 популяций). Выявлены 82 аллельных варианта изоферментных генов, 19 аллельных вариантов локусов хлоропластной ДНК и 2 аллельных варианта локуса митохондриальной ДНК. Установлено географическое распространение аллелей и рассмотрены региональные особенности геногеографической дифференциации еловой формации. Подтверждено наличие в Беларуси представителей двух миграционных потоков – южного и северного. Показано, что основная концентрация деревьев *P. abies* южного (карпатского) происхождения наблюдается на юго-западе страны. Выявлена клинальная изменчивость для ряда маркеров в направлениях с юга на север и с запада на восток. Полученные данные в целом согласуются с результатами исследований, основанных на анализе распространения фенов чешуй шишек.

Ключевые слова: ель европейская; *Picea abies*; изоферменты; микросателлитный анализ; хлоропластная ДНК; митохондриальная ДНК; интрогрессия.

Образец цитирования:

Падутов ВЕ. Особенности формирования популяционной структуры *Picea abies* (L.) Karst. на территории Беларуси. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2021;1:78–91.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-78-91>

For citation:

Padutov VE. Features of *Picea abies* (L.) Karst. population structure formation on the territory of Belarus. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:78–91. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-78-91>

Автор:

Владимир Евгеньевич Падутов – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, доцент, заведующий научно-исследовательским отделом генетики, селекции и биотехнологии.

Author:

Vladimir E. Padutov, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), docent; head of the research department of genetics, breeding and biotechnology.
forestgen@mail.ru

FEATURES OF *PICEA ABIES* (L.) KARST. POPULATION STRUCTURE FORMATION ON THE TERRITORY OF BELARUS

V. E. PADUTOV^a

^aForest Institute, National Academy of Sciences of Belarus,
71 Praletarskaja Street, Homiel 246001, Belarus

One of the main forest forming tree species in Belarus is the European spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). The formation of European spruce forest population genetic structure took place under the influence of migration flows from different refugia during the postglacial period. For the genogeographic study of *P. abies* 25 isozyme genes (*Aat-1*, *Aat-2*, *Adh*, *Gdh*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Skdh*, *6-Pgd-1*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Sdh*, *Gpi*, *Hk*, *Me*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Dia-4*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Fl-Est*) of nuclear DNA (analysis was carried out in 10 populations), 3 microsatellite loci (Pt63718, Pt26081, Pt71936) of chloroplast DNA (57 populations were considered) and 1 microsatellite locus (mt15-D02) of mitochondrial DNA (56 populations were studied) were used. As a result, 82 allelic variants of isozyme genes, 19 allelic variants of chloroplast DNA loci and 2 allelic variants of mitochondrial DNA locus were found. The spatial distribution of the alleles was defined and the regional features of the genogeographic differentiation of the spruce forest were considered. The presence of two migration flows representatives (southern and northern) in Belarus was confirmed. It was shown that the highest concentration of *P. abies* trees with southern (Carpathian) origin is observed in the southwest of the country. Clinal variability was revealed for a number of markers in the directions from south to north and from west to east. In general the data obtained are consistent with the results of studies based on the analysis of the spatial distribution of the cone scales traits.

Keywords: European spruce; *Picea abies*; isozymes; microsatellite analysis; chloroplast DNA; mitochondrial DNA; introgression.

Введение

Ель европейская (*Picea abies* (L.) Karst.) является одним из основных лесообразующих видов Беларуси, выполняя важные экономические, экологические и социальные функции. Еловая формация занимает 9,4 % лесопокрытой площади территории страны и характеризуется сложной историей формирования своей популяционно-генетической структуры.

Как известно, *P. abies* произрастает на Европейском континенте, где ее ареал, занимающий обширную территорию, разделен на три изолированные между собой области [1] – альпийскую (альпийско-балканскую), карпатскую (герцинско-карпатскую) и бореальную (восточноевропейскую, северобалтийскую), восточную границу которой точно определить затруднительно из-за широкой зоны интрогрессивной гибридизации между елью европейской и елью сибирской. Бореальная область сплошного распространения *P. abies* отделена от Карпатского региона так называемой польской дизъюнкцией, или «безъельным коридором» [2]. Выявление на территории Беларуси типов шишек [3; 4], различающихся по форме чешуй и характерных либо для Карпатского региона Украины, либо для северо-восточной области европейской части России, позволило предположить, что в среднем голоцене данный «безъельный коридор» отсутствовал. Вследствие этого распространение ели европейской на территорию Беларуси могло происходить со стороны двух центров [2] – карпатского (*P. abies* subsp. *acuminata*) и бореального (*P. abies* subsp. *abies*). Реконструкция исторически возможных путей распространения *P. abies* карпатского происхождения на территорию Беларуси [5] показала, что наиболее вероятным является юго-западный миграционный путь, который был направлен из Восточных Карпат в Полесье через Волыно-Подольскую возвышенность. Кроме того, В. П. Зерницкая¹ в своей диссертации предполагает, что юго-западное отступление пути (в сторону Беловежской пуши) проходило также и через Люблинскую возвышенность.

Изучение внутривидового разнообразия и дифференциации популяций лесообразующих видов, особенно в зоне внутри- и межвидовой интрогрессивной гибридизации, является важным направлением исследований в области популяционной генетики и ботаники. До недавнего времени для получения информации о процессах, происходящих в популяциях *P. abies*, как уже отмечалось выше, использовались фенотипические признаки, позднее в качестве маркеров генов применялись изоферменты [6; 7]. В последние годы в связи с разработкой специфических праймеров значительно увеличилось число генетических исследований хвойных, в которых ДНК-маркерами выступают микросателлитные локусы [8–15].

¹Зерницкая В. П. Палеогеография Белорусского Полесья в позднеледниковье и голоцене (по данным спорово-пыльцевового анализа): автореф. дис. ... канд. геогр. наук: 11.00.04. Минск: Белорус. ордена Трудового Красного Знамени гос. ун-т им. В. И. Ленина, 1991.

Наиболее часто микросателлиты используются в популяционных и экологических исследованиях для изучения генного потока, миграционных процессов, внутривидового распределения генетической изменчивости, степени дифференциации популяций. Наряду с маркерами ядерной ДНК в генетических исследованиях широкое распространение получили методы, основанные на применении маркеров митохондриальной ДНК (у хвойных наследуются по материнской линии) и хлоропластной ДНК (у хвойных наследуются по отцовской линии), что позволяет получать дополнительную информацию о генетическом родстве популяций.

Цель данного исследования заключалась в изучении геногеографической структуры белорусских популяций ели европейской на основе анализа изменчивости трех различных типов генетических маркеров (изоферментов, хлоропластных и митохондриальных микросателлитов).

Материалы и методы исследования

Объектами исследования для изоферментного анализа были 416 деревьев из 10 природных популяций (Национальный парк «Беловежская пуща», Барановичский лесхоз, Национальный парк «Припятский», Гомельский лесхоз, Бельничский лесхоз, Могилёвский лесхоз, Бегомльский лесхоз, Глубокский лесхоз, Полоцкий лесхоз, Городокский лесхоз), для микросателлитного анализа хлоропластной ДНК – 610 деревьев из 57 природных популяций (Брестская область – 9, Гродненская – 8, Гомельская – 8, Минская – 12, Могилёвская – 8, Витебская – 12), для микросателлитного анализа митохондриальной ДНК – 596 деревьев из 56 природных популяций (Брестская область – 10, Гродненская – 8, Гомельская – 8, Минская – 13, Могилёвская – 6, Витебская – 11). Экспериментальным материалом для анализа изоферментов являлись семена, для выделения ДНК – хвоя или почки без признаков повреждения. В случае невозможности сбора хвои или почек отбирали образцы наружного слоя древесины (до 7 мм) путем сверления шнековым сверлом ($d = 10$ мм) при скорости вращения ротора не более 300–350 об/мин. Отобранный материал (≈ 100 мг) помещали в микропробирки с 70 % этанолом.

Изоферментный анализ проводился методом электрофореза в крахмальном геле. Гомогенизация образцов осуществлялась в фарфоровых ступках при температуре 5 °С с использованием экстрагирующего буфера следующего состава: сахароза – 0,81 г; ЭДТА – 1,5 мг; дитиотреитол – 1,6 мг; аскорбиновая кислота – 1,76 мг; альбумин – 11 мг; НАД – 2,7 мг; НАДФ – 2,2 мг; пиридоксаль – 0,5 мг; β -меркаптоэтанол – 0,066 мл; PVP – 0,8 г на 10 мл дистиллированной воды (рН доводится до 6,7 1 моль/л раствором трис-(оксиметил)-аминометана). Гелевые блоки для электрофоретического фракционирования включали буферный раствор, 13–14 % гидролизованный крахмал и 10 % сахарозу. Оптимальным для анализа всех используемых в работе изоферментов является применение трех буферных систем:

- А (трис-ЭДТА-боратная, рН 8,6) – электродный буфер содержит 900 ммоль/л трис-(оксиметил)-аминометан, 500 ммоль/л борную кислоту, 20 ммоль/л ЭДТА, 40 ммоль/л $MgCl_2$, гелевый буфер готовится путем разведения 50 мл электродного буфера до 1 л дистиллированной водой;
- В (трис-цитрат, рН 6,2/трис-НСl, рН 8,0) – электродный буфер включает 233 ммоль/л трис-(оксиметил)-аминометан и 86,15 ммоль/л лимонную кислоту, гелевый буфер содержит 500 ммоль/л трис-(оксиметил)-аминометан гидрохлорид, рН доводится 1 н NaOH;
- С (трис-цитратная, рН 6,2) – электродный буфер включает 233 ммоль/л трис-(оксиметил)-аминометан и 86,15 ммоль/л лимонную кислоту, гелевый буфер готовится путем разведения 35 мл электродного буфера до 1 л дистиллированной водой.

Гистохимическое окрашивание изоферментов выполнено по стандартным методикам [16–19]. Анализ проведен на основе 15 генферментных систем (буферная система А – алкогольдегидрогеназа, КФ 1.1.1.1, аспаратаминотрансфераза, КФ 2.6.1.1, гексокиназа, КФ 2.7.1.1, глутаматдегидрогеназа, КФ 1.4.1.2, лейцинаминопептидаза, КФ 3.4.11.1, малик-энзим, КФ 1.1.1.40, сорбитолдегидрогеназа, КФ 1.1.1.14, флуоресцентная эстераза, КФ 3.1.1.2, фосфоглюкомутаза, КФ 2.7.5.1; буферная система В – диафораза, КФ 1.6.4.3, изоцитратдегидрогеназа, КФ 1.1.1.42, шикиматдегидрогеназа, КФ 1.1.1.25; буферная система С – глюкозофосфатизомераза, КФ 5.3.1.9, малатдегидрогеназа, КФ 1.1.1.37, 6-фосфоглюконатдегидрогеназа, КФ 1.1.1.44), которые кодируются 25 изоферментными генами (*Aat-1*, *Aat-2*, *Adh*, *Gdh*, *Idh-1*, *Idh-2*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mdh-3*, *Skdh*, *6-Pgd-1*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*, *Lap-1*, *Lap-2*, *Sdh*, *Gpi*, *Hk*, *Me*, *Dia-1*, *Dia-2*, *Dia-4*, *Pgm-1*, *Pgm-2*, *Fl-Est*).

Выделение ДНК осуществлено модифицированным СТАВ-методом [20]. Полученные препараты ДНК растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды для последующего хранения при –4 °С. Генетический анализ хлоропластной ДНК проведен по 3 микросателлитным локусам (Pt63718, Pt26081, Pt71936), которые ранее были использованы при анализе ели европейской и ели сибирской [21; 22], с применением следующих пар праймеров: локус Pt63718 – F: 5'-CCCGTATCCAGATATACTTCC-3', R: 5'-TGGTTTGATTCATTTCGTTTCAT-3'; локус Pt26081 – F: 5'-CACAAAAGGATTTTTTTTCAGTG-3',

R: 5'-CGACGTGAGTAAGAATGGTTG-3'; локус Pt71936 – F: 5'-TTCATTGGAAATACACTAGCCCC-3', R: 5'-AAAACCGTACATGAGATTCCC-3'. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) выполнена по программе: длительная денатурация (3 мин, 94 °C); 30 циклов – денатурация (15 с, 94 °C), отжиг (15 с, 60 °C), элонгация (30 с, 72 °C); длительная элонгация (5 мин, 72 °C). Электрофоретическое фракционирование и детекцию меченых продуктов амплификации проводили в генетическом анализаторе ABI Prism 310 или ABI 3500 (*Applied Biosystems*, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Для анализа результатов использовали программный пакет *GeneMapper 4.0* (*Applied Biosystems*).

Генетический анализ митохондриальной ДНК осуществлен по локусу mt15-D02 (номер в GenBank – AY897577) с применением праймеров F: 5'-TATCTGACTTGCCCTATC-3', R: 5'-ATCCGAATACATACACC-3'. Для проведения ПЦР использована программа: длительная денатурация (10 мин, 94 °C); 40 циклов – денатурация (1 мин, 94 °C), отжиг (1 мин, 54 °C), элонгация (2 мин, 72 °C); длительная элонгация (10 мин, 72 °C). Электрофоретическое фракционирование продуктов амплификации выполнено в электрофоретических камерах с использованием 2 % агарозных гелей с последующим окрашиванием в растворе этидия бромид.

Математическая обработка данных проведена с помощью пакета программ *PopGene Version 1.32*, *Statistica 6.0*, *GenAlEx 6.5* и *Microsoft Excel*.

Результаты и их обсуждение

В ходе анализа 25 изоферментных генов были выявлены 82 аллельных варианта, частоты встречаемости которых представлены в табл. 1. Из данных таблицы следует, что все гены у ели европейской оказались полиморфными, при этом в большинстве популяций практически для каждого гена преобладает наиболее общий (доминантный) аллель. Только для *6-Pgd-2* и *Dia-4* в некоторых популяциях частота альтернативного аллеля выше, чем доминантного (для Беларуси в целом) варианта. Для таких генов, как *Mdh-3*, *Lap-2*, *6-Pgd-2*, *Me*, *Dia-4* и *Gpi*, различия в частотах некоторых аллелей между отдельными популяциями составляют более 20 %.

Таблица 1

Аллельные частоты по 25 изоферментным генам у *P. abies* в Беларуси

Table 1

Allelic frequencies of 25 isozyme genes of *P. abies* in Belarus

Аллель	Популяции										В целом по Беларуси
	БП	Бр	Пр	Гм	Бл	Мг	Бг	Гл	Пл	Гр	
Aat-1											
1,00	0,971	0,939	0,968	0,962	1,000	0,952	0,948	0,974	0,917	0,946	0,964
1,10	0,029	0,061	0,032	0,038	0	0,048	0,052	0,026	0,083	0,054	0,036
Aat-2											
0,30	0,013	0,015	0	0	0	0	0,017	0	0	0	0,006
0,65	0,563	0,500	0,581	0,520	0,586	0,532	0,586	0,513	0,583	0,554	0,548
1,00	0,425	0,485	0,419	0,480	0,414	0,468	0,397	0,487	0,417	0,446	0,446
Adh											
0,90	0,025	0	0	0,025	0,017	0	0	0,006	0	0	0,011
1,00	0,975	1,000	1,000	0,975	0,983	1,000	1,000	0,994	1,000	1,000	0,989
Gdh											
0,75	0,068	0,061	0,081	0,200	0,138	0,145	0,103	0,130	0,125	0,179	0,111
1,00	0,932	0,939	0,919	0,800	0,862	0,855	0,897	0,870	0,875	0,821	0,889
Idh-1											
0,70	0	0	0	0	0	0	0,017	0	0	0	0,001
0,90	0,005	0	0,024	0	0	0	0	0	0	0	0,003
1,00	0,951	0,944	0,976	0,962	1,000	0,903	0,966	1,000	1,000	0,982	0,967
1,10	0,044	0,056	0	0,038	0	0,097	0,017	0	0	0,018	0,029

Продолжение табл. 1
Continuation table 1

Алель	Популяции										В целом по Беларуси
	БП	Бр	Пр	Гм	Бл	Мг	Бг	Гл	Пл	Гр	
Idh-2											
0,70	0	0,015	0	0	0	0	0	0,013	0	0	0,004
1,00	1,000	0,985	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,987	1,000	1,000	0,996
Mdh-1											
0,95	0	0	0	0	0	0	0	0,006	0	0	0,001
1,00	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,994	1,000	1,000	0,998
1,10	0,004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001
Mdh-2											
0,80	0,004	0,015	0	0	0,017	0	0	0	0	0	0,004
1,00	0,996	0,985	1,000	1,000	0,983	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996
Mdh-3											
0	0,013	0,015	0	0,019	0	0,016	0,017	0,007	0,042	0	0,011
0,90	0,212	0,121	0,226	0,135	0,034	0,210	0,207	0,201	0	0,107	0,172
1,00	0,674	0,803	0,726	0,827	0,948	0,661	0,707	0,746	0,917	0,804	0,748
1,15	0,068	0,030	0,032	0,019	0,017	0,097	0,052	0,045	0,042	0,054	0,051
1,30	0,034	0,030	0,016	0	0	0,016	0,017	0	0	0,036	0,019
Skdh											
0,80	0,004	0	0	0	0	0	0,034	0	0	0	0,004
1,00	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,948	1,000	1,000	1,000	0,981
1,05	0,046	0	0	0	0	0	0,017	0	0	0	0,015
Lap-1											
0	0,025	0,015	0	0	0,052	0	0,086	0,045	0	0	0,026
0,94	0,067	0,091	0,113	0,058	0,034	0,065	0,121	0,097	0,042	0,036	0,076
0,97	0	0,015	0	0,058	0	0	0	0	0	0,071	0,010
1,00	0,808	0,758	0,726	0,827	0,793	0,742	0,690	0,669	0,708	0,786	0,755
1,04	0,100	0,121	0,129	0,058	0,034	0,145	0,052	0,156	0,208	0,107	0,111
1,10	0	0	0,032	0	0,086	0,048	0,052	0,032	0,042	0	0,023
Lap-2											
0,95	0,021	0,030	0,016	0,019	0,017	0,103	0,069	0,019	0,042	0,036	0,031
1,00	0,763	0,727	0,613	0,827	0,776	0,776	0,569	0,786	0,708	0,768	0,744
1,05	0,150	0,182	0,290	0,135	0,207	0,086	0,293	0,149	0,083	0,143	0,169
1,10	0,050	0	0,081	0,019	0	0,034	0,069	0,032	0,167	0,054	0,043
1,05/1,10	0,017	0,061	0	0	0	0	0	0,013	0	0	0,012
Sdh											
0	0	0,015	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001
0,95	0,050	0,030	0,032	0,021	0	0,016	0,034	0,013	0	0	0,026
1,00	0,950	0,955	0,968	0,979	1,000	0,952	0,966	0,968	1,000	1,000	0,966
1,05	0	0	0	0	0	0,032	0	0,019	0	0	0,006

Продолжение табл. 1
Continuation table 1

Аллель	Популяции										В целом по Беларуси
	БП	Бр	Пр	Гм	Бл	Мг	Бг	Гл	Пл	Гр	
6-Pgd-1											
0,90	0	0,015	0	0,038	0	0	0,052	0,019	0	0	0,011
1,00	1,000	0,970	1,000	0,962	1,000	1,000	0,948	0,981	1,000	0,946	0,984
1,10	0	0,015	0	0	0	0	0	0	0	0,054	0,005
6-Pgd-2											
0,65	0,346	0,379	0,452	0,435	0,517	0,468	0,483	0,474	0,458	0,429	0,427
0,85	0	0,015	0	0,022	0	0	0	0,006	0,042	0,036	0,008
1,00	0,654	0,591	0,548	0,522	0,448	0,532	0,517	0,519	0,500	0,518	0,559
1,20	0	0,015	0	0,022	0,034	0	0	0	0	0,018	0,006
6-Pgd-3											
0,50	0,394	0,288	0,238	0,295	0,362	0,242	0,259	0,312	0,333	0,321	0,323
1,00	0,602	0,712	0,762	0,705	0,638	0,758	0,741	0,688	0,667	0,679	0,676
1,15	0,005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001
Fl-Est											
0	0	0	0	0	0	0	0	0,009	0	0	0,001
0,70	0	0	0,081	0,038	0	0	0	0,009	0	0	0,010
1,00	0,967	0,955	0,806	0,923	1,000	0,984	0,948	0,983	1,000	0,982	0,956
1,30	0,030	0,045	0,113	0,038	0	0,016	0,052	0	0	0,018	0,032
Me											
0	0,004	0	0	0,020	0,100	0,016	0	0,039	0,250	0	0,022
0,10	0,030	0	0	0,040	0	0,048	0,026	0,024	0	0,018	0,024
0,60	0,026	0,045	0	0,020	0,100	0,032	0,026	0,070	0,042	0,018	0,036
1,00	0,901	0,940	1,000	0,920	0,800	0,855	0,947	0,859	0,708	0,964	0,898
1,20	0,039	0,015	0	0	0	0,048	0	0,008	0	0	0,020
Dia-1											
0	0,004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,001
0,80	0	0	0,016	0	0	0,016	0	0	0	0	0,002
1,00	0,996	1,000	0,984	1,000	1,000	0,984	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996
Dia-2											
0	0	0	0	0	0	0	0	0,007	0	0	0,001
0,70	0	0	0	0	0	0	0	0,007	0	0	0,001
1,00	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,987	1,000	1,000	0,998
Dia-4											
1,00	0,530	0,515	0,484	0,481	0,750	0,468	0,534	0,546	0,375	0,393	0,517
1,10	0,470	0,485	0,516	0,519	0,200	0,532	0,466	0,454	0,625	0,607	0,480
1,15	0	0	0	0	0,050	0	0	0	0	0	0,002
Hk											
0,90	0,059	0	0,048	0,042	0	0	0,026	0,032	0,042	0	0,036
1,00	0,937	1,000	0,952	0,938	1,000	1,000	0,974	0,968	0,958	0,971	0,960
1,10	0,004	0	0	0,021	0	0	0	0	0	0,029	0,004

Окончание табл. 1
Ending table 1

Аллель	Популяции										В целом по Беларуси
	БП	Бр	Пр	Гм	Бл	Мг	Бг	Гл	Пл	Гр	
Pgm-1											
0,90	0,004	0,015	0	0	0	0	0	0,013	0	0,036	0,007
1,00	0,996	0,985	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,987	1,000	0,964	0,993
Pgm-2											
0,85	0,004	0	0,032	0	0,052	0,016	0,017	0,013	0,042	0	0,013
1,00	0,928	1,000	0,903	0,886	0,897	0,984	0,948	0,968	0,958	0,929	0,942
1,15	0,067	0	0,065	0,114	0,052	0	0,034	0,019	0	0,071	0,045
Gpi											
0,80	0,106	0,167	0,129	0,038	0,190	0,129	0,052	0,084	0,208	0,125	0,112
1,00	0,818	0,773	0,677	0,808	0,759	0,774	0,914	0,818	0,708	0,857	0,802
1,15	0,063	0,045	0,194	0,154	0,017	0,032	0,017	0,078	0,083	0	0,068
1,25	0,013	0,015	0	0	0,034	0,065	0,017	0,019	0	0,018	0,018

Примечание. БП – Национальный парк «Беловежская пуща»; Бр – Барановичский лесхоз; Пр – Национальный парк «Припятский»; Гм – Гомельский лесхоз; Бл – Бельничский лесхоз; Мг – Могилёвский лесхоз; Бг – Бегомльский лесхоз; Гл – Глубокский лесхоз; Пл – Полоцкий лесхоз; Гр – Городокский лесхоз.

