

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2024. Т. 69, № 3

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2024. Т. 69, № 3

Журнал основан в 1956 г. как «Весці Акадэміі навук БССР. Серыя біялагічных навук»,
с 1992 г. – «Весці Акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук»,
с 1998 г. – современное название

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 395 от 18 мая 2009 г.

*Входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь
для опубликования результатов диссертационных исследований, включен в базу данных
Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)*

Главный редактор

Олег Юрьевич Баранов – Отделение биологических наук Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

- А. В. Кильчевский** (*заместитель главного редактора*) – Президиум Национальной академии наук
Беларуси, Минск, Республика Беларусь
- М. Е. Никифоров** (*заместитель главного редактора*) – Научно-практический центр Национальной
академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь
- В. Г. Колосовская** (*ведущий редактор журнала*)
- З. М. Алещенкова** – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Рес-
публика Беларусь
- И. Д. Вологовский** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Бе-
ларуси, Минск, Республика Беларусь
- А. Е. Гончаров** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

- В. В. Демидчик** – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
Н. И. Дубовец – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Л. Ф. Кабашникова – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Э. И. Коломиец – Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Республика Беларусь
Н. А. Ламан – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
В. Е. Падутов – Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь
В. Н. Прохоров – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
В. Н. Решетников – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
В. В. Титок – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
В. И. Торчик – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Л. В. Хотылева – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

- В. Ф. Багинский** – Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь
А. Баршевский – Даугавпилский университет, Даугавпилс, Латвийская Республика
В. Е. Гайдук – Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, Брест, Республика Беларусь
Ю. Ю. Дгебуадзе – Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
Н. А. Колчанов – Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация
В. В. Кузнецов – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
В. Олех-Пяэцка – Варшавский университет естественных наук, Варшава, Республика Польша
О. Н. Пугачев – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
А. И. Рапопорт – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвийская Республика
И. А. Тихонович – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Адрес редакции:

ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Сайт: vestibio.belnauka.by

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2024. Т. 69, № 3.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*

Компьютерная верстка *Н. И. Кащуба*

Подписано в печать 08.07.2024. Выход в свет 29.07.2024. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 80 экз. Заказ 133.

Цена номера: индивидуальная подписка – 14,01 руб., ведомственная подписка – 32,74 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий № 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220084, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».

Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2024

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2024, vol. 69, no. 3

The Journal was founded in 1956 under the title
“Proceedings of the Academy of Sciences of BSSR. Biological series”,
since 1992 – “Proceedings of the Academy of Sciences of Belarus. Biological series”,
since 1998 it comes under its actual title

Issued four times a year

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The Journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus
in the State Registry of Mass Media, reg. no. 395

*The Journal is included in the List of Journals for Publication of the results
of Dissertation Research in the Republic of Belarus and in the database
of Russian Science Citation Index (RSCI)*

Editor-in-Chief

Oleg Yu. Baranov – Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

Alexander V. Kilchevsky (*Associate Editor-in-Chief*) – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Michail Y. Nikiforov (*Associate Editor-in-Chief*) – Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus

Valentina G. Kolosovskaya (*Leading Editor*)

Zinaida M. Aleshchenkova – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Vadim V. Demidchik – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Dubovets Nadezhda I. – Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Andrei E. Hancharou – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Lyudmila F. Kabashnikova – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Lyubov V. Khotyleva – Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Emiliya I. Kolomiets – State Research and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology, Minsk, Republic of Belarus
Nikolai A. Laman – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir E. Padutov – Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
Valery N. Prokhorov – Institute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir N. Reshetnikov – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir V. Titok – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir I. Torchyk – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Igor D. Volotovskii – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E d i t o r i a l C o u n c i l

Vladimir F. Baginski – F. Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus
Arvids Barsevskis – Daugavpils University, Daugavpils, Republic of Lithuania
Yuri Yu. Dgebuadze – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Vasiliy E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus
Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Wanda Olech-Piasecka – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Republic of Poland
Oleg N. Pugachev – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation
Alexander I. Rapoport – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvian Republic
Igor A. Tikhonovich – All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russian Federation

Address of the Editorial Office:

*1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Phone: +375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Website: vestibio.belnauka.by*

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series, 2024, vol. 69, no. 3.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *N. I. Kashuba*

Sent for press 08.07.2024. Output 29.07.2024. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher’s signatures 11.3. Circulation 80 copies. Order 133.
Number price: individual subscription – 14.01 byn., departmental subscription – 32.74 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise “Publishing House “Belaruskaya Navuka”.
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer,
distributor of printing editions no. 1/18 dated of August 2, 2013. License for press no. 02330/455 dated of December 30, 2013.
Address: F. Skorina Str., 40, 220084, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE “Publishing House “Belaruskaya Navuka”,
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series, 2024

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

ЗМЕСТ

Ярмолевич В. А., Пантелеев С. В., Хархасова И. А., Зенюк К. В., Иващенко Л. О., Константинов А. В., Баранов О. Ю. Видовая структура микобиомов корней самосева и сеянцев сосны обыкновенной и ели европейской.....	183
Давыденко А. И., Кохан А. Ю., Дремук И. А., Шамова Е. В., Осипова А. В., Гончаров А. Е. Методика биохимической модификации поверхности стекла для изготовления белковых микрочипов	198
Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Мауерсбергер Ш., Шкуматов В. М. Подавление побочных реакций ацетилирования прегненолона в трансгенных дрожжах с использованием конкурентного ингибирования и оптимальной системы «вектор – хозяин»	207
Филина Н. И., Курбат М. Н. Особенности функционирования дофаминергической и серотонинергической нейромедиаторных систем некоторых отделов головного мозга крыс при введении препаратов AZT (зидовудин) и S-аденозил-L-метионин	217
Поклонская Н. В., Амвросьева Т. В., Богущ З. Ф., Шилова Ю. А., Колтунова Ю. Б., Бельская И. В. Молекулярная эпидемиология вирусов ЕСНО30, циркулирующих в Беларуси на протяжении последних 25 лет.....	224
Никитин А. Н., Кудин М. В., Калиниченко С. А., Ласько Т. В., Шуранкова О. А., Мищенко Е. В. Построение прогноза накопления ¹³⁷ Cs древесными растениями и сельскохозяйственными культурами с использованием метода решающих деревьев	237
Винтер М. А., Щеколова А. С., Казловский И. С., Зинченко А. И. Получение комплексов 3',5'-циклического диаденозинмонофосфата с Mg,Al-слоистым двойным гидроксидом (<i>на англ. яз.</i>).....	249
Шакун В. В., Кришук И. А. Этолого-экологические адаптации барсука обыкновенного (<i>Meles meles</i>) в зоне отчуждения и отселения Полесского государственного радиационно-экологического заповедника.....	254

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

CONTENTS

Yarmalovich V. A., Panteleev S. V., Kharkhasova I. A., Zeniuk K. V., Ivashchanka L. A., Konstantinov A. V., Baranov O. Yu. Species structure of natural regeneration and seedling root mycobiomes of Scots pine and Norway spruce.....	183
Davydzenka A. I., Kokhan A. Yu., Dremuk I. A., Shamova E. V., Osipava A. U., Hancharou A. Ya. Technique of modifying the glass surface for production of protein microchips.....	198
Faletrov Y. V., Frolova N. S., Mauersberger S., Shkumatov V. M. Suppressing the side reactions of pregnenolone acetylation in transgenic yeast using competitive inhibition and optimal vector–host system	207
Filina N. I., Kurbat M. N. Features of the functioning of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems of some parts of the rat brain after AZT (zidovudine) and S-adenosyl-L-methionine drugs administration.....	217
Paklonskaya N. V., Amvrosieva T. V., Bogush Z. F., Shilova Y. A., Koltunova Y. B., Belskaya I. V. Molecular epidemiology of Echovirus 30 in Belarus over the last 25 years	224
Nikitin A. N., Kudin M. V., Kalinichenko S. A., Lasko T. V., Shurankova O. A., Mishchanka E. V. Forecasting the accumulation of ¹³⁷ Cs by trees and crops using the decision tree method.....	237
Vinter M. A., Shchokolova A. S., Kazlouski I. S., Zinchenko A. I. Production of 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate complex with Mg,Al-layered double hydroxide.....	249
Shakun V. V., Kryshchuk I. A. Ethological and ecological adaptations of Eurasian badger (<i>Meles meles</i>) in the exclusion and resettle zone of the Polesie State Radiation-Ecological Reserve	254

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.25:630*1
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-183-197>

Поступила в редакцию 15.05.2024
Received 15.05.2024

**В. А. Ярмолевич¹, С. В. Пантелеев², И. А. Хархасова², К. В. Зенюк¹,
Л. О. Иващенко¹, А. В. Константинов², О. Ю. Баранов³**

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт леса НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

³Отделение биологических наук НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВИДОВАЯ СТРУКТУРА МИКОБИОМОВ КОРНЕЙ САМОСЕВА И СЕЯНЦЕВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ И ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ

Аннотация. В статье изложены результаты молекулярно-генетической идентификации видового состава микобиомов корневых систем 1–2-летних растений сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.), произрастающих в лесных питомниках и естественных насаждениях. Установлены показатели биоразнообразия (обилие видов, индекс доминирования, индекс разнообразия Шеннона) и приведена сравнительная характеристика исследованных микобиомов.

Выявлено, что основные видовые комплексы микориз ювенильных растений сосны и ели образованы сходными грибными видами, относящимися к родам *Wilcoxina*, *Phialocephala*, *Helotiaceae* и др. При этом для самосева характерна и моновидовая микориза, представленная базидиомицетами родов *Russula*, *Rhizopogon*, *Laccaria*. Наибольшие значения показателей видового разнообразия грибных сообществ отмечались для самосева как ели европейской ($H_{\max} = 2,6$), так и сосны обыкновенной ($H_{\max} = 2,5$). Ведущим фактором, определяющим видовую структуру микобиомов в естественных условиях и в питомниках, являлись локальные почвенно-биотические условия.

Ключевые слова: микобиом, самосев, сеянцы, сосна обыкновенная, ель европейская, микориза, патогены

Для цитирования: Видовая структура микобиомов корней самосева и сеянцев сосны обыкновенной и ели европейской / В. А. Ярмолевич [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 183–197. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-183-197>

**Vasili A. Yarmalovich¹, Stanislav V. Panteleev², Irina A. Kharkhasova², Karalina V. Zeniuk¹,
Liubou A. Ivashchanka¹, Andrey V. Konstantinov², Oleg Yu. Baranov³**

¹Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

²Forest Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

³Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

SPECIES STRUCTURE OF NATURAL REGENERATION AND SEEDLING ROOT MYCOBIOMES OF SCOTS PINE AND NORWAY SPRUCE

Abstract. Mycobiomes of roots of 1–2-year-old *Pinus sylvestris* L. and *Picea abies* (L.) Karst. plants in forest nurseries and natural woods were studied using molecular genetic methods. Biodiversity indicators were established (species abundance, dominance index, Shannon diversity index) and comparative characteristics of the studied mycobiomes were provided.

It was revealed that the main species complexes of mycorrhizae of juvenile pine and spruce plants were formed by a similar list of fungal species from the genera *Wilcoxina*, *Phialocephala*, *Helotiaceae*, etc. At the same time, natural regeneration was also characterized by monospecies mycorrhiza represented by basidiomycetes from the genera *Russula*, *Rhizopogon*, *Laccaria*. In fungal communities the highest level of species diversity indicators values was observed for Norway spruce ($H_{\max} = 2.6$) and Scots pine ($H_{\max} = 2.5$) seedlings from forest stands. The leading factor determining the species structure of mycobiomes, both in natural conditions and in nurseries, was local soil-biotic conditions.

Keywords: mycobiome, natural regeneration, seedlings, Scots pine, Norway spruce, mycorrhiza, pathogens

For citation: Yarmalovich V. A., Panteleev S. V., Kharkhasova I. A., Zeniuk K. V., Ivashchanka L. A., Konstantinov A. V., Baranov O. Yu. Species structure of natural regeneration and seedling root mycobiomes of Scots pine and Norway spruce. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 183–197 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-183-197>

Введение. Изучение особенностей формирования микобиомов корневых систем растений представляет собой важную, но достаточно сложную научную задачу, успешное выполнение которой позволяет раскрывать основные механизмы и закономерности функционирования почвенных биоценозов. Сложность анализа в значительной степени обусловлена трудоемкостью точной

идентификации ассоциированных с корнями грибов при использовании доступных для исследователей микробиологических и микроскопических методов. Практическая значимость изучения видового состава микобиомов корней растений заключается в разработке агротехнологических методов его регулирования и направленного формирования, что позволяет сократить удельный вес патогенной микрофлоры и увеличить содержание целевых симбиотических микроорганизмов.

Научные исследования фитопатогенной микобиоты, в том числе возбудителей болезней корневых систем, широко представлены в литературе, и их количество постоянно увеличивается. Особую актуальность в последнее время приобрели направления мониторинга появления агрессивных рас космополитных и инвазивных видов, а также ранее не описанных видов микромицетов [1, 2].

Явление микоризы впервые было описано в 1879 г. биологом Ф. М. Каменским [3], а сам термин был введен ботаником А. Б. Франком в 1885 г. [4]. В то же время, несмотря на практическую значимость данного типа симбиоза, механизмы формирования микоризных ассоциаций, в том числе на древесных видах, описаны недостаточно полно [5].

Одним из факторов, ограничивающих изучение микоризной микрофлоры, является отсутствие эффективных способов культивирования микобионтов, в частности трудоемкость получения и депонирования культур *in vitro* для последующего описания. В связи с интенсивным развитием молекулярно-генетических технологий анализа микроорганизмов видовой перечень идентифицированных микоризообразователей начал существенно расширяться [6, 7], что позволило перейти от изучения функциональной роли отдельных таксонов симбиотических грибов к определению свойств и характеристик их ассоциаций. Так, например, изучение эктомикоризы (ЭКМ) как одного из наиболее распространенных типов грибного симбиоза позволило разработать препараты и технологии микоризации, что имеет особое значение в программах по лесовосстановлению с использованием методов инокуляции посадочного материала в лесных питомниках и культурах. Искусственная микоризация показала свою актуальность при разработке стратегии защиты лесов от последствий изменения климата [8].

Видовое богатство и таксономическое разнообразие микоризных симбионтов существенно: около 7–10 тыс. видов грибов образуют ЭКМ примерно с 8 тыс. видов растений, произрастающих на большей части земного шара и представляющих преимущественно лесные экосистемы [9]. В качестве примера можно привести сосну обыкновенную – основную лесообразующую породу Беларуси, которая способна вступать в микоризный симбиоз почти с 300 видами ЭКМ-грибов [10–13]. Необходимость микоризного взаимодействия обусловлена участием ЭКМ-грибов в круговороте биогенных элементов, а также их способностью оптимизировать метаболизм растений, усиливать у последних минеральное питание и устойчивость к ряду неблагоприятных факторов среды: засухе, засолению, воздействию тяжелых металлов и патогенов [14, 15]. Грибной мицелий в составе микоризы позволяет увеличить всасывающую поверхность корней растений, мобилизовать в почве труднорастворимые соединения фосфора, калия и других минеральных элементов, синтезировать ряд биологически активных веществ. В свою очередь, грибы, будучи гетеротрофными организмами, получают от растений органический углерод [14, 16, 17]. Особая роль в интеграции сообществ растений и грибов в многоуровневую коммуникационную сеть [18], а также в повышении плодородия почвы отводится грибам-микоризообразователям [19–21].

Микоризные микобиомы, как правило, характеризуются большим видовым разнообразием (от 20 до 35 таксонов) даже в случае монокультур лесных древесных растений. Большинство исследователей объясняют данную особенность микрофлоры высокой конкуренцией за ресурсы и активным межвидовым взаимодействием [22]. Аналогичная ситуация и в лесных питомниках, где отмечается постоянное антропогенное воздействие на среду обитания. Анализ микобиомов корней лесного посадочного материала, проведенный в 23 питомниках Польши, показал, что сеянцы даже однолетних растений практически полностью колонизированы. В целом в обследованных питомниках выявлено 29 таксонов грибов. При этом в пределах корневой системы одного растения видовое разнообразие варьировалось от 3–10 таксонов для однолетних сеянцев до 6–13 таксонов для двухлетних сеянцев. Выявлено, что в грибных сообществах микоризных грибов однолетних сеянцев преобладали представители Ascomycota, в частности *Wilcoxina mikolae*.

В то же время у двулетних растений происходила трансформация структуры видовых сообществ корней с заменой представителей Ascomycota на Basidiomycota (*Suillus luteus*, *Rhizopogon roseolus*, *Thelephora terrestris*, *Hebeloma crustuliniforme* и др.) [23].

Дальнейшее развитие молекулярно-генетических методов анализа грибных организмов дало возможность выполнять идентификацию микобиомов на новом качественном уровне: проводить диагностику на уровне штаммов или отдельных генотипов, оценивать количественное содержание генетического материала грибов, типировать моно- и полиинфекции, анализировать биологические образцы, представленные в следовых количествах, и др.

Применение технологий высокопроизводительного секвенирования и интенсивное накопление в базах данных генетической информации определили высокую популярность метагенетического подхода к анализу сообществ микроорганизмов, в том числе грибов. В отличие от метагеномного скрининга, в ходе метагенетических исследований данные, полученные в результате диагностирования участков ортологичных (баркодинговых) генов микроорганизмов, анализируются непосредственно в изучаемом материале. Одними из преимуществ генетических подходов идентификации (перед микробиологическими) являются учет и количественная оценка некультивируемых (как правило, биотрофных) патогенов наряду с культивируемыми микроорганизмами. Кроме того, молекулярно-генетический анализ микобиомов позволяет идентифицировать все находящиеся в биологическом образце виды грибов независимо от их таксономической принадлежности и долевого участия [24].

Цель исследований – проведение метагенетического анализа микобиомов корней молодых растений сосны обыкновенной и ели европейской и последующий сравнительный анализ видовой структуры изученных ассоциаций.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись 1–2-летние растения сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. и ели европейской *Picea abies* (L.) Karst., произрастающие на территории Беларуси в 10 лесных питомниках и 10 естественных насаждениях. Растения, собранные в лесных питомниках, были обозначены нами как «сеянцы», в естественных насаждениях – как «самосев». Перечень мест коллектирования экспериментального материала представлен в табл. 1.

Образцы из питомников были представлены посадочным материалом с открытой корневой системой, выращиваемым в условиях открытого (посевное отделение) и защищенного (теплицы, короба) грунта. Отбор самосева под пологом леса осуществляли на территориях лесничеств, где располагались питомники, т. е. в пределах аналогичного географического расположения. Растения на участках выращивания отбирали равномерно, максимально сохраняя корневые системы. Коллектирование производили с июля по октябрь 2022 г.

Пробоподготовка. В полевых условиях производили поверхностную очистку корневых систем от частиц почвы и внешних примесей стороннего биологического материала в проточной воде, а затем в 70%-ном этаноле. Образцы упаковывали в одноразовые полиэтиленовые пакеты и в течение 3–12 ч помещали на первичное хранение (до 1 сут) в морозильную камеру ($T = -18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Долгосрочное хранение (до 6 мес.) осуществлялось при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Для последующего анализа в лабораторных условиях было отобрано 258 фрагментов корневых систем размером 1–5 мм от визуально здоровых, хорошо развитых растений. Препарированный материал промывали дистиллированной водой и помещали в центрифужные пробирки типа Eppendorf (1,5 мл).

ДНК-анализ. Препараты ДНК получали с помощью СТАВ-метода [25] с измененным режимом этапа экстракции ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

В качестве маркерного локуса для метагенетического анализа микобиомов использовали внутренний транскрибируемый спейсер ITS1 рДНК [24, 26].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли с помощью набора ArtMix Форез (2X) (АртБиоТех, Беларусь) согласно инструкции фирмы-производителя, ПЦР-амплификацию маркерного локуса – с применением праймеров ITS1F/ITS2FAM [26].

На первом этапе исследований с использованием генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) проводили электрофоретический

Т а б л и ц а 1. Места коллектирования биологических образцов

T a b l e 1. Field material collection sites

Геоботаническая подзона	Лесхоз (учреждение) / лесничество (питомник)	Местоположение (квартал/выдел), тип леса, возраст, отделение питомника	Древесный вид	Возраст, растений, лет
Самосев (под пологом леса)				
I (широколиственно-еловые леса)	Полоцкий учебно-опытный / –	177/2, С. мш., 104 года	С. об.	2
			Е. евр.	2
	Двинская ЭЛБ / Подевильское	32/20, С. ор., 65 лет 1/60, С. ор., 120 лет	С. об.	2
			Е. евр.	2
II (елово-грабовые дубравы)	Негорельский учебно-опытный / Центральное	77/24, С. ор., 75 лет 33/1, С. ор., 130 лет	С. об.	2
			Е. евр.	2
	Жорновская ЭЛБ / Жорновское	156/25, С. ор., 75 лет		2
III (грабовые дубравы)	Речицкий опытный / Речицкое	24/25, С. кис., 140 лет		2
	Корневская ЭЛБ / Корневское	163/8, С. ор., 83 года 173/20, С. мш., 68 лет 402/7, С. ор., 78 лет	С. об.	1–2
				1
				1–2
Сеянцы (в лесных питомниках)				
I (широколиственно-еловые леса)	Двинская ЭЛБ / врем. питомник	Посевное и закрытого грунта	С. об.	1
			Е. евр.	2
	Островецкий опытный / пост. питомник	Посевное	Е. евр.	1
II (елово-грабовые дубравы)	Воложинский / пост. питомник	Посевное	С. об.	2
	Любанский / пост. питомник	Посевное	Е. евр.	1
	Любанский / кулисный питомник	Посевное	С. об.	2
	Любанский / тепличное хозяйство	Короб	Е. евр.	1
	Негорельский УОЛ	Посевное	С. об.	2
	Осиповичский опытный / пост. питомник	Посевное и закрытого грунта	С. об.	1
			Е. евр.	1
	Узденский / пост. питомник	Посевное	С. об.	2
III (грабовые дубравы)	Корневская ЭЛБ	Посевное	С. об.	1
Всего	10 питомников	10 насаждений		–

анализ всего спектра получаемых ПЦР-продуктов образцов. Интерпретацию полученных данных выполняли с помощью программного пакета GeneMapper v. 4.1 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для установления видовой принадлежности ампликонов все их размерные варианты (по 3 шт. от разных образцов) отсекали по отдельности с применением праймера ITS1F на базе генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколам фирмы-производителя. Видовую идентификацию секвенированных нуклеотидных последовательностей образцов грибов осуществляли в базе данных NCBI GenBank (США), используя онлайн-сервис BLAST [27].

Полученные данные идентификации грибов (на основе результатов секвенирования и размера маркерного региона ITS1) заносили в таблицу для составления молекулярно-генетического атласа-определителя. Последующий анализ атласа-определителя показал, что все выявленные в микобиомах виды грибов характеризовались уникальным (видоспецифичным) размером маркерного региона ITS1, что обуславливало информативность данного молекулярного признака.