Обращает на себя внимание большое количество аллелей, выявленных у ели европейской практически в каждом локусе (см. табл. 1). При этом основная их часть была представлена в подавляющем числе популяций. Наряду с часто встречающимися аллелями в ельниках обнаружены 22 редких (их частота для вида на территории республики составляет менее 1 %). Интересно отметить, что 10 из 22 редких аллелей присутствовали только в какой-либо одной популяции, т. е. оказались уникальными. Это является отражением микроэволюционных процессов, протекающих в настоящий момент в популяциях ели европейской.

Для большинства генов не выявлено каких-либо тенденций в распределении частот встречаемости аллелей. Исключение составляют гены *Gdh*, *6-Pgd-2* и *Dia-4*, у которых частота встречаемости альтернативных аллелей (0,75; 0,65 и 1,10 соответственно) увеличивается в направлении с юго-запада на северо-восток, а частота доминантных аллелей (1,00) снижается. Следует отметить, что указанные гены входят в группу из 6 генов (*Gdh*, *Dia-4*, *6-Pgd-2*, *6-Pgd-3*, *Gpi*, *Lap-1*), которые, как было показано ранее, проявляют клинальную изменчивость на территории от Карпат до Сибири [7]. Отсутствие каких-либо региональных особенностей в Беларуси по генам *6-Pgd-3*, *Gpi* и *Lap-1*, по-видимому, связано с тем, что площадь нашей страны на этой территории составляет небольшую долю и случайные отклонения (на локальном уровне) в популяционной структуре затушевывают целостную картину.

Интересно, что при анализе природных популяций елей комплекса *P. abies* – *P. obovata* (разделены на 5 групп – карпатские, белорусско-балтийские, предуральские, зауральские, центральносибирские) для 4 генов (*Gpi*, *Dia-4*, *6-Pgd-2* и *6-Pgd-3*) отмечалось постепенное увеличение или уменьшение частоты встречаемости ряда аллельных вариантов от Карпат до Алтая [7]. Полученные результаты по этим генам хорошо согласуются с предположениями о том, что в голоцене произошло воссоединение ареалов ели европейской и ели сибирской, ранее (до оледенений) представлявших собой единый макровид, с образованием клины с запада на восток (особенно хорошо это видно на примере семенных чешуй шишек) [1].

Однако по генам *Gdh* (аллель 0,75) и *Lap-1* (аллель 1,10) наблюдается более сложная ситуация, поскольку максимальную концентрацию указанные аллельные варианты имели не в Карпатах или на Алтае, а на территории около Урала, в то время как на запад и на восток их частота плавно снижалась. Эти данные поддерживают высказанную еще в 1940–50-х гг. гипотезу о том, что во время последнего оледенения ель сохранялась в центральных районах европейской части России, в так называемом Костромском рефугиуме [23; 24]. В этом смысле особого внимания заслуживает предположение о том, что основу Костромского рефугиума составила ель, образовавшаяся в результате контакта чистой *P. abies* и чистой *P. obovata* еще около 100 тыс. лет назад в микулинское межледниковье [24]. В голоцене ель европейская и ель сибирская вошли в соприкосновение не друг с другом, а с елью из Костромского рефугиума, которая начала быстро расширять свой ареал после отступления ледника, и в результате

возникли вторичные зоны гибридизации, одной из которых, по-видимому, является территория Беларуси. При этом ель в Костромском рефугиуме могла по одним аллельным вариантам сохранить частоты встречаемости, образовавшиеся в первичной зоне гибридизации в последнее межледниковье, а по другим – накопить различия, что проявляется в виде клин от Предуралья на запад и восток.

Проведенные ранее исследования показали наличие клинальной изменчивости также по встречаемости остроchешуйчатых форм шишек (характерный признак для особей *subsp. acuminata*) и тупоchешуйчатых форм шишек (отличительная особенность представителей *subsp. abies*), которые являются фенами, т. е. генотипически обусловленными вариантами определенных признаков, чье проявление зависит от генетического материала обеих родительских форм на уровне ядерной ДНК. В направлении с юга на север и с запада на восток долевое участие представителей *subsp. acuminata* в еловой формации Беларуси постепенно уменьшается, а особей *subsp. abies* – увеличивается [4]. На юге республики (подзона широколиственно-сосновых лесов) распространение *subsp. acuminata* достигает 85 %, в то время как в центральной (подзона грабово-дубово-темнохвойных лесов) и северной (подзона дубово-темнохвойных лесов) частях Беларуси составляет 17–24 и 5–7 % соответственно [4; 25]. Но и на территории Полесья данные таксоны произрастают неравномерно, хотя ввиду существующей в ареале дизъюнкции центром вторичного расселения *subsp. acuminata* на Европейской равнине, как отмечает в своей диссертации В. И. Парфенов², является Полесье. Участие *subsp. acuminata* в лесах восточной половины Брестской области (Столинский, Житковичский, Лельчицкий лесхозы) в составе фитоценозов в отдельных экотопах достигает 84 %, в то время как в Национальном парке «Беловежская пуща», Брестском и Кобринском лесхозах составляет 30 % [26].

В отличие от маркеров ядерной ДНК (изоферменты) несколько иная ситуация по распространению представителей *subsp. acuminata* и *subsp. abies* выявлена при анализе митохондриальной ДНК (исследование происходит по материнской линии с помощью семян). На основании результатов изучения локуса mt15-D02 (табл. 2) установлено, что в северной (Витебская область), центральной (Минская область) и восточной (Могилёвская и Гомельская области) частях Беларуси в древостоях *P. abies* встречается только митотип mt15-D02⁷⁵³ в юго-западной (Брестская и частично Гродненская области) – митотипы mt15-D02⁷⁵³ и mt15-D02¹²⁴⁹. Частота встречаемости последнего варианта снижается в северном направлении от 100 % в островных ельниках Брестской области до 40 % в Слонимском лесхозе и 20 % в Волковысском лесхозе Гродненской области.

Таблица 2

Аллельные частоты по митохондриальному локусу mt15-D02 у *P. abies* в Беларуси

Table 2

Allelic frequencies of mitochondrial locus mt15-D02 of *P. abies* in Belarus

Лесхоз, лесничество	Возраст, лет	Состав насаждения	Частота встречаемости митотипов mt15-D02, %	
			1249	753
Брестская область				
Брестский, Меднянское	110	4Е3С2Олч1Д	100	0
Брестский, Каменецкое	80	6Е4С	80	20
Дрогичинский, Антопольское	75	8Е1Б1Олч+Д	100	0
Малоритский, Великоритское	115	9С1Е+Б	100	0
Малоритский, Малоритское	75	7Е2Ос1Олч	100	0
Малоритский, Пожежинское	90	6Е3Ос1Б	90	10
Пинский, Бродницкое	75	6Е2С1Б1Ос	60	40
Пружанский, Березовское	–	–	100	0
Пружанский, Ружанское	100	9Е1С+Б,Д,Е	60	40
Столинский, Столинское	30	8Е2Б+Д,С	100	0
Гродненская область				
Волковысский, Волковысское	95	9Е1С+Б,Д,Е	20	80
Дятловский, Гезгаловское	80	8Е2С	0	100

² Парфенов В. И. Исследование еловых лесов и внутривидовой изменчивости ели обыкновенной на юге ареала (в Полесье) : дис. ... канд. биол. наук. Минск : Ин-т эксперим. ботаники и микробиологии, 1964.

Продолжение табл. 2
Continuation table 2

Лесхоз, лесничество	Возраст, лет	Состав насаждения	Частота встречаемости митотипов mt15-D02, %	
			1249	753
Лидский, Лидское	90	5E4C1Oc	0	100
Сморгонский, Сморгонское	75	8E1Oc1Б	0	100
Щучинский, Дембровское	90	8E2Oc	0	100
Слонимский, Альбертинское	100	7E2C1Д+Ос,Б	60	40
Гродненский, Индурское	80	5E2C2Oc1Б	0	100
Ивьевский, Ивьевское	80	6E2C1Б1Oc	0	100
Гомельская область				
НП «Припятский», Симоничское	80	6E3C1Б	0	100
Лельчицкий, Замошское	65	7E1Б2Oc	0	100
Житковичский, Милевичское	70	5E2C2Oc1Б	0	100
Петриковский, Лучицкое	65	5E5C	0	100
Октябрьский, Шкавское	–	–	0	100
Калинковичский, Клиновское	85	6E1C2Олч1Б	0	100
Речицкий, Бело-Болотское	95	6E2C2Д+Ос	0	100
Рогачевский, Сверженское	60	8E2C	0	100
Минская область				
Борисовский, Пригородное	90	9E1C	0	100
Воложинский, Ивенецкое	79	10Е+Б,Олч,С	0	100
Клецкий, Несвижское	80	7E1Д1Г1C	0	100
Копыльский, Копыльское	55	10Е+С,Б	0	100
Крупский, Крупское	90	6E3C1Б	0	100
Логойский, Каменское	90	8E2C	0	100
Молодечненский, Молодечненское	70	8E1C1Б	0	100
Пуховичский, Светоборское	100	9E1C	0	100
Слуцкий, Жилин-Бродское	60	7E1C2Б+Ос	0	100
Старобинский, Краснослободское	85	6E2C2Г+Д,Б,Олч,Ос	0	100
Стародорожский, Фаличское	50	4E1C3Б2Oc	0	100
Столбцовский, Окинчицкое	110	5E3C2Б+Д,Е	0	100
Узденский, Валерьяновское	65	6E2Б2Oc+Олч,Кл	0	100
Могилёвская область				
Белыничский, Кругловичское	65	7E1C1Б1Oc+Д	0	100
Быховский, Ворониновское	100	6E4C+Б,Ос	0	100
Горецкий, Темнолесское	55	8E2Д+С,Ос	0	100
Жорновская ЭЛБ, Лапичское	70	5E3Б2Oc+Г,Д	0	100
Кличевский, Кличевское	60	6E2C2Б+Ос,Д	0	100
Костюковичский, Костюковичское	–	–	0	100
Витебская область				
Верхнедвинский, Верхнедвинское	100	8E2C	0	100
Витебский, Лосвидское	120	7E1C2Е+Б	0	100
Городокский, Езеришенское	60	7E1Б2Oc+Олч	0	100

Окончание табл. 2
Ending table 2

Лесхоз, лесничество	Возраст, лет	Состав насаждения	Частота встречаемости митотипов mt15-D02, %	
			1249	753
Двинская ЭЛБ, Прошковское	110	8Е2С	0	100
Дисненский, Миорское	60	7Е2С1Б	0	100
Леоэненский, Ясенево	70	10Е	0	100
Полоцкий, Полоцкое	70	4Е3С3Б+Ос	0	100
Полоцкий, Туровлянский	75	9Е1Олч+С,Б	0	100
Россоновский, Россоновское	80	7Е2С1Б	0	100
Ушачский, Плинское	55	9Е1Б+Е,Ос,С	0	100
Шумилинский, Обольское	72	6Е3С1Б+Ос	0	100

Примечание. НП – национальный парк; ЭЛБ – экспериментальная лесная база Института леса НАН Беларуси.

Выявляемая по локусу mt15-D02 амплифицируемая зона размером 1249 нуклеотидных оснований (н. о.), как показано в работах зарубежных исследователей, характерна для южного постледникового миграционного потока *P. abies*, происходящего из Карпатского рефугиума, а зона размером 753 н. о. соответствует северному (бореальному) миграционному потоку, который распространялся с территории Русской равнины (северо-центральная область европейской части России) [9; 11; 12]. Таким образом, обнаруженный нами полиморфизм митохондриальной ДНК *P. abies* подтверждает, что на территории Беларуси произрастают особи, имеющие различное историческое происхождение, а именно карпатское и бореальное. В связи с вышеуказанным возникает вопрос о встречаемости представителей двух миграционных потоков в еловой формации Беларуси. Проведенные исследования показали, что деревья, происходящие по материнской линии от древостоев Карпатского региона, локализованы в юго-западной части Беларуси, при этом они не были выявлены в северных, центральных и восточных регионах страны. Полученные данные не в полной мере согласуются с результатами исследований по изоферментам и фенам.

В ходе анализа 3 микросателлитных локусов хлоропластной ДНК *P. abies* (наследование по отцовской линии за счет распространения пыльцы) были выявлены 19 аллелей: локус Pt63718 – 7 (90; 91; 93; 94; 95 (доминирующий); 96; 97 н. о.); локус Pt26081 – 7 (105; 106; 107; 108; 109 (доминирующий); 110; 111 н. о.); локус Pt71936 – 5 (138; 139; 140 и 141 (доминирующие); 142 н. о.). Частоты встречаемости выявленных аллелей каждого локуса по областям представлены в табл. 3.

Таблица 3

Аллельные частоты по хлоропластным локусам у *P. abies* в Беларуси

Table 3

Allelic frequencies of chloroplast loci of *P. abies* in Belarus

Аллель	Область						Среднее по Беларуси
	Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	Минская	Могилёвская	
Pt63718							
90	0,021	–	–	–	–	–	0,003
91	0,143	0,138	0,272	0,194	0,156	0,087	0,165
93	–	0,006	0,016	–	–	–	0,004
94	0,044	0,126	0,153	0,064	0,094	0,100	0,097
95	0,680	0,654	0,434	0,632	0,677	0,681	0,626
96	0,093	0,076	0,125	0,089	0,073	0,124	0,097
97	0,019	–	–	0,021	–	0,008	0,008
Pt26081							
105	–	–	–	–	–	0,008	0,001
106	–	–	–	–	–	0,011	0,002

Окончание табл. 3
Ending table 3

Аллель	Область						Среднее по Беларуси
	Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	Минская	Могилёвская	
107	–	–	–	–	0,010	–	0,002
108	0,067	0,031	0,016	0,059	0,094	0,024	0,049
109	0,662	0,747	0,823	0,749	0,629	0,678	0,715
110	0,271	0,218	0,130	0,179	0,246	0,279	0,220
111	–	0,004	0,031	0,013	0,021	–	0,011
Pt71936							
138	0,007	–	–	–	–	0,037	0,007
139	0,099	0,010	0,033	0,017	0,018	0,010	0,031
140	0,464	0,598	0,600	0,578	0,571	0,482	0,549
141	0,394	0,377	0,367	0,386	0,399	0,471	0,399
142	0,036	0,015	–	0,019	0,012	–	0,014

Практически все аллели отмечены в двух и более проанализированных ельниках. Однако некоторые варианты являлись уникальными и могли встречаться на территории лишь одного лесхоза (Pt26081¹⁰⁵ – Бельничский лесхоз, Pt26081¹⁰⁶ – Кличевский лесхоз Могилёвской области, Pt26081¹⁰⁷ – Крупский лесхоз Минской области). Аллель Pt63718⁹⁰ обнаружен только в древостоях *P. abies* Брестского и Ивацевичского лесхозов Брестской области. Наибольшее количество аллельных вариантов (по 14 ед.) выявлено в Брестской и Могилёвской областях, наименьшее – в Гомельской области (12 ед.). По локусу Pt71936 на территории различных лесхозов мог доминировать либо аллельный вариант Pt71936¹⁴⁰, либо Pt71936¹⁴¹.

В ходе анализа регионального распределения частот встречаемости аллелей микросателлитных локусов хлоропластной ДНК *P. abies* в разрезе областей наибольшие отличия от среднего по Беларуси выявлены для еловой формации Гомельской области по Pt63718 и Pt26081, а также для еловой формации Брестской области по Pt71936. Так, на территории Гомельской области частота встречаемости аллельных вариантов Pt63718⁹¹ и Pt63718⁹⁴ выше, чем в среднем по Беларуси, в 1,7 и 1,6 раза соответственно, а частота встречаемости Pt63718⁹⁵ и Pt26081¹¹⁰ ниже в 1,4 и 1,7 раза. В Брестской области выявлена концентрация аллеля Pt71936¹³⁹ (в 3,2 раза выше, чем в среднем по Беларуси), отмечено снижение частоты аллеля Pt71936¹⁴⁰. На территории региона также обнаружена самая низкая доля встречаемости аллельного варианта Pt63718⁹⁴ (4,4 %). По-видимому, такие особенности генетической структуры еловой формации в Гомельской и Брестской областях связаны с зональностью распространения древесного вида. Именно по данным территориям проходит южная граница распространения *P. abies*, а точнее по северной окраине Полесской низменности, южнее которой отмечаются лишь островные местонахождения изучаемого вида [5].

Анализ распределения аллельных вариантов *P. abies* по 3 изученным локусам хлоропластной ДНК не выявил существенных географических особенностей (по доминирующим аллелям), однако некоторые различия (по аллелям с меньшей частотой встречаемости) были установлены. Так, по локусу Pt63718 между западными и восточными областями Беларуси наблюдаются отличия, связанные с повышением частоты встречаемости варианта Pt63718⁹⁴ в восточной части Беларуси, наличием Pt63718⁹⁰ на юго-западе страны (Брестский и Ивацевичский лесхозы Брестской области), присутствием Pt63718⁹³ в Житковичском лесхозе Гомельской области и Лепельском лесхозе Витебской области. Что касается еще одного редкого аллеля (Pt63718⁹⁷), то он обнаружен в ельниках Лунинецкого лесхоза Брестской области и Сморгонского опытного лесхоза Гродненской области (частота встречаемости 0,167), а также в Чаусском лесхозе Могилёвской области (частота встречаемости 0,067).

По локусу Pt71936 в западной части Беларуси увеличивается частота встречаемости варианта Pt71936¹³⁹ при практически полном отсутствии в восточной части. Он отмечен в Брестской и Гродненской областях, в западных частях Минской и Витебской областей, а также в островных ельниках на юге Гомельской области (Комаринский и Лельчицкий лесхозы), т. е. за пределами сплошного произрастания изучаемого вида. Подобная ситуация наблюдается и для Pt71936¹⁴² (за исключением того, что этот вариант отсутствовал в Гомельской области). Аллель Pt71936¹³⁸ обнаружен на территории трех

лесхозов Могилёвской области (Кличевского – с частотой 0,092, Могилёвского – 0,133, Чаусского – 0,071) и одного лесхоза Брестской области (Малоритского – 0,067).

По локусу Pt26081 несколько выделяется центральная часть Беларуси. Аллель Pt26081¹⁰⁸, достаточно часто встречающийся в этой зоне, отсутствует на периферии страны – в западной части Брестской области, северо-западной части Витебской области, восточных частях Могилёвской и Гомельской областей. Сходная картина наблюдается и для Pt26081¹¹¹. Следует отметить, что, хотя варианты Pt26081¹⁰⁵, Pt26081¹⁰⁶ и Pt26081¹⁰⁷ обнаружены на территории только одного из лесхозов – Бельничского, Кличевского и Крупского соответственно, – эти лесхозы примыкают друг к другу, располагаясь на границе Минской и Могилёвской областей. Географическое распространение редких аллелей позволяет скорее предположить их местное происхождение, а не привнесение с миграционными потоками.

Выявленные особенности распространения ряда аллельных вариантов локусов Pt63718 и Pt71936 хлоропластной ДНК несколько отличаются от данных по митохондриальной ДНК и более хорошо согласуются с результатами исследований по маркерам ядерной ДНК, что указывает в этом случае на влияние однородных факторов при перемещении генетического материала. На основании совокупности имеющихся результатов исследований можно говорить о различном влиянии пула материнских генов и пула отцовских генов на процессы гибридизации между представителями двух таксонов. Таким образом, распространение принесенного южным и северным миграционными потоками генетического материала по территории республики идет разнородно как во времени, так и в пространстве, при этом ельники значительной части лесхозов Гродненской, Минской и Гомельской областей представляют собой обширную зону гибридизации. На то, что обмен генов между южным и северным миграционными потоками *P. abies* осуществляется преимущественно посредством пыльцы, указывает также исследование ядерной и цитоплазматической ДНК, проведенное Ё. Цудой (Y. Tsuda) с соавторами [15].

Заключение

Исследована геногеографическая структура популяций *P. abies* на территории Беларуси с использованием маркеров ядерной и цитоплазматической ДНК. Выявлены 82 аллельных варианта 25 изоферментных генов, 19 аллельных вариантов локусов Pt63718, Pt26081, Pt71936 хлоропластной ДНК и 2 аллельных варианта локуса mt15-D02 митохондриальной ДНК. Установлено географическое распространение аллелей и рассмотрены региональные особенности геногеографической дифференциации еловой формации. Для еловых древостоев юга Беларуси, где протекает южная граница сплошной области распространения *P. abies* и представлены ее островные местонахождения, частота встречаемости отдельных аллельных вариантов SSR-локусов хлоропластной ДНК (Гомельская область – Pt63718⁹¹, Pt63718⁹⁴, Pt63718⁹⁵, Pt26081¹¹⁰; Брестская область – Pt71936¹³⁹, Pt71936¹⁴⁰, Pt63718⁹⁴) имеет наиболее выраженные отклонения от средних значений по стране. Анализ изоферментов и хлоропластной ДНК показал наличие определенных региональных особенностей геногеографической структуры еловой формации в направлении с юга на север и с запада на восток; анализ митохондриальной ДНК – концентрацию на юго-западе Беларуси деревьев *P. abies* южного (карпатского) происхождения (имеют аллель mt15-D02¹²⁴⁹), а на остальной части страны – северного (бореального) происхождения (характеризуются вариантом mt15-D02⁷⁵³). Сопоставлены особенности географического распределения аллельных вариантов проанализированных локусов цитоплазматической ДНК с территориальным размещением формового разнообразия *P. abies* (деревья с тупо- и острошешуйчатыми формами шишек). На основании совокупности имеющихся результатов исследований можно говорить о различном влиянии пула материнских генов и пула отцовских генов на процессы гибридизации между представителями двух миграционных потоков на территории Беларуси.

Библиографические ссылки

1. Правдин ЛФ. *Ель европейская и ель сибирская в СССР*. Москва: Наука; 1975. 178 с.
2. Юркевич ИД, Голод ДС, Парфенов ВИ. *Типы и ассоциации еловых лесов (по исследованиям в БССР)*. Минск: Наука и техника; 1971. 351 с.
3. Парфенов ВИ. Новые для флоры Белоруссии биологические формы ели обыкновенной. *Доклады Академии наук БССР*. 1964;8(3):188–191.
4. Юркевич ИД, Голод ДС, Парфенов ВИ. Типология и формовой состав еловых лесов Белоруссии. В: Жуков АБ, редактор. *Вопросы лесоведения. Том 1*. Красноярск: [б. и.]; 1970. с. 180–185.
5. Парфенов ВИ. *Обусловленность распространения и адаптация видов растений на границах ареалов*. Минск: Наука и техника; 1980. 205 с.
6. Krutovskii KV, Bergmann F. Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity*. 1995;74(5):464–480. DOI: 10.1038/hdy.1995.67.

7. Гончаренко ГТ, Падутов ВЕ. Популяционная и эволюционная генетика елей Палеарктики. Гомель: Институт леса НАН Беларуси; 2001. 197 с.
8. Maghuly F, Nittinger F, Pinsker W, Praznik W, Fluch S. Differentiation among Austrian populations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] assayed by mitochondrial DNA markers. *Tree Genetics & Genomes*. 2007;3(3):199–206. DOI: 10.1007/s11295-006-0055-z.
9. Jin-Hua Ran, Xiao-Xin Wei, Xiao-Quan Wang. Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (Pinaceae): implications for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006;41(2):405–419. DOI: 10.1016/j.ympev.2006.05.039.
10. Litkowiec M, Dering M, Lewandowski A. Utility of two mitochondrial markers for identification of *Picea abies* refugial origin. *Dendrology*. 2009;61:65–71.
11. Dering M, Misiorny A, Lewandowski A, Korczyk A. Genetic and historical studies on the origin of Norway spruce in Białowieża Primeval Forest in Poland. *European Journal of Forest Research*. 2012;131(2):381–387. DOI: 10.1007/s10342-011-0510-8.
12. Потокина ЕК, Орлова ЛВ, Вишневецкая МС, Алексеева ЕА, Потокин АФ, Егоров АА. Генетическая дифференциация популяций ели на северо-западе России по результатам маркирования микросателлитных локусов. *Экологическая генетика*. 2012;10(2):40–49.
13. Aizawa M, Yoshimaru H, Ogawa H, Goto S, Kaji M. Natural hybridization of Yezo and Sakhalin spruce in central Hokkaido, revealed by DNA markers with contrasting modes of inheritance. *Plant Species Biology*. 2016;31(3):188–195. DOI: 10.1111/1442-1984.12101.
14. Мудрик ЕА, Полякова ТА, Шатохина АВ, Бондаренко ГН, Политов ДВ. Пространственное распределение гаплотипов второго интрона гена *nad1* в популяциях комплекса европейской и сибирской елей (*Picea abies* – *P. obovata*). *Генетика*. 2015;51(10):1117–1125. DOI: 10.7868/S0016675815100124.
15. Tsuda Y, Chen J, Stocks M, Källman T, Sønstebo JH, Parducci L, et al. The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? *Molecular Ecology*. 2016;25(12):2773–2789. DOI: 10.1111/mec.13654.
16. Harris H, Hopkinson DA. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics (with supplements)*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1978. [360 p.].
17. Wendel JF, Stuber CW. Plant isozymes: enzymes studied and buffer systems for their electrophoretic resolution in starch gels. *Isozyme Bulletin*. 1984;17:4–11.
18. Cheliak WM, Pitel JA. *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species*. Ottawa: Canadian Forestry Services; 1984. 49 p. Information report No.: PI-X-42.
19. Гончаренко ГТ, Падутов ВЕ, Потенко ВВ. Руководство по исследованию хвойных видов методом электрофоретического анализа изоферментов. 2-е издание. Гомель: Белорусский научно-исследовательский институт лесного хозяйства; 1989. 163 с.
20. Падутов ВЕ, Баранов ОЮ, Воропаев ЕВ. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол; 2007. 176 с.
21. Bucci G, Vendramin GG. Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Molecular Ecology*. 2000;9(7):923–934. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.00946.x.
22. Экарт АК, Семерикова СА, Семериков ВЛ, Кравченко АН, Дымшакова ОС, Ларионова АЯ. Применение различных типов генетических маркеров для оценки уровня внутривидовой дифференциации ели сибирской. *Сибирский лесной журнал*. 2014;4:84–91.
23. Нейштадт МИ. История лесов и палеогеография СССР в голоцене. Москва: Издательство Академии наук СССР; 1957. 403 с.
24. Голубец МА. Современная трактовка объема вида *Picea abies* (L.) Karst. и его внутривидовых таксонов. *Ботанический журнал*. 1968;53(8):1048–1062.
25. Юркевич ИД, Парфенов ВИ. К вопросу о систематике *Picea abies* (L.) Karst. *Бюллетень Главного ботанического сада*. 1967;64:41–48.
26. Парфенов ВИ. Флора Полесья как модель современной и прогнозной динамики флоры умеренной зоны. В: *Ботаника. Исследования. Выпуск 22*. Минск: Наука и техника; 1980. с. 48–56.

References

1. Pravdin LF. *El' evropeiskaya i el' sibirskaya v SSSR* [Norway spruce and Siberian spruce in the USSR]. Moscow: Nauka; 1975. 178 p. Russian.
2. Yurkevich ID, Golod DS, Parfenov VI. *Tipy i assotsiatsii elovykh lesov (po issledovaniyam v BSSR)* [Types and associations of spruce forests (according to research in the BSSR)]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1971. 351 p. Russian.
3. Parfenov VI. [Biological forms of Norway spruce, new for the flora of Belarus]. *Doklady Akademii nauk BSSR*. 1964;8(3):188–191. Russian.
4. Yurkevich ID, Golod DS, Parfenov VI. [Typology and shape composition of spruce forests in Belarus]. In: Zhukov AB, editor. *Voprosy lesovedeniya. Tom 1* [Questions of forest science. Volume 1]. Krasnoyarsk: [s. n.]; 1970. p. 180–185. Russian.
5. Parfenov VI. *Obuslovlennost' rasprostraneniya i adaptatsiya vidov rastenii na granitsakh arealov* [Conditionality of distribution and adaptation of plant species at the boundaries of areas]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1980. 205 p. Russian.
6. Krutovskii KV, Bergmann F. Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity*. 1995;74(5):464–480. DOI: 10.1038/hdy.1995.67.
7. Goncharenko GG, Padutov VE. *Populyatsionnaya i evolyutsionnaya genetika elei Palearktiki* [Population and evolutionary genetics of Palearctic spruces]. Gomel: Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus; 2001. 197 p. Russian.
8. Maghuly F, Nittinger F, Pinsker W, Praznik W, Fluch S. Differentiation among Austrian populations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] assayed by mitochondrial DNA markers. *Tree Genetics & Genomes*. 2007;3(3):199–206. DOI: 10.1007/s11295-006-0055-z.
9. Jin-Hua Ran, Xiao-Xin Wei, Xiao-Quan Wang. Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (Pinaceae): implications for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2006;41(2):405–419. DOI: 10.1016/j.ympev.2006.05.039.

10. Litkowiec M, Dering M, Lewandowski A. Utility of two mitochondrial markers for identification of *Picea abies* refugial origin. *Dendrology*. 2009;61:65–71.
11. Dering M, Misiorny A, Lewandowski A, Korczyk A. Genetic and historical studies on the origin of Norway spruce in Białowieża Primeval Forest in Poland. *European Journal of Forest Research*. 2012;131(2):381–387. DOI: 10.1007/s10342-011-0510-8.
12. Potokina EK, Orlova LV, Vishnevskaya MS, Alekseeva EA, Potokin AF, Egorov AA. Genetic differentiation of spruce populations in northwest Russia revealed with microsatellite markers. *Ecological genetics*. 2012;10(2):40–49. Russian.
13. Aizawa M, Yoshimaru H, Ogawa H, Goto S, Kaji M. Natural hybridization of Yezo and Sakhalin spruce in central Hokkaido, revealed by DNA markers with contrasting modes of inheritance. *Plant Species Biology*. 2016;31(3):188–195. DOI: 10.1111/1442-1984.12101.
14. Mudrik EA, Polyakova TA, Shatokhina AV, Bondarenko GN, Politov DV. Spatial distribution of intron 2 of *nad1* gene haplotypes in populations of Norway and Siberian spruce (*Picea abies* – *P. obovata*) species complex. *Genetika*. 2015;51(10):1117–1125. Russian. DOI: 10.7868/S0016675815100124.
15. Tsuda Y, Chen J, Stocks M, Källman T, Sonstebø JH, Parducci L, et al. The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? *Molecular Ecology*. 2016;25(12):2773–2789. DOI: 10.1111/mec.13654.
16. Harris H, Hopkinson DA. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics (with supplements)*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1978. [360 p.].
17. Wendel JF, Stuber CW. Plant isozymes: enzymes studied and buffer systems for their electrophoretic resolution in starch gels. *Isozyme Bulletin*. 1984;17:4–11.
18. Cheliak WM, Pitel JA. *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species*. Ottawa: Canadian Forestry Services; 1984. 49 p. Information report No.: PI-X-42.
19. Goncharenko GG, Padutov VE, Potenko VV. *Rukovodstvo po issledovaniyu khvoynykh vidov metodom elektroforeticheskogo analiza izofermentov* [Manual for the study of coniferous species by the method of electrophoretic analysis of isoenzymes]. 2nd edition. Gomel: Belorusskii nauchno-issledovatel'skii institut lesnogo khozyaistva; 1989. 163 p. Russian.
20. Padutov VE, Baranov OYu, Voropaev EV. *Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza* [Methods of molecular genetic analysis]. Minsk: Yunipol; 2007. 176 p. Russian.
21. Bucci G, Vendramin GG. Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence. *Molecular Ecology*. 2000;9(7):923–934. DOI: 10.1046/j.1365-294x.2000.00946.x.
22. Ekart AK, Semerikova SA, Semerikov VL, Kravchenko AN, Dymshakova OS, Larionova AY. The use of genetic markers of various types for evaluation of intraspecific differentiation level of the Siberian spruce]. *Sibirskii lesnoi zhurnal*. 2014;4:84–91. Russian.
23. Neishtadt MI. *Istoriya lesov i paleogeografiya SSSR v golotsene* [History of forests and paleogeography of the USSR in the Holocene]. Moscow: Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR; 1957. 403 p. Russian.
24. Golubets MA. [Modern interpretation of the volume of the species *Picea abies* (L.) Karst. and its intraspecific taxa]. *Botanicheskii zhurnal*. 1968;53(8):1048–1062. Russian.
25. Yurkevich ID, Parfenov VI. [On the taxonomy of *Picea abies* (L.) Karst.]. *Byulleten' Glavnogo botanicheskogo sada*. 1967;64:41–48. Russian.
26. Parfenov VI. [Flora of Polesie as a model of modern and forecast dynamics of the flora of the temperate zone]. In: *Botanika. Issledovaniya. Vypusk 22* [Botany. Researches. Issue 22]. Minsk: Nauka i tekhnika; 1980. p. 48–56. Russian.

Статья поступила в редколлегию 01.02.2021.
Received by editorial board 01.02.2021.

МЕЖГЕННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ В УВЕЛИЧЕНИИ ВЕРОЯТНОСТИ РАЗВИТИЯ АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Е. В. СНЫТКОВ¹⁾, В. Н. КИПЕНЬ²⁾, А. В. КАЗАЧОК³⁾, С. Б. МЕЛЬНОВ¹⁾

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

²⁾Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

³⁾Минский областной клинический центр «Психиатрия – наркология»,
ул. П. Бровки, 7, 220013, г. Минск, Беларусь

Представлены результаты молекулярно-генетического анализа 13 полиморфных вариантов генов, по данным полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) связанных с развитием аддиктивных состояний, в группе лиц с алкогольной зависимостью ($n = 142$) и группе сравнения ($n = 211$). Основным методом генотипирования – полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим высокоразрешающим плавлением ампликона (HRM) и кластеризацией профилей плавления, результаты плавления валидированы с использованием метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В итоге установлено, что однонуклеотидными полиморфизмами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости, являются генотип GG (rs7085104, *AS3MT*); генотип GG (rs7590720, *PECR*); аллель C (rs11191580, *NT5C2*); аллель T (rs17504622); аллель A (rs73229090, *EPHX2*); аллель A (rs1109501, *MUC7*).

Ключевые слова: алкогольная зависимость; предрасположенность; однонуклеотидный полиморфизм; ПЦР; высокочувствительный анализ кривых плавления; межгеновое взаимодействие.

Благодарность. Исследование частично поддержано грантом Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ гос. регистрации 20151043 от 04.05.2015 г.).

Образец цитирования:

Снытков ЕВ, Кипень ВН, Казачок АВ, Мельнов СБ. Межгеновые взаимодействия и генетический полиморфизм в увеличении вероятности развития алкогольной зависимости. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1:92–105.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-92-105>

For citation:

Snytkov EV, Kipen VN, Kazachok AV, Melnov SB. Intergenic interactions and genetic polymorphism in increasing the probability of alcoholic dependence. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2021;1:92–105. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-92-105>

Авторы:

Евгений Владимирович Снытков – преподаватель кафедры общей биологии и генетики факультета экологической медицины.

Вячеслав Николаевич Кипень – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории генетической и клеточной инженерии.

Александр Викторович Казачок – врач-психиатр-нарколог, заведующий организационно-методическим консультативным отделом.

Сергей Борисович Мельнов – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры экологической медицины и радиобиологии факультета экологической медицины.

Authors:

Evgenii V. Snytkov, lecturer at the department of general biology and genetics, faculty of environmental medicine.
evsnytkov@gmail.com

Vyacheslav N. Kipen, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of genetic and cellular engineering.
v.kipen@igc.by

Aleksandr V. Kazachok, psychiatrist-narcologist, head of the organizational and methodological advisory department.
kazachok@tut.by

Sergei B. Melnov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of environmental medicine and radiobiology, faculty of environmental medicine.
sbmelnov@gmail.com

INTERGENIC INTERACTIONS AND GENETIC POLYMORPHISM IN INCREASING THE PROBABILITY OF ALCOHOLIC DEPENDENCE

E. V. SNYTKOV^a, V. N. KIPEN^b, A. V. KAZACHOK^c, S. B. MELNOV^a

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

*^bInstitute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus*

*^cMinsk Regional Clinical Center «Psychiatry – Narcology»,
7 P. Broŭki Street, Minsk 220013, Belarus*

Corresponding author: E. V. Snytkov (evsnytkov@gmail.com)

The results of molecular genetic analysis of 13 polymorphic variants of genes, according to the data of genome-wide association studies (GWAS) associated with the development of addictive states, in the group of persons with alcohol dependence ($n = 142$) and in the comparison group ($n = 211$) are presented. The main genotyping method is polymerase chain reaction (PCR) followed by high resolution melting (HRM) and clustering of melting profiles; the melting results are validated using the restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. As a result, single nucleotide polymorphisms associated with an increased likelihood of alcohol dependence are genotype GG (rs7085104, *AS3MT*); genotype GG (rs7590720, *PECR*); allele C (rs11191580, *NT5C2*); allele T (rs17504622); allele A (rs73229090, *EPHX2*); allele A (rs1109501, *MUC7*).

Keywords: alcohol dependence; predisposition; single nucleotide polymorphism; PCR; high resolution melting curve analysis; intergenic interaction.

Acknowledgements. This study was partially supported by a grant from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (state registration No. 20151043 dated 04.05.2015).

Введение

Синдром алкогольной зависимости (алкоголизм, САЗ, код по Международной классификации болезней – F10) – хроническое состояние, характеризующееся пристрастием к алкоголю с психической и физиологической зависимостью от него. При этом синдром алкогольной зависимости имеет ряд социальных проявлений (повышение смертности, снижение уровня жизни людей, уменьшение налоговых отчислений, падение производительности труда, рост числа непреднамеренных травм, дорожно-транспортных происшествий, суицидов, случаев криминального поведения и др.).

Известно, что алкоголь способствует увеличению риска смерти от сопутствующих заболеваний, таких как цирроз печени, рак, сердечно-сосудистые заболевания. По данным Всемирной организации здравоохранения¹ (ВОЗ), тенденции потребления алкоголя и связанная с этим смертность в Европейском регионе с 1990 по 2014 г. показывают, что за этот период (25 лет) смертность, связанная с алкоголем, увеличилась на 4 %. Число смертельных исходов от сердечно-сосудистых заболеваний (исключая ишемическую болезнь сердца) и травм пропорционально выше в Центрально-Восточной и Восточной Европе вследствие общего высокого уровня потребления алкоголя в сочетании с эпизодами употребления спиртных напитков в больших количествах [1].

Также стоит отметить, что в Европейском регионе доля уровня заболеваемости и преждевременной смертности, обусловленных алкоголизмом, является самой высокой в мире. Установлено, что риск смерти от хронического заболевания, связанного с употреблением алкоголя, линейно возрастает с увеличением количества потребленного алкоголя в соответствии с моделью *доза – эффект*. По данным ВОЗ, в начале XX в. коэффициент смертности, ассоциированной с алкоголем, на 100 тыс. человек в масштабах Европейского союза составлял 57 для мужчин и 15 для женщин. Вместе с тем региональные уровни смертности варьировали в широких пределах: от 129 для мужчин и 27 для женщин на 100 тыс. человек в Центрально-Восточной и Восточной Европе до 30 для мужчин и 10 для женщин (самый низкий уровень) в Южной Европе. Причиной подавляющего большинства смертельных исходов и увечий, связанных с алкоголизмом, является транспортный травматизм, второе место (со значительным отставанием) занимает насилие [1].

В Республике Беларусь ведется статистический учет случаев развития алкогольной зависимости и употребления алкоголя на душу населения. По данным Национального статистического комитета

¹См.: <https://www.who.int/ru>.

Республики Беларусь, в последнее десятилетие уровень заболеваемости алкоголизмом и алкогольными психозами постепенно снижается. Стоит отметить, что это снижение не является результатом сокращения численности населения, так как количество пациентов с впервые установленным диагнозом на 100 тыс. человек уменьшается с 2010 г.

В настоящее время дискутируются две основные гипотезы: первая – генетический фактор развития алкогольной зависимости обусловлен совокупным влиянием множества низко- и среднепенетрантных генов, каждый из которых обладает незначительным эффектом по отдельности; вторая – наибольший вклад в развитие алкогольной зависимости вносит немногочисленная группа высокопенетрантных генов. Известно, что у людей, родители которых имели проблемы с контролем употребления алкоголя, риск развития алкоголизма заметно выше [2], поэтому, на наш взгляд, генетические и экологические факторы риска одинаково важны в развитии алкоголизма.

Алкогольная зависимость у одного из членов семьи является сильным предиктором алкоголизма и у других членов семьи с положительной корреляционной связью. Это обусловлено более ранним началом употребления алкоголя [3] и более тяжелой симптоматикой алкоголизма [4].

В настоящий момент общеизвестными генами, полиморфные локусы которых связаны с развитием алкогольной зависимости, являются *ADH1B* и *ALDH2*. У людей более 90 % поглощенного алкоголя удаляется путем метаболического разложения, которое в основном происходит в печени (гепатоцитах). Генетические полиморфизмы p.His48Arg (*ADH1B*) и p.Glu504Lys (*ALDH2*) оказывают сильное влияние на метаболизм алкоголя. Скорость окисления этанола увеличивается при носительстве аллеля His (*ADH1B*) и уменьшается при наличии аллеля Lys (*ALDH2*), который кодирует неактивную форму фермента, что приводит к повышению уровня ацетальдегида после употребления алкоголя из-за более медленной скорости его метаболизма. В европеоидных популяциях почти нет гетерозигот этих связанных с алкоголем полиморфизмов [5]. Установлено, что полиморфизм гена *ADH1B* оказывает большое влияние на ряд признаков, в том числе алкогольную зависимость [6] и рак желудочно-кишечного тракта [7–10]. Влияние полиморфизма гена *ALDH2* во многом зависит от расовой или этнической группы. Так, например, было показано, что патологический генотип более распространен среди азиатов, чем среди европейцев или афроамериканцев [11]. Данный факт, несомненно, диктует необходимость выявления дополнительных генов, полиморфизм которых связан с развитием алкоголизма вне зависимости от расовой либо этнической группы.

В постгеномную эру все больше исследований направлено на полногеномный поиск ассоциаций (*genome-wide association studies*, GWAS) генетических маркеров с развитием алкоголизма [12; 13].

В связи с этим определение и оценка частоты распространенности рискассоциированных аллелей потенциальных генов-кандидатов, влияющих на формирование алкогольной зависимости, представляются весьма актуальной задачей. Таким образом, цель настоящего исследования – оценить частоту распространенности генотипов и аллелей для ряда полиморфных вариантов генов, по данным GWAS предположительно ассоциированных с повышенной вероятностью развития аддиктивных зависимостей.

Материалы и методы исследования

Данное исследование проведено по типу *случай – контроль*. В него были включены 353 добровольца, постоянно проживающих на территории Республики Беларусь, для 142 из которых клинически установлена алкогольная зависимость (основная группа), в то время как 211 человек не имели пристрастия к спиртосодержащим веществам (группа сравнения). По основным демографическим критериям (пол, возраст, социальный статус и пр.) группа сравнения соответствовала основной группе.

После проведения разъяснительной беседы и получения добровольного согласия в письменной форме у всех испытуемых был осуществлен забор биологического материала (буккального эпителия) на тампон-зонд. ДНК выделяли стандартным двухэтапным методом фенольно-хлороформной экстракции [14]. Идентификацию генотипа в исследуемых полиморфных сайтах проводили с использованием технологии плавления ампликона высокого разрешения (*high resolution melting*, HRM) на термоциклере CFX96 Touch (*Bio-Rad*, США) в режиме реального времени по следующему протоколу: 1) стадия амплификации (95 °C, 2 мин); 2) денатурация ДНК (95 °C, 10 с), отжиг праймеров (60 °C, 30 с), элонгация (72 °C, 30 с) – 40 циклов; 3) стадия плавления ампликона (95 °C в течение 30 с, 60 °C на протяжении 1 мин, затем повышение температуры от 65 до 95 °C (температурный инкремент +0,2 °C) со считыванием флуоресцентного сигнала в течение 10 с на каждом этапе). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 20 мкл с использованием реагента Precision Melt Supermix for High Resolution Melt (HRM) Analysis (*Bio-Rad*) в 3-кратной повторности согласно рекомендации производителя, количество геномной ДНК на реакцию составляло 30–50 нг, концентрация праймеров была 200–400 нмоль/л. Для анализа результатов аллельной кластеризации применяли программное обеспечение *Precision Melt*

*Analysis*TM v.1.3 (*Bio-Rad*). Корректность определения генотипа контролировали с помощью метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ).