В случае отсутствия в базе данных NCBI GenBank для депозитов ITS1-маркера соответствующих им видовых названий грибов или непосредственно самих искомым последовательностей обозначение данных таксонов микромицетов при проведении сравнительной оценки микобиомов производили по значению молекулярного размера маркерного региона ITS1 (например, *Uncultured fungus 230* или *Uncultured fungus 288*).

Для оценки видовой структуры и видового разнообразия микобиомов использовали следующие показатели: обилие видов (частоты встречаемости), индекс доминирования, индекс разнообразия Шеннона [28]. Математико-статистическую обработку и кластерный анализ сходства структуры микобиомов выполняли с помощью пакета Statistica 6.0 (StatSoft Inc., США).

Результаты и их обсуждение. В результате молекулярно-генетических исследований корневых окончаний сеянцев сосны обыкновенной и ели европейской было идентифицировано 163 варианта ITS-маркера, для 120 из которых была установлена видовая принадлежность. При последующем анализе нуклеотидные последовательности с уровнем сходства $\geq 97\%$ были объединены в 102 операционные таксономические единицы (ОТЕ). Большинство (70,5 %) выявленных ОТЕ относилось к отделу Ascomycota, остальные – к представителям отделов Basidiomycota (26,5 %) и Zygomycota (3 %). Наибольшее количество (85,3 % от всего числа) ОТЕ было обнаружено в образцах корней сосны, для ели их состав был менее разнообразным – 64,7 %. При этом 51 (50,0 %) ОТЕ была обнаружена как у ели, так и у сосны, а другая половина – в корнях сеянцев только одной из пород (15 (14,7 %) и 36 (35,3 %) шт. соответственно).

Количество нередких (усредненная частота встречаемости $>1\%$) ОТЕ для сосны обыкновенной составило 31 шт., или 35,6 % от ее общего разнообразия. При этом доминирующая группа (усредненная частота встречаемости $>10\%$) была представлена двумя ОТЕ: *Wilcoxina mikolae* (референсный депозит в NCBI GenBank OM238173.1) и *Helotiaceae* sp. (референсный депозит в NCBI GenBank MF789678). Аналогичные показатели для ели европейской составили: нередкие ОТЕ – 24 (36,4 %) шт., доминирующие – 2 (3 %) шт. Как и у сосны обыкновенной, у ели европейской группа доминантов также была представлена указанными выше космополитными микоризными видами грибов – *Wilcoxina mikolae* и *Helotiaceae* sp. Усредненная частота их встречаемости для изученных хвойных пород была сходной и составила 21 и 11,7 % у сосны обыкновенной, 27,3 и 14,5 % – у ели европейской соответственно. Сравнительный анализ перечней нередких ОТЕ грибов у сосны обыкновенной и ели европейской показал, что 16 из них были нередкими у обеих пород, 18 являлись нередкими для одной породы и редкими для другой. Пять ОТЕ были идентифицированы только у одной из пород: три (*Laccaria* sp., *Rhizopogon roseolus*, *Exophiala* sp.) у сосны обыкновенной, две (*Leotiomyces* sp., *Mrakia* sp.) у ели европейской. Согласно литературным данным, перечисленные таксоны грибов не являются узкоспециализированными и их отсутствие у сеянцев одной из древесных пород, по всей видимости, связано с локальными особенностями выборок [29, 30].

Все идентифицированные таксоны грибов были разделены на две функциональные группы: микоризные и условно-патогенные (факультативные паразиты). Отнесение грибных организмов к той или иной группе было опосредованным – осуществлялось исходя из их таксономического названия и базировалось на результатах исследований разных авторов [31, 32]. Согласно проведенной систематизации микобиоты, порядка 60 % были отнесены к симбиотическим видам, образующим устойчивые ассоциации с корневыми окончаниями хвойных пород, остальные – к естественным компонентом микобиома растений, оказывающим негативное влияние в случае ослабления организма хозяина стрессовыми факторами [33, 34].

Проведенный анализ попарных сочетаний грибных таксонов не позволил установить влияние отдельных элементов микобиома друг на друга, что выражалось в отсутствии прямой или обратной корреляции значений показателей долевого участия (представленности) ОТЕ в образцах корневых окончаний. Также не установлено достоверной взаимосвязи наличия или отсутствия тех или иных микромицетов в образцах. Так, в табл. 2 представлен фрагмент базы данных структуры микобиомов образцов корней, полученной на основании метагенетического анализа грибных сообществ.

Несмотря на наличие в табл. 2 отдельных образцов, представленных сверх- и монодоминантными сообществами [35], входящие в их состав ОТЕ могли участвовать в формировании и других вариантов ассоциаций, существенно отличающихся как по таксономическому составу, так и по представленности тех или иных грибных организмов.

Отсутствие, по результатам анализа, статистически достоверных закономерностей формирования видового состава микобиомов, на наш взгляд, не может указывать на нейтральный характер взаимоотношений между разными грибными организмами, а, по всей видимости, объясняется целым рядом стохастических факторов – локальными особенностями структуры микобиоты почв (в том числе «эффектом основателя»), викаризмом, штаммовым разнообразием (включая их свойства) одних и тех же видов грибов, заселением разных участков корней в пределах сеянца

Т а б л и ц а 2. Видовая структура микобиомов корней сеянцев сосны обыкновенной по данным метагенетического анализа (фрагмент базы данных)

T a b l e 2. Species structure of mycobiomes of Scots pine seedling roots based on the metagenetic analysis data (database fragment)

Обозначение микромицета	Номер образца растения								
	1	2	3	71	75	126	128	149	150
<i>Akanthomyces muscarius</i>	0	0	1,92	0	0	0	0	0	0
<i>Archaeorhizomyces</i> sp.	7,76	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cadophora</i> sp.	0	0	0	0	0,81	0	0	0	0
<i>Clonostachys</i> sp.	0	5,15	11,21	0	0	0	0	0	0
<i>Dactylonectria</i> sp.	2,82	4,36	14,5	0,29	0,91	0	0	0,33	0,5
<i>Fusarium</i> sp.	6,83	0	6,47	0	14,91	0	0	0	11,3
<i>Hebeloma naviculosporum</i>	0	0	1,54	0	0	0	0	0	0
<i>Helotiaceae</i> sp.	0	8,3	1,02	5,49	3,91	0	100	24,9	41,33
<i>Hyaloscypha hepaticicola</i>	0	0	2,31	28,34	4,62	0	0	0	0
<i>Lactarius</i> sp.	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0
<i>Meliniomyces variabilis</i>	0	0	0	0	2,01	0	0	0	0
<i>Mollisia</i> sp.	0	0	0	0	8,26	0	0	0	0
<i>Mortierella humilis</i>	0	0	0	4,03	0	0	0	0	0
<i>Nemania serpens</i>	0	0	4,61	0	0	0	0	0	0
<i>Oidiodendron</i> sp.	0	0	0	4,8	5,57	0	0	0	4,27
<i>Peniophora cinerea</i>	0	0	0	7,47	16,51	0	0	0	0
<i>Peziza</i> sp.	62,67	0	0	0	0	0	0	38,06	0
<i>Phialocephala fortinii</i>	14,73	7,34	0	7,71	13,08	0	0	0	0
<i>Phoma</i> sp.	0	0	0	1,93	0	0	0	0	0
<i>Pustularia</i> sp.	0	0	0	3,35	8,16	0	0	0	0
<i>Russula</i> sp.	0	0	0	0,57	0	100	0	0	0
<i>Suillus luteus</i>	3,76	0	0	1,83	5,13	0	0	0	0
<i>Talaromyces ruber</i>	0	1,83	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tetracladium furcatum</i>	0	0	1,11	0	0	0	0	0	0
<i>Tomentella</i> sp.	0	0	0	1,27	0	0	0	0	0
<i>Trechisporales</i> sp.	0	2,12	0	0	0	0	0	0	0
<i>Tricholoma</i> sp.	0	0	0	2,45	0	0	0	0	0
<i>Tuber</i> sp.	0	0	1,58	0	0	0	0	0	0
<i>Tylospora asterophora</i>	0	29,44	20,87	0	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 18p</i>	0	18,72	0	0	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 18n</i>	0	0	0	5,5	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus MW215033.1</i>	0	1,98	0	0	6,81	0	0	0	0
<i>Wilcoxina mikolae</i>	0	13,79	21,71	0	0	0	0	36,71	41,33
<i>Uncultured fungus 225</i>	0	0	0	4,84	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 230</i>	0	4,82	0	0	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 231</i>	0	0	7,37	0	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 232</i>	0	0	0	0	6,71	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 238</i>	0	0	0	1,81	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 242</i>	0	0	0	3,09	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 260</i>	0	2,16	0	0	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 285</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1,27
<i>Uncultured fungus 294</i>	0	0	0	0,72	0,53	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 316</i>	0	0	3,78	0	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 335</i>	0	0	0	14	0	0	0	0	0
<i>Uncultured fungus 358</i>	0	0	0	0	2,09	0	0	0	0

П р и м е ч а н и е. Жирным шрифтом выделены ОТЕ с долевым участием в образце $\geq 10\%$.

разными видами грибных организмов, трансформацией микобиомов во времени и на разных стадиях онтогенеза растений.

Изучение сеянцев из различных регионов Беларуси также не выявило значимых различий в структурах анализируемых групп, что, вероятно, указывает на более значительный вклад локальных особенностей мест сбора образцов в формирование микобиомов корневых систем растений.

В то же время проведенный анализ микобиомов в разрезе особенностей произрастания (естественных или при выращивании в питомниках) позволил выявить ряд отличий как в видовой структуре, так и применительно к параметрам, описывающим биоразнообразие.

Анализ уровня дифференциации структур микобиомов (на основе усредненных частот встречаемости грибных видов) показал, что наибольшим сходством обладали группы с одинаковыми условиями произрастания (рис. 1).

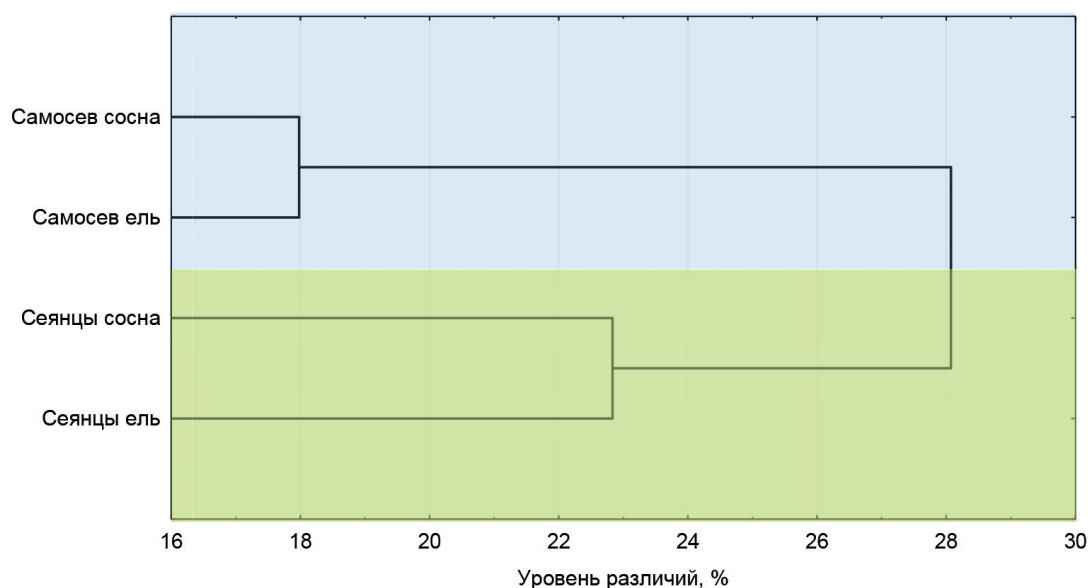


Рис. 1. Дендрограмма степени дифференциации видовых структур микобиомов корней самосева и сеянцев

Fig. 1. Dendrogram of species differentiation of natural regeneration and seedling root mycobiomes structures

У отмеченных на дендрограмме двух отдельных кластеров (естественные насаждения (самосев) и лесные питомники (сеянцы)) наименьший уровень различий выявлен среди объектов естественного происхождения, что, вероятно, обусловлено более низкими значениями усредненных частот встречаемости, доминирующих в микобиомах ОТЕ. Так, медиана значений индекса доминирования для сеянцев сосны из естественных насаждений и лесных питомников составила 0,25 и 0,34 соответственно, для ели – 0,39 и 0,44 (рис. 2).

Особенностью самосева сосны являлось значительное число (22,7 %) выявленных образцов с моновидовыми микоризами (индекс доминирования – 1). При этом в качестве монодоминантных микоризообразователей у разных образцов могли выступать альтернативные виды-симбионты: характерные для взрослых растений базидиомицеты родов *Russula*, *Rhizopogon*, *Laccaria* и ассоциированные, как правило, с молодыми растениями аскомицетные грибы *Wilcoxina mikolae*, *Helotiaceae* sp. В корневых системах всех изученных сеянцев были идентифицированы в основном комплексные по составу микобиомы, содержащие два и более вида грибов одновременно.

Распределение значений индекса доминирования среди микобиомов сеянцев сосны характеризовалось определенной асимметричностью (рис. 3). В то же время для грибных ассоциаций самосева никаких закономерностей в распределении данного показателя не выявлено.

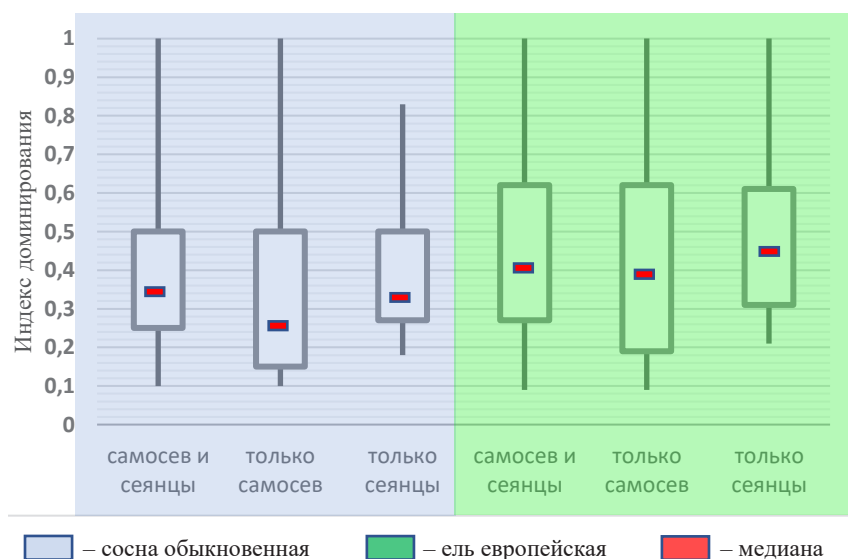


Рис. 2. Распределение значений индекса доминирования среди проанализированных групп образцов
 Fig. 2. Distribution of dominance index values among the analyzed groups of samples

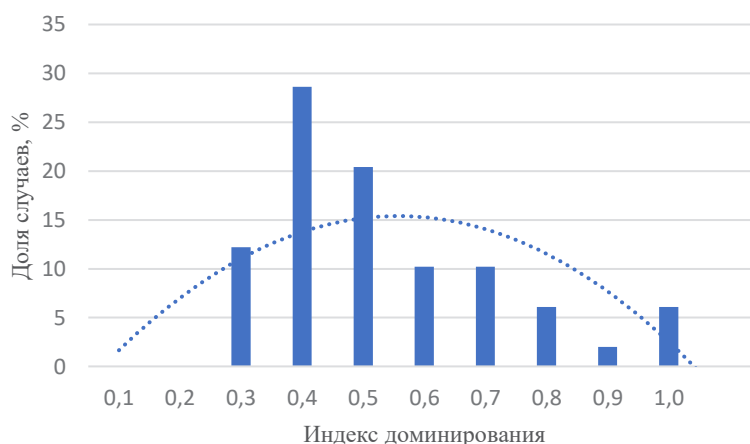


Рис. 3. Распределение значений индекса доминирования среди микобиомов сеянцев сосны
 Fig. 3. Distribution of dominance index values among the mycobiomes of pine seedlings

Для ели европейской как в группе самосева, так и у сеянцев выраженные закономерности распределения значений индекса доминирования отсутствовали. На наш взгляд, полученные результаты для ели европейской в целом, а также для группы самосева сосны обыкновенной указывают на гетерогенность обобщенных выборок, связанную с локальными особенностями мест сбора экспериментального материала.

Изучение параметров, описывающих уровень биологического разнообразия микобиомов, показало, что в целом микоризы самосева сосны и ели являются более разнородной группой (в пределах как индивидуальных образцов растений, так и их совокупности) по сравнению с грибными ассоциациями, идентифицированными в условиях лесных питомников. Так, медиана значения индекса разнообразия Шеннона для самосева сосны обыкновенной составила 1,65, а для условий питомника не превысила 1,35. Для ели европейской значения данного параметра составили 1,35 и 1,05 соответственно. Диапазон значений индекса разнообразия Шеннона для самосева сосны и ели также был более широкий по сравнению с таковым у сеянцев из лесных питомников (рис. 4).

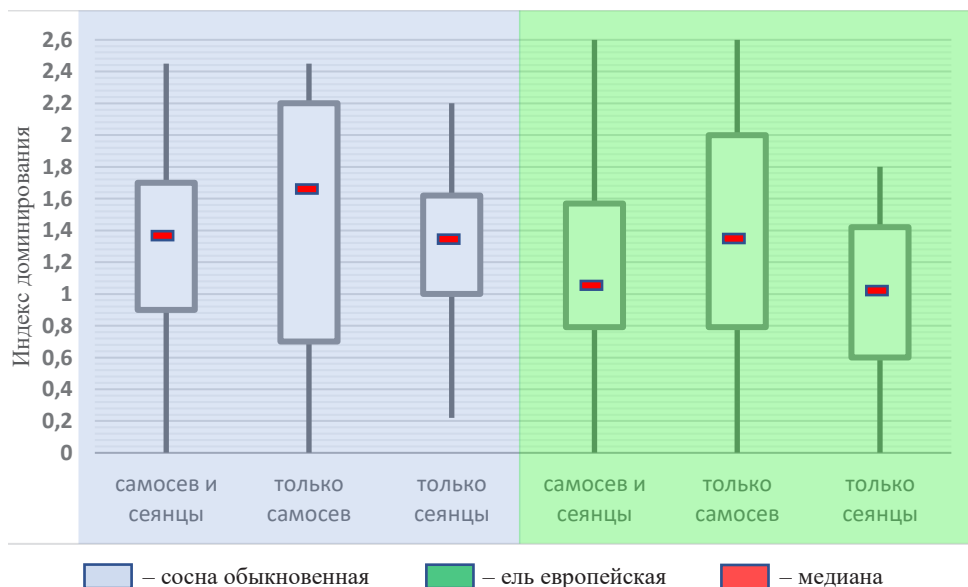


Рис. 4. Распределение значений индекса Шеннона среди проанализированных групп образцов

Fig. 4. Distribution of Shannon Diversity Index among the analyzed groups of samples

Кроме того, проведенный анализ индивидуальных значений индекса Шеннона в каждой из групп растений показал, что для самосева и сеянцев ели европейской, а также для самосева сосны выраженные закономерности в распределении значений показателей отсутствовали, а их распределение среди микобиомов, относящихся к питомникам, в целом отличалось определенной асимметричностью (рис. 5).

Как и в случае с индексом доминирования, выявляемая гетерогенность структур обобщенных выборок, по всей видимости, подтверждает наше предположение о значимой роли локальных особенностей произрастания растительного материала в формировании структуры микоризных комплексов. Данный факт подтверждается и результатами сравнительного анализа степени дифференциации структур выявляемых микобиомов. Так, на рис. 6, где представлена дендрограмма, иллюстрирующая уровень различий видовых структур образцов микориз сеянцев ели европейской из различных лесных питомников, видно, что кластеризация образцов в основном соответствует местам расположения питомников, но не дифференцирует их отдель-

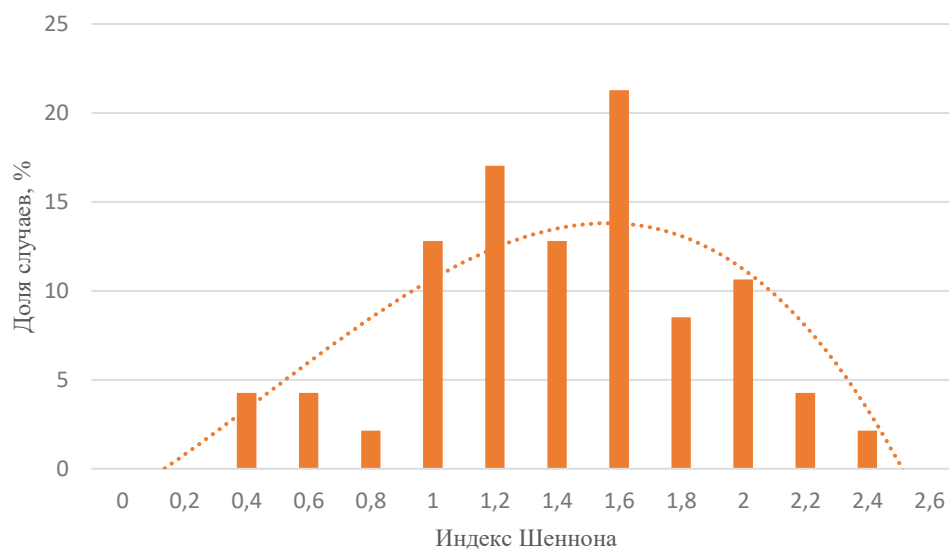


Рис. 5. Распределение значений индекса Шеннона в выборке микобиомов корней сеянцев

Fig. 5. Distribution of Shannon Diversity Index among the samples of seedling root mycobiomes

ные участки (теплица, открытый грунт, коробка). Следует также отметить, что даже в случае вхождения отдельных образцов в структуру кластеров других питомников их расположение на дендрограмме являлось пограничным с соответствующей им по происхождению группой. Так, например, образец 18 семени ели (Двинская экспериментальная лесная база) на дендрограмме оказался в общем кластере с образцами, относящимися к Осиповичскому опытному лесхозу. В то же время образец 18 на дендрограмме граничит с образцом 19 кластера Двинской экспериментальной базы.

Детальный анализ полученных результатов показал, что сходство видовых структур обеспечивается в основном за счет «маркерных» таксонов – общих для почвенных условий каждого питомника.