Праймеры смоделированы с использованием инструмента Primer-BLAST² (*National Center for Biotechnology Information*, США), в котором реализованы алгоритмы Primer3 и BLAST. Характеристика исследованных полиморфизмов представлена в табл. 1.

Таблица 1

Структура праймеров для амплификации
фрагментов в полиморфных сайтах генов

Table 1

The structure of primers for amplification
of fragments in polymorphic gene sites

Полиморфизм (ген)	Последовательность олигонуклеотидов	Рестриктаза*
rs6902771 (<i>ESR1</i>)	F: 5'-AGTGCCATGAAAAACAAGTATAGGG-3' R: 5'-CTCCCTCATCAATCAAGTCCCC-3'	RsaI
rs7085104 (<i>AS3MT</i>)	F: 5'-TTGGTCTCCGTTTTGGTGATGTA-3' R: 5'-TCCATCTTTCTTCAGTGTGCAGTT-3'	MspI
rs7590720 (<i>PECR</i>)	F: 5'-ATCCAAAATAGCCTAGAGATTTGGC-3' R: 5'-ATGCTACGTCAAACTAGCGA-3'	DdeI
rs11191580 (<i>NT5C2</i>)	F: 5'-TGTTTTCTTATGGGCTTGC-3' R: 5'-TTTGCCCTCTCAAAAAGCAC-3'	TspRI
rs17504622	F: 5'-AGTAACATCCAACGGCTCACAG-3' R: 5'-GGGCATGGCAGCTCTAAGGAG-3'	AluI
rs56205728 (<i>BUB1B-PAK6</i>)	F: 5'-CAACAGGAAACATCTTCCAAGACA-3' R: 5'-TTATATGCTAATTTGGGGTTAGCG-3'	AciI
rs73229090 (<i>EPHX2</i>)	F: 5'-CTCCAGTCCCAGCCCTATTATG-3' R: 5'-TGCTAATCCCCTCCCATCGC-3'	DpnI
rs237238 (<i>HIP1</i>)	F: 5'-AGCCACTTACAAGTTGTTACGTC-3' R: 5'-AGGCAACCTGCAGATGAGTGAC-3'	MspI
rs1109501 (<i>MUC7</i>)	F: 5'-TGGCTTTAACACCGTAAGAACA-3' R: 5'-AATGGTACCTTCTTGTGTGTCC-3'	AciI
rs2007044 (<i>CACNA1C</i>)	F: 5'-CAGGTAGGAGCAGTCCGGTG-3' R: 5'-GCAAAGTGGAAGTAAAAATGGAAC-3'	AciI
rs2273500 (<i>CHRNA4</i>)	F: 5'-GGGTCTGATGGCGAAAAGCAC-3' R: 5'-GTCTTTGCCCCACCCTTGA-3'	AluI
rs3735025 (<i>DGKI</i>)	F: 5'-ACCTAAAATGGGGCTCCTCTCAC-3' R: 5'-TTGGAATGTTGCACAGAGGCTAAT-3'	AluI
rs4356203 (<i>PIK3C2A</i>)	F: 5'-TTTTCTCAGCCTAGAGGTGACA-3' R: 5'-CAACCCTACTCTAAGGGGTCC-3'	HhaI

*Все использованные рестриктазы произведены компанией *New England Biolabs* (США).

Для нахождения различий между номинальными показателями применяли метод χ -квадрат. Уровень статистической значимости p при множественных сравнениях вычисляли экспериментально для каждого конкретного случая (сравнения) в процессе моделирования в пакете *SPSS v.20* (*IBM*, США). При этом использовали точный критерий Фишера, основанный на пермутации (*permutation*): уровень p рассчитывается по формулам комбинаторной теории вероятностей. Анализ ассоциации генотипов и аллелей с риском развития заболевания проводили путем вычисления показателя отношения шансов (ОШ) для каждого анализируемого полиморфного сайта (с расчетом 95 % доверительного интервала (ДИ)). Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета *SPSS v.20*.

Анализ межгенных взаимодействий проводили биоинформатическим методом многофакторного сокращения размерности (*multifactor dimensionality reduction*, MDR) с применением размещенного в открытом доступе программного обеспечения *MDR v.3.0.2*. В процессе моделирования были использованы

²См.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

высококонсервативные настройки поиска конфигурации модели, которые позволили однозначно дифференцировать наличие либо отсутствие статистически значимых эффектов: количество атрибутов (*attribute count range*) – от 1 до n (где n – количество переменных в модели); воспроизводимость модели (*cross-validation count*) – 100; анализ топ-моделей (*track top models*) – 1000; поиск конфигурации модели (*search method configuration*) – всесторонний (*exhaustive*); метод сравнения (*ambiguous cell analysis*) – точный тест Фишера (*Fisher's exact test*); классификация ячеек (*ambiguous cell assignment*) – неклассифицированные (*unclassified*). Математической базой данной программы является непараметрический кластерный анализ для обнаружения и описания нелинейного типа взаимодействия между дискретными генетическими атрибутами.

Результаты и их обсуждение

Распределение генотипов и аллелей исследуемых полиморфных вариантов генов. Нами изучено распределение частот генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов *ESR1*, *AS3MT*, *PECR*, *NT5C2*, *BUB1B-PAK6*, *EPHX2*, *HIP1*, *MUC7*, *CACNA1C*, *CHRNA4*, *DGKI* и *PIK3C2A* у лиц, страдающих алкогольной зависимостью, и у представителей группы сравнения (табл. 2).

Все полиморфные локусы были выбраны на основании данных информационной базы GWAS Catalog³. В работу вошли локусы, для которых уровень значимости $p < 1 \cdot 10^{-6}$. Также в непосредственной близости от этих локусов отсутствовали другие полиморфизмы, что является необходимым условием для проведения HRM-анализа, а расчетная разница в температурах плавления для различных аллелей была наибольшей (на основании расчетов в Oligonucleotide Properties Calculator⁴).

Таблица 2

Результат генотипирования по исследуемым полиморфизмам

Table 2

Result of genotyping for the studied polymorphisms

Полиморфизм (ген)	Генотип или аллель	Группа сравнения	Основная группа	p	ОШ (95 % ДИ)
rs6902771 (<i>ESR1</i>)	C/C	68 (32,2 %)	27 (19,0 %)	0,0110	0,49 (0,30–0,82)
	C/T	88 (41,7 %)	79 (55,6 %)		1,75 (1,14–2,69)
	T/T	55 (26,1 %)	36 (25,4 %)		0,96 (0,59–1,57)
	CC	68 (32,2 %)	36 (25,4 %)	0,1910	0,49 (0,30–0,82)
	CT/TT	143 (67,8 %)	106 (74,6 %)		2,03 (1,22–3,37)
	CC/CT	156 (73,9 %)	115 (81,0 %)	0,1570	1,04 (0,64–1,69)
	TT	55 (26,1 %)	27 (19,0 %)		0,96 (0,59–1,57)
	Аллель С	224 (53,1 %)	133 (46,8 %)	0,1040	0,78 (0,58–1,05)
	Аллель Т	198 (46,9 %)	151 (53,2 %)		1,28 (0,95–1,74)
rs7085104 (<i>AS3MT</i>)	A/A	86 (40,8 %)	56 (39,4 %)	0,1080	0,95 (0,61–1,46)
	A/G	94 (44,5 %)	53 (37,4 %)		0,74 (0,48–1,15)
	G/G	31 (14,7 %)	33 (23,2 %)		1,76 (1,02–3,03)
	AA	86 (40,8 %)	56 (39,4 %)	0,8260	0,95 (0,61–1,46)
	AG/GG	125 (59,2 %)	86 (60,6 %)		1,06 (0,68–1,63)
	AA/AG	180 (53,3 %)	109 (76,8 %)	0,0490	0,57 (0,33–0,98)
	GG	31 (14,7 %)	33 (23,2 %)		1,76 (1,02–3,03)
	Аллель А	266 (63,0 %)	165 (58,1 %)	0,1880	0,81 (0,60–1,11)
	Аллель G	156 (37,0 %)	119 (41,9 %)		1,23 (0,90–1,67)

³См.: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>.

⁴См.: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>.

Продолжение табл. 2
Continuation table 2

Полиморфизм (ген)	Генотип или аллель	Группа сравнения	Основная группа	<i>p</i>	ОШ (95 % ДИ)
rs7590720 (<i>PECR</i>)	A/A	109 (51,7 %)	74 (52,1 %)	0,0150	1,02 (0,67–1,56)
	A/G	87 (41,2 %)	45 (31,7 %)		0,66 (0,42–1,03)
	G/G	15 (7,1 %)	23 (16,2 %)		2,53 (1,27–5,03)
	AA	109 (51,7 %)	74 (52,1 %)	1,0000	1,02 (0,67–1,56)
	AG/GG	102 (48,3 %)	68 (47,9 %)		0,98 (0,64–1,50)
	AA/AG	196 (92,9 %)	119 (83,8 %)	0,0080	0,40 (0,20–0,79)
	GG	15 (7,1 %)	23 (16,2 %)		2,53 (1,27–5,03)
	Аллель А	305 (72,3 %)	193 (67,9 %)	0,2180	0,81 (0,59–1,13)
	Аллель G	117 (27,7 %)	91 (32,1 %)		1,23 (0,89–1,71)
rs11191580 (<i>NT5C2</i>)	C/C	0 (0,0 %)	3 (2,1 %)	0,0060	10,61 (0,54–207,06)
	C/T	35 (16,6 %)	37 (26,1 %)		1,77 (1,05–2,99)
	T/T	176 (83,4 %)	102 (71,8 %)		0,51 (0,30–0,85)
	CC	0 (0,0 %)	3 (2,1 %)	0,0640	10,61 (0,54–207,06)
	CT/TT	211 (100,0 %)	139 (97,9 %)		0,09 (0,01–1,84)
	CC/CT	35 (16,6 %)	40 (28,2 %)	0,0120	1,97 (1,18–3,30)
	TT	176 (83,4 %)	102 (71,8 %)		0,51 (0,30–0,85)
	Аллель C	35 (8,3 %)	43 (15,2 %)	0,0050	1,97 (1,23–3,17)
	Аллель T	387 (91,7 %)	241 (84,8 %)		0,51 (0,32–0,81)
rs17504622	C/C	191 (90,5 %)	103 (72,5 %)	<0,0001	0,28 (0,15–0,50)
	C/T	16 (7,6 %)	26 (18,3 %)		2,73 (1,41–5,31)
	T/T	4 (1,9 %)	13 (9,2 %)		5,22 (1,66–16,34)
	CC	191 (90,5 %)	103 (72,5 %)	<0,0001	0,28 (0,15–0,50)
	CT/TT	20 (9,5 %)	39 (27,5 %)		3,62 (2,00–6,52)
	CC/CT	207 (98,1 %)	129 (90,8 %)	0,0040	0,19 (0,06–0,60)
	TT	4 (1,9 %)	13 (9,2 %)		5,22 (1,66–16,34)
	Аллель C	398 (94,3 %)	232 (81,7 %)	<0,0001	0,27 (0,16–0,45)
	Аллель T	24 (5,7 %)	52 (18,3 %)		3,72 (2,23–6,19)
rs56205728 (<i>BUB1B-PAK6</i>)	A/A	30 (14,2 %)	29 (20,4 %)	0,0610	1,55 (0,88–2,72)
	A/G	72 (34,1 %)	57 (40,2 %)		1,29 (0,83–2,01)
	G/G	109 (51,7 %)	56 (39,4 %)		0,61 (0,40–0,94)
	AA/AG	102 (48,3 %)	86 (60,6 %)	0,0290	1,64 (1,07–2,53)
	GG	109 (51,7 %)	56 (39,4 %)		0,61 (0,40–0,94)
	AA	30 (14,2 %)	29 (20,4 %)	0,1460	1,55 (0,88–2,72)
	AG/GG	181 (85,8 %)	113 (79,6 %)		0,65 (0,37–1,13)
	Аллель А	132 (31,3 %)	115 (40,5 %)	0,0100	1,49 (1,09–2,05)
	Аллель G	290 (68,7 %)	169 (59,5 %)		0,67 (0,49–0,92)

Продолжение табл. 2
Continuation table 2

Полиморфизм (ген)	Генотип или аллель	Группа сравнения	Основная группа	<i>p</i>	ОШ (95 % ДИ)
rs73229090 (EPHX2)	A/A	0 (0,0 %)	12 (8,5 %)	<0,000 1	40,52 (2,38–690,13)
	A/C	38 (18,0 %)	32 (22,5 %)		1,32 (0,78–2,24)
	C/C	173 (82,0 %)	98 (69,0 %)		0,49 (0,30–0,81)
	AA	0 (0,0 %)	12 (8,5 %)	<0,000 1	40,52 (2,38–690,13)
	AC/CC	211 (100,0 %)	130 (91,5 %)		0,02 (0,01–0,42)
	AA/AC	38 (18,0 %)	44 (31,0 %)	0,007 0	2,04 (1,24–3,37)
	CC	173 (82,0 %)	98 (69,0 %)		0,49 (0,30–0,81)
	Аллель А	38 (9,0 %)	56 (19,7 %)	<0,000 1	2,48 (1,59–3,87)
	Аллель С	384 (91,0 %)	228 (80,3 %)		0,40 (0,26–0,63)
rs237238 (HIP1)	A/A	165 (78,2 %)	118 (83,1 %)	0,411 0	1,37 (0,79–2,37)
	A/G	44 (20,9 %)	24 (16,9 %)		0,77 (0,45–1,34)
	G/G	2 (0,9 %)	0 (0,0 %)		0,29 (0,01–6,17)
	AA	165 (78,2 %)	118 (83,1 %)	0,279 0	1,37 (0,79–2,37)
	AG/GG	46 (21,8 %)	24 (16,9 %)		0,73 (0,42–1,26)
	AA/AG	209 (99,1 %)	142 (100,0 %)	0,518 0	3,40 (0,16–71,37)
	GG	2 (0,9 %)	0 (0,0 %)		0,29 (0,01–6,17)
	Аллель А	374 (88,6 %)	260 (91,5 %)	0,209 0	1,39 (0,83–2,33)
	Аллель G	48 (11,4 %)	24 (8,5 %)		0,72 (0,43–1,20)
rs1109501 (MUC7)	A/A	13 (6,2 %)	26 (18,3 %)	<0,000 1	3,41 (1,69–6,90)
	A/G	81 (38,3 %)	60 (42,3 %)		1,17 (0,76–1,81)
	G/G	117 (55,5 %)	56 (39,4 %)		0,52 (0,34–0,81)
	AA/AG	94 (44,5 %)	86 (60,6 %)	0,003 0	1,91 (1,24–2,95)
	GG	117 (55,5 %)	56 (39,4 %)		0,52 (0,34–0,81)
	AA	13 (6,2 %)	26 (18,3 %)	<0,000 1	3,41 (1,69–6,90)
	AG/GG	198 (93,8 %)	116 (81,7 %)		0,29 (0,14–0,59)
	Аллель А	107 (25,4 %)	112 (39,5 %)	<0,000 1	1,92 (1,39–2,65)
	Аллель G	315 (74,6 %)	172 (60,5 %)		0,52 (0,38–0,72)
rs2007044 (CACNA1C)	A/A	89 (42,2 %)	56 (39,4 %)	0,002 0	0,89 (0,58–1,38)
	A/G	66 (31,3 %)	67 (47,2 %)		1,96 (1,26–3,05)
	G/G	56 (26,5 %)	19 (13,4 %)		0,43 (0,24–0,76)
	AA	89 (42,2 %)	56 (39,4 %)	0,659 0	0,89 (0,58–1,38)
	AG/GG	122 (57,8 %)	86 (60,6 %)		1,12 (0,73–1,73)
	AA/AG	155 (73,5 %)	123 (86,6 %)	0,003 0	2,34 (1,32–4,14)
	GG	56 (26,5 %)	19 (13,4 %)		0,43 (0,24–0,76)
	Аллель А	244 (57,8 %)	179 (63,0 %)	0,167 0	1,24 (0,91–1,69)
	Аллель G	178 (42,2 %)	105 (37,0 %)		0,80 (0,59–1,10)

Окончание табл. 2
Ending table 2

Полиморфизм (ген)	Генотип или аллель	Группа сравнения	Основная группа	<i>p</i>	ОШ (95 % ДИ)
rs2273500 (<i>CHRNA4</i>)	C/C	4 (1,9 %)	4 (2,8 %)	0,073 0	1,50 (0,37–6,10)
	C/T	77 (36,5 %)	36 (25,4 %)		0,59 (0,37–0,95)
	T/T	130 (61,6 %)	102 (71,8 %)		1,59 (1,00–2,51)
	CC	4 (1,9 %)	4 (2,8 %)	0,7190	1,50 (0,37–6,10)
	СТ/ТТ	207 (98,1 %)	138 (97,2 %)		0,67 (0,16–2,71)
	СС/СТ	81 (38,4 %)	40 (28,2 %)	0,0520	0,63 (0,40–1,00)
	ТТ	130 (61,6 %)	102 (71,8 %)		1,59 (1,00–2,51)
	Аллель С	85 (20,1 %)	44 (15,5 %)	0,1170	0,73 (0,49–1,08)
	Аллель Т	337 (79,9 %)	240 (84,5 %)		1,38 (0,92–2,05)
rs3735025 (<i>DGKI</i>)	C/C	37 (17,5 %)	23 (16,2 %)	0,1390	0,91 (0,51–1,61)
	C/T	85 (40,3 %)	72 (50,7 %)		1,52 (0,99–2,34)
	T/T	89 (42,2 %)	47 (33,1 %)		0,68 (0,44–1,06)
	CC	37 (17,5 %)	23 (16,2 %)	0,7740	0,91 (0,51–1,61)
	СТ/ТТ	174 (82,5 %)	119 (83,8 %)		1,10 (0,62–1,95)
	СС/СТ	122 (57,8 %)	95 (66,9 %)	0,0950	1,47 (0,95–2,30)
	ТТ	89 (42,2 %)	47 (33,1 %)		0,68 (0,44–1,06)
	Аллель С	159 (37,7 %)	118 (41,5 %)	0,3020	1,18 (0,86–1,60)
	Аллель Т	263 (62,3 %)	166 (58,5 %)		0,85 (0,63–1,16)
rs4356203 (<i>PIK3C2A</i>)	A/A	65 (30,8 %)	31 (21,8 %)	0,0040	0,63 (0,38–1,03)
	A/G	99 (46,9 %)	92 (64,8 %)		2,08 (1,34–3,23)
	G/G	47 (22,3 %)	19 (13,4 %)		0,54 (0,30–0,96)
	AA	65 (30,8 %)	31 (21,8 %)	0,0680	0,63 (0,38–1,03)
	AG/GG	146 (69,2 %)	111 (78,2 %)		1,59 (0,97–2,61)
	AA/AG	164 (77,7 %)	123 (86,6 %)	0,0380	1,86 (1,04–3,32)
	GG	47 (22,3 %)	19 (13,4 %)		0,54 (0,30–0,96)
	Аллель А	229 (54,3 %)	154 (54,2 %)	0,9920	1,0 (0,74–1,35)
	Аллель G	193 (45,7 %)	130 (45,8 %)		1,0 (0,74–1,35)

Примечание. Полужирным шрифтом выделены маркеры, определяющие различия между группами.

В результате наибольший вклад в увеличение риска развития алкогольной зависимости из числа исследованных внесли полиморфные варианты rs17504622, rs73229090 (*EPHX2*) и rs1109501 (*MUC7*). Так, полиморфный вариант rs17504622 был ассоциирован с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости: рискассоциированным оказался генотип ТТ – ОШ = 5,22 (95 % ДИ = 1,66–16,34), протективный эффект выявлен для генотипа СС – ОШ = 0,28 (95 % ДИ = 0,15–0,50). При анализе рецессивной модели наследования показано, что генотипы СС/СТ в совокупности имеют протективный эффект – ОШ = 0,19 (95 % ДИ = 0,06–0,60). Статистически значимые различия между двумя группами отмечены и по полиморфному варианту rs73229090 (*EPHX2*): рискассоциированным является генотип АА – ОШ = 40,52 (95 % ДИ = 2,38–690,13), протективный эффект имеет генотип СС – ОШ = 0,49 (95 % ДИ = 0,30–0,81). Полиморфный вариант rs1109501 (*MUC7*) также оказался связан с повышенной вероятностью развития алкоголизма: рискассоциированным выступает генотип АА – ОШ = 3,41 (95 % ДИ = 1,69–6,90), протективным эффектом обладает генотип GG – ОШ = 0,52 (95 % ДИ = 0,34–0,81).

Статистически значимые различия в пределах сравниваемых групп определены и для полиморфизмов в генах *PECR*, *NT5C2* и *AS3MT*, рискассоциированными оказались как раз минорные аллели или генотипы. Для полиморфного варианта rs7590720 (*PECR*) ассоциированным с повышенной вероятностью развития алкоголизма является генотип GG – ОШ = 2,53 (95 % ДИ = 1,27–5,03). Для полиморфизма rs11191580 (*NT5C2*) рискассоциированным выступает генотип CC – ОШ = 10,61 (95 % ДИ = 0,54–207,06), а протективный эффект показан для генотипа TT – ОШ = 0,51 (95 % ДИ = 0,30–0,85). Для полиморфного варианта rs7085104 (*AS3MT*) ассоциированным с повышенной вероятностью развития алкоголизма является генотип GG – ОШ = 1,76 (95 % ДИ = 1,02–3,03).

Для полиморфных вариантов в генах *ESR1*, *CACNA1C*, *PIK3C2A* и *BUB1B-PAK6* также найдены различия в пределах сравниваемых групп, однако последующая интерпретация затруднена ввиду ассоциации с повышенной вероятностью развития алкоголизма именно гетерозиготных генотипов или генотипов с высокой частотой распространенности в исследуемых группах. Так, анализ полиморфизма rs6902771 (*ESR1*) показал наличие статистически значимых различий в распределении частот генотипов между группами: генотип C/T ассоциирован с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости – ОШ = 1,75 (95 % ДИ = 1,14–2,69), генотип C/C имеет протективный эффект – ОШ = 0,49 (95 % ДИ = 0,30–0,82). Полиморфные варианты rs2007044 (*CACNA1C*) и rs4356203 (*PIK3C2A*) ассоциированы с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости при наличии генотипа A/G – ОШ = 1,96 (95 % ДИ = 1,26–3,05) и ОШ = 2,08 (95 % ДИ = 1,34–3,23) соответственно. Для полиморфизма rs56205728 (*BUB1B-PAK6*) неблагоприятной аллелью является А – ОШ = 1,49 (95 % ДИ = 1,09–2,05).

Анализ полиморфных вариантов rs237238 (*HIP1*), rs2273500 (*CHRNA4*) и rs3735025 (*DGKI*) не выявил статистически значимых различий в распределении генотипов между основной группой и группой сравнения.

Взаимодействие исследуемых полиморфных вариантов генов у лиц с алкогольной зависимостью. Моделирование взаимодействия исследуемых полиморфных вариантов генов было проведено с учетом всей полученной в процессе молекулярно-генетического анализа информации. Преимуществом использованного MDR-анализа является возможность оценить совокупные взаимодействия, ассоциированные с формированием мультифакториального фенотипа. Дерево кластеризации, отражающее характер взаимодействия полиморфных вариантов при алкогольной зависимости, представлено на рис. 1. В результате моделирования получены два кластера, при этом в каждом из них выделены два субкластера. Кластер 1: субкластер 1.1 – rs17504622 и rs2007044 (*CACNA1C*); субкластер 1.2 – rs6902771 (*ESR1*), rs7085104 (*AS3MT*), rs11191580 (*NT5C2*), rs1109501 (*MUC7*), rs7590720 (*PECR*) и rs73229090 (*EPHX2*). Кластер 2: субкластер 2.1 – rs56205728 (*BUB1B-PAK6*) и rs3735025 (*DGKI*); субкластер 2.2 – rs237238 (*HIP1*), rs2273500 (*CHRNA4*) и rs4356203 (*PIK3C2A*).

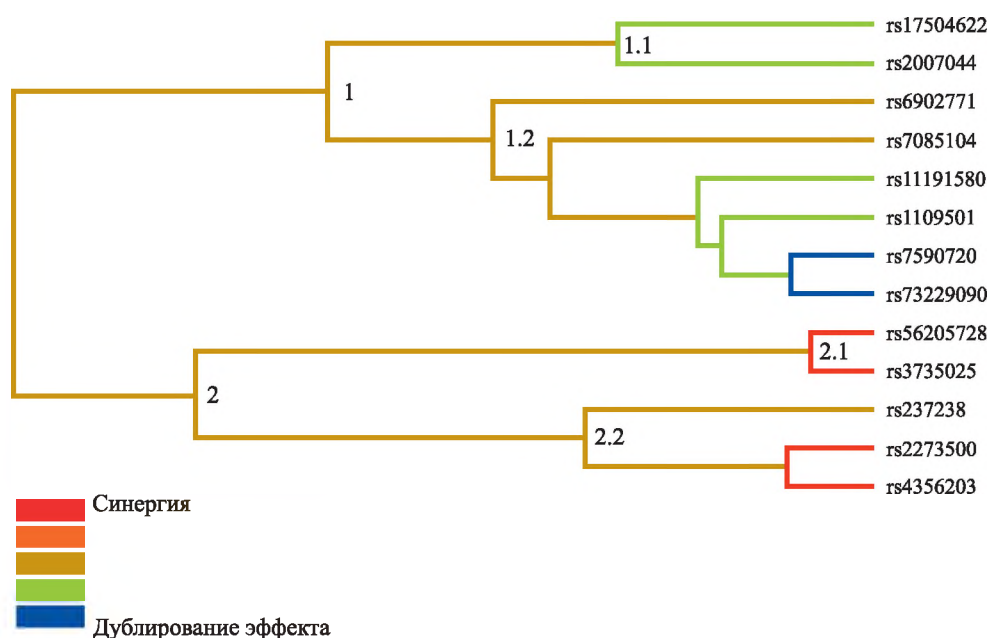


Рис. 1. Взаимодействия полиморфных вариантов генов в увеличении вероятности развития алкогольной зависимости

Fig. 1. Interaction of polymorphic variants of genes in increasing the likelihood of developing alcohol dependence

Анализ дерева кластеризации позволяет сделать следующие заключения:

- для взаимодействия полиморфных локусов rs56205728 (*BUB1B-PAK6*) и rs3735025 (*DGKI*), а также rs2273500 (*CHRNA4*) и rs4356203 (*PIK3C2A*) характерен синергический эффект (линии красного цвета);
- взаимодействие полиморфных локусов rs7590720 (*PECR*) и rs73229090 (*EPHX2*) имеет аддитивный эффект (линия синего цвета);
- все остальные взаимодействия являются нейтральными.

Результаты моделирования межгенных взаимодействий позволили определить две статистически значимые модели, ассоциированные с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости. Модель № 1 включает три полиморфизма: rs4356203 (*PIK3C2A*), генотипы AA, AG и GG; rs73229090 (*EPHX2*), генотипы AA, AC и CC; rs2273500 (*CHRNA4*), генотипы CC, CT и TT. Модель № 2 также включает три полиморфизма: rs1109501 (*MUC7*), генотипы AA, AG и GG; rs7085104 (*AS3MT*), генотипы AA, AG и GG; rs17504622, генотипы CC, CT и TT.

Сбалансированная точность предсказания для модели № 1 составила 73,39 %, чувствительность – 84,47 %, специфичность – 71,23 %, воспроизводимость – 100/100 (рис. 2). Для модели № 2 сбалансированная точность предсказания была равна 67,48 %, чувствительность – 64,81 %, специфичность – 93,24 %, воспроизводимость – 100/100 (рис. 3).

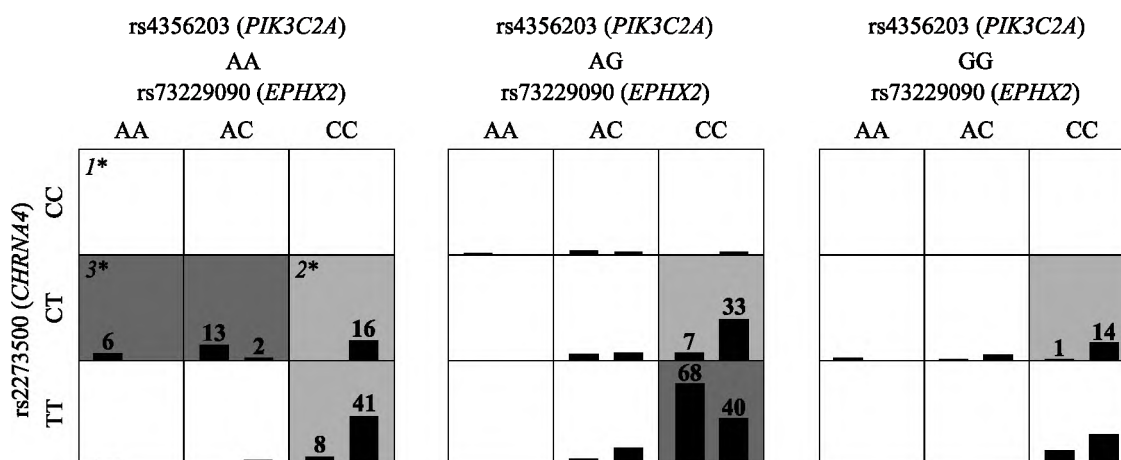


Рис. 2. Комбинации генотипов в рамках модели № 1 для полиморфных вариантов rs4356203 (*PIK3C2A*), rs73229090 (*EPHX2*) и rs2273500 (*CHRNA4*) при алкогольной зависимости:

I* (белый цвет) – различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы; 2* (светло-серый цвет) – сочетание генотипов, связанное с низким риском развития алкогольной зависимости (протективный эффект); 3* (темно-серый цвет) – сочетание генотипов, связанное с высоким риском развития алкогольной зависимости (патогенетический эффект)

Fig. 2. Combinations of genotypes within the framework of model No. 1 for polymorphic variants rs4356203 (*PIK3C2A*), rs73229090 (*EPHX2*) and rs2273500 (*CHRNA4*) in alcohol dependence:

I* (white color) – differences between the frequency of occurrence of the genotype in the main group and the comparison group are statistically insignificant; 2* (light gray color) – a combination of genotypes, associated with a low risk of alcohol dependence (protective effect); 3* (dark gray color) – a combination of genotypes, associated with a high risk of alcohol dependence (pathogenetic effect)

В рамках модели № 1 ассоциированными с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости генотипами являются AA (rs4356203, *PIK3C2A*), AA/AC (rs73229090, *EPHX2*), CT (rs2273500, *CHRNA4*) – ОШ = 16,29 (95 % ДИ = 3,70–71,66), $p = 0,0002$; AG (rs4356203, *PIK3C2A*), CC (rs73229090, *EPHX2*), TT (rs2273500, *CHRNA4*) – ОШ = 5,15 (95 % ДИ = 2,98–8,89), $p < 0,0001$. В то же время протективный эффект показан при наличии генотипов AA (rs4356203, *PIK3C2A*), CC (rs73229090, *EPHX2*), CT/TT (rs2273500, *CHRNA4*) – ОШ = 0,13 (95 % ДИ = 0,06–0,29), $p = 0,0021$; GG (rs4356203, *PIK3C2A*), CC (rs73229090, *EPHX2*), CT (rs2273500, *CHRNA4*) – ОШ = 0,09 (95 % ДИ = 0,01–0,71), $p = 0,0225$.

В рамках модели № 2 ассоциированными с выраженной повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости генотипами являются AG (rs1109501, *MUC7*), GG (rs7085104, *AS3MT*), CC (rs17504622) – ОШ = 6,90 (95 % ДИ = 2,37–20,11), $p = 0,0004$. Протективный эффект показан при наличии генотипов AG (rs1109501, *MUC7*), AG (rs7085104, *AS3MT*), CC (rs17504622) – ОШ = 0,32 (95 % ДИ = 0,15–0,67), $p = 0,0027$; GG (rs1109501, *MUC7*), GG (rs7085104, *AS3MT*), CC (rs17504622) – ОШ = 0,17 (95 % ДИ = 0,05–0,62), $p = 0,0071$.

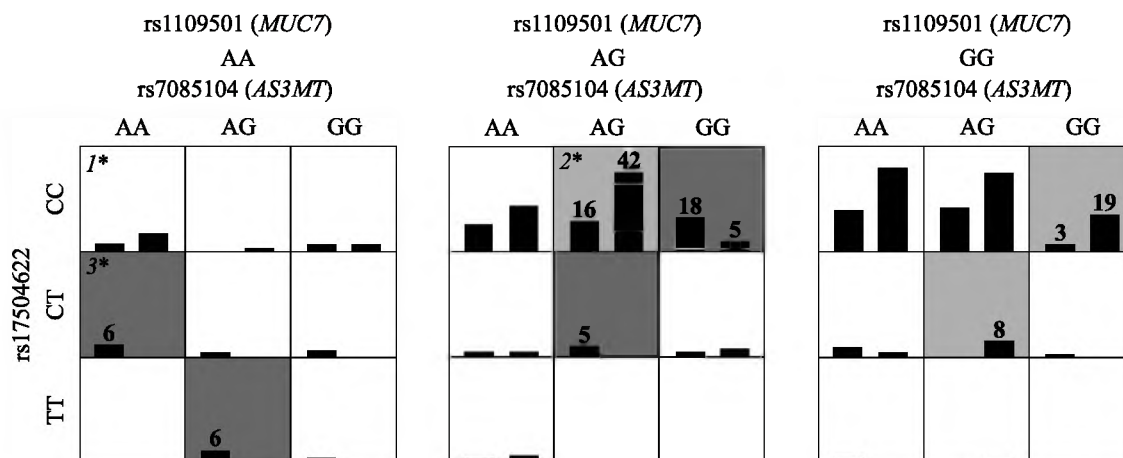


Рис. 3. Комбинации генотипов в рамках модели № 2 для полиморфных вариантов rs1109501 (*MUC7*), rs7085104 (*AS3MT*) и rs17504622 при алкогольной зависимости: 1* (белый цвет) – различия между частотой встречаемости генотипа в основной группе и группе сравнения статистически незначимы; 2* (светло-серый цвет) – сочетание генотипов, связанное с низким риском развития алкогольной зависимости (протективный эффект); 3* (темно-серый цвет) – сочетание генотипов, связанное с высоким риском развития алкогольной зависимости (патогенетический эффект)

Fig. 3. Combinations of genotypes within model No. 2 for polymorphic variants rs1109501 (*MUC7*), rs7085104 (*AS3MT*) and rs17504622 for alcohol dependence: 1* (white color) – differences between the frequency of occurrence of the genotype in the main group and the comparison group are statistically insignificant; 2* (light gray color) – a combination of genotypes, associated with a low risk of alcohol dependence (protective effect); 3* (dark gray color) – a combination of genotypes, associated with a high risk of alcohol dependence (pathogenetic effect)

Роль полиморфизма анализируемых генов в контексте развития аддиктивных расстройств. Полиморфный локус rs17504622 не входит в кодирующую последовательность какого-либо гена, однако он находится в регуляторной области гена *GRIA1* (glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha1), GeneID: 2890). Рецепторы глутамата являются преобладающими рецепторами возбуждающих нейротрансмиттеров в головном мозге млекопитающих и активируются при различных нормальных нейрофизиологических процессах. Ген *GRIA1* регулирует активность рецепторов нейромедиаторов, участвующих в регуляции постсинаптической концентрации ионов кальция, обуславливает рецепторную, а также глутаматергическую передачу сигнала. Поскольку глутамат является одним из важнейших нейромедиаторов, можно предположить, что данный фактор способен оказывать значительное влияние на развитие различных нарушений высшей нервной деятельности, в том числе и аддиктивных форм поведения. На текущий момент известно, что полиморфный вариант rs17504622 ассоциирован с шизофренией [15], аллель риска – Т.

Ген *EPHX2* (epoxide hydrolase 2, GeneID: 2053) кодирует эпоксидгидролазу 2, принимает участие в метаболизме ксенобиотиков, разлагая потенциально токсичные эпоксиды. В научной литературе имеются многочисленные сообщения о связи полиморфизма rs73229090 с увеличенным риском развития шизофрении [16–19].

Ген *MUC7* (mucin 7, secreted, GeneID: 4589) кодирует слюнный муцин, который выполняет защитную функцию, способствует удалению бактерий из полости рта и помогает пережевыванию, речеобразованию и глотанию [20; 21]. В литературе имеются данные о связи полиморфного локуса rs1109501 данного гена с развитием алкогольной зависимости [12]. В контексте определения роли гена *MUC7* в развитии алкоголизма стоит также упомянуть и о протеогликанах, они могут влиять на активность и стабильность сигнальных молекул в цитоплазме клеток [22; 23]. Из вышесказанного следует, что полиморфные варианты гена *MUC7*, в частности rs1109501, способны оказывать влияние на образование гликолипидов и протеогликанов, молекулы которых задействованы в передаче сигналов и формировании нервной ткани, модифицируя тем самым риск развития алкогольной зависимости.

Ген *PECR* (peroxisomal *trans*-2-enoyl-CoA reductase, GeneID: 55825) кодирует белок, участвующий в удлинении цепей жирных кислот, а также в фитоловом метаболическом процессе. Фитол и его метаболиты активируют факторы транскрипции PPAR-альфа [24] и ретиноидный X-рецептор (RXR) [25].

PPAR-альфа, также известный как NR1C1 (подсемейство ядерных рецепторов 1, группа C, субъединица 1) – это фактор транскрипции и главный регулятор липидного обмена в печени [26]. Ретиноидный X-рецептор действует как фактор транскрипции и является регулятором работы многих транскрипционных факторов [27; 28]. Кроме того, белок PEXR связывается с белками семейства нейролигинов, которые отвечают за клеточную адгезию на постсинаптической мембране и обеспечивают образование и поддержание синапсов между нейронами, влияют на свойства нейронных сетей, определяя синаптические функции, и опосредуют передачу сигналов, рекрутируя и стабилизируя ключевые синаптические компоненты [29]. В рамках GWAS было выявлено, что полиморфный локус rs7590720, в частности аллель G этого гена, ассоциирован с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости [30]. Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что нарушения работы данного гена могут приводить как к снижению эффективности метаболизма спирта в печени, так и к нарушению передачи синаптических импульсов и снижению ощущения удовлетворения при употреблении алкоголя.

Ген *NT5C2* (5'-nucleotidase, cytosolic II, GeneID: 22978) кодирует гидролазу, которая играет важную роль в клеточном метаболизме пуринов, действуя в первую очередь на инозин-5'-монофосфат и другие пуриновые нуклеотиды. Продукт данного гена принимает участие в процессах обмена аденозина, метаболизма инозин монофосфата, катаболизма пуриновых нуклеотидов. В многочисленных исследованиях GWAS было показано, что изучаемый нами полиморфный локус тесно связан с такими заболеваниями, как шизофрения [31–33], синдром дефицита внимания с гиперактивностью, расстройствами аутистического спектра [32].

Ген *AS3MT* (arsenite methyltransferase, GeneID: 57412) катализирует перенос метильной группы от S-аденозил-L-метионина в трехвалентный мышьяк и играет важную роль в метаболизме мышьяка [34]. Известно, что токсичность последнего связана с дисфункцией центральной нервной системы (ЦНС) и развитием психопатических состояний [35; 36]. Изучение полиморфизма данного гена является перспективным для поиска причин развития нарушений высшей нервной деятельности и аддиктивного поведения (в том числе и наркомании), учитывая наличие доказательств его ассоциации с шизофренией и аффективными расстройствами [15; 37]. Поскольку мышьяк способен оказывать токсическое действие на ЦНС, можно предположить, что нарушение регуляции метаболизма мышьяка опосредует связь между полиморфным локусом rs7085104 гена *AS3MT* и наркотической зависимостью.

Ген *ESR1* (estrogen receptor 1, GeneID: 2099) кодирует рецептор эстрогена – фактор транскрипции, активируемый лигандом и состоящий из нескольких доменов, важных для связывания гормонов, ДНК и активации транскрипции. Белок локализуется в ядре, где он может образовывать гомодимер или гетеродимер с рецептором эстрогена 2. Эстроген и его рецепторы необходимы для полового развития и репродуктивной функции, также он отвечает за рост скелета и нормальное функционирование сердечно-сосудистой и нервной систем. По данным базы UniProtKB⁵, этот белок способен селективно и нековалентно взаимодействовать с определенной нуклеотидной последовательностью двухцепочечной ДНК (мотивом) в регуляторной области для модуляции транскрипции генов, а также с хроматином эукариотического ядра во время интерфазы [38]. В работе [30] показано, что полиморфизм rs6902771, в частности аллель C, ассоциирован с повышенной вероятностью развития алкоголизма. Данное наблюдение косвенно подтверждается результатами настоящего исследования: генотип C/T определен как повышающий вероятность развития этого заболевания.

Ген *CACNA1C* (calcium voltage-gated channel subunit alpha1 C, GeneID: 775) кодирует субъединицу альфа-1 потенциалзависимого кальциевого канала. Белок CACNA1C необходим для сокращения гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, кишечника, а также для нормального регулирования артериального давления [39]. Кроме того, белок CACNA1C играет важную роль в регулировании потенциалзависимого притока кальция, который, в свою очередь, модулирует передачу сигналов, включая регуляцию некоторых зависимых от кальция генов, таких как нейротрофический фактор головного мозга [40]. Известно, что полиморфизм rs2007044 влияет на эффективность связывания фактора транскрипции и изменяет промоторную активность гена *CACNA1C* [41]. Эти факты подтверждают связь полиморфных локусов гена *CACNA1C* с нарушениями высшей нервной деятельности, в том числе с различными формами аддиктивного поведения, например алкогольной зависимостью.

Ген *PIK3C2A* (phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha, GeneID: 5286) кодирует киназу, которая играет важную роль в сигнальных путях, участвующих в пролиферации клеток, онкогенной трансформации, выживании и миграции клеток, внутриклеточном перемещении белков. По данным UniProtKB, белок селективно и нековалентно взаимодействует с АТФ и катализирует выделение энергии путем превращения АТФ в АДФ. Было показано, что полиморфный вариант rs4356203 связан с шизофренией [32; 42] и биполярным расстройством [42].

⁵См.: <https://www.uniprot.org/>.

Заклучение

Каждая популяция характеризуется своим специфическим набором генотипов и особым соотношением частот встречаемости различных аллелей генов. Проведенный анализ частоты распространения генотипов и аллелей по полиморфным вариантам генов *ESR1*, *AS3MT*, *PECR*, *NT5C2*, *BUB1B-PAK6*, *EPHX2*, *HIP1*, *MUC7*, *CACNA1C*, *CHRNA4*, *DGKI* и *PIK3C2A* позволил определить их вклад в увеличение вероятности возникновения алкогольной зависимости среди жителей Республики Беларусь. Генетическими маркерами, ассоциированными с повышенной вероятностью развития алкогольной зависимости, являются генотип GG (rs7085104, *AS3MT*) – ОШ = 1,76 (95 % ДИ = 1,02–3,03); генотип GG (rs7590720, *PECR*) – ОШ = 2,53 (95 % ДИ = 1,27–5,03); аллель С (rs11191580, *NT5C2*) – ОШ = 1,97 (95 % ДИ = 1,23–3,17); аллель Т (rs17504622) – ОШ = 3,72 (95 % ДИ = 2,23–6,19); аллель А (rs73229090, *EPHX2*) – ОШ = 2,48 (95 % ДИ = 1,59–3,87); аллель А (rs1109501, *MUC7*) – ОШ = 1,92 (95 % ДИ = 1,39–2,65).

Анализ, направленный на оценку модификации вероятности развития алкогольной зависимости при одновременном носительстве полиморфных вариантов исследованных генов, показал, что при одновременном наличии генотипов AA (rs4356203, *PIK3C2A*), AA/AC (rs73229090, *EPHX2*), CT (rs2273500, *CHRNA4*); AG (rs4356203, *PIK3C2A*), CC (rs73229090, *EPHX2*), TT (rs2273500, *CHRNA4*); AG (rs1109501, *MUC7*), GG (rs7085104, *AS3MT*), CC (rs17504622) вероятность развития заболевания возрастает более чем в 5 раз – ОШ = 16,29 (95 % ДИ = 3,70–71,66), ОШ = 5,15 (95 % ДИ = 2,98–8,89) и ОШ = 6,90 (95 % ДИ = 2,37–20,11) соответственно.