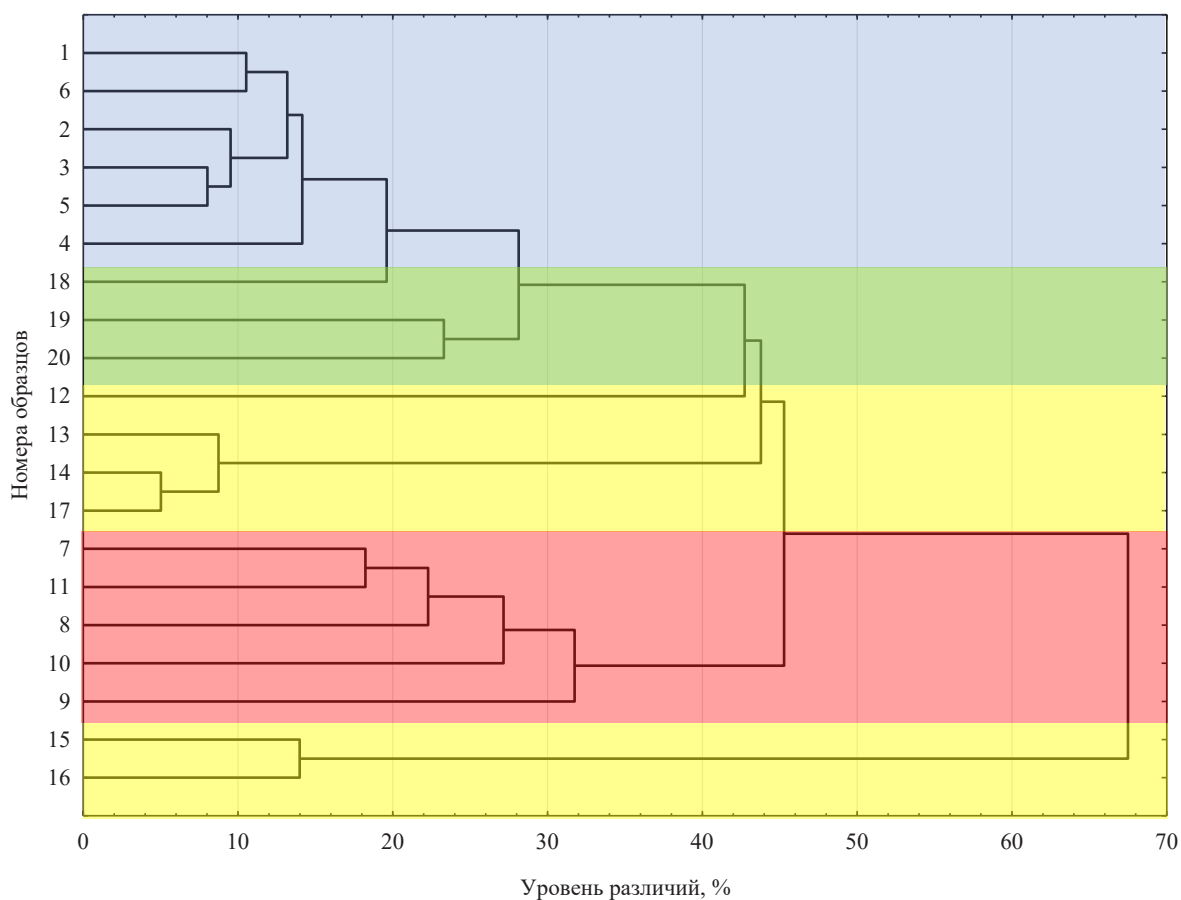


Рис. 6. Дендрограмма степени дифференциации видовых структур микобиомов корней сеянцев ели европейской из различных питомников. Места взятия образцов: 1–3 – Осиповичский опытный лесхоз (закрытый грунт), 4–6 – Осиповичский опытный лесхоз (открытый грунт); 7–11 – Островецкий лесхоз (открытый грунт); 12–14 – Любанский лесхоз (открытый грунт, коробка); 15–17 – Любанский лесхоз (открытый грунт); 18–20 – Двинская экспериментальная лесная база Института леса НАН Беларуси (временный питомник, открытый грунт)

Fig. 6. Dendrogram of differentiation of species mycobiome structures among the roots of Norway spruce seedlings from various nurseries. Sampling locations: 1–3 – Osipovichi experimental forestry enterprise (closed ground), 4–6 – Osipovichi experimental forestry enterprise (open ground); 7–11 – Ostrovets forestry (open ground); 12–14 – Lyuban forestry (open ground, box); 15–17 – Lyubansky forestry enterprise (open ground); 18–20 – Dvinsk experimental forest base of the Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (temporary nursery, open ground)

Так, общим таксоном микобиомов сеянцев ели европейской являлся микромицет *Wilcoxina mikolae*, частота встречаемости которого для большинства образцов варьировалась от 13,1 до 100 % (в среднем – 39,4 %, медиана – 36,7 %). В качестве «маркерной» ОТЕ микориз питомников Осиповичского опытного лесхоза и Двинской экспериментальной базы можно выделить *Helotiaceae* sp. (30,1–63,4 %). В питомниках других лесхозов данная ОТЕ не выявлена. В качестве

«маркерного» таксона питомника Островецкого лесхоза выступал микромицет *Phialocephala fortinii* (26,8–54,4 %). Его встречаемость в других питомниках была единичной, а долевое участие в микоризах сеянцев не превысило 1,6 %. Еще одной ОТЕ, характеризующей питомник Островецкого лесхоза, является *Tylospora asterophora*, которая зачастую хоть и не имела доминирующего положения в микоризах (1,42–27,6 %), но не была нами идентифицирована в других локациях. *Hyaloscypha hepaticicola* в данном питомнике также выявлена в умеренном количестве (4,2–6,9 %) и обнаружена только в единичном случае за пределами Любанского лесхоза.

Сходные результаты получены и для сеянцев сосны обыкновенной. Так, на рис. 7 представлена дендрограмма, иллюстрирующая уровень сходства видовых структур микориз сеянцев из открытого грунта питомников трех лесхозов. Несмотря на то что уровень различий между образцами во многих случаях превышал 50 %, в целом характер кластеризации на дендрограмме соответствовал местам произрастания растений, что также подтверждает наличие особенностей у видовых структур данных выборок. При этом следует отметить, что определенный вклад в структуру дендрограмм (см. рис. 6, 7) помимо «маркерных» (общих для локации) видов вносили и особенности всей совокупности распределения таксонов в образцах (включая частоты представленности и сочетание отдельных элементов микросообществ).

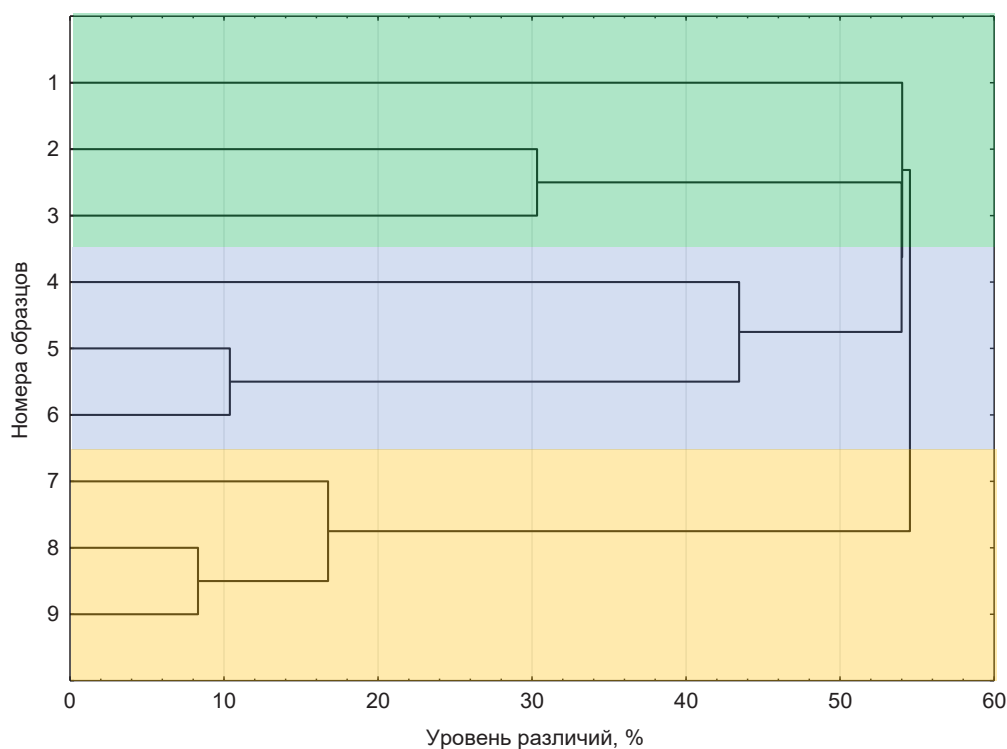


Рис. 7. Фрагмент дендрограммы, показывающей степень дифференциации видовых структур микобиомов корней сеянцев сосны обыкновенной из различных питомников (открытый грунт). Места взятия образцов: 1–3 – Узденский лесхоз, 4–6 – Осиповичский опытный лесхоз, 7–9 – Воложинский лесхоз

Fig. 7. Dendrogram (fragment) of differentiation among mycobiome structures of Scots pine seedling roots collected in open ground of various nurseries. Sampling locations: 1–3 – Uzda forestry enterprise, 4–6 – Osipovichi experimental forestry, 7–9 – Volozhinsky forestry enterprise

Совокупный анализ структуры микобиомов образцов корней сеянцев обеих пород (сосны обыкновенной и ели европейской) также подтвердил преобладающую роль локальных почвенно-биотических особенностей в формировании структуры грибных ассоциаций (рис. 8). Как видно из дендрограммы, представленной на рис. 8, основной характер кластеризации в первую очередь связан с местом произрастания. Так, наибольшее сходство структуры микобиомов корней, как правило, имели сеянцы, произрастающие на территории одного и того же питомника (6–11, 5-10-12 – Осиповичский опытный лесхоз, 2-7, 3-9-8 – Двинская экспериментальная база).

Отсутствие значимых различий между образцами сосны и ели обусловлено главным образом доминирующей составляющей микоризы семянцев – грибными видами, имеющими широкую специализацию – *Helotiaceae* sp. и *Wilcoxina mikolae*, а также наличием в корнях сходной условно-патогенной микрофлоры – *Dactylonectria* sp. (доля инфицированных растений: сосна – 86,2 %, усредненное содержание в микобиоте – 10,55 %, ель – 76,4 и 6,74 % соответственно).

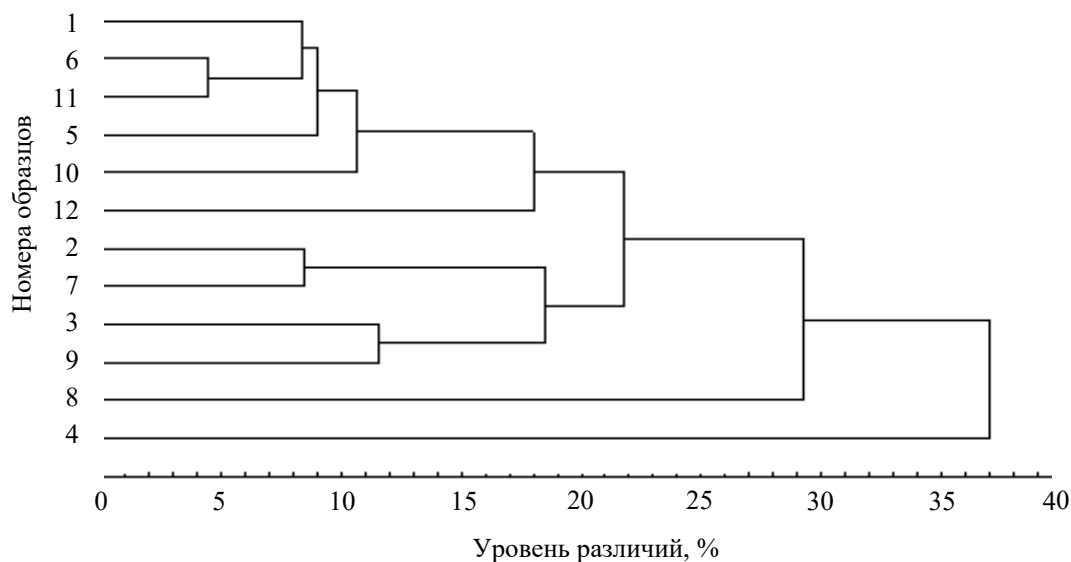


Рис. 8. Фрагмент дендрограммы, показывающей степень дифференциации видовых структур микобиомов корней семянцев сосны обыкновенной и ели европейской из различных питомников. Места взятия образцов: 1–3 – Двинская экспериментальная база (сосна), 4–6 – Осиповичский опытный лесхоз (сосна), 7–9 – Двинская экспериментальная база (ель), 10–12 – Осиповичский опытный лесхоз (ель)

Fig. 8. Dendrogram (fragment) of differentiation among mycobionte structures of Scots pine and Norway spruce seedling roots collected in various nurseries. Sampling locations: 1–3 – Dvina experimental base (pine), 4–6 – Osipovichi experimental forestry enterprise (pine), 7–9 – Dvina experimental base (spruce), 10–12 – Osipovichi experimental forestry enterprise (spruce)

Учитывая фитопатологический аспект, отметим, что кроме *Dactylonectria* в корневых системах самосева и семянцев сосны и ели идентифицирован широкий круг облигатных и факультативных паразитов, относящихся к родам *Apiospora*, *Coniochaeta*, *Eleutheromyces*, *Epicoccum*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Nemania*, *Peniophora*, *Phoma* и *Rhizoctonia*. При этом количество инфицированных растений среди самосева (сосна – 50,3 %, ель – 64,2 %) было ниже, чем у семянцев, выращиваемых в условиях питомника (сосна – 100 %, ель – 81,2 %). Долевое участие патогенной микрофлоры в микобиоме для самосева и семянцев сосны было примерно одинаковым – 14,4 и 15,1 % соответственно. Для ели данный показатель был выше для самосева (20,6 %), чем для семянцев (4,7 %).

Заключение. Изучение видовой структуры микобиомов корней самосева и семянцев сосны и ели показало следующее: основные видовые комплексы микориз ювенильных растений сосны и ели образованы сходными грибными видами, а наибольшие значения показателей разнообразия грибных сообществ отмечаются у растений, произрастающих в естественных насаждениях. При этом для самосева, собранного под пологом леса, могут формироваться моновидовые микоризы, представленные базидиомицетными грибами – симбионтами взрослых растений; ведущим фактором, определяющим видовую структуру микобиомов как в естественных условиях, так и в питомниках, являются локальные почвенно-биотические условия. Исходя из этого, контролируемое формирование почвенной микобиоты является обоснованным направлением в совершенствовании агротехники выращивания лесного посадочного материала и позволяет создать устойчивые почвенные ассоциации грибов-микоризобразователей для последующей биотизации растений.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант № B22-002.

Acknowledgements. The work was supported by the BRFFR, grant No. B22-002.

Список использованных источников

1. The emergence of new aggressive leaf rust races with the potential to supplant the resistance of wheat cultivars / R. I. Omara [et al.] // *Biology (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, N 9. – Art. 925. <https://doi.org/10.3390/biology10090925>
2. Comparative analysis of secondary metabolites in *Diplodia corticola* strains with different virulence degrees associated with canker and dieback of *Quercus* spp. / M. M. Salvatore [et al.] // *Molecules*. – 2023. – Vol. 28, N 17. – Art. 6302. <https://doi.org/10.3390/molecules28176302>
3. Kamienski, F. Les organes végétatifs du *Monotropa hypopitys* L. / F. Kamienski // *Mémoires de la Société nationale des Sciences Naturelles et Mathématiques de Cherbourg*. – 1882. – Vol. 26. – P. 1–40.
4. Frank, A. B. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze / A. B. Frank // *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* – 1885. – Bd. 3. – S. 128–145.
5. Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*) and *Acaulospora gedanensis* revised / P. Niezgoda [et al.] // *Front. Microbiol. (Sec. Microbial Symbioses)*. – 2024. – Vol. 15. – Art. 1320014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1320014>
6. Henrion, B. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers / B. Henrion, G. Chevalier, F. Martin // *Mycol. Res.* – 1994. – Vol. 98. – P. 37–43. [https://doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80333-x](https://doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80333-x)
7. Молекулярно-генетическая диагностика микоризообразующей микрофлоры сосны и ели в лесных питомниках и культурах / С. В. Пантелеев [и др.] // *Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы: материалы V Междунар. науч. конф., посвящ. 135-летию со дня рождения Н. И. Вавилова, Минск, 21–25 нояб. 2022 г. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси*. – Минск, 2022. – С. 66.
8. Seb, J. Role of ectomycorrhiza in forest ecosystems: a review / J. Seb, T. Ajungla // *Int. J. Adv. Res.* – 2018. – Vol. 6, N 8. – P. 866–873. <https://doi.org/10.21474/ijar01/7588>
9. Taylor, A. F. S. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world / A. F. S. Taylor, I. J. Alexander // *Mycologist*. – 2005. – Vol. 19, N 3. – P. 102–112. <https://doi.org/10.1017/s0269915x05003034>
10. Hintikka, V. On the macromycete flora in oligotrophic pine forests of different ages in South Finland / V. Hintikka // *Acta Bot. Fenn.* – 1988. – Vol. 136. – P. 89–94.
11. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees / L. Jonsson [et al.] // *New Phytol.* – 1999. – Vol. 142, N 1. – P. 151–162. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00383.x>
12. Abundance, diversity, and vitality of mycorrhizae of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in lignite recultivation sites / B. Münzenberger [et al.] // *Mycorrhiza*. – 2004. – Vol. 14. – P. 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0257-2>
13. Shifts in taxonomical and functional structure of ectomycorrhizal fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) underpinned by partner tree ageing / M. Rudawska [et al.] // *Pedobiologia*. – 2018. – Vol. 71. – P. 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2018.08.003>
14. Smith, S. E. *Mycorrhizal symbiosis* / S. E. Smith, D. J. Read. – 3rd ed. – New York: Academic Press, 2008. – 787 p.
15. Read, D. J. The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots / D. J. Read // *The ecology and physiology of the fungal mycelium: Symposium of the British Mycological Society Held at Bath University, April 11–15, 1983* / ed.: D. H. Jennings, A. D. M. Rayner. – Cambridge, 1984. – P. 215–240.
16. Benito, B. Unravelling potassium nutrition in ectomycorrhizal associations / B. Benito, M. Gonzalez-Guerrero // *New Phytol.* – 2014. – Vol. 201, N 3. – P. 707–709. <https://doi.org/10.1111/nph.12659>
17. Siddiqui, Z. A. *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry* / Z. A. Siddiqui, M. S. Akhtar, K. Futai. – Dordrecht: Springer, 2008. – 359 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7>
18. Bruns, T. D. Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do exceptions tell us / T. D. Bruns, M. I. Biddartondo, D. L. Taylor // *Integ. Comp. Biol.* – 2002. – Vol. 42, N 2. – P. 352–359. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.352>
19. Landis, T. D. Inoculate with mycorrhizae, rebuild your soil, and help stop global warming / T. D. Landis, M. A. Amaranthus // *Forest Nursery Notes*. – 2009. – Vol. 29, N 1. – P. 13–16.
20. Application of network theory to potential mycorrhizal networks / D. Southworth [et al.] // *Mycorrhiza*. – 2005. – Vol. 15, N 8. – P. 589–595. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0368-z>
21. Mukerji, K. G. Mycorrhizae in the integrated pest and disease management / K. G. Mukerji, A. Ciancio // *General concepts in integrated pest and disease management* / ed.: A. Ciancio, K. G. Mukerji. – Dordrecht, 2007. – P. 245–266. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6061-8_10
22. Bruns, T. D. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi / T. D. Bruns // *The significance and regulation of soil biodiversity: Proceedings of the International Symposium on Soil Biodiversity, held at Michigan State University, East Lansing, May 3–6, 1993* / ed.: H. P. Collins, G. P. Robertson, M. J. Klug. – Dordrecht, 1995. – P. 63–73. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0479-1_5
23. Rudawska, M. Ectomycorrhizal fungal assemblages of nursery grown scots pine are influenced by age of the seedlings / M. Rudawska, T. Leski // *Forests*. – 2021. – Vol. 12, N 2. – Art. 134. <https://doi.org/10.3390/f12020134>
24. Падутов, В. Е. Метагеномный анализ грибных фитопатогенов посадочного материала берез / В. Е. Падутов // *Наука и инновации*. – 2022. – № 3. – С. 66–70. <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-3-66-70>
25. Падутов, В. Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Е. В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

26. Gardes, M. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application of the identification of mycorrhizae and rusts / M. Gardes, T. D. Bruns // *Mol. Ecol.* – 1993. – Vol. 2, N 2. – P. 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
27. BLAST [Electronic resource]. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Date of access: 04.12.2022.
28. Magurran, A. E. Ecological diversity and its measurement / A. E. Magurran. – New Jersey: Princeton University Press, 1988. – 179 p.
29. Mueller, G. M. Systematics of *Laccaria* (*Agaricales*) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types / G. M. Mueller // *Fieldiana Botany*. – 1992. – Vol. 30. – P. 1–158.
30. Zeller, S. M. Rhizopogon in North America / S. M. Zeller, C. W. Dodge // *Ann. Missouri Bot. Gard.* – 1918. – Vol. 5, N 1. – P. 1–30; 32–36. <https://doi.org/10.2307/2990021>
31. The fungal community. Its organization and role in the ecosystem / ed.: J. Dighton, J. F. White. – 4th ed. – Boca Raton: CRC Press, 2017. – 652 p.
32. Watkinson, S. C. The fungi / S. C. Watkinson, L. Boddy, N. Money. – UK: Academic Press, 2016. – 478 p.
33. Фундаментальная фитопатология / С. Ф. Багирова [и др.]; под ред. Ю. Т. Дьякова. – М.: КРАСАНД, 2023. – 512 с.
34. Федоров, Н. И. Лесная фитопатология / Н. И. Федоров. – Минск: БГТУ, 2004. – 462 с.
35. Работнов, Т. А. Фитоценология / Т. А. Работнов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 352 с.