Представленные в настоящей работе данные демонстрируют важность исследований по оценке значимости совместного вклада ряда независимых или взаимодействующих генов систем метаболизма, регуляции и клеточного транспорта для выявления возможной совокупности маркеров предрасположенности к алкогольной зависимости. Для ряда рассмотренных полиморфизмов имеется связь с шизофренией, алкоголизмом, расстройствами аутистического спектра. Следовательно, полученные нами результаты будут способствовать дальнейшему поиску и анализу общих генетических компонент для аддитивных заболеваний, включая алкогольную зависимость.

Библиографические ссылки/References

1. Shield KD, Rylett M, Rehm J. *Public health successes and missed opportunities. Trends in alcohol consumption and attributable mortality in the WHO European Region, 1990–2014*. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2016. 88 p.
2. Kumar R, Kumar KJ, Benegal V. Trait impulsivity in alcohol-naïve offspring at high risk for alcoholism. *Indian Journal of Psychological Medicine*. 2018;40(6):547–555. DOI: 10.4103/IJPSYM.IJPSYM_92_18.
3. Dawson DA. The link between family history and early onset alcoholism: earlier initiation of drinking or more rapid development of dependence? *Journal of Studies on Alcohol*. 2000;61(5):637–646. DOI: 10.15288/jsa.2000.61.637.
4. Moss HB, Chen CM, Yi H-Y. Subtypes of alcohol dependence in a nationally representative sample. *Drug and Alcohol Dependence*. 2007;91(2–3):149–158. DOI: 10.1016/j.drugalcdep.2007.05.016.
5. Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C, et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*. 2004;159(1):1–16. DOI: 10.1093/aje/kwh003.
6. Gelernter J, Kranzler HR, Sherva R, Almasy L, Koesterer R, Smith AH, et al. Genome-wide association study of alcohol dependence: significant findings in African- and European-Americans including novel risk loci. *Molecular Psychiatry*. 2014;19(1):41–49. DOI: 10.1038/mp.2013.145.
7. McKay JD, Truong T, Gaborieau V, Chabrier A, Chuang S-C, Byrnes G, et al. Genome-wide association study of upper aerodigestive tract cancers conducted within the INHANCE consortium. *PLOS Genetics*. 2011;7(3):e1001333. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001333.
8. Chen Wu, Kraft P, Kan Zhai, Jiang Chang, Zhaoming Wang, Yun Li, et al. Genome-wide association analyses of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese identify multiple susceptibility loci and gene-environment interactions. *Nature Genetics*. 2012;44(10):1090–1097. DOI: 10.1038/ng.2411.
9. Holmes MV, Dale CE, Zuccolo L, Silverwood RJ, Yiran Guo, Zheng Ye, et al. Association between alcohol and cardiovascular disease: Mendelian randomisation analysis based on individual participant data. *BMJ*. 2014;349:g4164. DOI: 10.1136/bmj.g4164.
10. Silverwood RJ, Holmes MV, Dale CE, Lawlor DA, Whittaker JC, Smith GD, et al. Testing for non-linear causal effects using a binary genotype in a Mendelian randomization study: application to alcohol and cardiovascular traits. *International Journal of Epidemiology*. 2014;43(6):1781–1790. DOI: 10.1093/ije/dyu187.
11. Wall TL, Luczak SE, Hiller-Sturmhöfel S. Biology, genetics, and environment: underlying factors influencing alcohol metabolism. *Alcohol Research: Current Reviews*. 2016;38(1):59–68.
12. Heath AC, Whitfield JB, Martin NG, Pergadia ML, Goate AM, Lind PA, et al. Quantitative-trait genome-wide association study of alcoholism risk in the community: findings and implications. *Biological Psychiatry*. 2011;70(6):513–518. DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.02.028.
13. Edwards AC, Deak JD, Gizer IR, Lai D, Chatzinakos C, Wilhelmsen KP, et al. Meta-analysis of genetic influences on initial alcohol sensitivity. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 2018;42(12):2349–2359. DOI: 10.1111/acer.13896.
14. Sambrook J, Russel DW, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual. Volume 1. Chapter 1. Plasmids and their usefulness in molecular cloning*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 1.1–1.170.

15. Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, Moran JL, Kähler AK, Akterin S, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nature Genetics*. 2013;45(10):1150–1159. DOI: 10.1038/ng.2742.
16. Ohi K, Shimada T, Yasuyama T, Uehara T, Kawasaki Y. Variability of 128 schizophrenia-associated gene variants across distinct ethnic populations. *Translational Psychiatry*. 2017;7(1):e988. DOI: 10.1038/tp.2016.260.
17. Addepalli A, Kalyani S, Singh M, Bandyopadhyay D, Mohan KN. Correction: CalPen (Calculator of Penetrance), a web-based tool to estimate penetrance in complex genetic disorders. *PLOS ONE*. 2020;15(6):e0228156. DOI: 10.1371/journal.pone.0235547.
18. Wang Q, Chen R, Cheng F, Wei Q, Ji Y, Yang H, et al. Bayesian framework that integrates multi-omics data and gene networks predicts risk genes from schizophrenia GWAS data. *Nature Neuroscience*. 2019;22(5):691–699. DOI: 10.1038/s41593-019-0382-7.
19. Pouget JG, Gonçalves VF, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Spain SL, Finucane HK, Raychaudhuri S, et al. Genome-wide association studies suggest limited immune gene enrichment in schizophrenia compared to 5 autoimmune diseases. *Schizophrenia Bulletin*. 2016;42(5):1176–1184. DOI: 10.1093/schbul/sbw059.
20. Reddy M, Levine M, Paranchych W. Low-molecular-mass human salivary mucin, MG2: structure and binding of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1993;4(3):315–323. DOI: 10.1177/10454411930040030901.
21. Kirkbride HJ, Bolscher JG, Nazmi K, Vinall LE, Nash MW, Moss FM, et al. Genetic polymorphism of MUC7: allele frequencies and association with asthma. *European Journal of Human Genetics*. 2001;9(5):347–354. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200642.
22. Ibrahim SA, Gadalla R, El-Ghonaimey EA, Samir O, Mohamed HT, Hassan H, et al. Syndecan-1 is a novel molecular marker for triple negative inflammatory breast cancer and modulates the cancer stem cell phenotype via the IL-6/STAT3, Notch and EGFR signaling pathways. *Molecular Cancer*. 2017;16(1):57. DOI: 10.1186/s12943-017-0621-z.
23. Ibrahim SA, Hassan H, Vilardo L, Kumar SK, Kumar AV, Kelsch R, et al. Syndecan-1 (CD138) modulates triple-negative breast cancer stem cell properties via regulation of LRP-6 and IL-6-mediated STAT3 signaling. *PLOS ONE*. 2013;8(12):e85737. DOI: 10.1371/journal.pone.0085737.
24. Gloerich J, van Vlies N, Jansen GA, Denis S, Ruiter JPN, van Werkhoven MA, et al. Phytol-enriched diet induces changes in fatty acid metabolism in mice both via PPAR α -dependent and -independent pathways. *Journal of Lipid Research*. 2005;46(4):716–726. DOI: 10.1194/jlr.M400337-JLR200.
25. Kitareewan S, Burka LT, Tomer KB, Parker CE, Deterding LJ, Stevens RD, et al. Phytol metabolites are circulating dietary factors that activate the nuclear receptor RXR. *Molecular Biology of the Cell*. 1996;7(8):1153–1317. DOI: 10.1091/mbc.7.8.1153.
26. Grabacka M, Pierzchalska M, Dean M, Reiss K. Regulation of ketone body metabolism and the role of PPAR α . *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(12):2093. DOI: 10.3390/ijms17122093.
27. Santos NC, Kim KH. Activity of retinoic acid receptor- α is directly regulated at its protein kinase sites in response to follicle-stimulating hormone signaling. *Endocrinology*. 2010;151(5):2361–2372. DOI: 10.1210/en.2009-1338.
28. Chen H, Lin R, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, et al. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell*. 1997;90(3):569–580. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80516-4.
29. Gerhard D. Neuroscience. 5th edition. By Dale Purves, George Augustine, David Fitzpatrick, William Hall, Anthony-Samuel Lamentia, and Leonard White. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.; 2012. 759 p. US \$112.95 Hardcover. ISBN: 978-0878936953. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. 2013;86(1):113–114.
30. Treutlein J, Cichon S, Ridinger M, Wodarz N. Genome-wide association study of alcohol dependence. *Archives of General Psychiatry*. 2009;66(7):773–784. DOI: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.83.
31. Bergen SE, O'Dushlaine C, Ripke S, Lee PH, Ruderfer DM, Akterin S. Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. *Molecular Psychiatry*. 2012;17(9):880–886. DOI: 10.1038/mp.2012.73.
32. The Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nature Genetics*. 2011;43(10):969–976. DOI: 10.1038/ng.940.
33. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet*. 2013;381(9875):1371–1379. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)62129-1.
34. Sumi D, Himeno S. Role of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase in arsenic metabolism and toxicity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2012;35(11):1870–1875. DOI: 10.1248/bpb.b212015.
35. Tyler CR, Allan AM. Effects of arsenic exposure on neurological and cognitive dysfunction in human and rodent studies: a review. *Current Environmental Health Reports*. 2014;1(2):132–147. DOI: 10.1007/s40572-014-0012-1.
36. Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medical Journal*. 2003;79(933):391–396. DOI: 10.1136/pmj.79.933.391.
37. Li L, Chang H, Peng T, Li M, Xiao X. Evidence of AS3MT d2d3-associated variants within 10q24.32-33 in the genetic risk of major affective disorders. *Molecular Neuropsychiatry*. 2016;2(4):213–218. DOI: 10.1159/000452998.
38. Mondal T, Rasmussen M, Pandey GK, Isaksson A, Kanduri C. Characterization of the RNA content of chromatin. *Genome Research*. 2010;20(7):899–907. DOI: 10.1101/gr.103473.109.
39. Nystoriak MA, Nieves-Cintrón M, Patriarchi I, Buonarati OR, Prada MP, Morotti S, et al. Ser1928 phosphorylation by PKA stimulates the L-type Ca²⁺ channel CaV1.2 and vasoconstriction during acute hyperglycemia and diabetes. *Science Signaling*. 2017;10(463):eaaf9647. DOI: 10.1126/scisignal.aaf9647.
40. Pinton P, Ferrari D, Magalhães P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, et al. Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells. *The Journal of Cell Biology*. 2000;148(5):857–862. DOI: 10.1083/jcb.148.5.857.
41. Fanfan Zheng, Yanling Zhang, Wuxiang Xie, Wenqiang Li, Chao Jin, Weifeng Mi. Further evidence for genetic association of CACNA1C and schizophrenia: new risk loci in a Han Chinese population and a meta-analysis. *Schizophrenia Research*. 2014;152(1):105–110. DOI: 10.1016/j.schres.2013.12.003.
42. Ruderfer DM, Fanous AH, Ripke S, McQuillin A, Amdur RL, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, et al. Polygenic dissection of diagnosis and clinical dimensions of bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2014;19(9):1017–1024. DOI: 10.1038/mp.2013.138.

УДК 535.34:535.371

ОСОБЕННОСТИ ИНФРАКРАСНЫХ СПЕКТРОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ДИСЛИПИДЕМИЕЙ¹

**Е. В. КОРОЛИК¹⁾, М. В. ГОЛЬЦЕВА¹⁾,
В. А. ЖУКОВСКАЯ¹⁾, Г. Г. ЛУБНЕВСКАЯ¹⁾, А. А. ИВАНОВ¹⁾**

¹⁾Белорусский государственный медицинский университет,
пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь

Проведен анализ ИК-спектров плазмы крови здоровых доноров, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Установлено, что структура основного транспортного белка плазмы крови – альбумина – в плазме крови пациентов с инфарктом мозга, пациентов с ИБС и представителей контрольной группы практически одинакова. Показано, что при отсутствии изменений во вторичной и третичной структуре альбумина повышение связывания анионных гидрофобных метаболитов в плазме крови пациентов с дислипидемией по сравнению с контролем обусловлено структурными изменениями в липопротеинах низкой плотности (ЛПНП) и липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП).

Ключевые слова: ИК-спектроскопия; метод флуоресцентного зондирования; дислипидемия; альбумин; липопротеины низкой плотности; липопротеины очень низкой плотности.

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:

Королик ЕВ, Гольцева МВ, Жуковская ВА, Лубневская ГГ, Иванов АА. Особенности инфракрасных спектров плазмы крови пациентов с дислипидемией. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2021;1:106–111. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-106-111>

For citation:

Korolik EV, Goltseva MV, Zhukovskaya VA, Lubnevskaya GG, Ivanov AA. Features of infrared spectra of blood plasma of patients with dyslipidemia. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;1:106–111. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-106-111>

Авторы:

Елена Викторовна Королик – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Марина Владимировна Гольцева – старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Вера Алексеевна Жуковская – старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Галина Григорьевна Лубневская – старший преподаватель кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Александр Аркадьевич Иванов – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики фармацевтического факультета.

Authors:

Elena V. Korolik, PhD (physics and mathematics); associate professor at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

elena_korolik@mail.ru

Marina V. Goltseva, senior lecturer at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

mgoltseva@yandex.ru

Vera A. Zhukovskaya, senior lecturer at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

vera49@tut.by

Galina G. Lubnevskaya, senior lecturer at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

l_gala@tut.by

Alexander A. Ivanov, PhD (physics and mathematics); associate professor at the department of medical and biological physics, pharmaceutical faculty.

ivanovphysics@gmail.com

FEATURES OF INFRARED SPECTRA OF BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH DYSLIPIDEMIA

*E. V. KOROLIK^a, M. V. GOLTSEVA^a,
V. A. ZHUKOVSKAYA^a, G. G. LUBNEVSKAYA^a, A. A. IVANOV^a*

^aBelarusian State Medical University, 83 Dzierżyński Avenue, Minsk 220116, Belarus

Corresponding author: E. V. Korolik (elena_korolik@mail.ru)

The paper analyzes the IR spectra of blood plasma from healthy donors, patients with brain infarction and patients with coronary heart disease (CHD). It was found that the structure of the main transport protein of blood plasma – albumin – in the blood plasma of patients with brain infarction, patients with CHD and representatives of the control group is almost identical. It is shown that in the absence of changes in the secondary and tertiary structure of albumin, the increase in binding of anionic hydrophobic metabolites in the blood plasma of patients with dyslipidemia compared to control is due to structural changes in low-density lipoproteins (LDL) and very low-density lipoproteins (VLDL).

Keywords: IR spectroscopy; fluorescence sensing; dyslipidemia; albumin; low-density lipoproteins; very low-density lipoproteins.

Введение

В настоящее время метод инфракрасной (ИК) спектроскопии благодаря существенному повышению его аналитических возможностей в результате использования ИК фурье-спектрометров находит все большее применение в медико-биологических исследованиях, например для компонентного анализа плазмы крови и структуры входящих в ее состав белков, диагностики на этой основе различных заболеваний [1–3]. В последние годы возрастает интерес к структуре и метаболизму липидов в организме. Атеросклероз является причиной наиболее серьезных сердечно-сосудистых заболеваний, в частности ишемической болезни сердца (ИБС), которая может привести к развитию инфаркта миокарда, а также инфаркту головного мозга [4]. На долю основных сердечно-сосудистых заболеваний, вызываемых атеросклерозом, в целом приходится примерно половина смертных случаев среди взрослого населения. Поэтому любая дополнительная информация о структурно-функциональном состоянии основных транспортных систем плазмы крови у пациентов с дислипидемией позволит более четко подойти к вопросу коррекции нарушений липидного обмена, которая является актуальной задачей практической медицины.

Цель данной работы – анализ ИК-спектров плазмы крови здоровых доноров, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ИБС для подтверждения наличия или отсутствия возможных конформационных изменений молекул альбумина в плазме крови пациентов с дислипидемией разного генеза.

Материалы и методы исследования

В работе использовалась плазма крови здоровых доноров (контрольная группа, $n = 34$); пациентов с лакунарным инфарктом головного мозга и дислипидемией ($n = 22$); пациентов с ИБС и дислипидемией ($n = 21$). Забор образцов крови производился утром натощак. В качестве консерванта применялся гепарин. Кровь, взятую из периферической вены, помещали в стеклянную пробирку с гепарином (10 МЕ на 1 мл крови) и центрифугировали для сепарации плазмы и клеток (2500 об/мин, 15 мин). Плазму отбирали в пластиковые тубы и замораживали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для всех исследованных образцов плазмы пациентов с дислипидемией был выполнен биохимический анализ крови на содержание альбумина, общего холестерина, триглицеридов и холестерина липопротеинов различной плотности, а для образцов контрольной группы – только альбумина.

Для проведения ИК-спектроскопических исследований плазмы крови пациентов с дислипидемией были получены тонкие пленки на поверхности оптических окон из кристаллов KRS-5 путем нанесения дозированного количества разбавленной плазмы. Пленки формировались при комнатной температуре в течение 24 ч. ИК-спектры в области частот $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ регистрировались на ИК фурье-спектрометре (Nicolet Analytical Instruments, США) при спектральном разрешении 2 см^{-1} и числе сканирований 256, при этом прибор постоянно продували сухим воздухом.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было проведено исследование связывающей способности альбумина и липопротеинов у пациентов с ИБС и лакунарным инфарктом головного мозга методом флуоресцентного зондирования. Оно показало повышение связывания анионного флуоресцентного зонда 8-анилинонафталин-1-

сульфоната (АНС) в плазме крови пациентов по сравнению с контролем [5; 6]. Все пациенты с дислипидемией были разделены на две группы в зависимости от основного диагноза. К первой группе отнесены пациенты с диагнозом «лакунарный инфаркт головного мозга», ко второй – «ИБС». Альбумин является главным транспортным белком, связывающим анионный флуоресцентный зонд АНС в плазме крови. Интенсивность флуоресценции этого зонда зависит от концентрации альбумина в плазме крови, его загруженности лигандами, а также от конформационных изменений белка, приводящих к появлению дополнительных центров связывания [6]. Для получения более объективных данных нами был использован флуоресцентный параметр ($I_{\text{АНС}}/C_{\text{САЧ}}$) – интенсивность флуоресценции зонда АНС, нормированная на единицу концентрации сывороточного альбумина человека (САЧ). Флуоресцентный параметр $I_{\text{АНС}}/C_{\text{САЧ}}$, характеризующий связывающую способность альбумина плазмы крови по отношению к анионным гидрофобным метаболитам, у пациентов первой группы превысил аналогичный параметр для здоровых доноров на 29 %, а у пациентов второй группы – на 49 %. В таблице приведены средние значения концентрации альбумина для контрольной группы, исследуемых пациентов с лакунарным инфарктом головного мозга и ИБС. Из таблицы видно, что при данных патологиях в плазме крови наблюдается существенное уменьшение содержания альбумина (на 23,0 и 29,5 % соответственно) по сравнению с его концентрацией у контрольной группы.

Средние значения биохимических показателей
плазмы крови здоровых доноров и пациентов с инфарктом мозга и ИБС
Averages of biochemical indicators in blood plasma of healthy donors
and patients with brain infarction and coronary heart disease

Биохимические показатели	Здоровые доноры (<i>n</i> = 34)	Пациенты с инфарктом мозга (<i>n</i> = 22)	Пациенты с ИБС (<i>n</i> = 21)
Концентрация альбумина, г/л	44,00 ± 1,42	34,00 ± 1,42*	31,40 ± 1,42*
Суммарное содержание ЛПНП и ЛПОНП, ммоль/л	<3,00 (норма)	4,08 ± 0,12*	4,65 ± 0,14*

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

Для подтверждения наличия или отсутствия возможных конформационных изменений молекул альбумина в плазме крови пациентов с дислипидемией были получены и проанализированы ИК-спектры пленок плазмы крови контрольной группы, пациентов с инфарктом мозга и пациентов с ИБС с различным уровнем липопротеинов, которые представлены на рис. 1. Для пациентов с инфарктом мозга содержание ЛПНП и ЛПОНП составило 3,67 ммоль/л (кривая 2), а для пациентов с ИБС – 4,32 и 6,78 ммоль/л (кривые 3 и 4) соответственно. В интервале 1700–1200 см⁻¹ наблюдаются полосы, известные в литературе как полосы поглощения Амид I, Амид II и Амид III [1; 2; 7]. Самая интенсивная полоса с максимумом при 1651 см⁻¹ (Амид I) обусловлена валентными колебаниями групп С=О полипептидных цепей. Полосы поглощения с максимумом при 1545 см⁻¹ (Амид II) определяются в основном деформационными колебаниями пептидных NH-групп и боковыми группами некоторых аминокислот. В интервале частот 1350–1200 см⁻¹ проявляются полосы деформационных колебаний NH-групп и валентных колебаний CN-групп полипептидного остова (Амид III) [1; 2]. Полосы Амид I, Амид II и Амид III чувствительны к изменению вторичной и третичной структуры белков [1; 2; 7].

В рассматриваемых ИК-спектрах (см. рис. 1) в области частот 3000–2800 см⁻¹ наблюдаются четыре перекрывающиеся полосы поглощения малой интенсивности с максимумами при 2957; 2927; 2873 и 2854 см⁻¹. Полосы при 2957 и 2873 см⁻¹ обусловлены асимметричными и симметричными валентными колебаниями СН₃-групп соответственно, а полосы при 2927 и 2854 см⁻¹ – асимметричными и симметричными валентными колебаниями СН₂-групп.

На рис. 2 представлены ИК-спектры пленок плазмы крови контрольной группы, альбумина, ЛПНП и ЛПОНП. Спектр пленки альбумина (см. рис. 2, кривая 2) практически идентичен спектру пленки плазмы крови донора контрольной группы (см. рис. 2, кривая 1). Это объясняется тем, что основными компонентами плазмы крови (за вычетом воды и растворенных неорганических солей) являются белки, из которых свыше 50 % приходится на альбумин. ИК-спектры липопротеинов (кривые 3 и 4) резко отличаются от спектров альбумина (кривая 2) и плазмы крови (кривая 1) наличием высокоинтенсивных полос валентных колебаний СН₂-группы при 2924 и 2854 см⁻¹ и полосы валентных колебаний карбонильной группы при 1736 см⁻¹. Эти полосы обусловлены липидной составляющей липопротеинов [3; 7].

Высокая интенсивность полос поглощения СН₂-групп в ИК-спектрах липопротеинов при сравнительно небольшой интенсивности этих полос в ИК-спектрах белков делает область 3000–2800 см⁻¹ наиболее подходящей для анализа уровня липопротеинов в плазме крови.

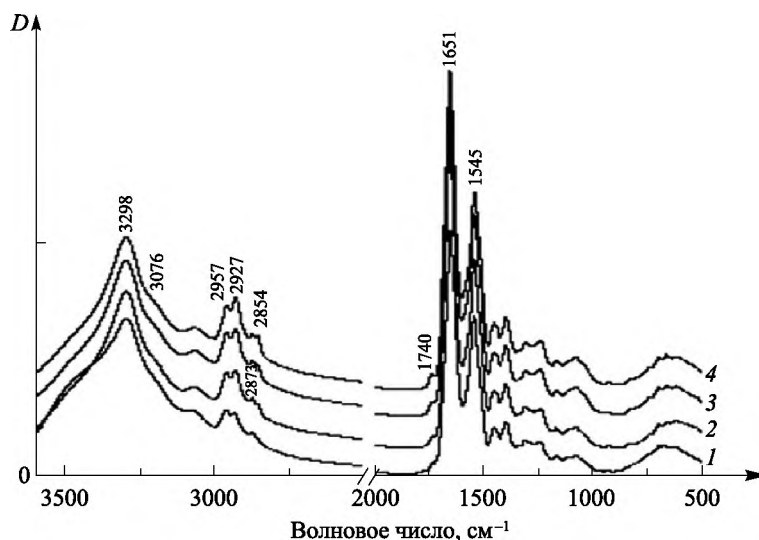


Рис. 1. ИК фурье-спектры пленок плазмы крови контрольной группы (1), пациентов с инфарктом мозга (2) и ИБС (3, 4) в области частот 3600–500 cm^{-1} (для наглядности спектры смещены по оси ординат)

Fig. 1. IR Fourier spectrums of blood plasma films of the control group (1), patients with brain infarction (2) and coronary heart disease (3, 4) in the area of frequencies 3600–500 cm^{-1} (spectra are shifted along the ordinate for clarity)

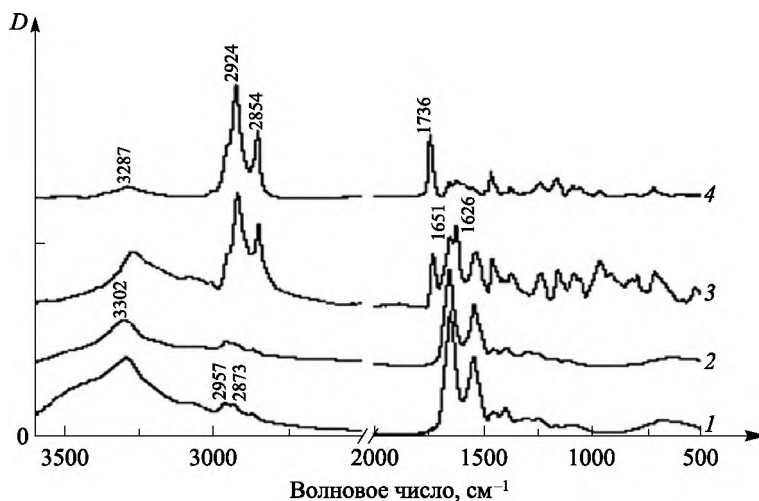


Рис. 2. ИК фурье-спектры пленок плазмы крови контрольной группы (1), альбумина (2), ЛПНП (3) и ЛПОНП (4) в области частот 3600–500 cm^{-1} (для наглядности спектры смещены по оси ординат)

Fig. 2. IR Fourier spectrums of blood plasma films of the control group (1), albumin (2), LDL (3) and VLDL (4) in the area of frequencies 3600–500 cm^{-1} (spectra are shifted along the ordinate for clarity)

Сравнительный анализ ИК-спектров плазмы крови контрольной группы (см. рис. 1, кривая 1), пациентов с инфарктом мозга (см. рис. 1, кривая 2) и пациентов с ИБС (см. рис. 1, кривые 3 и 4) показал, что отличия в исследуемых образцах плазмы крови наблюдаются только в областях 3000–2800 и 1800–1700 cm^{-1} , которые обусловлены липидной составляющей липопротеинов. Форма контура, положение максимумов и относительные интенсивности полос Амид I (1651 cm^{-1}), Амид II (1545 cm^{-1}) и Амид III (интервал частот 1350–1200 cm^{-1}) практически такие же, как в спектре плазмы крови контрольной группы (см. рис. 1, кривая 1). Так как полосы Амид I, Амид II и Амид III чувствительны к изменению вторичной и третичной структуры белков [1; 2], то это может означать, что структура белков, в частности альбумина, в плазме крови пациентов с инфарктом мозга, пациентов с ИБС и доноров контрольной группы практически одинакова. Это свидетельствует об отсутствии возможности появления дополнительных связывающих центров на данном транспортном белке. Функциональная активность

альбумина в этом случае должна либо оставаться в норме, либо снижаться за счет избыточного накопления отрицательно заряженных гидрофобных метаболитов. Однако, по данным флуоресценции зонда АНС, связывающая способность плазмы крови обеих групп пациентов по отношению к отрицательно заряженным гидрофобным метаболитам существенно повышается, несмотря на снижение концентрации альбумина.

Известно [5; 6], что анионный зонд АНС в плазме крови взаимодействует в основном с молекулами альбумина, но может реагировать и на поверхностный заряд липидных структур. При атеросклерозе в атерогенных липопротеинах плазмы крови происходят структурные изменения, выражающиеся в увеличении размеров ЛПОНП, появлении дополнительных положительно заряженных групп на поверхности ЛПНП и ЛПОНП, а также увеличении вязкости липидной фазы липопротеинов [8]. Изменения в относительной интенсивности полос поглощения при 2924 и 2854 см⁻¹ и полосы валентных колебаний карбонильной группы при 1736 см⁻¹ в ИК-спектрах пациентов с инфарктом мозга (см. рис. 1, кривая 2) и пациентов с ИБС (см. рис. 1, кривые 3 и 4) по сравнению с ИК-спектром контрольной группы (см. рис. 1, кривая 1) свидетельствуют об изменении структуры липопротеинов. Учитывая оба этих экспериментальных факта, можно сделать вывод, что наблюдаемое увеличение связывания зонда АНС в плазме крови у пациентов с инфарктом мозга и ИБС обусловлено изменением структуры липопротеинов при дислипидемии разного генеза, приводящим к появлению дополнительных положительно заряженных групп на поверхности ЛПНП и ЛПОНП.

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод, что при отсутствии изменений во вторичной и третичной структуре альбумина повышение связывания анионных гидрофобных метаболитов в плазме крови пациентов с дислипидемией и лакунарным инфарктом мозга и ИБС по сравнению с контролем обусловлено структурными изменениями в ЛПНП и ЛПОНП.

Библиографические ссылки

1. Shaw RA, Mantsch HH. Infrared spectroscopy in clinical and diagnostic analysis. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation. Volume 1*. Chichester: John Wiley and Sons; 2000. [p. 83–102].
2. Ivanov AI, Korolenko EA, Korolik EV, Firsov SP, Zhabankov RG, Marchewka MK, et al. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;408(1):69–77. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00533-7.
3. Krilov D, Balarin M, Kosović M, Gamulin O, Brnjac-Kraljević J. FT-IR spectroscopy of lipoproteins – a comparative study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;73(4):701–706. DOI: 10.1016/j.saa.2009.03.015.
4. Аронов ДМ. *Лечение и профилактика атеросклероза*. Москва: Триада-Х; 2000. 411 с.
5. Королик АК, Дикевич АЭ, Оганова ЕГ, Короленко ЕА, Королик ЕВ, Иванов АА. Структурно-функциональное состояние основных транспортных белков плазмы крови пациентов с дислипидемией. В: Кирковский ВВ, редактор. *Экстракорпоральная гемокоррекция в интенсивной терапии критических состояний. Тезисы докладов 6-й Международной научно-практической конференции; 23 мая 2013 г.; Минск, Беларусь*. Минск: Белорусский государственный медицинский университет; 2013. с. 89–92.
6. Короленко ЕА, Королик ЕВ, Королик АК, Кирковский ВВ. Оценка методом флуоресцентного зондирования связывающей способности основных транспортных белков плазмы крови при циррозе печени. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2007;74(4):507–511.
7. Королик ЕВ, Короленко ЕА, Третинников ОН, Козлякова ОВ, Королик АК, Кирковский ВВ. Динамика уровня липопротеинов в плазме крови беременных женщин в зависимости от сроков беременности по данным ИК фурье-спектроскопии. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2012;79(6):933–937.
8. Формазюк ВЕ, Добрецов ГЕ, Владимиров ЮА. Измерение поверхностного заряда липопротеидов, выделенных из плазмы крови лиц с гиперальфалипотеидемией. *Вопросы медицинской химии*. 1981;27(1):125–128.

References

1. Shaw RA, Mantsch HH. Infrared spectroscopy in clinical and diagnostic analysis. In: Meyers RA, editor. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation. Volume 1*. Chichester: John Wiley and Sons; 2000. [p. 83–102].
2. Ivanov AI, Korolenko EA, Korolik EV, Firsov SP, Zhabankov RG, Marchewka MK, et al. Chronic liver and renal diseases differently affect structure of human serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2002;408(1):69–77. DOI: 10.1016/S0003-9861(02)00533-7.
3. Krilov D, Balarin M, Kosović M, Gamulin O, Brnjac-Kraljević J. FT-IR spectroscopy of lipoproteins – a comparative study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;73(4):701–706. DOI: 10.1016/j.saa.2009.03.015.
4. Aronov DM. *Lechenie i profilaktika ateroskleroza* [Treatment and prevention of atherosclerosis]. Moscow: Triada-X; 2000. 411 p. Russian.

5. Korolik AK, Dikevich AE, Oganova EG, Korolenko EA, Korolik EV, Ivanov AA. [Structural and functional state of the main transport proteins of the blood plasma of patients with dyslipidemia]. In: Kirkovskii VV, editor. *Ekstrakorporal'naya gemokorrekcziya v intensivnoi terapii kriticheskikh sostoyanii. Tezisy dokladov 6-i Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 23 maya 2013 g.; Minsk, Belarus* [Extra-corporeal hemocorrection in intensive care of critical conditions. Collection of reports of the 6th International scientific and practical conference; 2013 May 23; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State Medical University; 2013. p. 89–92. Russian.
6. Korolenko EA, Korolik EV, Korolik AK, Kirkovskij VV. Estimation of the binding ability of main transport proteins of blood plasma at liver cirrhosis by the method of fluorescent probes. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2007;74(4):507–511. Russian.
7. Korolik EV, Korolenko EA, Tretinnikov ON, Kozlyakova OV, Korolik AK, Kirkovskiy VV. Dynamics of lipoproteins level in blood plasma of pregnant women against gestational age according to FTIR spectroscopy data. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2012;79(6):933–937. Russian.
8. Formazyuk VE, Dobretsov GE, Vladimirov YuA. [Change in the surface charge of lipoproteins isolated from the blood plasma of individuals with hyperalphalipoproteinemia]. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1981;27(1):125–128. Russian.

Статья поступила в редколлегию 06.07.2020.
Received by editorial board 06.07.2020.

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К СОЛЕВОМУ СТРЕССУ У РАСТЕНИЙ ОЗИМОГО РАПСА ЭНДОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

И. А. ГРИНЕВА¹⁾, В. А. ЛОМОНОСОВА¹⁾, Д. В. МАСЛАК¹⁾,
И. А. РУССКИХ²⁾, Л. Е. САДОВСКАЯ¹⁾, Т. Л. СКАКУН¹⁾,
И. Н. ФЕКЛИСТОВА¹⁾, Н. П. МАКСИМОВА¹⁾

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

²⁾Республиканский центр экологии и краеведения, ул. Макаенка, 8, 220114, г. Минск, Беларусь

В результате проведения экспериментов по исследованию индукции устойчивости у растений озимого рапса в условиях солевого стресса установлено, что обработка их эндофитными бактериальными штаммами 12 (выделен из зерна кукурузы), R13 (выделен из корней тритикале) и 22 (выделен из корней ржи) существенно увеличивает выживаемость, длину и массу побегов растений. Отобранные эндофитные штаммы являются перспективными для создания на их основе фитопротекторного бактериального биопрепарата.

Ключевые слова: эндофитные бактерии; солевой стресс; системная устойчивость; озимый рапс.

Благодарность. Работа выполнена в рамках задания 3.17 «Отбор и характеристика высокоактивных антибиотикопродуцирующих эндофитных бактерий, обладающих фитостимулирующим действием, с целью создания нового средства защиты овощных и технических культур» подпрограммы «Микробные биотехнологии» государственной программы научных исследований «Биотехнологии» на 2016–2020 гг.

Образец цитирования:

Гринева ИА, Ломоносова ВА, Маслак ДВ, Русских ИА, Садовская ЛЕ, Скакун ТЛ, Феклистова ИН, Максимова НП. Повышение устойчивости к солевому стрессу у растений озимого рапса эндофитными бактериями. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2021;1:112–117.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-112-117>

For citation:

Grineva IA, Lomonosova VA, Maslak DV, Russkikh IA, Sadovskaya LE, Skakun TL, Feklistova IN, Maksimova NP. Improving resistance to salt stress by endophytic bacteria in winter rape plants. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2021;1:112–117. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-112-117>

Авторы:

Ирина Александровна Гринева – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Вероника Александровна Ломоносова – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Диана Викторовна Маслак – заведующий сектором молекулярной генетики и биотехнологии микроорганизмов научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Иван Анатольевич Русских – заведующий лабораторией.

Людмила Евгеньевна Садовская – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Татьяна Леонидовна Скакун – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Ирина Николаевна Феклистова – кандидат биологических наук; заведующий научно-исследовательской лабораторией молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой генетики биологического факультета.

Authors:

Irina A. Grineva, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

grineva@mail.ru

Veronika A. Lomonosova, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

nikaglad@gmail.com

Diana V. Maslak, head of the sector of molecular genetics and biotechnology of microorganisms at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

diana-maslak@yandex.ru

Ivan A. Russkikh, head of the laboratory.

herehue@gmail.com

Ludmila E. Sadovskaya, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

ludmilasadovskaya@rambler.ru

Tatyana L. Skakun, senior researcher at the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

stanysik@yandex.by

Irina N. Feklistova, PhD (biology); head of the laboratory of molecular genetics and biotechnology, department of genetics, faculty of biology.

feklistova_iren@rambler.ru

Natalya P. Maksimova, doctor of science (biology), full professor; head of the department of genetics, faculty of biology.

nataliamaximova@yahoo.com

IMPROVING RESISTANCE TO SALT STRESS BY ENDOPHYTIC BACTERIA IN WINTER RAPE PLANTS

*I. A. GRINEVA^a, V. A. LOMONOSOVA^a, D. V. MASLAK^a,
I. A. RUSSKIKH^b, L. E. SADOVSKAYA^a, T. L. SKAKUN^a,
I. N. FEKLISTOVA^a, N. P. MAKSIMOVA^a*

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

^b*Republican Center of Ecology and Local Studies, 8 Makajonka Street, Minsk 220114, Belarus*

Corresponding author: I. A. Grineva (grineva@mail.ru)

As a result of laboratory experiments to study the induction of systemic resistance in winter rape plants under conditions of salt stress, it was found that treatment of plants with endophytic bacterial strains 12 (isolated from corn grain), R13 (isolated from triticale roots) and 22 (isolated from rye roots) significantly increases the survival rate, length and weight of plant shoots. The selected endophytic strains are promising for the creation of a phytoprotective bacterial biological preparation on their basis.

Keywords: endophytic bacteria; salt stress; systemic resistance; winter rape.

Acknowledgements. This work was carried out within the framework of task 3.17 «Selection and characterization of highly active antibiotic-producing endophytic bacteria with phyto stimulating action in order to create a new means of protection for vegetable and industrial crops» of the subprogram «Microbial biotechnologies» of the state program of scientific research «Biotechnologies» for 2016–2020.

Введение

Интерес к экологизации сельского хозяйства в последние годы возрастает во всем мире, что обусловлено заботой о здоровье человека и стремлением замедлить вредное влияние общества на окружающую среду. В растениеводстве работники агропромышленного комплекса и ученые стремятся сохранить и приумножить урожай сельскохозяйственных культур, одновременно снизив или исключив пестицидную нагрузку и уменьшив количество вносимых удобрений. В Республике Беларусь подобное направление деятельности поддержано на законодательном уровне. Так, в 2019 г. вступил в силу Закон Республики Беларусь от 9 ноября 2018 г. № 144-З «О производстве и обращении органической продукции». Одним из путей получения органических продуктов является применение в растениеводстве биологических препаратов на основе микроорганизмов, способных проявлять целый комплекс хозяйственно полезных свойств.

Эндофитные бактерии – группа PGPR-бактерий, которые не образуют какие-либо специфические структуры у растений и мутуалистически существуют внутри растительных тканей, что делает их менее зависимыми от факторов внешней среды и одновременно с этим позволяет активно влиять на растение-хозяина. Изучение эндофитных бактерий актуально, так как они обладают широким спектром хозяйственно полезных свойств: стимулируют рост растений, улучшают их питание, проявляют антифунгальную и антибактериальную активность, борются с нематодами и насекомыми, существенно увеличивают продуктивность сельскохозяйственных культур, повышают устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Учеными было показано, что инокуляция растений эндофитными бактериями способствует благополучному перенесению растениями абиотических стрессов, таких как засоление, засуха, низкие температуры, чрезмерное оводнение, содержание в почве поллютантов. Установлено, что используемые в экспериментах эндофитные бактерии повышают устойчивость растений-хозяев посредством нескольких механизмов: влияния на изменение метаболизма, уровня фитогормонов и морфологии растений, накопления протекторных молекул, индукции системной устойчивости ISR-типа [1–3].

В литературных источниках описано значительное количество родов и видов эндофитных бактерий у сельскохозяйственных растений. Исследования, использующие современные технологии, позволяют идентифицировать даже те эндофитные микроорганизмы, которые не могли быть выделены посевом стерилизованных растительных тканей на питательные среды. Однако для нужд биотехнологии наибольший интерес представляют культивируемые эндофитные штаммы (так называемые факкультативные эндофиты), имеющие в жизненном цикле этап существования за пределами растения-хозяина [1; 2].

Внутренняя среда здоровых растений чаще всего населена не монокультурой микроорганизмов, а совокупностью эндофитов. Причем эндофитное сообщество находится в настолько тесном и активном взаимодействии с растением-хозяином, что обуславливает формирование у последнего МАР-фенотипа (*microbiome-associated phenotype*). Тенденцией исследований последних лет является изучение и прогнозирование взаимодействия сельскохозяйственных растений не только с отдельными эндофитными штаммами, но и с различными микробными эндофитными консорциумами [1].

Известно, что эндофитные бактерии не обладают высокой специфичностью и могут передаваться как горизонтально между соседними растениями, так и вертикально из поколения в поколение с семенами и пылью, причем установлено повышение частоты передачи эндофитных бактерий у растений в стрессовых условиях [1].

Совокупность указанных выше фактов позволяет создавать эффективные биологические препараты пролонгированного действия на основе эндофитных бактерий для органического земледелия. Применение подобных биопрепаратов в сельском хозяйстве требует меньших затрат, чем использование пестицидов и удобрений, но при этом дает значительный стимулирующий и защитный эффект, не оказывая негативного влияния на биоразнообразие и плодородие почв, здоровье человека.

Целью данного исследования было изучение возможности повышать устойчивость модельного объекта озимого рапса к абиотическому стрессу – засолению ростовой среды раствором NaCl – за счет обработки эндофитными бактериями.

Материалы и методы исследования

Для получения лабораторных образцов бактериальных культур штаммы из коллекции эндофитных нефитопатогенных бактерий НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета БГУ [4] выращивали на круговом шейкере в картофельном бульоне в течение 48 ч при 28 °С. Для приготовления картофельного бульона к 300 мл измельченного картофеля добавляли 1000 мл дистиллированной воды, отваривали до готовности и фильтровали. Стерилизацию осуществляли автоклавированием при 1,52 бара на протяжении 0,5 ч.

В качестве модели для изучения способности эндофитных бактерий индуцировать устойчивость растений к абиотическим неблагоприятным факторам окружающей среды в лабораторных условиях был выбран сорт озимого рапса Зорны, выращиваемый при засолении ростовой агаризованной среды

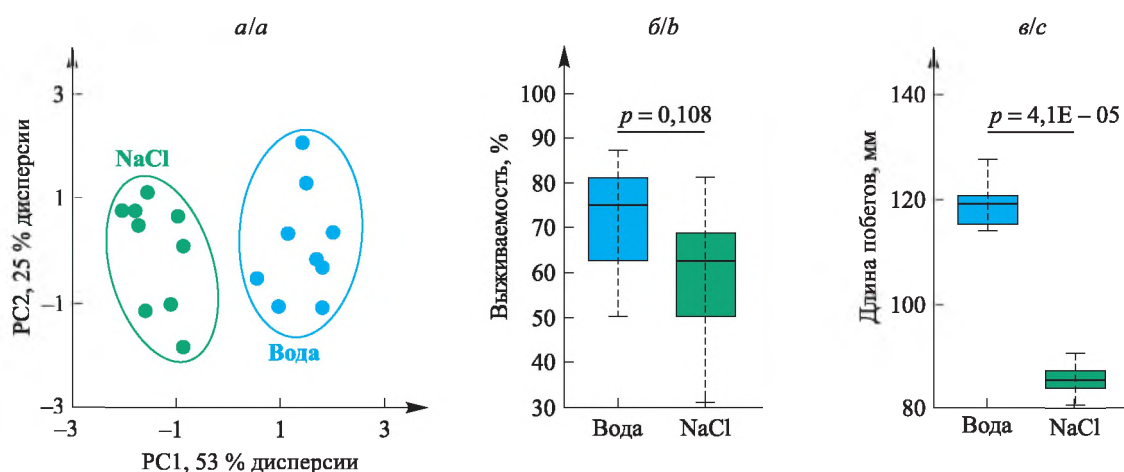


Рис. 1. Точечная диаграмма распределения двух контрольных групп растений рапса (а), а также бокс-плоты выживаемости (б) и длины побегов (в) растений рапса при засолении 150 ммоль/л NaCl и в его отсутствие.