References

1. Omara R. I., Nehela Y., Mabrouk O. I., Elsharkawy M. M. The emergence of new aggressive leaf rust races with the potential to supplant the resistance of wheat cultivars. *Biology (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 9, art. 925. <https://doi.org/10.3390/biology10090925>
2. Salvatore M. M., Russo M. T., Nicoletti R., Mahamedi A. E., Berraf-Tebbal A., Cimmino A., Masi M., Andolfi A. Comparative analysis of secondary metabolites in *Diplodia corticola* strains with different virulence degrees associated with canker and dieback of *Quercus* spp. *Molecules*, 2023, vol. 28, no. 17, art. 6302. <https://doi.org/10.3390/molecules28176302>
3. Kamienski F. Les organes végétatifs du *Monotropa hypopitys* L. *Mémoires de la Société nationale des Sciences Naturelles et Mathématiques de Cherbourg*, 1882, vol. 26, pp. 1–40.
4. Frank A. B. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 1885, Bd. 3, S. 128–145.
5. Niezgoda P., Błaszczkowski J., Błaszczkowski T., Stanisławczyk A., Zubek S., Milczarski P. [et al.]. Three new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) and *Acaulospora gedanensis* revised. *Frontiers in Microbiology* (Sec. Microbial Symbioses), 2024, vol. 15, art. 1320014. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1320014>
6. Henrion B., Chevalier G., Martin F. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research*, 1994, vol. 98, pp. 37–43. [https://doi.org/10.1016/s0953-7562\(09\)80333-x](https://doi.org/10.1016/s0953-7562(09)80333-x)
7. Panteleev S. V., Kharkhasova I. A., Konstantinov A. V., Ostrikova M. Ya., Ivashchenko L. O., Yarmolovich V. A., Baranov O. Yu. Molecular genetic diagnostics of mycorrhiza-forming microflora of pine and spruce in forest nurseries and artificial stands. *Genetika i biotekhnologiya XXI veka: problemy, dostizheniya, perspektivy: materialy V Mezhduнародnoi nauchnoi konferentsii, posvyashchennoi 135-letiyu so dnya rozhdeniya N. I. Vavilova, Minsk, 21–25 noyabrya 2022 goda* [Genetics and biotechnology of the 21st century: problems, achievements, prospects: materials of the V International scientific conference dedicated to the 135th anniversary of the birth of N. I. Vavilov, Minsk, November 21–25, 2022]. Minsk, 2022, p. 66 (in Russian).
8. Seb J., Ajungla T. Role of ectomycorrhiza in forest ecosystems: a review. *International Journal of Advanced Research*, 2018, vol. 6, no. 8, pp. 866–873. <https://doi.org/10.21474/ijar01/7588>
9. Taylor A. F. S., Alexander I. J. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist*, 2005, vol. 19, no. 3, pp. 102–112. <https://doi.org/10.1017/s0269915x05003034>
10. Hintikka V. On the macromycete flora in oligotrophic pine forests of different ages in South Finland. *Acta Botanica Fennica*, 1988, vol. 136, pp. 89–94.
11. Jonsson L., Dahlberg A., Nilsson M-C., Kårén O., Zackrisson O. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytologist*, 1999, vol. 142, no. 1, pp. 151–162. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00383.x>
12. Münzenberger B., Gollack J., Ullrich A., Schmincke B., Hüttl R. F. Abundance, diversity, and vitality of mycorrhizae of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in lignite recultivation sites. *Mycorrhiza*, 2004, vol. 14, pp. 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0257-2>
13. Rudawska M., Gollack J., Ullrich A., Schmincke B., Hüttl R. F. Shifts in taxonomical and functional structure of ectomycorrhizal fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) underpinned by partner tree ageing. *Pedobiologia*, 2018, vol. 71, pp. 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2018.08.003>
14. Smith S. E., Read D. J. *Mycorrhizal symbiosis*. New York, Academic Press, 2008. 787 p.
15. Read D. J. The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots. *The ecology and physiology of the fungal mycelium: Symposium of the British Mycological Society Held at Bath University, April 11–15, 1983*. Cambridge, 1984, pp. 215–240.
16. Benito B., Gonzalez-Guerrero M. Unravelling potassium nutrition in ectomycorrhizal associations. *New Phytologist*, 2014, vol. 201, no. 3, pp. 707–709. <https://doi.org/10.1111/nph.12659>
17. Siddiqui Z. A., Akhtar M. S., Futai K. *Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry*. Dordrecht, Springer Publ., 2008. 359 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8770-7>

18. Bruns T. D., Bidartondo M. I., Taylor D. L. Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do exceptions tell us. *Integrative and Comparative Biology*, 2002, vol. 42, no. 2, pp. 352–359. <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.352>
19. Landis T. D., Amaranthus M. A. Inoculate with mycorrhizae, rebuild your soil, and help stop global warming. *Forest Nursery Notes*, 2009, vol. 29, no. 1, pp. 13–16.
20. Southworth D., He X.-H., Swenson W., Bledsoe C. S., Horwath W. R. Application of network theory to potential mycorrhizal networks. *Mycorrhiza*, 2005, vol. 15, no. 8, pp. 589–595. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0368-z>
21. Mukerji K. G., Ciancio A. Mycorrhizae in the integrated pest and disease management. *General concepts in integrated pest and disease management*. Dordrecht, 2007, pp. 245–266. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6061-8_10
22. Bruns T. D. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *The significance and regulation of soil biodiversity: Proceedings of the International Symposium on Soil Biodiversity, held at Michigan State University, East Lansing, May 3–6, 1993*. Dordrecht, 1995, pp. 63–73. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0479-1_5
23. Rudawska M., Leski T. Ectomycorrhizal fungal assemblages of nursery grown scots pine are influenced by age of the seedlings. *Forests*, 2021, vol. 12, no. 2, art. 134. <https://doi.org/10.3390/f12020134>
24. Padutov V. E. Metagenomic analysis of fungal phytopathogens of birch planting growth material. *Nauka i innovatsii* [Science and innovations], 2022, no. 3, pp. 66–70 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2022-3-66-70>
25. Padutov V. E., Baranov O. Yu., Voropaev E. V. *Methods of molecular genetic analysis*. Minsk, Ynipol Publ., 2007. 176 p. (in Russian).
26. Gardes M., Bruns T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application of the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 1993, vol. 2, no. 2, pp. 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1993.tb00005.x>
27. BLAST. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 04.12.2022).
28. Magurran A. E. *Ecological diversity and its measurement*. New Jersey, Princeton University Press Publ., 1988. 179 p.
29. Mueller G. M. Systematics of *Laccaria* (*Agaricales*) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Botany*, 1992, vol. 30, pp. 1–158.
30. Zeller S. M., Dodge C. W. Rhizopogon in North America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1918, vol. 5, no. 1, pp. 1–30; 32–36. <https://doi.org/10.2307/2990021>
31. Dighton J., White J. F. *The fungal community. Its organization and role in the ecosystem*. 4th ed. Boca Raton, CRC Press, 2017. 652 p.
32. Watkinson S. C., Boddy L., Money N. *The fungi*. UK, Academic Press Publ., 2016. 478 p.
33. Bagirova S. F., Dzhavakhiya V. G., Ozeretskovskaya O. L., Provorov N. A., Tikhonovich I. A., Shcherbakova L. A. *Fundamental phytopathology*. Moscow, KRASAND Publ., 2023. 512 p. (in Russian).
34. Fedorov N. I. *Forest phytopathology*. Minsk, Belarusian State Technological University, 2004. 462 p. (in Russian).
35. Rabotnov T. A. *Phytocenology*. 3rd ed. Moscow, Moscow State University Press, 1983. 352 p. (in Russian).

Информация об авторах

Ярмолович Василий Александрович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yarm@belstu.by

Пантелеев Станислав Викторович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: stasikdesu@mail.ru

Хархасова Ирина Алексеевна – мл. науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: harhasova18@mail.ru

Зенюк Каролина Владимировна – аспирант. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kvzeniuk@belstu.by

Иващенко Любовь Олеговна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ivashchenko@belstu.by

Константинов Андрей Вячеславович – науч. сотрудник. Институт леса НАН Беларуси (ул. Пролетарская, 71, 246050, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: avkonstantinof@mail.ru

Баранов Олег Юрьевич – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, академик-секретарь НАН Беларуси (пр-т Независимости, 66, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: betula-belarus@mail.ru

Information about the authors

Vasili A. Yarmalovich – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yarm@belstu.by

Stanislav V. Panteleev – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: stasikdesu@mail.ru

Irina A. Kharkhasova – Junior Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: harhasova18@mail.ru

Karalina V. Zeniuk – Postgraduate student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kvzeniuk@belstu.by

Liubou A. Ivashchanka – Junior Researcher. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ivashchenko@belstu.by

Andrey V. Konstantinof – Researcher. Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: avkonstantinof@mail.ru

Oleg Yu. Baranov – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Academician-Secretary of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: betula-belarus@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 57.088.1
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-198-206>

Поступила в редакцию 08.02.2024
Received 08.02.2024

**А. И. Давыденко, А. Ю. Кохан, И. А. Дремук, Е. В. Шамова,
А. В. Осипова, А. Е. Гончаров**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МЕТОДИКА БИОХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ СТЕКЛА ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ МИКРОЧИПОВ

Аннотация. Белковый микрочип – универсальный инструмент для одновременной диагностики широкого спектра заболеваний человека. Для изготовления микрочипа на подложке иммобилизируют белковые молекулы. Одним из самых распространенных и доступных типов подложек является стекло, однако, поскольку стеклянная поверхность не содержит функциональных групп, которые обеспечивали бы надежное связывание с белками, требуется ее модификация.

Целью данной работы являлась разработка методики химической модификации стеклянной поверхности для изготовления белковых микрочипов. В процессе разработки методики варьировали следующие параметры: растворитель для 3-аминопропилтриэтоксисилана, время проведения реакции силанизации, концентрация глутарового альдегида, состав буфера для печати целевого белка (меченного флуорохромом аллофикоцианином анти-IgE человека) на модифицированную поверхность. Об эффективности иммобилизации белковых молекул судили по интенсивности флуоресценции спотов. В результате исследований установлено отсутствие влияния растворителя для 3-аминопропилтриэтоксисилана на эффективность иммобилизации целевого белка на модифицированной поверхности и определено оптимальное время проведения реакции силанизации – 60 мин, а также показано, что оптимальная концентрация глутарового альдегида – 2,5 % (v/v), а оптимальный состав буфера для печати – фосфатно-солевой буфер с добавлением 4 % (v/v) глицерина. Предложенная методика обеспечивает эффективную иммобилизацию белков, что продемонстрировано на примере флуоресцентно-меченых антител. В дальнейшем планируется использовать данную методику для изготовления белковых микрочипов для аллергодиагностики с целью выявления специфических IgE в сыворотке крови пациентов.

Ключевые слова: микрочип, белки, поверхность, модификация, стекло, буфер, IgE

Для цитирования: Методика биохимической модификации поверхности стекла для изготовления белковых микрочипов / А. И. Давыденко [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 198–206. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-198-206>

**Anastasiya I. Davydenka, Anatoli Yu. Kokhan, Irina A. Dremuk, Ekaterina V. Shamova,
Antanina U. Osipava, A. Ya. Hancharou**

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

TECHNIQUE OF MODIFYING THE GLASS SURFACE FOR PRODUCTION OF PROTEIN MICROCHIPS

Abstract. Protein microarray consists of a support (usually glass or polymer) and immobilized proteins (ferments, antibodies, etc.). Being one of the most widespread and accessible support material, glass still has a significant disadvantage: its surface doesn't contain functional groups capable of bonding with proteins. Therefore, the glass surface needs to be modified in order to immobilize capture proteins.

The aim of this work was to develop a technique of chemical modification of the glass surface for fabrication of protein microarrays. In our study we varied the following experimental parameters: solvent for 3-aminopropyltriethoxysilane, time of silanization reaction, concentration of glutaraldehyde, composition of a buffer for printing the target protein (allophycocyanin-labelled human anti-IgE) on the modified surface. The efficiency of protein molecule immobilization was quantified using the intensity of spot fluorescence. As a result, it was shown that there was no influence of the solvent for 3-aminopropyltriethoxysilane on the immobilization efficiency of the target protein on the modified surface, and the optimal time for the silanization reaction was 60 minutes. It was also shown that the optimal concentration of glutaraldehyde was 2.5 % (v/v) and the optimal composition of the printing buffer was phosphate-buffered saline with the addition of 4 % (v/v) glycerol.

Keywords: microarray, proteins, surface, modification, glass

For citation: Davydenka A. I., Kokhan A. Yu., Dremuk I. A., Shamova E. V., Osipava A. U., Hancharou A. Ya. Technique of modifying the glass surface for production of protein microchips. *Vestsi Natsyunal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 198–206 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-198-206>

Введение. Микрочиповые технологии являются незаменимым инструментом в диагностике заболеваний человека, поскольку они представляют собой высокочувствительный метод мультиплексного обнаружения различных биомаркеров [1, 2]. Белковые микрочипы – компактные системы анализа, которые позволяют одновременно определять и анализировать большое количество аналитов-белков из небольших количеств проб в рамках одного эксперимента. Существует три класса белковых микрочипов, каждый из которых имеет уникальную биомедицинскую направленность: аналитические микрочипы, функциональные микрочипы и микрочипы с обращенной фазой [3, 4]. Наиболее распространенными являются аналитические микрочипы, которые обычно используются для профилирования сложной смеси белков с целью измерения аффинности связывания, специфичности и уровней экспрессии белков в смеси. Функциональные белковые микрочипы отличаются от аналитических тем, что они состоят из массивов, содержащих полноразмерные функциональные белки или белковые домены и используются для изучения биохимической активности всего протеома в одном эксперименте [4]. Принципиально противоположным типом чипов являются чипы с обращенной фазой. На подложку таких биочипов наносят лизаты клеток или образцы тканей, а затем обрабатывают их раствором, содержащим специфический к выявляемому веществу лиганд [5].

Белковые биочипы достаточно сложны в изготовлении, что связано с наличием у белков определенной трехмерной структуры, играющей важную роль в обеспечении их функциональной активности и взаимодействия с другими молекулами. Традиционно микрочипы печатаются на стеклянных поверхностях, однако в качестве подложек могут быть использованы и другие типы поверхностей, а выбор различных материалов требует адаптированных методов функционализации поверхности. Поскольку для разных поверхностей требуются индивидуальные протоколы активации, для молекул с разнообразными функциональными возможностями также необходимы индивидуальные стратегии иммобилизации.

Функциональность микрочипов во многом зависит от морфологии поверхности, которая влияет как на чувствительность измерений, так и на реакционную способность иммобилизованных молекул. Для конкретных молекулярных анализов белки, локализованные на поверхности, должны сохранять свою нативную функциональную активность, поэтому молекулярная структура должна быть сохранена. Более того, они должны быть распределены так, чтобы оставаться доступными для связывания. Поддержание определенной ориентации иммобилизованных молекул необходимо также для обеспечения эффективности связывания. Если иммобилизованные белки неправильно ориентированы на поверхности микрочипа или денатурированы, это может существенно повлиять на последующие события биомолекулярного взаимодействия [6, 7].

Большинство материалов, используемых в качестве подложек, не имеют функциональных групп, которые обеспечили бы связывание биомолекул с подложкой, поэтому требуется предварительная их активация [8]. В настоящее время при изготовлении микрочипов осуществляют модификацию подложек физическими либо химическими методами, причем предпочтение отдают, как правило, химической модификации, так как этот способ обеспечивает лучшее связывание биомолекул с поверхностью подложки.

Цель данной работы – разработка методики химической модификации стеклянной поверхности для изготовления белковых микрочипов.

Методика исследования. Модификацию очищенной и активированной поверхности стекла проводили с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана (APTES) и глутарового альдегида (ГА). В качестве иммобилизованного белка использовали антитело к IgE человека (клон 4H10), меченное флуорохромом APC (аллофикоцианин). Общая схема модификации поверхности стеклянной подложки представлена на рис. 1.

Для иммобилизации белковых молекул на модифицированную поверхность стекла использовали прибор Versa spotter 10. Параметры задавали с помощью специализированного ПО VERSAware. На стекло наносили растворы белков в виде спотов (капель) (от 20 до 200), по 50 нл на каждый спот. Расстояние между спотами – 1,5 мм. После иммобилизации белков подложки помещали на несколько часов во влажную атмосферу и затем в течение 1 ч проводили блокировку поверхности в 1%-ном (масс.) растворе бычьего сывороточного альбумина в PBST

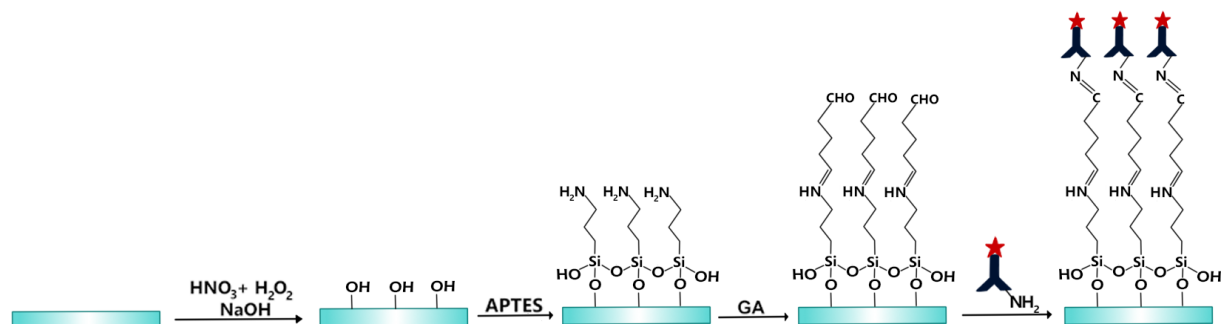


Рис. 1. Схема процесса модификации поверхности стекла для изготовления белкового микрочипа

Fig. 1. Scheme of the process of glass surface modification for protein microchip fabrication

(фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,1 % v/v ПАВ Tween 20). Затем подложки трижды отмывали в TBST (трис-буфер с добавлением 0,05 % v/v ПАВ Tween 20), в воде и высушивали.

Детектирование белковых молекул осуществляли с помощью лазерного сканера микрочипов LuxScan 10K/A (CapitalBio, КНР). Возбуждение флуоресценции осуществляли на длине волны 635 нм, регистрацию – в канале Cy-5 (фильтр 675 ± 10 нм). Об эффективности иммобилизации белковых молекул судили по интенсивности флуоресценции спотов.

Для статистической обработки полученных данных использовали программу Origin 2021 (OriginLab, США), для оценки достоверности различий – критерий Манна–Уитни. В качестве критерия достоверности различий показателей принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для эффективной иммобилизации белковых молекул на поверхности стеклянных подложек процедура модификации поверхности стекла должна быть оптимальной. Наиболее часто используемым и коммерчески доступным способом является обработка поверхности стеклянных и кремниевых подложек силанами (силанизация). Модификация amino- и хлорсиланами приводит к формированию гидрофобной поверхности и обеспечивает физическую адсорбцию белков к поверхности [5]. Дополнительная модификация поверхности альдегидными группами способствует ковалентному связыванию белков с поверхностью при их иммобилизации [6].

На первом этапе процесса модификации подложек стекла очищали с помощью смеси концентрированной азотной кислоты и пероксида водорода (соотношение объемов 3 : 1). Инкубация стекол в данном растворе в течение 1–2 ч позволяет удалить органические загрязнения, а также провести механическую очистку за счет выделения газообразного кислорода при разложении H_2O_2 в кислой среде. Связывание с APTES требует наличия свободных гидроксильных групп, поэтому целесообразной представляется дополнительная обработка подложки (называемая также активацией) с целью увеличения количества OH-групп на поверхности. Существуют различные способы увеличения количества поверхностных OH-групп, при этом одни требуют дополнительного оборудования (плазменная печь), другие же крайне небезопасны в использовании (смесь концентрированной серной кислоты и пероксида водорода, известная как раствор Пирани). Нами был выбран наиболее безопасный и достаточно эффективный метод активации поверхности стекла: подложки помещали в раствор гидроксида натрия (1 ммоль/л) при температуре 80 °C на 30 мин.

Второй этап – модификация поверхности с использованием 1%-ного (v/v) раствора APTES. Эффективность модификации поверхности аminosилами может зависеть от растворителя, однако имеющиеся в литературе данные на этот счет противоречивы. Нами изучено влияние двух типов растворителей на эффективность модификации поверхности: 96%-ного этанола (полярного протонного растворителя) и ДХМ (малополярного апротонного растворителя). Для иммобилизации белков чипы, покрытые APTES, инкубировали в течение 30 мин в 2,5%-ном растворе (v/v) ГА.

На рис. 2 представлены показатели интенсивности флуоресценции спотов, соответствующих иммобилизованным флуоресцентно-меченым белковым молекулам. Как видно из графика, при

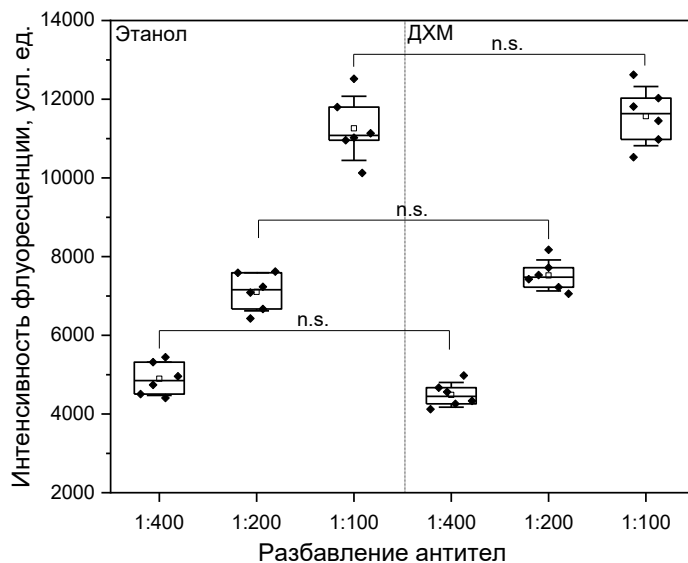


Рис. 2. Влияние растворителя для APTES на эффективность связывания белков (на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC, в разбавлении 1 : 400 (0,25 мкг/мл), 1 : 200 (0,5 мкг/мл), 1 : 100 (1 мкг/мл). Здесь и на рис. 3–8 данные представлены в виде медианы с интерквартильным размахом [25-й процентиль; 75-й процентиль] и стандартного отклонения

Fig. 2. Effect of solvent for APTES on the protein binding efficiency (antibody to human IgE labeled with APC fluorochrome 1 : 400 (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1 : 200 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 1 : 100 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was immobilized onto the surface of the microarrays). Here and in Fig. 3–8 data is presented as median with interquartile ranges [25th percentile; 75th percentile] and standard deviation

использовании данных растворителей эффективность связывания белков статистически не отличается для всего диапазона разбавлений флуоресцентных антител (от 1 : 100 до 1 : 400).

Следует отметить, что процесс утилизации ДХМ очень сложный, поэтому, учитывая коммерческую доступность этанола, целесообразным является использование данного растворителя для модификации поверхности APTES.

Изучено также влияние продолжительности реакции силанизации на эффективность иммобилизации белков (рис. 3). Показано, что проведение реакции силанизации в течение 60 мин обеспечивает более эффективную иммобилизацию белков на поверхности модифицированной подложки ($p < 0,05$).

Третий этап – взаимодействие силанизированной поверхности подложки с ГА. Для реакции использовали фосфатно-солевой буфер для стабилизации ГА, так как при отклонении pH от нейтрального уровня увеличивается вероятность протекания нежелательных реакций внутри- и межмолекулярной конденсации.

В данной работе изучена эффективность иммобилизации белковых молекул при различных концентрациях ГА. Установлено, что увеличение концентрации ГА с 1 до

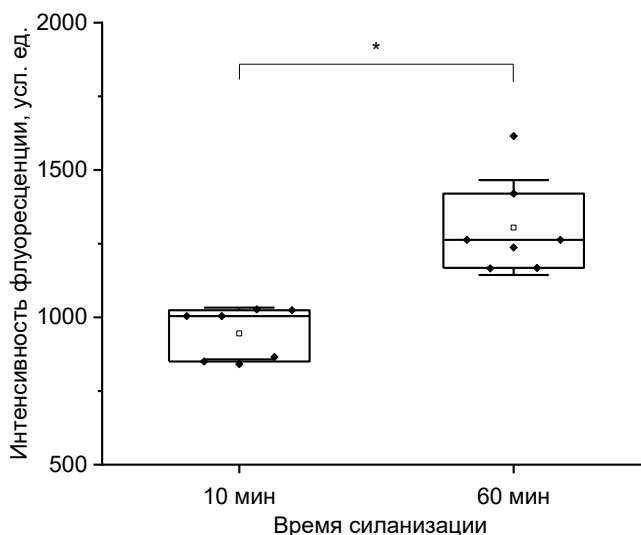


Рис. 3. Влияние продолжительности реакции силанизации на эффективность связывания белков. Здесь и на рис. 3–6 на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC (0,4 мкг/мл). * – $p < 0,05$ (критерий Манна–Уитни)

Fig. 3. Effect of silanization reaction duration on the protein binding efficiency. Here and in Fig. 3–6 antibody to human IgE labeled with APC fluorochrome (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was immobilized onto the surface of the microarrays. * – $p < 0.05$ (Mann–Whitney test)

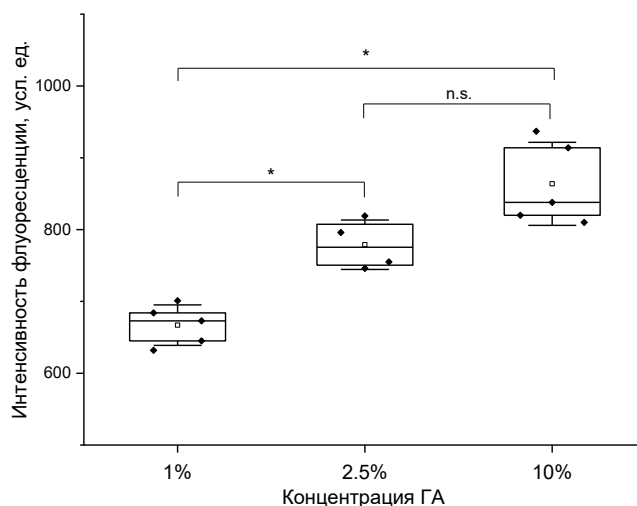


Рис. 4. Влияние концентрации ГА на эффективность связывания белков

Fig. 4. Effect of GA concentration on the protein binding efficiency

10 % (v/v) (рис. 4) приводит не только к улучшению иммобилизации белков ($p < 0,05$), но и к повышению интенсивности фона, что снижает значение соотношения сигнал/шум, а следовательно, и чувствительность системы. В связи с этим в дальнейших экспериментах для модификации поверхности целесообразнее было использовать концентрацию ГА 2,5 % (v/v).

Далее была поставлена задача подобрать оптимальный состав буфера для нанесения белков на подложку (печать белковых молекул). Согласно литературным данным [9], при изготовлении белковых микрочипов наиболее часто используют буферные растворы PBS и СВВ, а для более эффективной иммобилизации белковых молекул в буферный раствор добавляют глицерин.

Нами проведен сравнительный анализ буферных растворов PBS (pH = 7,4) и СВВ

(pH = 9,6) для печати, а также подобрана оптимальная концентрация глицерина в растворах.

Изучено влияние состава буферного раствора для печати на эффективность связывания белков (рис. 5). В исследованиях использовали глицерин в фиксированной концентрации 10 % (v/v). Из представленных данных следует, что оптимальный состав буферного раствора для печати – фосфатно-солевой буфер (pH = 7,4) с добавлением глицерина (10 % v/v). Такой буферный раствор поддерживает физиологический уровень pH, оптимальный для сохранения структурной организации белков, а присутствие глицерина уменьшает испарение воды (что благоприятно влияет на процесс иммобилизации), а также улучшает морфологические характеристики спотов.

Следующим этапом исследований стало определение оптимальной концентрации глицерина в буферном растворе для печати. На рис. 6 представлены данные об эффективности иммобилизации белков на поверхности микрочипов при варьировании концентрации глицерина (v/v) 0, 10, 20 и 30 % в буферном растворе для печати. Показано, что концентрация глицерина более 10 % снижает интенсивность флуоресценции спотов с иммобилизованными белками, что, вероятно,

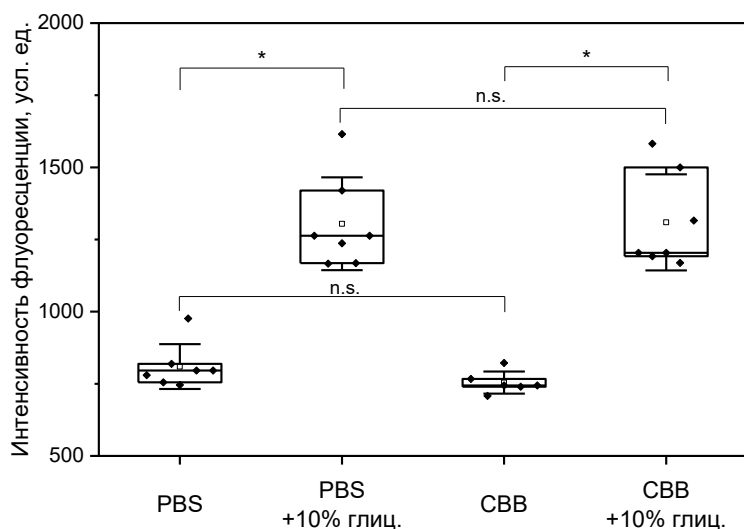


Рис. 5. Влияние состава буферного раствора для печати на эффективность связывания белков

Fig. 5. Effect of printing buffer solution composition on the protein binding efficiency

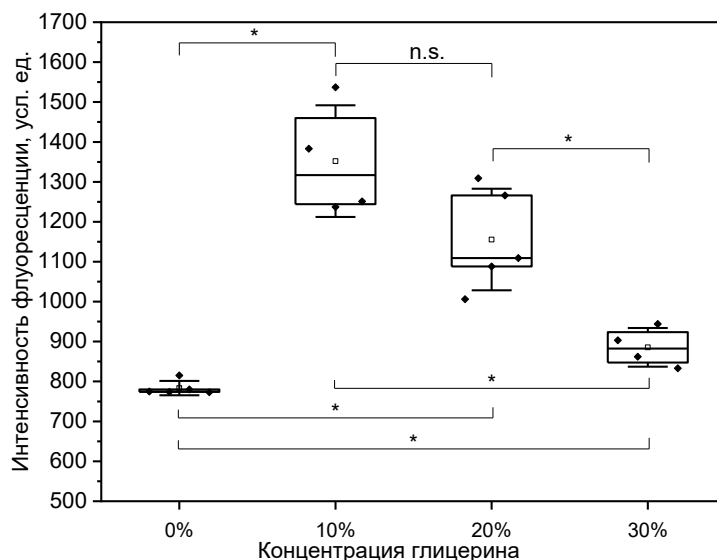


Рис. 6. Влияние концентрации глицерина (диапазон 0–30 % v/v) в буферном растворе для печати на эффективность связывания белков

Fig. 6. Effect of glycerol concentration (range 0–30 % v/v) in printing buffer solution on protein binding efficiency

является следствием уменьшения эффективности иммобилизации белков из-за повышенной вязкости раствора.

Далее было изучено влияние глицерина в диапазоне концентраций 0 до 10 % (v/v) при различных разведениях иммобилизованных белковых молекул (рис. 7). Из полученных данных следует, что оптимальная концентрация глицерина в составе буфера для печати – 4 % (v/v).

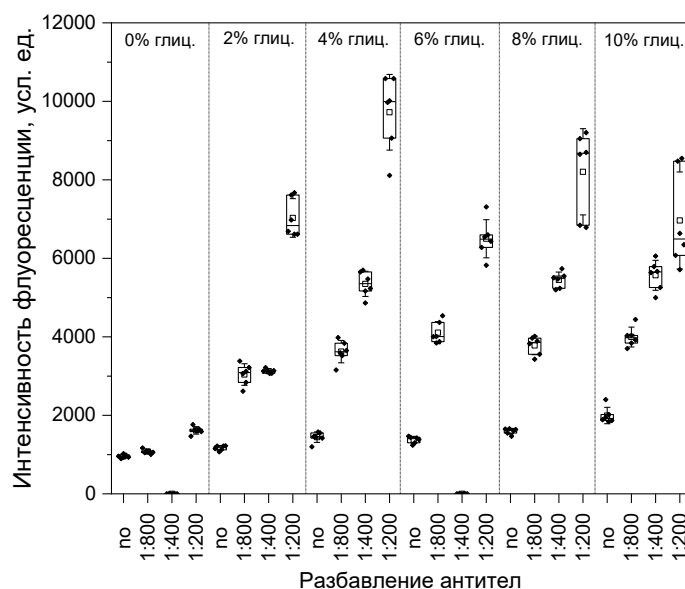


Рис. 7. Влияние концентрации глицерина (диапазон 0–10 % v/v) в буферном растворе для печати на эффективность связывания белков при различном разбавлении (на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC, в разбавлении 1 : 800 (0,125 мкг/мл), 1 : 400 (0,25 мкг/мл), 1 : 200 (0,5 мкг/мл). no – споты буфера для печати без добавления флуоресцентно-меченого IgE

Fig. 7. Effect of glycerol concentration (range 0–10 % v/v) in the printing buffer solution on the protein binding efficiency at different dilutions (antibody to human IgE labeled with APC fluorochochrome in different dilutions 1 : 800 (0.125 µg/ml), 1 : 400 (0.25 µg/ml), 1 : 200 (0.5 µg/ml) were immobilized onto the surface of the microarrays). no – spots of printing buffer without the addition of fluorescently labeled IgE

Согласно литературным источникам, добавление детергента Тритон X-100 в буфер для печати улучшает морфологические характеристики спотов (в частности, равномерность нанесения белка на подложку в заданных границах), не влияя при этом на флуоресцентный сигнал [10]. В связи с этим нами изучено влияние тритона в составе буфера для печати на эффективность иммобилизации белковых молекул на поверхность подложки (рис. 8). В буфер для печати добавляли Тритон X-100 в низкой концентрации (0,003 %), чтобы нивелировать его влияние на конформацию белков.

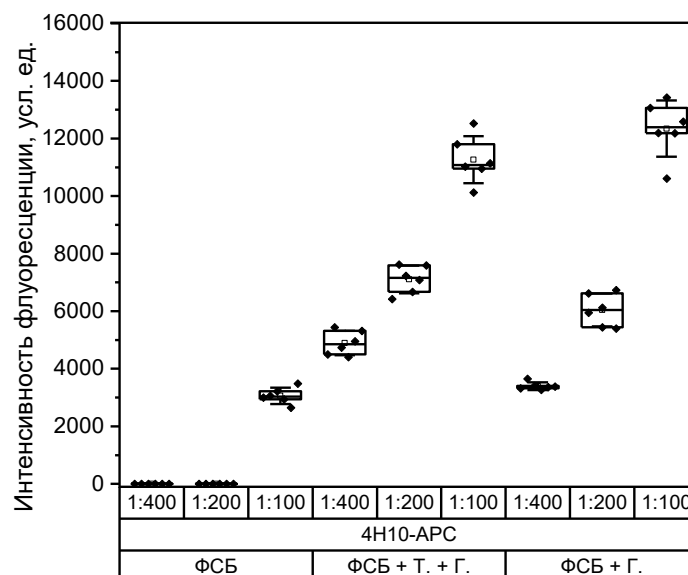


Рис. 8. Влияние добавок глицерина и Тритона X-100 в буферном растворе для печати на эффективность связывания белков при различном разбавлении (на поверхность микрочипов иммобилизовали антитело к IgE человека, меченное флуорохромом APC, в разбавлении 1 : 400 (0,25 мкг/мл), 1 : 200 (0,5 мкг/мл), 1 : 100 (1 мкг/мл)). ФСБ – фосфатно-солевой буфер, Т – Triton X-100, Г – глицерин

Fig. 8. Effect of glycerol and Triton X-100 additives in printing buffer solution on protein binding efficiency at different dilutions (antibody to human IgE labeled with APC fluorochrome in dilutions 1 : 400 (0.25 $\mu\text{g/ml}$), 1 : 200 (0.5 $\mu\text{g/ml}$), 1 : 100 (1 $\mu\text{g/ml}$) was immobilized onto the surface of the microarrays). ФСБ – phosphate buffered saline, Т – Triton X-100, Г – glycerol

Полученные данные (рис. 8) свидетельствуют об отсутствии значительного влияния Тритона X-100 на иммобилизацию белков. При этом улучшения морфологических характеристик спотов не отмечено.

Следовательно, в качестве оптимального состава буферного раствора для печати будет фосфатно-солевой буфер (pH 7,4) с добавлением 4 % глицерина.

На основании полученных данных предложена следующая методика модификации поверхности стеклянной подложки:

1. Очистка в смеси $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ (3 : 1 v/v) в течение 30 мин.
2. Активация в 1 моль/л NaOH в течение 30 мин при 80 °С.
3. Силанизация в 1 %-ном (v/v) растворе АРТЕС в 96%-ном (v/v) этаноле в течение 10 мин с последующим выдерживанием при температуре 110 °С в течение 30 мин.
4. Модификация в 2,5%-ном (v/v) растворе ГА в течение 30 мин.
5. Печать с использованием PBS с добавлением 4 % глицерина (v/v).

Заключение. В результате проведенных исследований разработана методика модификации поверхности стекла для эффективной иммобилизации белковых молекул с целью изготовления белковых микрочипов. Методика включает в себя этап очистки и активации поверхности, модификацию поверхности АРТЕС и глутаровым альдегидом, а также подбор оптимального состава буферного раствора для иммобилизации белковых молекул. Предложенная методика обеспечивает эффективную иммобилизацию белков, что продемонстрировано на примере флуоресцентно-

меченых антител. В дальнейшем планируется использовать данную методику для изготовления белковых микрочипов для аллергодиагностики с целью выявления специфических IgE в сыворотке крови пациентов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках мероприятия 35 «Разработать тест-систему на основе технологии микрочипов для выявления IgE-зависимых аллергических реакций» подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии» Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 годы.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of activity 35 “Develop a test system based on microchip technology to detect IgE-dependent allergic reactions” of subprogram 1 “Innovative biotechnologies” of the State program “High-tech technologies and equipment” for 2021–2025.

Список использованных источников

1. Interferometric silicon biochips for label and label-free DNA and protein microarrays / M. Cretich [et al.] // *Proteomics*. – 2012. – Vol. 12, N 19–20. – P. 2963–2977. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200202>
2. Wilson, D. S. Functional protein microarrays / D. S. Wilson, S. Nock // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2002. – Vol. 6, N 1. – P. 81–85. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(01\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(01)00281-2)
3. Preparation of substrates for microarray protein chips with different ending functional groups / A. Shiu [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 2022. – Vol. 502. – Art. 113218. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113218>
4. Hall, D. Protein microarray technology / D. Hall, J. Ptacek, M. Snyder // *Mech. Ageing Dev.* – 2007. – Vol. 128, N 1. – P. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.021>
5. Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis / R. Speer [et al.] // *Curr. Opin. Mol. Ther.* – 2005. – Vol. 7, N 3. – P. 240–245.
6. The effect of uniform capture molecule orientation on biosensor sensitivity: Dependence on analyte properties / A. K. Trilling [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – Vol. 40, N 1. – P. 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.027>
7. Schäferling, M. Protein microarrays: Surface chemistry and coupling schemes / M. Schäferling, D. Kambhampati [Electronic resource] // *Protein Science Encyclopedia* / A. R. Fersht (ed.). – 2008. – Mode of access: <https://doi.org/10.1002/9783527610754.fa04>. – Date of access: 31.05.2024.
8. Surface modification strategies for biomedical applications: Enhancing cell-biomaterial interfaces and biochip performances / S. Roh [et al.] // *BioChip J.* – 2023. – Vol. 17. – P. 174–191. <https://doi.org/10.1007/s13206-023-00104-4>
9. Optimization of printing buffer for protein microarrays based on aldehyde-modified glass slides / Y. Liu [et al.] // *Front Biosci.* – 2007. – Vol. 12, N 10. – P. 3768–3773. <https://doi.org/10.2741/2350>
10. Ramos-de-la-Peña, A. M. Protein A chromatography: challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies / A. M. Ramos-de-la-Peña, J. González-Valdez, O. Aguilar // *J. Sep. Sci.* – 2019. – Vol. 42, N 9. – P. 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>

References

1. Cretich M., Monroe M. R., Reddington A., Zhang X., Daaboul G. G., Damin F., Sola L., Unlu M. S., Chiari M. Interferometric silicon biochips for label and label-free DNA and protein microarrays. *Proteomics*, 2012, vol. 12, no. 19–20, pp. 2963–2977. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200202>
2. Wilson D. S., Nock S. Functional protein microarrays. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, vol. 6, no. 1, pp. 81–85. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(01\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(01)00281-2)
3. Shiu A., Chen J., Hsiao C., Chang S., Hwa K., Leggett G. Preparation of substrates for microarray protein chips with different ending functional groups. *Journal of Immunological Methods*, 2022, vol. 502, art. 113218. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113218>
4. Hall D., Ptacek J., Snyder M. Protein microarray technology. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2007, vol. 128, no. 1, pp. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.021>
5. Speer R., Wulfkuhle J. D., Liotta L. A., Petricoin E. F. 3rd. Reverse-phase protein microarrays for tissue-based analysis. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2005, vol. 7, no. 3, pp. 240–245.
6. Trilling A. K., Harmsen M. M., Ruigrok V. J. B., Zuilhof H., Beekwilder J. The effect of uniform capture molecule orientation on biosensor sensitivity: Dependence on analyte properties. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, vol. 40, no. 1, pp. 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.027>
7. Schäferling M., Kambhampati D. Protein microarrays: Surface chemistry and coupling schemes. *Protein Science Encyclopedia*, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1002/9783527610754.fa04> (accessed 31.05.2024).
8. Roh S., Jang Y., Yo J., Seong H. Surface modification strategies for biomedical applications: enhancing cell-biomaterial interfaces and biochip performances. *BioChip Journal*, 2023, vol. 17, pp. 174–191. <https://doi.org/10.1007/s13206-023-00104-4>
9. Liu Y., Li C. M., Yu L., Chen P. Optimization of printing buffer for protein microarrays based on aldehyde-modified glass slides. *Frontiers in Bioscience*, 2007, vol. 12, no. 10, pp. 3768–3773. <https://doi.org/10.2741/2350>
10. Ramos-de-la-Peña A. M., González-Valdez J., Aguilar O. Protein A chromatography: challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *Journal of Separation Science*, 2019, vol. 42, no. 9, pp. 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>

Информация об авторах

Давыденко Анастасия Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: asyacm251@gmail.com

Кохан Анатолий Юрьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rrchypp@gmail.com

Дремук Ирина Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: irinadremuk@yandex.by

Шамова Екатерина Вячеславовна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lubakova@gmail.com

Осипова Антонина Владимировна – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aosipova@tut.by

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

Information about the authors

Anastasiya I. Davydenka – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: asyacm251@gmail.com

Anatoli Yu. Kokhan – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rrchypp@gmail.com

Irina A. Dremuk – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irinadremuk@yandex.by

Ekaterina V. Shamova – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lubakova@gmail.com

Antanina U. Osipava – Ph. D. (Med.), Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aosipova@tut.by

Andrei Ya. Hancharou – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 604+547.963+43.645.2+577.152.231

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-207-216>

Поступила в редакцию 31.01.2024

Received 31.01.2024

Я. В. Фалетров¹, Н. С. Фролова¹, Ш. Мауерсбергер², В. М. Шкуматов¹

¹Научно-исследовательский институт физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

²Институт микробиологии Дрезденского технологического университета, Дрезден, Германия

ПОДАВЛЕНИЕ ПОБОЧНЫХ РЕАКЦИЙ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ПРЕГНЕНОЛОНА В ТРАНСГЕННЫХ ДРОЖЖАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ОПТИМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ «ВЕКТОР – ХОЗЯИН»

Аннотация. Известно, что прегненолон и продукты его превращения цитохромом P450 17 α -гидроксилаза/17,20-лиаза (P450c17) – 17-гидроксипрегненолон, дегидроэпиандростерон – подвергаются 3-O-ацетилированию ферментом Atf2p дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Нами установлено, что добавление в среду для культивирования изоамилового или амилового спирта уменьшает образование 3-O-ацетилированных продуктов как неиндуцированными, так и индуцированными клетками трансгенных дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α , экспрессирующими P450c17 под контролем промотора *GAL10*. Более эффективным оказалось использование микроорганизма-хозяина *Yarrowia lipolytica* и промотора экспрессии изоцитратлиаза *ICL1*. Анализ генома дрожжей *Y. lipolytica* с помощью программы BLAST показал отсутствие в них потенциальных аналогов Atf2p, что подтверждено отсутствием продуктов ацетилирования прегненолона. Выбор оптимального организма-хозяина является альтернативой методу получения штамма с удаленными генами.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, Atf2p дрожжей, P450-редуктаза дрожжей, P450c17, изоамиловый спирт, BLAST, рациональная комбинация системы «вектор–хозяин»

Для цитирования: Подавление побочных реакций ацетилирования прегненолона в трансгенных дрожжах с использованием конкурентного ингибирования и оптимальной системы «вектор – хозяин» / Я. В. Фалетров [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 207–216. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-207-216>

Yaroslav V. Faletrov¹, Nina S. Frolova¹, Stephan Mauersberger², Vladimir M. Shkumatov¹

¹Research Institute for Physicochemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Microbiology, Dresden University of Technology, Dresden, Germany

SUPPRESSING THE SIDE REACTIONS OF PREGNENOLONE ACETYLATION IN TRANSGENIC YEAST USING COMPETITIVE INHIBITION AND OPTIMAL VECTOR–HOST SYSTEM

Abstract. The rational design of the vector–host system and the conditions for its use is the key to its most effective use as a biocatalyst for obtaining valuable products or for testing potential bioregulators. In this work, we will consider examples of such solutions for some yeasts from the literature over the past 5 years and our experience in optimizing the reactions of 17 α -hydroxylation of pregnanes with recombinant strains of the yeast *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica*. Thus, it was known that pregnenolone and its product pregnenolone and the products of its transformation by cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17) – 17 hydroxypregnenolone, dehydroepiandrosterone – undergo 3-O-acetylation by the Atf2p enzyme of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We have found that adding isoamyl or amyl alcohol to the cultivation medium significantly reduced the formation of 3-O-acetylated products by both uninduced and induced cells of transgenic yeast *S. cerevisiae* GRF18 YEp5117 α expressing P450c17 under the control of the *GAL10* promoter. In this case, the Atf2p substrate competition model was applied. A more effective solution was to use a different host microorganism and an expression promoter. The analysis of the genome of the yeast *Y. lipolytica* using the BLAST program showed the absence of potential analogues of Atf2p, which was confirmed by the absence of pregnenolone acetylation products. Selecting the optimal host organism is an alternative to using a strain with a deleted gene.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, yeast Atf2p, Yeast P450 reductase, Mammalian P450c17, isoamyl alcohol, BLAST, rational combination of vector–host system

For citation: Faletrov Y. V., Frolova N. S., Mauersberger S., Shkumatov V. M. Suppressing the side reactions of pregnenolone acetylation in transgenic yeast using competitive inhibition and optimal vector–host system. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 207–216 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-207-216>

Введение. Основное место в промышленном получении стероидов занимает химико-ферментативный синтез с использованием природных микроорганизмов, причем осуществление ряда стадий модификации стероидов с использованием биотехнологий (окислительное отщепление боковых цепей природных стероидов, Δ^1 -дегидрирование, 11β -гидроксилирование) принципиально изменило методы получения всего спектра стероидных гормонов [1–4]. Эти уже ставшие традиционными подходы практически реализовали свой потенциал с точки зрения оптимизации промышленного производства таких ценных продуктов. Важной проблемой при использовании природных микроорганизмов как биокатализаторов превращения стероидов является наличие побочных реакций. Как правило, это требует применения модифицированных исходных субстратов (фторпроизводных, $\Delta^{1,3,5}$ ненасыщенных стероидов, 3-оксимов стеранов) и ингибиторов побочных реакций (α, α' -дипиридила, 1,10 фенантролина, 8-гидроксихинолина и др.), что усложняет решение производственных задач [4, 5].