На рисунках б и в приведены боксы, отсекающие верхний и нижний квартили распределения данных, медиана распределения обозначена жирной горизонтальной линией внутри каждого бокса, усы указывают крайние (минимальные и максимальные) значения выборок, уровень значимости p рассчитан с помощью двустороннего двухвыборочного t -теста

Fig. 1. Scatterplot demonstrating the distribution of rapeseed plants from two control groups (a), and boxplots showing the survival (b) as well as sprout length (c) in rapeseed plants under normal water or 150 mmol/L NaCl treatment conditions. Boxplots in figures b and c include minimum (lower whisker), first quartile (lower bound of box), median (horizontal bold line inside box), third quartile (upper bound of box), interquartile range (box) and maximum (upper whisker); p -values were calculated with two-sided two-sample Student's t -test

Кнопка раствором NaCl в концентрации 150 ммоль/л. Подготовленные бактериальные суспензии (0,2 мл бактериальной суспензии, разведенной в 10 раз стерильной водопроводной водой) вносили в сосуды с 17,8 мл теплой (45 °C) агаризованной среды Кноп (1 %), туда же добавляли по 2 мл концентрата NaCl (1500 ммоль/л, или 87,66 г/л NaCl) и перемешивали. На поверхность застывшей среды каждого сосуда раскладывали семена рапса, проращивали их в темноте 3 сут при 20 °C, затем растили на свету в светотеплице 16–17 сут при 20 °C, закрыв стерильным стеклянным колпаком. В качестве контроля № 1 использовали растения, в ростовую среду которых вместо концентрата NaCl внесли стерильную водопроводную воду, а в качестве контроля № 2 – растения, в питательной среде которых суспензию бактерий заменили 0,2 мл картофельного бульона, разведенного в 10 раз стерильной водопроводной водой. Эксперименты были поставлены в 3-кратной повторности, количество вегетационных сосудов в каждом варианте эксперимента составляло не менее трех. В ходе эксперимента оценивали выживаемость, длину, сырую и сухую массу побегов растений рапса. Статистическую обработку результатов исследования проводили в программе *Microsoft Excel*, а также среде программирования *R*.

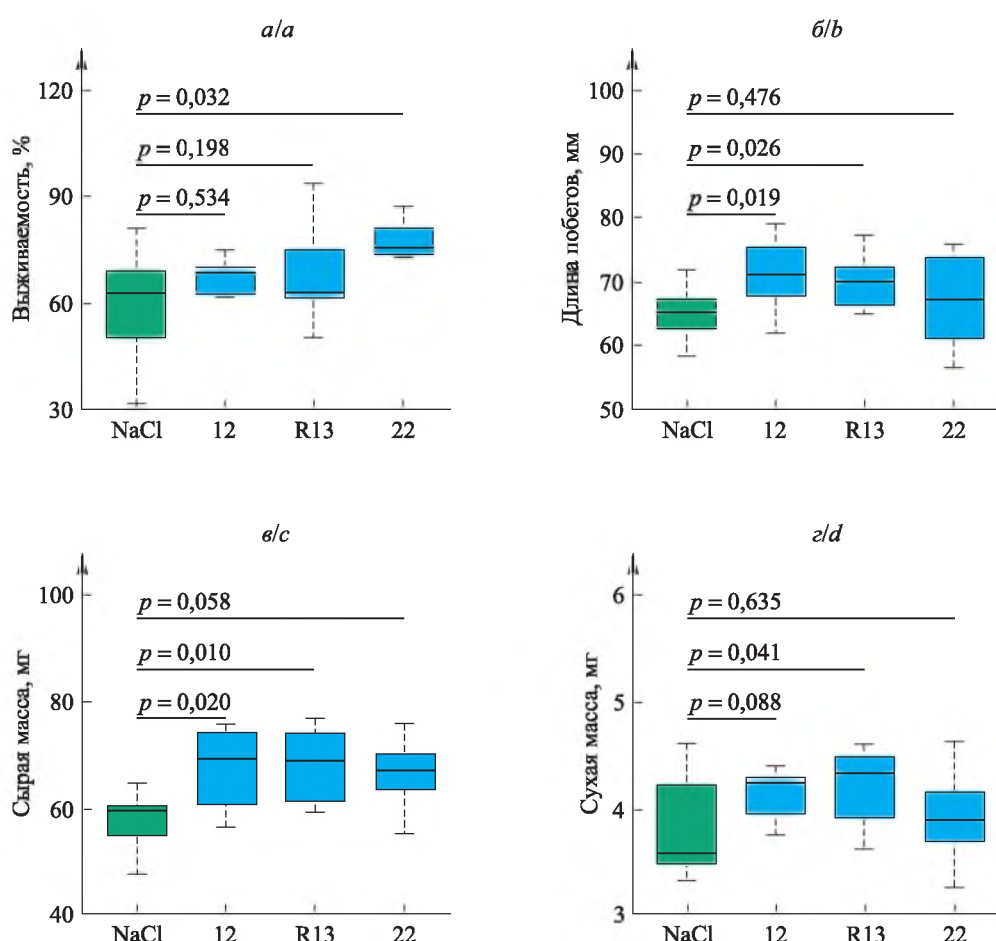


Рис. 2. Выживаемость (а), длина (б), сырая (в) и сухая (г) масса побегов рапса при обработке растений штаммами эндوفитных бактерий 12, R13 и 22 в условиях засоления 150 ммоль/л NaCl. На рисунке представлены боксы, отсекающие верхний и нижний квартили распределения данных, медиана распределения обозначена жирной горизонтальной линией внутри каждого бокса, усы указывают крайние (минимальные и максимальные) значения выборок, уровень значимости p рассчитан с помощью двустороннего двухвыборочного t -теста

Fig. 2. Survival (a), sprout length (b), wet (c) and dry (d) mass of sprouts of the rapeseed plants following endophytic bacteria strains 12, R13 or 22 treatment under 150 mmol/L NaCl saline conditions. Boxplots include minimum (lower whisker), first quartile (lower bound of box), median (horizontal bold line inside box), third quartile (upper bound of box), interquartile range (box) and maximum (upper whisker); p -values were calculated with two-sided two-sample Student's t -test

Результаты и их обсуждение

В исследовании были изучены 10 штаммов бактерий-эндофитов (7, 9, 12, 16, 22, 39, 41, 43, Э33 и R13). Их влияние на устойчивость рапса к засолению оценивалось по четырем признакам (параметрам или характеристикам): выживаемости растений, их длине, а также сырой и сухой массе побегов. При этом первоначальный дизайн исследования предполагал два контроля: добавление к ростовой среде стерильной водопроводной воды или же 1500 ммоль/л концентрата NaCl.

С помощью метода главных компонент – стандартного метода многомерной статистики, одновременно учитывающего все признаки, по которым описывались растения в нашем исследовании, – мы определили, что две контрольные группы растений четко различаются между собой (рис. 1, а). Изучение же каждого из признаков в отдельности показало, что неблагоприятный абиотический фактор (засоление ростовой среды 150 ммоль/л NaCl) достоверно снижает только длину побегов у контрольных растений рапса сорта Зорны по сравнению с рапсом, выращенным в отсутствие этого повреждающего фактора (см. рис. 1, в). По остальным признакам мы наблюдали заметное, но все же статистически недостоверное их снижение при засолении (как, например, в случае выживаемости (см. рис. 1, б)). Эти результаты показывают, что для дальнейших сравнительных исследований целесообразнее использовать контроль с добавлением к ростовой среде 1500 ммоль/л концентрата NaCl. Кроме того, очевидно, что метод главных компонент позволяет уловить четкие различия между сравниваемыми группами растений по совокупности всех изучаемых признаков, тогда как сравнение по отдельным признакам не всегда дает однозначный результат.

Дальнейший сравнительный анализ показал, что обработка растений 3 штаммами бактерий-эндофитов (из 10 изученных) достоверно повышает выраженность некоторых из исследуемых признаков у рапса в условиях засоления. Так, внесение бактерий штамма 12 достоверно увеличивает длину побегов рапса, выращенного при засолении, на 12,8 %, а сырую массу побегов – на 14,8 %. Клетки штамма R13 благоприятно воздействуют на длину, сырую и сухую массу побегов (рост на 9,8; 16,1 и 11,3 % соответственно), что продемонстрировано на рис. 2. Клетки штамма 22 повышают выживаемость растений при засолении на 16 %. Эти результаты свидетельствуют о том, что некоторые бактерии-эндофиты могут индуцировать повышенную устойчивость рапса к такому неблагоприятному фактору, как засоление.

Однако поскольку, опираясь на отдельные признаки, не всегда можно однозначно сказать, каково же совокупное влияние бактерий на растения (по одному признаку могут быть изменения, а по другим – нет), то мы воспользовались возможностями метода главных компонент, чтобы оценить

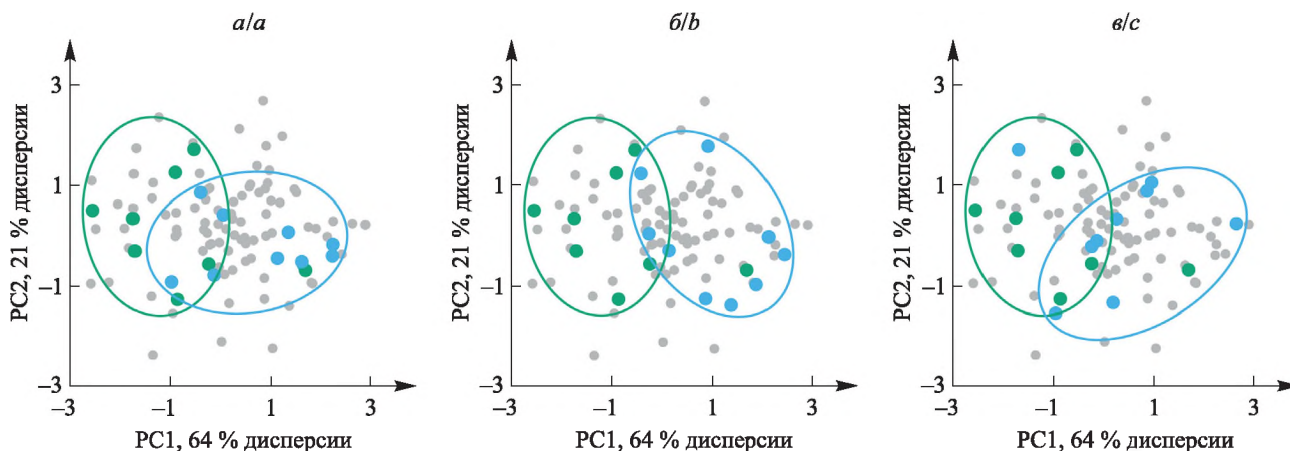


Рис. 3. Точечные диаграммы распределения контрольных и экспериментальных растений рапса, обработанных бактериальными эндофитными штаммами 12 (а), R13 (б) и 22 (в) при засолении 150 ммоль/л NaCl.

Все растения рапса, участвующие в эксперименте, обозначены серым цветом (●), контрольные растения – зеленым (●), а экспериментальные – голубым (●).

Диаграммы рассчитаны с помощью метода главных компонент по совокупности всех изученных в эксперименте параметров растений

Fig. 3. Scatterplots of control and experimental rapeseed plants following endophytic bacteria strains 12 (a), R13 (b) or 22 (c) treatment under 150 mmol/L NaCl saline conditions.

The gray dots (●) represent the entire set of rapeseed plants enrolled in the study.

A subset of control plants is marked in green (●) and experimental ones are blue (●).

These plots are based on linear approximation of all investigated features of the rapeseed plants using principal component analysis

влияние штаммов бактерий-эндофитов на растения рапса сразу по всем исследуемым признакам. Как видно на рис. 3, внесение бактериальных эндофитных штаммов 12 (см. рис. 3, а), R13 (см. рис. 3, б) и 22 (см. рис. 3, в) в агаризованную среду Кюпа приводит к такому совокупному изменению учитываемых в эксперименте признаков растений, что на точечных диаграммах рассеяния эти растения располагаются достаточно компактно (точки голубого цвета справа) и лишь в незначительной степени перекрываются с областями, занимаемыми контрольными растениями в условиях засоления (точки зеленого цвета слева). По другим штаммам мы не наблюдали столь надежного разделения контрольных и экспериментальных групп растений. Эти результаты, по нашему мнению, согласуются с результатами, описанными выше, и подтверждают способность бактериальных эндофитных штаммов 12, R13 и 22 эффективно индуцировать устойчивость к засолению у растений озимого рапса.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований из 10 протестированных эндофитных бактерий отобраны штаммы 12 (выделен из зерна кукурузы сорта Гитаго), R13 (выделен из корней тритикале сорта Дубрава) и 22 (выделен из корней ржи), которые повышали устойчивость к засолению 150 ммоль/л NaCl у растений озимого рапса. Впоследствии планируется изучить механизмы, лежащие в основе благоприятного влияния инокуляции эндофитными бактериями на растения рапса при засолении. Отобранные эндофитные штаммы являются перспективными для дальнейшего исследования и создания на их основе фитопротекторного бактериального биопрепарата.

Библиографические ссылки

1. Васильева ЕН, Ахтемова ГА, Жуков ВА, Тихонович ИА. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве. *Экологическая генетика*. 2019;17(1):19–32. DOI: 10.17816/ecogen17119-32.
2. Miliute I, Buzaite O, Baniulis D, Stanys V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2015;102(4):465–478. DOI: 10.13080/z-a.2015.102.060.
3. Firdous J, Lathif NA, Mona R, Muhamad N. Endophytic bacteria and their potential application in agriculture: a review. *Indian Journal of Agricultural Research*. 2019;53(1):1–7. DOI: 10.18805/IJARE.A-366.
4. Гринева ИА, Савчик АВ, Ломоносова ВА, Маслак ДВ, Кулешова ЮМ, Садовская ЛЕ и др. Выделение штаммов эндофитных бактерий, перспективных для создания фитозащитных биопрепаратов, и изучение их антагонистических свойств. В: Маслак ДВ, редактор. *Биологически активные препараты для растениеводства. Научное обоснование – рекомендации – практические результаты. Материалы XIV Международной научно-практической конференции; 3–8 июля 2018 г.; Минск, Беларусь*. Минск: БГУ; 2018. с. 69–71.

References

1. Vasileva EN, Akhtemova GA, Zhukov VA, Tikhonovich IA. Endophytic microorganisms in fundamental research and agriculture. *Ecological Genetics*. 2019;17(1):19–32. Russian. DOI: 10.17816/ecogen17119-32.
2. Miliute I, Buzaite O, Baniulis D, Stanys V. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. *Zemdirbyste-Agriculture*. 2015;102(4):465–478. DOI: 10.13080/z-a.2015.102.060.
3. Firdous J, Lathif NA, Mona R, Muhamad N. Endophytic bacteria and their potential application in agriculture: a review. *Indian Journal of Agricultural Research*. 2019;53(1):1–7. DOI: 10.18805/IJARE.A-366.
4. Grineva IA, Savchik AV, Lomonosova VA, Maslak DV, Kuleshova YuM, Sadovskaya LE, et al. [Isolation of strains of endophytic bacteria, promising for the creation of phytoprotective biological products, and the study of their antagonistic properties]. In: Maslak DV, editor. *Biologicheski aktivnye preparaty dlya rastenievodstva. Nauchnoe obosnovanie – rekomendatsii – prakticheskie rezultaty. Materialy XIV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 3–8 iyulya 2018 g.; Minsk, Belarus'* [Biologically active drugs for crop production. Scientific justification – recommendations – practical results. Materials of the 14th International scientific-practical conference; 2018 July 3–8; Minsk, Belarus]. Minsk: Belarusian State University; 2018. p. 69–71. Russian.

Статья поступила в редакцию 28.08.2020.
Received by editorial board 28.08.2020.

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 57(072)(075.8)

Гричик В. В. **Методика преподавания биологии с основами воспитательной работы** [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)» / В. В. Гричик ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 121 с. : табл. Библиогр.: с. 120–121. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/252160>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 08.12.2020, № 014408122020.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)», включает в себя разделы: теоретический, контроля знаний и вспомогательный, содержащий учебно-программные материалы и список рекомендованной литературы. Курс «Методика преподавания биологии с основами воспитательной работы» предполагает изучение научно-методических основ преподавания биологических дисциплин в общеобразовательной школе и получение первичных навыков обучающей деятельности и организации учебно-воспитательного процесса.

УДК 614.8(075.8)

Безопасность жизнедеятельности человека [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для студентов, обучающихся на специальностях гуманитарного профиля / БГУ ; сост.: Н. А. Телюк [и др.]. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 520 с. : ил. Библиогр.: с. 517–520. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/253155>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 21.12.2020, № 014921122020.

Электронный учебно-методический комплекс «Безопасность жизнедеятельности человека» предназначен для студентов специальностей гуманитарного профиля. Рассматриваются основные положения защиты населения в чрезвычайных ситуациях техногенного и природного характера, проблемы защиты окружающей среды и энергосбережения и охраны труда.

УДК 579(075.8)

Чернявская М. И. **Микробная синэкология** [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 80 12 «Микробиология», профилизация «Фундаментальная и прикладная микробиология» / М. И. Чернявская ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 64 с. : ил. Библиогр.: с. 63–64. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/253690>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 30.12.2020, № 015930122020.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов II ступени высшего образования специальности 1-31 80 12 «Микробиология» (профилизация «Фундаментальная и прикладная микробиология»). Содержание ЭУМК посвящено разнообразию взаимоотношений как между самими микроорганизмами, так и между микроорганизмами и макроорганизмами, молекулярным и физиологическим основам этих связей, а также трофической структуре микробных сообществ, таких как цианобактериальные маты, анаэробные метаногенные сообщества.

УДК 579.25(075.8)

Титок М. А. **Векторные системы** [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец.: 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)», 1-31 01 03 «Микробиология» / М. А. Титок ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2020. 45 с. Библиогр.: с. 44–45. Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/254038>. Загл. с экрана. Деп. в БГУ 14.01.2021, № 000114012021.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов специальностей 1-31 01 01-03 «Биология (биотехнология)», 1-31 01 03 «Микробиология». Содержание ЭУМК предполагает изучение особенностей организации и функционирования генетического материала про- и эукариотических организмов, основных методов работы с молекулами ДНК, принципов создания векторных молекул на основе природных плазмид и вирусов и их использование в генной инженерии для изучения тонких механизмов экспрессии генов и создания генно-модифицированных клеток и организмов.

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Янко Р. В., Левашов М. И. Морфологические отличия поджелудочной железы нормо- и гипертензивных крыс после сочетанного воздействия прерывистой гипоксии и мелатонина.....	3
Яглова Н. В., Обернихин С. С., Яглов В. В., Назимова С. В., Тимохина Е. П. Клеточные механизмы нарушения синтеза минерало- и глюкокортикоидов эндокринным дисраптором ДДТ.....	12
Юркевич М. Ю., Дубко А. Д., Нижегородова Д. Б., Лобай М. В., Зафранская М. М. Биосовместимость децеллюляризованного скаффолда печени в исследованиях <i>in vitro</i>	20
Харитонова В. Р., Сидоров А. В. Особенности накопления активных форм кислорода в первичной культуре нервных клеток <i>Lymnaea stagnalis</i>	28

БИОХИМИЯ

Урбан В. А., Давидовский А. И., Вересов В. Г. <i>In silico</i> анализ димеризации PD-L1, индуцированной ресвератролом	39
---	----

БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Титова А. Д., Кудин К. В., Прокулевич В. А. Особенности экспрессии белка капсида цирковируса свиней 2-го типа в бактериальных клетках.....	48
Печенкина Е. И., Самович Т. В., Козел Н. В. Влияние фотосенсибилизатора бенгальского розового на продуктивность и пигментный состав <i>Haematococcus pluvialis</i>	58
Габриелян Л. С. Перспективы применения отходов алкогольной промышленности в фотовыделении водорода пурпурной бактерией <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	70

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Падутов В. Е. Особенности формирования популяционной структуры <i>Picea abies</i> (L.) Karst. на территории Беларуси.....	78
Снытков Е. В., Кипень В. Н., Казачок А. В., Мельнов С. Б. Межгенные взаимодействия и генетический полиморфизм в увеличении вероятности развития алкогольной зависимости.....	92

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Королик Е. В., Гольцева М. В., Жуковская В. А., Лубневская Г. Г., Иванов А. А. Особенности инфракрасных спектров плазмы крови пациентов с дислипидемией	106
Гринева И. А., Ломоносова В. А., Маслак Д. В., Русских И. А., Садовская Л. Е., Скакун Т. Л., Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Повышение устойчивости к солевому стрессу у растений озимого рапса эндифитными бактериями.....	112
Аннотации депонированных в БГУ работ.....	118

CONTENTS

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

<i>Yanko R. V., Levashov M. I.</i> Morphological differences in the pancreas of normo- and hypertensive rats after joint exposure of intermittent hypoxia and melatonin.....	3
<i>Yaglova N. V., Obernikhin S. S., Yaglov V. V., Nazimova S. V., Timokhina E. P.</i> Cellular mechanisms of impaired mineralocorticoid and glucocorticoid production by endocrine disruptor DDT.....	12
<i>Yurkevich M. Yu., Dubko A. D., Nizheharodava D. B., Labai M. V., Zafranskaya M. M.</i> Biocompatibility of a decellularized liver scaffold in studies <i>in vitro</i>	20
<i>Haritonova V. R., Sidorov A. V.</i> Peculiarities of reactive oxygen species accumulation in the primary culture of nerve cells of <i>Lymnaea stagnalis</i>	28

BIOCHEMISTRY

<i>Urban V. A., Davidovskii A. I., Veresov V. G.</i> <i>In silico</i> analysis of resveratrol induced PD-L1 dimerisation.....	39
---	----

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

<i>Titova A. D., Kudzin K. V., Prokulevich V. A.</i> Properties of expression of protein capsid porcine circovirus type 2 in bacterial cells	48
<i>Pechenkina E. I., Samovich T. V., Kozel N. V.</i> The influence of Rose Bengal photosensitizer on the productivity and pigment composition of <i>Haematococcus pluvialis</i>	58
<i>Gabrielyan L. S.</i> The prospects of alcohol industry wastes application in photoproduction of hydrogen by the purple bacteria <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	70

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

<i>Padutov V. E.</i> Features of <i>Picea abies</i> (L.) Karst. population structure formation on the territory of Belarus	78
<i>Snytkov E. V., Kipen V. N., Kazachok A. V., Melnov S. B.</i> Intergenic interactions and genetic polymorphism in increasing the probability of alcoholic dependence	92

SHORT COMMUNICATIONS

<i>Korolik E. V., Goltseva M. V., Zhukovskaya V. A., Lubnevskaya G. G., Ivanov A. A.</i> Features of infrared spectra of blood plasma of patients with dyslipidemia	106
<i>Grineva I. A., Lomonosova V. A., Maslak D. V., Russkikh I. A., Sadovskaya L. E., Skakun T. L., Feklistova I. N., Maksimova N. P.</i> Improving resistance to salt stress by endophytic bacteria in winter rape plants.....	112
Indicative abstracts of the papers deposited in BSU	118

*Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.
Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).*

**Журнал Белорусского
государственного университета. Биология.
№ 1. 2021**

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. Пижикова*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 28.02.2021.

Тираж 100 экз. Заказ 79.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
ЛП № 02330/89 от 03.03.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

© БГУ, 2021

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 1. 2021**

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 28.02.2021.

Edition 100 copies. Order number 79.

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, 2021