Альтернативным подходом является использование трансгенных микроорганизмов, экспрессирующих только необходимые ферментные системы для селективных модификаций стероидов. Однако реализация этого подхода сопряжена с различными трудностями и помимо «встраивания» генов. Например, для *Saccharomyces cerevisiae*, наиболее изученных с точки зрения генетических манипуляций, установлено, что прегненолон, дегидроэпиандростерон (ДГЕА) и некоторые другие аналогичные Δ^5 -3-гидроксистероиды ацетируются ферментом Atf2p [6]. Образующиеся 3-О-ацетиловые эфиры не являются субстратами ферментов дальнейшего стероидогенеза млекопитающих (P450c17, CYP21, HSD3B1), а следовательно, получение целевых производных практически невозможно. Также в этих дрожжах содержатся функциональные аналоги 17β -гидроксистероиддегидрогеназ, Ayr1p и Fox2p, 20α -гидроксистероиддегидрогеназ, Gcylp и YPR1p, которые восстанавливают кетонные группы соответствующих стероидных субстратов, интермедиатов и продуктов [7–9], а значит, заводят процесс биосинтеза конечных стероидных продуктов в тупик. Поэтому в работе Szchebara с соавт. [10] по созданию трансгенного штамма *S. cerevisiae*, продуцирующего гидрокортизон из простых источников углерода, дополнительно были удалены гены, кодирующие упомянутые выше белки дрожжей, что значительно повлияло на жизнеспособность штамма.

Другое ограничение при создании клеточных биокатализаторов превращения стероидов связано с низкой растворимостью этих соединений в водных средах. Для преодоления этого ограничения используют смешивающиеся с водой растворители, двухфазные системы, диспергируют субстраты на мицеллах поверхностно-активных веществ, а также добавляют циклодекстрины для образования комплексов со стероидами [3, 11]. Дополнительное введение химических реагентов в ходе биотехнологического процесса усложняет весь процесс производства, включая его экологичность. Эти ограничения (наличие побочных продуктов и растворимость гидрофобных субстратов) можно преодолеть с помощью оптимальных систем «хозяин–вектор», в которых объединены строгая регио- и стереоспецифичность ферментов стероидогенеза млекопитающих и биотехнологические преимущества клеток микроорганизмов, использующих гидрофобные субстраты и синтезирующих собственные поверхностно-активные вещества [12–19].

Цель работы – установить с использованием приемов рационального дизайна биокатализатора и контроля протекания реакции 3-О-ацетилирования прегненолона с применением алифатических спиртов, а также с помощью компьютерного анализа генома *Y. lipolytica* наличие в трансгенных штаммах дрожжей потенциальных аналогов Atf2p.

Материалы и методы исследования. *Химические реагенты.* В работе использованы стероиды (прогестерон, прегненолон, 17α -гидроксипрегненолон, прегненолон-3-О-ацетат) производства Sigma-Aldrich, а также компоненты питательных сред YPD и YNB производства Difco Laboratories.

Исходные и трансформированные штаммы микроорганизмов. Исходным микроорганизмом служил *S. cerevisiae* GRF18 (Mata his3-11 his 3-15 leu2-3 leu2-112 cir+ canR). В качестве трансформантов использовали *S. cerevisiae* GRF18/YEp51 (трансформант штамма GRF18 с челночной плазмидой YEp51 – негативный контрольный штамм) и *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a, содержащий встроенный ген P450c17 под контролем промотора *GAL10* [8]. Исходный штамм *Y. lipolytica* E129 (MATA leu2-270 ura3-302 lys11-23 xpr2-322) использовали для трансформации с многокопийной интегративной плазмидой p67IC17a [16]. Вектор содержал экспрессионную кассету с кДНК

P450c17 под контролем промотора и терминатора изоцитратлиазы *ICL1* (индукция алканами, жирными кислотами, этанолом; репрессия глюкозой). Рекомбинантные линии гаплоидных и диплоидных штаммов *Y. lipolytica* использовали для биотрансформации стероидов после гетерологической экспрессии P450c17 из коры надпочечников и сверхэкспрессии собственной NADPH-зависимой, FAD/FMN-содержащей P450 редуктазы (CPR) дрожжей. Прототрофные диплоидные линии *Y. lipolytica* (линии E129A15, DE и DC) получены путем скрещивания гаплоидных мультикопийных трансформантов PO1d (MATA leu2-270 xpr2-322) или E129 (MATA leu2-270 lys211-23 xpr2-322) с диким ауксотрофным штаммом A1-5 (MATB met6) [14].

Культивирование трансформантов микроорганизмов и биотрансформация стероидов. Культивирование рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117a, индукцию биосинтеза P450C17 D-галактозой и биотрансформацию прогестерона проводили так же, как в работе [8]. В случае рекомбинантных линий дрожжей *Y. lipolytica* культивирование и индукция чужеродного белка и сверхэкспрессия собственной CPR осуществлялись так, как описано ранее [15, 16], путем добавления в среду индукторов – этанола или *n*-гексадекана до 1 % (v/v). При изучении влияния алифатических спиртов на ацелирование стероидов в *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117a дополнительно на стадии внесения субстрата в среду добавляли изоамиловый, амиловый, циклогексильный спирты или этанол (контроль) из расчета 0,5 % (v/v). Общая концентрация спиртов составляла 1,0 % (v/v).

Газохроматографический анализ. Анализ проб Δ^5 -стероидов проводился методом высокотемпературной капиллярной газофазной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе GC 17A, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и компьютерной системой контроля и анализа данных CLASS-VP (Shimadzu, Япония). Для анализа стероидов использовали колонку RTX 1 (Restek) с пленкой силиконового масла в качестве неподвижной фазы (длина 30 м, внутренний диаметр 3,2 мкм, толщина фазы 0,5 мкм). Скорость потока газа-носителя (N_2) составляла 1,1 мл/мин, температура инжектора и детектора – 310 °С. Используемая программа температурного градиента колонки: 0–16,7 мин – 200–300 °С (6 °С/мин), 16,7–20,0 мин – 300 °С. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

BLAST-анализ геномов на наличие гомологов Atf2p. Виртуальный поиск белков аналогов Atf2p *S. cerevisiae* в *Y. lipolytica* и других типов дрожжей, используемых для экспрессии цитохромов P450 стероидогенеза млекопитающих, осуществляли при помощи программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), используя доступные базы данных первичных последовательностей белков и алгоритмы их сравнения [20]. Для моделирования трехмерной структуры Atf2p, которая не имеет высокой степени гомологии с белками с экспериментально определенной трехмерной структурой, использовали интернет-ресурсы на основе технологии искусственного интеллекта AlphaFold2/ColabFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). Последовательность этого белка доступна на интернет-ресурсе Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) под кодами N1P2F9 (E1W10524). Трехмерные модели прегненолона и ДГЕА были загружены с ресурса Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>): коды веществ CID8955 и CID5881 соответственно. Для проведения расчетов параметров модельных белок-лигандных комплексов и анализа результатов использовали программу AutodockVina (размер области расчетов $5 \times 5 \times 5$ нм³) и программу-помощник FyTdock, для построения двухмерных графических представлений о рассчитанном положении стероидов – программу BioVia Discovery Studio.

Результаты и их обсуждение. Биотрансформация прегненолона *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a. Известно, что белки Atf2p и Atf1p могут катализировать образование ацетиловых эфиров изоамилового и ряда других алифатических спиртов в *S. cerevisiae* [21, 22]. Это послужило предпосылкой для использования ряда алифатических спиртов в качестве конкурентных субстратов Atf2p с целью уменьшения ацелирования прегненолона и его производных в дрожжах *S. cerevisiae*. Наличие в дрожжах собственной микросомальной FAD/FMN-содержащей цитохром P450-редуктазы (CPR) [23] способствовало их выбору как микроорганизмов-хозяев для получения 17 α -гидроксилированных стероидов.

Установлено, что при использовании неиндуцированных клеток прегненолон за 4 ч практически полностью превращался в 3-О-ацетат прегненолона, тогда как добавление в среду изоамилового спирта до 0,5 % (v/v) практически полностью подавляло ацелирование прегненолона (соотношение ацетата и субстрата уменьшалось в 8 раз (0,11 по сравнению 0,87 в контроле) (рис. 1).

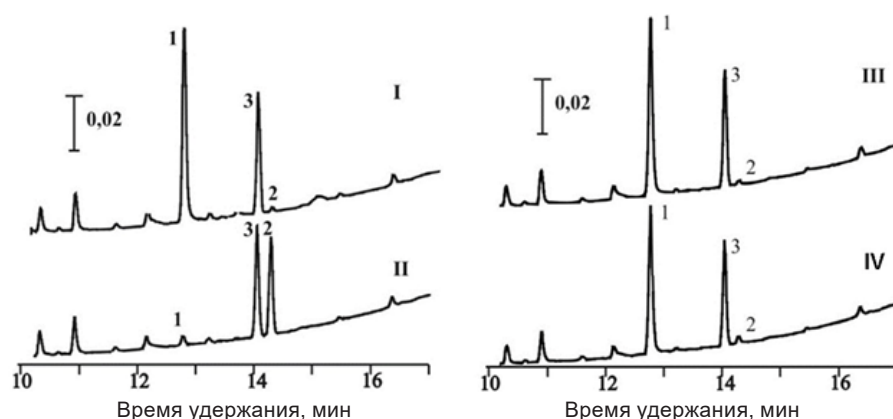


Рис 1. Хроматограммы ГЖХ-анализа биотрансформации прегненолона неиндуцированными клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α (I и II – контроль (0 и 4 ч соответственно); III и IV – с добавлением изоамилового спирта до 0,5 % (v/v) (0 и 4 ч соответственно)). 1 – прегненолон, 2 – прегненолона 3-О-ацетат, 3 – прогестерон (внутренний стандарт)

Fig. 1. Chromatograms of GC analysis of pregnenolone biotransformation by uninduced *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α cells (I and II – control (0 and 4 hours, respectively); III and IV – with the addition of isoamyl alcohol up to 0.5 % (v/v) (0 and 4 hours, respectively)). 1 – pregnenolone, 2 – pregnenolone 3-O-acetate, 3 – progesterone (internal standard)

С целью оценки применимости данного подхода в условиях активности встроенного P450c17 изучено, как добавление изоамилового, амилового и циклогексилового алифатических спиртов влияет на соотношение реакций 17 α -гидроксилирования и 3-О-ацетилирования в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α . За 4 ч биотрансформации при использовании амилового спирта наблюдалось уменьшение содержания неацетилированного 17 α -гидроксиpregненолона (как и при применении изоамилового спирта), тогда как как при использовании циклогексанола отмечался менее выраженный эффект (см. таблицу).

Установлено, что в концентрациях до 0,5 % исследованные алифатические спирты не оказывали влияния на рост используемого штамма дрожжей, что позволяет предположить отсутствие общего токсического эффекта. Возможная причина уменьшения степени 3-О-ацетилирования стероидов исследованными алифатическими спиртами заключалась в конкурентном превращении спирта и стероида ферментом Atf2p, что подтверждается каталитическими свойствами Atf2p [21, 22], а также сходством геометрии цикла А прегненолона и исследуемых спиртов (рис. 2).

Содержание прегненолона, 17 α -гидроксиpregненолона и их 3-О-ацетатов (%) при биотрансформации прегненолона индуцированными клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α (Preg, 17-Preg, Pac и 17-Pac-прегненолона, 17 α -гидроксиpregненолона, прегненолона 3-О-ацетата и 17 α -гидроксиpregненолона 3-О-ацетата соответственно), %

Relative content of pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone and their 3-O-acetates (%) during the biotransformation of pregnenolone by induced *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α cells (Preg, 17-Preg, Pac и 17-Pac-pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone, pregnenolone 3-O-acetate и 17 α -hydroxypregnenolone 3-O-acetate, respectively), %

Время биотрансформации	Спирт	Preg	17-Preg	Pac	17-Pac
2 ч	Изоамиловый	82,7	13,6	2,6	1,1
	Циклогексиловый	85,6	7,5	3,4	3,4
	Амиловый	86,9	9,8	3,3	0,0
	Этиловый (контроль)	77,1	8,2	9,9	4,9
4 ч	Изоамиловый	60,6	14,5	21,2	3,7
	Циклогексиловый	15,4	4,2	66,5	13,8
	Амиловый	60,9	14,4	21,2	3,6
	Этиловый (контроль)	4,3	2,8	74,9	18,1

Примечание. Preg – прегненолон, 17-Preg – 17 α -гидроксиpregненолон, Pac – прегненолон 3-О-ацетат, 17-Pac – 17 α -гидроксиpregненолон 3-О-ацетат.

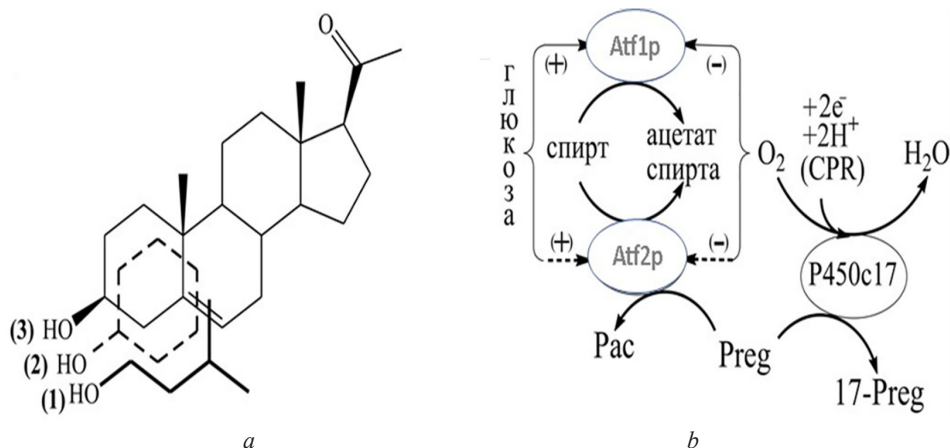


Рис. 2. Структуры субстратов Atf2p и предполагаемый характер их совместного метаболизма с помощью P450c17 и Atf2p в *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a: a – схожие фрагменты структур гипотетического (2) и установленных (1 и 3) субстратов Atf2p (1 – изоамиловый спирт (жирная сплошная), 2 – циклогексанол (жирная пунктирная), 3 – прегненолон (тонкая сплошная)); b – предложенная схема начального этапа совместного метаболизма алифатических спиртов и прегненолона в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a и потенциальное влияние кислорода и глюкозы на данный процесс [6]. Preg, 17-Preg и Pac – прегненолон, 17 α -гидроксиpregненолон и прегненолон 3-O-ацетат соответственно; (+) и (–) – индукция и репрессия биосинтеза ферментов Atf1p и Atf2p

Fig. 2. Structures of Atf2p substrates and the proposed pattern of their co-metabolism by P450c17 and Atf2p in *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a: a – similar fragments of the structures of hypothetical (2) and established (1 and 3) substrates of Atf2p (1 – isoamyl alcohol (fat solid), 2 – cyclohexanol (bold dotted line), 3 – pregnenolone (thin solid)); b – proposed scheme of the initial stage of the joint metabolism of aliphatic alcohols and pregnenolone in induced *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a cells and the potential influence of oxygen and glucose on this process according to [6]. Preg, 17-Preg and Pac – pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone and pregnenolone 3-O-acetate, respectively; (+) and (–) – induction and repression of the biosynthesis of the enzymes Atf1p and Atf2p

Наблюдаемая слабая конкуренция алифатических спиртов с прегненолоном может быть отнесена к быстрому ацетилированию спиртов посредством Atf1p, не способного превращать прегненолон в его ацетилированную форму, что отражено на рис. 2. Подавлению ацетилирования 3 β -гидроксистероидов в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a, экспрессирующих P450c17, также может препятствовать понижение внутриклеточного содержания кислорода (репрессора гена Atf1p), который затрачивается на активность по P450c17-зависимому 17 α -гидроксилированию прегненолона (рис. 2). Изоамиловый спирт и его ацетат являются естественными метаболитами аминокислоты лейцина в дрожжах *S. cerevisiae*, а 2-метилбутиловый – естественным метаболитом изолейцина [24], что создает предпосылки для использования этой аминокислоты как регулятора ацетилирования прегненолона и родственных стероидов *S. cerevisiae*.

BLAST-анализ Y. lipolytica и превращение стероидов трансгенными штаммами, экспрессирующими P450c17. Анализ аминокислотных последовательностей белков протеома *Y. lipolytica* по базе NCBI (алгоритм BLAST) показал явное отсутствие аналогов Atf2p в этих дрожжах. Установлено также отсутствие гомологов (возможных функциональных аналогов Atf2p) и для дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [25] и *Pichia pastoris* [26], для которых показана функциональная активность *in cellulo* встроенных ферментов стероидогенеза млекопитающих, использующих прегненолон как субстрат (P450c17, CYP21, 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа) или как продукт (CYP11A1). Согласно нашим данным, для этих микроорганизмов не сообщалось об ацетилировании прегненолона и ДГЕА, однако у *Pichia fermentans* ITD00165 зарегистрировано образование ацетата изоамилового спирта [27]. Среди дрожжей и грибов белки с хорошей гомологией с Atf2p дрожжей *S. cerevisiae* обнаружены у *Nakaseomyces glabratus*, *Vanderwaltozyma polyspora* DSM 70294, *Tetrapisispora phaffii* CBS 4417 (покрытие последовательности не менее 98 %, E-value от 0.0 до 1e-172). Отрицательный результат поиска гомологов Atf2p получен и у других организмов, для которых описана экспрессия стероидогенных ферментов млекопитающих: у бактерии *E. coli* [28, 29], растений [30] и *Homo sapiens* [31]. Однако следует учитывать и возможность существования функциональных аналогов Atf2p, не характеризующихся высокой сте-

пению гомологии с ферментом-прототипом. Например, показано, что прегненолон в присутствии олеил-КоА человека способен превращаться в прегненолона олеат под действием ацилтрансферазы 1 (ACAT1), не являющейся гомологом Atf2p [32, 33]. При этом не установлено превращение прегненолона в 3-О-ацетат. Также важно отметить, что P450c17-экспрессирующие трансгенные клетки дрожжей, не имеющие Atf2p, как клеточная модель больше подходят для тестирования лекарственных веществ.

Биотрансформация прегненолона *Y. lipolytica* DE5-54.1. При использовании клеток *Y. lipolytica*, экспрессирующих P450c17 под контролем промотора *ICL1*, прегненолон за 6 ч количественно превращается в 17 α -гидроксиpregненолон без каких-либо дополнительных продуктов, включая 3-О-ацетаты (рис. 3).

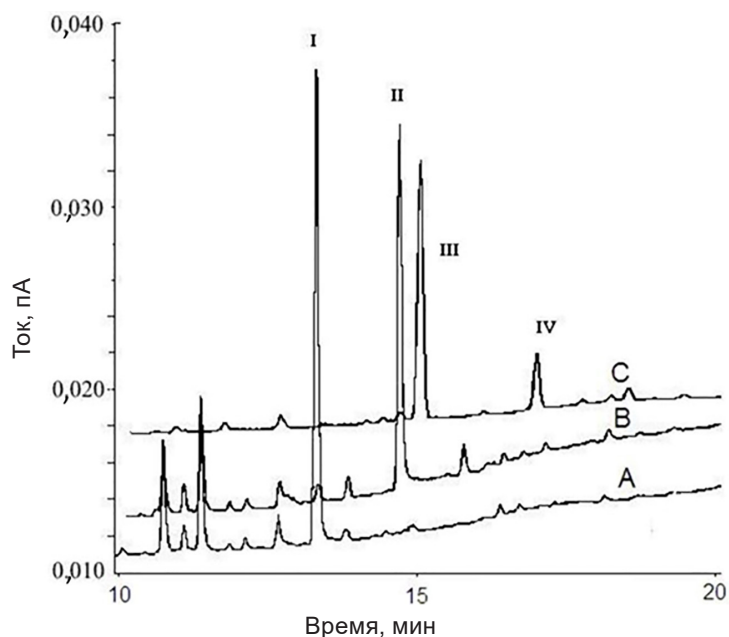


Рис. 3. Газохроматографический анализ проявления прегненолона рекомбинантными дрожжами *Y. lipolytica* и *S. cerevisiae*, экспрессирующими P450c17. I – прегненолон, II – 17 α -гидроксиpregненолон, III и IV – 3-О-ацетаты прегненолона и 17 α -гидроксиpregненолона; A, B – *Y. lipolytica* DE5-54.1 (0 и 6 ч биотрансформации соответственно), C – *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α (4 ч биотрансформации)

Fig. 3. Gas chromatography analysis of the manifestation of pregnenolone by recombinant yeasts *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae* expressing P450c17. I – pregnenolone, II – 17 α -hydroxypregnenolone, III and IV – 3-O-acetates of pregnenolone and 17 α -hydroxypregnenolone; A, B – *Y. lipolytica* DE5-54.1 (0 and 6 h of biotransformation, respectively), C – *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α

Таким образом, показано отсутствие прегненолон-ацетилазной активности *Y. lipolytica* в условиях эксперимента. Возможно, это является следствием отсутствия соответствующих ферментов (данные BLAST) или незначительного уровня их экспрессии вследствие минимального использования глюкозы – потенциального индуктора Atf2p. Поскольку Atf2p не имеет хороших гомологов среди белков с известной трехмерной структурой из базы данных PDB, ранее было невозможно получить компьютерную модель этого фермента для прогноза связывания и превращения веществ по методологии докинга. Недавно на базе искусственного интеллекта AlphaFold2 были созданы алгоритм и сервис на его основе, где можно смоделировать трехмерную структуру белка по его аминокислотной последовательности (в настоящей работе смоделирована структура белка Atf2p). Далее эту структуру использовали для проведения докинга с прегненолоном и ДГЕА. В результате показана возможность связывания этих стероидов с Atf2p, что предполагает близкую колокализацию гидроксигрупп этих стероидов и имидазольного цикла гистидина 189 (His189) (рис. 4).

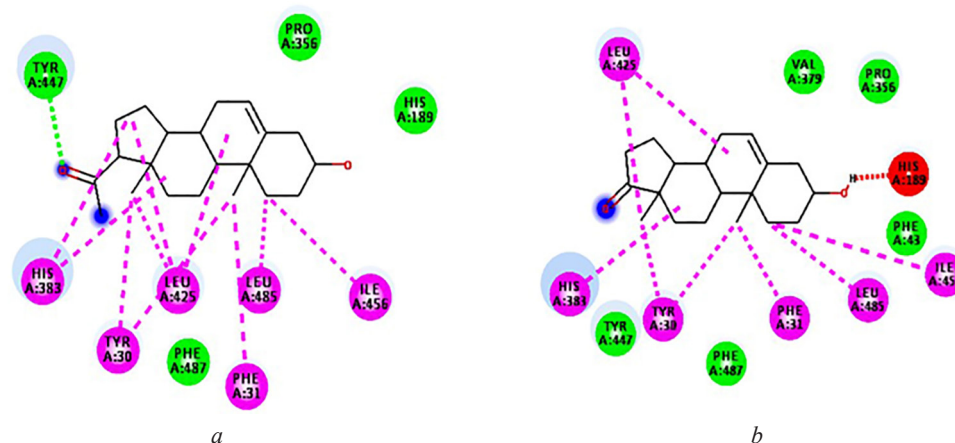


Рис. 4. Рассчитанные положения прегненолона (a) и ДГЕА (b) в полости модельной структуры Atf2p, показывающие возможную роль His189 в катализе переноса ацетильной группы на 3β-гидроксигруппу этих стероидов

Fig. 4. Calculated positions of pregnenolone (a) and DHEA (b) in the cavity of the Atf2p model structure, showing the possible role of His189 in catalyzing the transfer of the acetyl group to the 3β-hydroxy group of these steroids

Полученные результаты показали близкое расположение 3β-гидроксигруппы прегненолона и ДГЕА вблизи His189 этого белка. По данным литературы, остатки гистидина выполняют каталитические функции в различных ацил-КоА ацилтрансферазах [32, 33].

Согласно полученным результатам, в дрожжах *Y. lipolytica* прегненолон и 17α-гидрокси-прегненолон не подвергаются 3-О-ацетилированию вследствие отсутствия (по данным BLAST и данных о геноме этих дрожжей) аналога Atf2p. Данный факт наряду с разработкой этого организма как объекта генно-инженерных манипуляций по «встраиванию» систем экспрессии для ферментных систем стероидогенеза (P450ssc, аденодоксина, аденодоксин-редуктазы, P450c17) под контролем *ICL*-промотора [8, 9, 14–16] способствует созданию эффективных биокатализаторов получения стероидных гормонов. С другой стороны, трансгенные дрожжи *Y. lipolytica*, экспрессирующие P450c17, могут быть использованы как модель стероидогенных клеток млекопитающих для скрининга ингибиторов P450c17 – потенциальных лекарств для терапии рака простаты. Отсутствие 3-О-ацетилирования позволяет с помощью таких дрожжей тестировать ряд ингибиторов на основе производных 3β-гидрокси-Δ⁵-стероидов, в частности аналогов абиратерона – соединения-лидера при лечении рака предстательной железы [34], которые характеризуются большим сродством взаимодействия с P450c17 по сравнению с их аналогами 3-кето-Δ⁴-гидроксистероидов [31, 35, 36].

Заключение. Показано, что добавление алифатических спиртов – изоамилового и амилового – уменьшает степень ацетилирования прегненолона и 17α-гидрокси-прегненолона на среде YPD клетками дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a, не содержащими и содержащими предварительно индуцированный D-галактозой P450c17. Этот эффект является следствием конкурентного метаболизма стероидных и нестероидных спиртов фермента Atf2p. Таким образом, реализован подход, позволяющий уменьшить нежелательные свойства генно-инженерного биокатализатора путем специальных добавок в среду для культивирования. Однако этот подход не обеспечил полного устранения побочной реакции вследствие токсичности спиртов при концентрациях более 1 % и их метаболизма ферментом Atf1p. В связи с этим была исследована другая комбинация «микроорганизм-хозяин и система экспрессии». Показано отсутствие прегненолон-ацетилазной активности у *Y. lipolytica* в условиях экспрессии встроенного P450c17 под контролем промотора *ICL1* из-за отсутствия, по данным гомологии, аналогов фермента Atf2p. Таким образом, нами продемонстрировано, как анализ генома микроорганизма-хозяина способствует прогнозу нежелательных свойств нового биокатализатора и минимизации числа необходимых генно-инженерных операций для его создания.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований (номера госрегистрации 20065241, 20103068 и 20210560).

Acknowledgements. The work was financially supported by the Government program for scientific research (numbers of state registration 20065241, 20103068 and 20210560).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Charney, W. Microbial transformation of steroids / W. Charney, H. L. Herzog. – New York: Academic Press, 1967. – 728 p.
2. Ахрем, А. А. Стероиды и микроорганизмы / А. А. Ахрем, Ю. А. Титов. – М.: Наука, 1970. – 525 с.
3. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments / P. Fernandes [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2003. – Vol. 32, N 6. – P. 688–705. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
4. Новые подходы к синтезу стероидов / В. М. Шкуматов [и др.] // Выбранные научные работы Белорусского государственного университета: у 7 т. / В. В. Свирыдаў (адк. рэд.) [і інш.]. – Т. 5: Хімія. – Мінск, 2001. – С. 447–460.
5. Marshech, W. J. Microbial degradation of sterols / W. J. Marshech, S. Kraychy, R. D. Muir // *Appl. Microbiol.* – 1972. – Vol. 23, N 1. – P. 72–77. <https://doi.org/10.1128/am.23.1.72-77.1972>
6. Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism / G. Cauet [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 261, N 1. – P. 317–324. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00282.x>
7. Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian steroid hydroxylase CYP7B: Ayr1p and Fox2p display 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity / P. Vico [et al.] // *Yeast.* – 2002. – Vol. 19, N 10. – P. 873–886. <https://doi.org/10.1002/yea.882>
8. Биотрансформация стероидов рекомбинантным штаммом дрожжей, экспрессирующим бычий цитохром P-45017 α / В. М. Шкуматов [и др.] // *Биохимия.* – 2002. – Т. 67, № 4. – С. 547–560.
9. Окисление 17 α ,20 β - и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-онов, побочных продуктов биотрансформации прогестерона, рекомбинантными микроорганизмами, экспрессирующими цитохром P-45017 α / В. М. Шкуматов [и др.] // *Биоорган. химия.* – 2003. – Т. 29, № 6. – С. 640–647.
10. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast / F. M. Szczebara [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, N 2. – P. 143–148. <https://doi.org/10.1038/nbt775>
11. Manosroi, J. Enhancement of 17 α -hydroxyprogesterone production from progesterone by biotransformation using hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation technique / J. Manosroi, S. Saowakhon, A. Manosroi // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 112, N 4–5. – P. 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.10.003>
12. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications / P. Fickers [et al.] // *FEMS Yeast Res.* – 2005. – Vol. 5, N 6–7. – P. 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
13. Zinjarde, S. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 / S. Zinjarde, A. Pant // *J. Basic. Microbiol.* – 2002. – Vol. 42, N 1. – P. 67–73. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M)
14. Mauersberger, S. Cytochrome P450 expression in *Yarrowia lipolytica* and its use in steroid biotransformation / S. Mauersberger, L. A. Novikova, V. M. Shkumatov // *Yarrowia lipolytica* / ed. G. Barth. – New York, 2013. – P. 171–226. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38583-4_7
15. Влияние модификаторов биосинтеза стероидов на биотрансформацию прогестерона рекомбинантными микроорганизмами экспрессирующими цитохром P450c17 / В. М. Шкуматов [и др.] // *Биомед. химия.* – 2006. – Т. 52, № 3. – С. 298–308.
16. Субстратная специфичность и реакции биотрансформации стероидов, осуществляемые рекомбинантными микроорганизмами *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующими цитохром P450c17 / В. М. Шкуматов [и др.] // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 539–546.
17. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains / Yu. Zhang [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 2017. – Vol. 39, N 7. – P. 1033–1039. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2331-4>
18. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system / R. Zhang [et al.] // *ACS Synth. Biol.* – 2019. – Vol. 8, N 12. – P. 2666–2678. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00018>
19. Xu, S. Optimization of campesterol-producing yeast strains as a feasible platform for the functional reconstitution of plant membrane-bound enzymes / S. Xu, X. Teng, Y. Li // *ACS Synth. Biol.* – 2023. – Vol. 12, N 4. – P. 1109–1118. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00599>
20. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices / S. F. Altschul [et al.] // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272, N 20. – P. 5101–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>
21. Production of isoamyl acetate in acka-pta and/or ldh mutants of *Escherichia coli* with overexpression of yeast ATF2 / R. V. Vadali [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 63, N 6. – P. 698–704. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1452-y>
22. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene / T. Fujii [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 3. – P. 910–915. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.910-915.1997>
23. Expression of human liver cytochrome P450 IIIA4 in yeast. A functional model for the hepatic enzyme / J. Renaud [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – Vol. 194, N 3. – P. 889–896. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19483.x>
24. Yuan, J. Engineering the leucine biosynthetic pathway for isoamyl alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* / J. Yuan, P. Mishra, C. B. Ching // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 44, N 1. – P. 107–117. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1855-2>
25. Corticosteroid biosynthesis revisited: no direct hydroxylation of pregnenolone by steroid 21-hydroxylase / S. Loke [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – Art. 633785. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.633785>
26. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase $\alpha 3\beta 1$ isoform / M. Hirz [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97, N 21. – P. 9465–9478. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5156-7>
27. Screening of native yeast from *Agave duranguensis* fermentation for isoamyl acetate production / G. Hernández-Carbajal [et al.] // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2013. – Vol. 56, N 3. – P. 357–363. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300002>
28. Ehmer, P. B. Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli* / P. B. Ehmer, J. Jose, R. W. Hartmann // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 75, N 1. – P. 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00137-0)
29. Barnes, H. J. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli* / H. J. Barnes, M. P. Arlotto, M. R. Waterman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, N 13. – P. 5597–5601. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5597>

30. *De novo* progesterone synthesis in plants [Electronic resource] / R. Li [et al.] // bioRxiv. – 2023. – Mode of access: <https://doi.org/10.1101/2023.07.19.549634>. – Date of access: 31.05.2024.
31. Prostate cancer androgen biosynthesis relies solely on CYP17A1 downstream metabolites / G. Snarterse [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2024. – Vol. 236. – Art. 106446. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106446>
32. Cellular pregnenolone esterification by acyl-CoA:cholesterol acyltransferase / M. A. Rogers [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, N 21. – P. 17483–17492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331306>
33. A critical role for the histidine residues in the catalytic function of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase catalysis: evidence for catalytic difference between ACAT1 and ACAT2 / S. An [et al.] // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580, N 11. – P. 2741–2749. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.035>
35. Inhibitors of enzymes of androgen biosynthesis: cytochrome P45017 α and 5 α -steroid reductase / M. Jarman [et al.] // *Nat. Prod. Reports.* – 1998. – Vol. 15, N 5. – P. 495–512. <https://doi.org/10.1039/A815495Y>
36. Differential induction of C6 glioma apoptosis and autophagy by 3 β -hydroxysteroid-indolamine conjugates / J. Panada [et al.] // *Steroids.* – 2023. – Vol. 200. – Art. 109326. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109326>

References

- Charney W., Herzog H. L. *Microbial transformation of steroids*. New York, Academic Press Publ., 1967. 728 p.
- Akhrem A. A., Titov Yu. A. *Steroids and microorganisms*. Moscow, Nauka Publ., 1970. 525 p. (in Russian).
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H. M., Cabral J. M. S. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, vol. 32, no. 6, pp. 688–705. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Radyuk V. G., Frolova N. S., Raikov A. V., Novikova L. A., Nazarov P. A., Druitsa V. L., Luzikov V. N. New approaches to the synthesis of steroids. *Selected scientific practices of the Belarusian State University. Vol. 5. Chemistry*. Minsk, 2001, pp. 447–460 (in Russian).
- Marsheck W. J., Kraychy S., Muir R. D. Microbial degradation of sterols. *Applied Microbiology*, 1972, vol. 23, no. 1, pp. 72–77. <https://doi.org/10.1128/am.23.1.72-77.1972>
- Cauet G., Degryse E., Ledoux C., Spagnoli R., Achstetter T. Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. *European Journal of Biochemistry*, 1999, vol. 261, no. 1, pp. 317–324. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00282.x>
- Vico P., Cauet G., Rose K., Lathe R., Degryse E. Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian steroid hydroxylase CYP7B: Ayr1p and Fox2p display 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Yeast*, 2002, vol. 19, no. 10, pp. 873–886. <https://doi.org/10.1002/yea.882>
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Poljakov Y. S., Frolova N. S., Radyuk V. G., Mauersberger S., Chernogolov A. A., Honeck H., Schunck W.-H. Biotransformation of steroids by a recombinant yeast strain expressing bovine cytochrome P-45017 α . *Biochemistry (Moscow)*, 2002, vol. 67, no. 4, pp. 456–467 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/A:1015290108071>
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Radyuk V. G., Kashkan Zh. N., Kovganko N. V., Juretzek T., Mauersberger S. Oxidation of 17 α ,20 β - and 17 α ,20 α -dihydroxypregn-4-en-3-ones, side products of progesterone biotransformation with recombinant microorganisms expressing cytochrome P-45017 α . *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2023, vol. 29, pp. 581–587 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000008900.54667.d9>
- Szchebara F. M., Chandelier C., Villeret C., Masurel A., Bourot S., Duport C. [et al.]. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature Biotechnology*, 2003, vol. 21, no. 2, pp. 143–148. <https://doi.org/10.1038/nbt775>
- Manosroi J., Saowakhon S., Manosroi A. Enhancement of 17 α -hydroxyprogesterone production from progesterone by biotransformation using hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation technique. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, vol. 112, no. 4–5, pp. 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.10.003>
- Fickers P., Benetti P.-H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M. S., Nicaud J.-M. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 2005, vol. 5, no. 6–7, pp. 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
- Zinjarde S., Pant A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*, 2002, vol. 42, no. 1, pp. 67–73. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M)
- Mauersberger S., Novikova L. A., Shkumatov V. M. Cytochrome P450 expression in *Yarrowia lipolytica* and its use in steroid biotransformation *Yarrowia lipolytica*. New York, 2013, pp. 171–226. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38583-4_7
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Frolova N. S., Barth G., Mauersberger S. Effect of steroid biosynthesis modifiers on progesterone biotransformation by recombinant yeasts expressing cytochrome P450c17. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, Suppl. Ser. B, vol. 1, pp. 87–94 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1990750807010131>
- Shkumatov V. M., Frolova N. S., Rudaya E. V., Faletrov Ya. V., Mauersberger S., Barth G. Range of substrates and steroid bioconversion reactions performed by recombinant microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* expressing cytochrome P450c17. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, vol. 42, pp. 472–478 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S000368380605005x>
- Zhang Yu., Wang Y., Yao M., Liu H., Zhou X., Xiao W., Yuan Y. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnology Letters*, 2017, vol. 39, no. 7, pp. 1033–1039. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2331-4>
- Zhang R., Zhang Y., Wang Y., Yao M., Zhang J., Liu H., Zhou X., Xiao W., Yuan Y. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system. *ACS Synthetic Biology*, 2019, vol. 8, no. 12, pp. 2666–2678. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00018>
- Xu S., Teng X., Li Y. Optimization of campesterol-producing yeast strains as a feasible platform for the functional reconstitution of plant membrane-bound enzymes. *ACS Synthetic Biology*, 2023, vol. 12, no. 4, pp. 1109–1118. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00599>
- Altschul S. F., Wootton J. C., Gertz E. M., Agarwala R., Morgulis A., Schäffer A. A., Yu Y.-K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal*, 2005, vol. 272, no. 20, pp. 5101–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>

21. Vadali R. V., Horton C. E., Rudolph F. B., Bennett G. N., San K.-Y. Production of isoamyl acetate in acka-pta and/or ldh mutants of *Escherichia coli* with overexpression of yeast ATF2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, vol. 63, no. 6, pp. 698–704. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1452-y>
22. Fujii T., Kobayashi O., Yoshimoto H., Furukawa S., Tamai Y. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 3, pp. 910–915. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.910-915.1997>
23. Renaud J., Cullin Ch., Pompon D., Beaune Ph., Mansuy D. Expression of human liver cytochrome P450 IIIA4 in yeast. A functional model for the hepatic enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 1990, vol. 194, no. 3, pp. 889–896. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19483.x>
24. Yuan J., Mishra P., Ching C. B. Engineering the leucine biosynthetic pathway for isoamyl alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, vol. 44, no. 1, pp. 107–117. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1855-2>
25. Loke S., Stoll A., Machalz D., Botrè F., Wolber G., Bureik M., Parr M. K. Corticosteroid biosynthesis revisited: no direct hydroxylation of pregnenolone by steroid 21-hydroxylase. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2021, vol. 12, art. 633785. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.633785>
26. Hirz M., Richter G., Leitner E., Wriessnegger T., Pichler H. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase $\alpha 3\beta 1$ isoform. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, vol. 97, no. 21, pp. 9465–9478. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5156-7>
27. Hernández-Carbajal G., Rutiaga-Quiñones O. M., Pérez-Silva A., Saucedo-Castañeda G., Medeiros A., Soccol C. R., Soto-Cruz N. Ó. Screening of native yeast from Agave duranguensis fermentation for isoamyl acetate production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2013, vol. 56, no. 3, pp. 357–363. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300002>
28. Ehmer P. B., Jose J., Hartmann R. W. Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, vol. 75, no. 1, pp. 57–63. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00137-0)
29. Barnes H. J., Arlotto M. P., Waterman M. R. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1991, vol. 88, no. 13, pp. 5597–5601. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5597>
30. Li R., Guo S., Wang D., Yang T., Zhang X., Dai Z. *De novo* progesterone synthesis in plants. *BioRxiv*, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1101/2023.07.19.549634> (accessed 31.05.2024).
31. Snaterse G., Taylor A. E., Moll J. M., O’Neil D. M., Teubel W. J., van Weerden W. M., Arlt W., Hofland J. Prostate cancer androgen biosynthesis relies solely on CYP17A1 downstream metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2024, vol. 236, art. 106446. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106446>
32. Rogers M. A., Liu J., Kushnir M. M., Bryleva E., Rockwood A. L., Meikle A. W., Shapiro D., Vaisman B. L., Remaley A. T., Chang C. C. Y., Chang T. Y. Cellular pregnenolone esterification by acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 21, pp. 17483–17492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331306>
33. An S., Cho K.-H., Lee W. S., Lee J.-O., Paik Y.-K., Jeong A. T.-S. A critical role for the histidine residues in the catalytic function of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase catalysis: evidence for catalytic difference between ACAT1 and ACAT2. *FEBS Letters*, 2006, vol. 580, no. 11, pp. 2741–2749. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.035>
35. Jarman M., Smith H. J., Nicholls P. J., Simons C. Inhibitors of enzymes of androgen biosynthesis: cytochrome P45017 α and 5 α -steroid reductase. *Natural Product Reports*, 1998, vol. 15, no. 5, pp. 495–512. <https://doi.org/10.1039/A815495y>
36. Panada J., Klopava V., Kulahava T., Koran S., Faletrov Y., Frolova N., Fomina E., Shkumatov V. Differential induction of C6 glioma apoptosis and autophagy by 3 β -hydroxysteroid-indolamine conjugates. *Steroids*, 2023, vol. 200, art. 109326. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109326>

Информация об авторах

Фалетров Ярослав Вячеславович – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета (ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslav82@tut.by

Фролова Нина Степановна – науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета (ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: frolova_n_2006@bk.ru

Штефан Мауерсбергер – д-р наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии Дрезденского технологического университета (Хедда Фогель, 01062, г. Дрезден, Германия).

Шкуматов Владимир Макарович – член-корреспондент, д-р биол. наук.

Information about the authors

Yaroslav V. Faletrov – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Leading Researcher. Research Institute for Physicochemical Problems of Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslav82@tut.by

Nina S. Frolova – Researcher. Research Institute for Physicochemical Problems of Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: frolova_n_2006@bk.ru

Stephan Mauersberger – D. Sc., Senior Researcher. Institute of Microbiology, Dresden University of Technology (Hedda Vogel, 01062, Dresden, Germany). E-mail: Stephan.Mauersberger@tu-dresden

Vladimir M. Shkumatov – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.).

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 612.821:[615.281.8+615.214.32]-092.9

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-217-223>

Поступила в редакцию 12.12.2023

Received 12.12.2023

Н. И. Филина, М. Н. Курбат

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ НЕКОТОРЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ПРЕПАРАТОВ AZT (ЗИДОВУДИН) И S-АДЕНОЗИЛ-L-МЕТИОНИН

Аннотация. Известно, что антиретровирусный препарат зидовудин (AZT), зарекомендовавший себя не только в лечении ВИЧ-инфекции, оказывает побочные эффекты на центральную нервную систему. В основе патогенеза всех психопатологических симптомов лежат процессы активации и торможения нейромедиаторных систем, поэтому целью данной работы являлось сравнение показателей, характеризующих основные моноаминергические системы головного мозга крыс, включая уровни аминокислот-предшественников и метаболитов, в различных его отделах при воздействии лекарственных средств зидовудин (AZT) и гептрал (SAM) по отдельности и в комбинации и оценка возможного корректирующего эффекта S-аденозилметионина в условиях эксперимента. Последний обладает потенциальным нейропротекторным действием, уменьшая выраженность когнитивных нарушений при старении мозга, что связано с ингибированием окислительного стресса и нейровоспаления. Результаты эксперимента показали, что эффект AZT в большей степени проявляется на функционировании дофаминергической нейромедиаторной системы гипоталамуса (повышение уровня дофамина), а также стриатума и ствола головного мозга крыс (снижение содержания нейромедиатора), при этом увеличение концентрации серотонина наблюдается только в стволе. Применение SAM на фоне AZT приводило к нормализации содержания дофамина в гипоталамусе, стриатуме и стволе головного мозга крыс, а применение серотонина нормализовало его уровень в стволе, что свидетельствует о корректирующем эффекте препарата в отношении исследуемых показателей. При комбинированном применении SAM и AZT показатели концентрации серотонина во всех изученных отделах головного мозга крыс увеличивались и были близки к их значениям в группе животных, получавших только SAM.

Ключевые слова: AZT, SAM, дофамин, головной мозг крыс, серотонин, нейромедиаторная система, корректирующий эффект

Для цитирования: Филина, Н. И. Особенности функционирования дофаминергической и серотонинергической нейромедиаторных систем некоторых отделов головного мозга крыс при введении препаратов AZT (зидовудин) и S-аденозил-L-метионин / Н. И. Филина, М. Н. Курбат // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 217–223. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-217-223>

Nina I. Filina, Mikhail N. Kurbat

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

FEATURES OF THE FUNCTIONING OF DOPAMINERGIC AND SEROTONERGIC NEUROTRANSMITTER SYSTEMS OF SOME PARTS OF THE RAT BRAIN AFTER AZT (ZIDOVUDINE) AND S-ADENOSYL-L-METHIONINE DRUGS ADMINISTRATION

Abstract. Zidovudine (AZT) is an antiretroviral drug that has proven itself not only in treating HIV infection, but is associated with side effects on the central nervous system. All psychopathological symptoms are based on the processes of activation and inhibition of neurotransmitter systems, therefore, the purpose of this work was a comparative study of indicators characterizing the main monoaminergic systems of the brain of rats, including levels of amino acids precursors and metabolites, in different parts of the brain of rats when exposed to drugs zidovudine (AZT) and heptal (SAM) individually and in combination; to evaluate a possible corrective effect of S-adenosyl-L-methionine under experimental conditions. The latter has a potential neuroprotective effect on improving cognitive impairment during brain aging, which is associated with inhibiting oxidative stress and neuroinflammation. The results of the experiment showed that the effect of AZT is reflected to a greater extent on the functioning of the dopaminergic neurotransmitter system of the hypothalamus (increased dopamine levels), the striatum and midbrain of rats (decreased neurotransmitter content), an increase in serotonin concentration was noted only in the midbrain. The use of SAM against the background of AZT led to normalizing the dopamine content in the hypothalamus, striatum and brain stem of rats, serotonin – in the stem, which indicates the corrective effect of the drug on the studied neurotransmitter systems. The combined use of SAM and AZT leads to increasing serotonin concentrations in all studied parts of the brain of rats and are close to the values in the group of animals treated only with SAM.

Keywords: AZT, SAM, dopamine, brain of rats, serotonin, neurotransmitter system, corrective effect

For citation: Filina N. I., Kurbat M. N. Features of the functioning of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems of some parts of the rat brain after AZT (zidovudine) and S-adenosyl-L-methionine drugs administration. *Vestsi Natsyyanal' nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 217–223 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-217-223>

Введение. В настоящее время миллионы ВИЧ-инфицированных людей во всем мире получают антиретровирусную терапию (АРТ), которая подавляет репликацию вируса и улучшает иммунные реакции хозяина. Антиретровирусный препарат (АРВП) зидовудин (AZT), нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы, показан для лечения не только ВИЧ-инфекции. Сегодня активно ведутся исследования по изучению противоопухолевых эффектов этого препарата, а также его способности ингибировать другие вирусы, например аденовирус и вирус гепатита В. АРВП оказывают различные побочные эффекты на центральную и периферическую нервную систему, включая манию, психоз и нейропсихиатрические осложнения (депрессия, когнитивные нарушения, ухудшение памяти и нарушение сна) [1–3].

Механизмы, лежащие в основе данных нарушений, изучены недостаточно, поэтому необходимы дополнительные исследования для разработки эффективных методов лечения.

В основе патогенеза всех психопатологических симптомов, как психотических и аффективных, так и невротических и психосоматических, лежат процессы активации и торможения одних и тех же нейромедиаторных систем: ГАМК-ергических, серотониновых, дофаминовых, норадреналиновых и многих других [4].

Результаты недавних исследований показали изменение содержания нейромедиаторов (дофамина и серотонина) и их метаболитов в спинномозговой жидкости (СМЖ) у получающих супрессивную АРТ ВИЧ-инфицированных лиц, у многих из которых диагностирована депрессия. Однако воздействие антидепрессантов на нейромедиаторы нельзя исключать как фактор, влияющий на результаты [5]. Несмотря на невозможность изучения непосредственно тканей головного мозга человека, актуальность этих исследований не вызывает сомнений.

Применение S-аденозил-L-метионина как универсального донора метила является перспективным в лечении критических нейропсихиатрических заболеваний, поскольку он эффективно устраняет депрессивные симптомы и когнитивную дисфункцию [6]. Вещество обладает потенциальным нейропротекторным действием, уменьшая выраженность когнитивных нарушений, характерных при старении мозга, что связано с ингибированием окислительного стресса и нейровоспаления, а также сигналов $\alpha_7\text{nAChR}$ [7].

Высокая биологическая активность SAM вызвала интерес к изучению его влияния на обмен моноаминов в мозге. Проведенные на животных эксперименты по изучению влияния SAM на различные звенья метаболизма моноаминов показали противоречивые результаты. Так, при его введении в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно уровень серотонина в структурах мозга животных увеличивался в 2 раза [8].

Достоверно известно о снижении концентрации S-аденозилметионина в СМЖ при ВИЧ-инфекции, а введение SAM в течение 14 сут повышала уровень вещества в СМЖ [9].

Цель работы – сравнение показателей, характеризующих основные моноаминергические системы головного мозга крыс, включая уровни аминокислот-предшественников и метаболитов, в различных его отделах при воздействии лекарственных средств зидовудин (AZT) и гептрал (SAM) по отдельности и в комбинации и оценка возможного корригирующего эффекта S-аденозилметионина в условиях эксперимента.

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на 28 белых беспородных крысах-самцах массой 200–240 г, содержащихся на стандартном рационе вивария без ограничения доступа к воде. Крысы были разделены на четыре группы: контрольную и три опытные, по 7 особей в каждой. Все препараты вводили внутривенно (в/ж) через зонд в суспензии на 0,9%-ном растворе натрия хлорида. Животные 1-й группы («SAM») получали SAM в дозе 100 мг/кг/сут в течение 14 сут, 2-й группы («AZT») – AZT в дозе 100 мг/кг/сут в течение 21 сут. Животным 3-й группы («AZT + SAM») на фоне AZT вводили SAM, начиная с 8-х суток примене-

ния AZT. Контрольные животные получали в/ж эквивалентное количество 0,9%-ного раствора натрия хлорида. За 12 ч до забоя животных лишали пищи, но они имели доступ к воде как источнику питья.

Все манипуляции выполняли в соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном обращении с животными. После декапитации животных головной мозг извлекали, промывали охлажденным 0,9%-ным раствором натрия хлорида и выделяли исследуемые отделы, которые затем замораживали в жидком азоте.

Содержание катехоламинов, серотонина и их метаболитов, а также аминокислот-предшественников (тирозина, триптофана и 5-окситриптофана) определяли с помощью ион-парной ВЭЖХ с детектированием по флуоресценции (280/340 нм). Колонка 2,1×150 мм Zorbax Eclipse Plus C18, 3,5 мкм (Agilent Technologies, США) термостатировалась при 28 °С. Подвижная фаза: 0,1 М NaH₂PO₄, 0,034 М CH₃COOH, pH 3,65; 110 мг/л октилсульфоната натрия, 50 мг/л ЭДТА, 4,5 % (об.) ацетонитрила. Скорость потока 0,2 мл/мин [10]. Для идентификации определяемых соединений и количественной обработки хроматограмм использовали ванилиновую кислоту в качестве внутреннего стандарта.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0 с применением *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок после контроля нормальности распределения с помощью критерия Колмагорова–Смирнова. В случае отклонения распределения от нормального достоверность различий проверяли с помощью теста Краскела–Уоллиса и критерия Манна–Уитни. Все показатели выражали в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Различия между группами считали достоверно значимыми при *p* < 0,05.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что AZT быстро абсорбируется и проникает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), достигая максимальной концентрации через 0,5 ч после однократной дозы. Показано преимущественное распределение препарата в мозолистом теле, бледном шаре, полосатом теле и области неокортекса [11].

Т а б л и ц а 1. Содержание нейромедиаторов, их предшественников, метаболитов (нмоль/г) в гипоталамусе и стволе головного мозга крыс при воздействии AZT и SAM по отдельности и в комбинации

Table 1. Content of neurotransmitters, their precursors, and metabolites (nmol/g) in the hypothalamus and midbrain of rats after AZT and SAM drug administration individually and in combination

Показатель	Контроль	«SAM» (1-я группа)	«AZT» (2-я группа)	«AZT + SAM» (3-я группа)
<i>Гипоталамус</i>				
Тирозин	98,57 ± 4,84	81,50 ± 5,56*	96,00 ± 11,68	76,61 ± 6,73*
Дофамин	2,72 ± 0,29	1,83 ± 0,24*	5,61 ± 0,46*	2,77 ± 0,27**
3,4-ДОФУК	0,56 ± 0,08	0,60 ± 0,08	0,54 ± 0,10	0,74 ± 0,09
ГВК	0,68 ± 0,05	0,74 ± 0,07	0,68 ± 0,09	0,70 ± 0,06
НА	7,23 ± 0,67	4,30 ± 0,70*	6,24 ± 1,11	5,25 ± 0,74**
Триптофан	21,64 ± 1,51	23,38 ± 1,10	16,92 ± 1,76	21,98 ± 1,62
5-Окситриптофан	0,07 ± 0,002	0,03 ± 0,005	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,002
Серотонин	2,85 ± 0,41	3,21 ± 0,43	2,37 ± 0,34	4,47 ± 0,42*♦
5-ОИУК	3,70 ± 0,90	4,01 ± 0,75*	1,88 ± 0,24	4,27 ± 0,70*♦
<i>Ствол головного мозга</i>				
Тирозин	118,78 ± 5,06	92,09 ± 4,46*	118,21 ± 10,86	94,27 ± 5,26*
Дофамин	1,06 ± 0,10	0,87 ± 0,04	0,82 ± 0,04*	1,00 ± 0,05♦
3,4-ДОФУК	0,53 ± 0,09	0,48 ± 0,08	0,48 ± 0,05	0,56 ± 0,07
ГВК	1,19 ± 0,11	0,83 ± 0,11*	1,63 ± 0,19	0,84 ± 0,12*♦
НА	2,42 ± 0,22	1,96 ± 0,14	2,85 ± 0,20	2,27 ± 0,19
Триптофан	20,86 ± 2,09	23,12 ± 1,27	18,04 ± 1,45	21,98 ± 1,17
5-Окситриптофан	0,022 ± 0,003	0,013 ± 0,001*	0,020 ± 0,002	0,014 ± 0,001*♦
Серотонин	0,09 ± 0,01	0,25 ± 0,01*	0,25 ± 0,02*	0,26 ± 0,02*
5-ОИУК	0,47 ± 0,03	0,61 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,39 ± 0,01*

Примечание. Статистически значимые различия (*p* < 0,05): * – с контролем; ● – с 1-й группой; ♦ – со 2-й группой. То же в табл. 2. 3,4-ДОФУК – 3,4-диоксифенилуксусная кислота, ГВК – гомованилиновая кислота, НА – норадреналин, 5-ОИУК – 5-оксииндолуксусная кислота.

В стволе головного мозга животных 2-й группы («AZT») регистрировалось снижение в сравнении с контролем концентрации дофамина (на 23 %, $p < 0,05$), которая при совместном введении AZT и SAM (3-я группа) нормализовалась, достигнув контрольных значений. При этом содержание основного продукта метаболизма дофамина (ГБК) в этой группе было повышено на 37 %. Метаболический индекс дофамина в группе «AZT» вырос до $1,99 \pm 0,21$ в сравнении с контрольным значением – $1,16 \pm 0,12$ ($p < 0,05$).

Метаболические индексы дофамина (ГБК/ДА) и серотонина (5-ОИУК/серотонин) принято рассматривать как показатели, характеризующие уровень их обратного захвата. Вероятно, в условиях воздействия AZT в стриатуме и стволе головного мозга растет уровень обратного захвата дофамина пресинаптическими нейронами, где, собственно говоря, и локализованы ключевые ферменты его метаболизма.

В стриатуме прослеживается та же закономерность во 2-й группе («AZT»): снижение концентрации дофамина на 28 % ($p < 0,05$) при незначительном увеличении содержания ГБК и НА. При этом метаболический индекс дофамина вырос с $0,022 \pm 0,002$ в контрольной группе до $0,039 \pm 0,003$ в группе животных, получавших AZT. У животных 3-й группы («AZT + SAM») значения концентраций самого нейромедиатора и его метаболита (3,4-ДОФУК) были близки к таковым в контрольной группе. Содержание ГБК в данных экспериментальных условиях возросло на 45 % ($p < 0,05$), а НА, наоборот, снизилось на 45 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю. Это может быть связано со снижением активности дофамин- β -гидроксилазы, а неизменное в сравнении с контролем и 2-й группой содержание 3-метокситирамина на фоне возросшего уровня ГБК может указывать на усиление метилирования внеклеточной 3,4-ДОФУК с активацией катехол-О-метилтрансферазы при комбинированном воздействии AZT и SAM.

В гипоталамусе наблюдался обратный эффект: в условиях воздействия AZT (2-я группа) концентрация дофамина повысилась на 105 % ($p < 0,05$) в сравнении с контролем при неизменных концентрациях его метаболитов. Можно предположить блокирование транспортера дофамина, обеспечивающего обратный захват и метаболизм нейромедиатора. Подтверждением этому является тот факт, что молекулярное профилирование некоторых АРВ-препаратов выявило их взаимодействие с транспортерами катехоламинов и индоламинов, рецепторами ГАМК_A и 5-НТ_{2A}, а также другими рецепторами, известными в опосредовании наркотических эффектов [13]. При введении SAM на фоне AZT концентрация дофамина нормализовалась до контрольных значений, при этом, аналогично изменению в стриатуме, заметно уменьшилась концентрация НА (в сравнении с контролем – на 28 %, $p < 0,05$; в сравнении с группой «AZT» – на 16 %, $p < 0,05$).

В наименьшей степени изменения исследованных параметров коснулись коры больших полушарий головного мозга крыс и мозжечка, что проявилось в снижении содержания ГБК в этих отделах (в коре – на 65 %, $p < 0,05$; в мозжечке – на 35 %, $p < 0,05$) у животных 1-й («SAM») и 3-й («AZT + SAM») групп. При этом уровни дофамина были близки к контрольным значениям.

Выявлены также некоторые особенности в изменении показателей дофамин- и серотонинергической нейромедиаторных систем в изученных отделах головного мозга после воздействия препарата гептрал (1-я группа, «SAM») в сравнении с контролем. Содержание тирозина заметно снизилось, а триптофана – увеличилось во всех изученных отделах. В коре, стволе и гипоталамусе концентрация тирозина в группах «SAM» и «AZT + SAM» была снижена в среднем на 25 % ($p < 0,05$). Отмечалась тенденция к снижению концентраций дофамина и НА, а также к увеличению уровня серотонина во всех отделах. Полученные данные согласуются с результатами ряда исследований о влиянии SAM на метаболизм моноаминов в головном мозге крыс [6, 8].

Введение AZT не вызвало существенных изменений показателей серотонинергической нейромедиаторной системы в изученных отделах головного мозга. Однако в стволе головного мозга отмечалось увеличение содержания серотонина на 177 % ($p < 0,05$) относительно контроля. При этом воздействие SAM на фоне AZT не повлияло на изменение данного показателя. Коэффициент оборота серотонина 5-ОИУК/серотонин составил $3,4 \pm 0,41$ во 2-й группе («AZT») и $1,74 \pm 0,19$ в 3-й («AZT + SAM»), что было значительно ниже контрольного значения – $5,61 \pm 0,73$ ($p < 0,05$). Это может свидетельствовать о снижении MAO-опосредованного обмена серотонина. Возможно, на фоне воздействия препаратов создается некий дефицит фермента моноаминоксидазы.

Т а б л и ц а 2. Содержание нейромедиаторов, их предшественников, метаболитов (нмоль/г) в стриатуме, мозжечке и коре больших полушарий головного мозга крыс при воздействии AZT и SAM по отдельности и в комбинации

T a b l e 2. Content of neurotransmitters, their precursors, and metabolites (nmol/g) in the striatum, the cerebellum and the cerebral cortex of the brain of rats after AZT and SAM drug administration individually and in combination

Показатель	Контроль	«SAM» (1-я группа)	«AZT» (2-я группа)	«AZT + SAM» (3-я группа)
<i>Кора больших полушарий</i>				
Тирозин	115,82 ± 7,91	85,38 ± 6,35*	106,07 ± 8,54	85,89 ± 7,65*
Дофамин	1,26 ± 0,14	1,08 ± 0,12	1,46 ± 0,10	1,52 ± 0,09*
3,4-ДОФУК	0,69 ± 0,14	0,50 ± 0,08	0,62 ± 0,09	0,41 ± 0,06
ГВК	1,75 ± 0,16	0,62 ± 0,10*	1,58 ± 0,08	0,54 ± 0,10*
НА	3,22 ± 0,30	3,21 ± 0,27	3,23 ± 0,29	2,91 ± 0,14
Триптофан	19,33 ± 1,93	24,74 ± 1,31*	13,17 ± 0,62*	23,89 ± 1,82*
5-Окситриптофан	0,030 ± 0,003	0,019 ± 0,002*	0,025 ± 0,002	0,019 ± 0,002*
Серотонин	0,64 ± 0,06	2,96 ± 0,39*	0,58 ± 0,05	2,36 ± 0,29*
5-ОИУК	0,73 ± 0,09	2,05 ± 0,16*	0,64 ± 0,05	1,46 ± 0,09**
<i>Стриатум</i>				
Тирозин	111,61 ± 5,79	102,06 ± 6,80	101,82 ± 7,65	96,37 ± 7,49
Дофамин	162,50 ± 5,48	152,45 ± 13,46	118,74 ± 11,08*	167,92 ± 11,78*
3,4-ДОФУК	5,06 ± 0,44	3,66 ± 0,31*	2,88 ± 0,32*	4,08 ± 0,32*
ГВК	3,55 ± 0,27	4,03 ± 0,48	4,24 ± 0,27	5,09 ± 0,42*
НА	1,22 ± 0,19	1,19 ± 0,25	2,08 ± 0,57	0,67 ± 0,04*
3-Метокситирамин	1,96 ± 0,03	1,78 ± 0,07	1,66 ± 0,05	2,12 ± 0,09
Триптофан	20,23 ± 1,74	27,16 ± 0,84*	16,79 ± 1,08	28,41 ± 1,54*
5-Окситриптофан	0,027 ± 0,002	0,020 ± 0,001*	0,023 ± 0,002	0,014 ± 0,001**
Серотонин	1,22 ± 0,14	5,34 ± 0,48*	1,46 ± 0,17	4,60 ± 0,21*
5-ОИУК	1,27 ± 0,16	5,91 ± 0,58*	1,36 ± 0,13	5,16 ± 0,27*
<i>Мозжечок</i>				
Тирозин	76,20 ± 4,16	65,85 ± 4,45	75,86 ± 4,35	65,83 ± 4,69
Дофамин	1,05 ± 0,13	1,44 ± 0,21	1,07 ± 0,11	1,17 ± 0,10
3,4-ДОФУК	0,77 ± 0,09	0,78 ± 0,07	0,52 ± 0,09	0,58 ± 0,05*
ГВК	1,08 ± 0,07	0,64 ± 0,06*	0,93 ± 0,07	0,79 ± 0,08*
НА	4,75 ± 0,35	3,96 ± 0,49	4,31 ± 0,43	5,56 ± 0,56
Триптофан	20,39 ± 1,87	22,29 ± 0,97	16,82 ± 0,80	21,20 ± 1,14*
5-Окситриптофан	0,050 ± 0,006	0,027 ± 0,003*	0,053 ± 0,006	0,038 ± 0,004
Серотонин	3,13 ± 0,21	4,81 ± 0,58*	2,80 ± 0,39	5,43 ± 0,35*
5-ОИУК	2,78 ± 0,17	4,27 ± 0,64*	2,78 ± 0,38	5,26 ± 0,52*

Во 2-й опытной группе («AZT») во всех изученных отделах мозга наблюдалась тенденция снижению содержания триптофана. В коре больших полушарий головного мозга падение концентрации данной аминокислоты составило 32 % ($p < 0,05$) в сравнении с контролем. У животных 3-й опытной группы («AZT + SAM») концентрация данной аминокислоты во всех отделах, за исключением стриатума, была близка к таковой в контрольной группе.

Установлено, что АРВП вызывают клеточный стресс, приводя к старению эндотелиальных клеток, о чем свидетельствует снижение пролиферации и увеличение уровня маркеров воспаления. Это приводит к снижению целостности ГЭБ и нарушению функций эндотелиальных клеток [14]. Исходя из этого, можно предположить нарушение транспорта аминокислот через ГЭБ.

У животных 1-й и 3-й опытных групп достоверно уменьшалось содержание 5-окситриптофана в сравнении с контролем во всех отделах, кроме гипоталамуса. При этом значения его концентраций были близки в обеих группах.

Уровни же самого нейромедиатора и его основного метаболита (5-ОИУК) в изученных отделах головного мозга крыс 3-й опытной группы («AZT + SAM») возросли в сравнении с таковыми в контроле ($p < 0,05$) и во 2-й группе («AZT») ($p < 0,05$). Значения коэффициента 5-ОИУК/серотонин в гипоталамусе и стриатуме в 3-й опытной группе не отличается от его значений во 2-й группе.

Отличия между 1-й («SAM») и 3-й («AZT + SAM») опытными группами в содержании исследованных показателей незначительны, за исключением снижения содержания 5-ОИУК при сочетанном воздействии AZT и SAM в стволе (на 36 %, $p < 0,05$) и коре больших полушарий (на 30 %, $p < 0,05$) в сравнении с контролем.

Выводы

1. Выраженность нейромедиаторных нарушений в мозжечке и коре больших полушарий крыс менее существенна, чем в гипоталамусе, стриатуме и стволе головного мозга.

2. Эффект АРВП AZT (зидовудин) в большей степени проявляется на функционировании дофаминергической нейромедиаторной системы гипоталамуса (повышение уровня дофамина), стриатума и ствола головного мозга крыс (снижение содержания нейромедиаторов).

3. Применение SAM на фоне AZT приводит к нормализации уровня дофамина в гипоталамусе, стриатуме и стволе головного мозга крыс, что свидетельствует о корригирующем эффекте препарата в отношении дофаминергической нейромедиаторной системы.

4. Введение AZT влияет на изменение содержания серотонина (увеличение концентрации) только в стволе головного мозга крыс, а воздействие SAM на фоне AZT данный показатель не нормализует.

5. Комбинированное применение SAM и AZT приводит к увеличению концентрации серотонина во всех изученных отделах головного мозга крыс, которая близка к ее значению у животных, получавших только SAM.

Список использованных источников

1. Rubin, L. H. HIV, depression and cognitive impairment in the era of effective antiretroviral therapy / L. H. Rubin, P. M. Maki // *Curr. HIV/AIDS Rep.* – 2019. – Vol. 16, N 1. – P. 82–95. <https://doi.org/10.1007/s11904-019-00421-0>
2. Schneider, M. A. Combination of antiretroviral drugs Zidovudine and Efavirenz impairs tumor growths in a mouse model of cancer / M. A. Schneider, A. A. Buzdin // *Viruses.* – 2021. – Vol. 13, N 12. – P. 2396. <https://doi.org/10.3390/v13122396>
3. Shafiee, A. Alfa based regimens for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL): a systematic review and meta-analysis / A. Shafiee, N. Seighali // *Virology.* – 2023. – Vol. 20. – P. 118. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02077-0>
4. Сукиасян, С. Г. Мозг и психика: биологические основы психиатрии / С. Г. Сукиасян // *Sci. Eur.* – 2022. – Т. 90. – С. 42–53.
5. Cerebrospinal fluid levels of 5-HIAA and dopamine in people with HIV and depression / R. Fu [et al.] // *J. Neurovirol.* – 2023. – Vol. 29. – P. 440–448. <https://doi.org/10.1007/s13365-023-01142-2>
6. A comprehensive review on the efficacy of S-adenosyl-L-methionine in major depressive disorder / D. De Berardis [et al.] // *CNS Neurol. Disorder Drug Targets.* – 2016. – Vol. 15, N 1. – P. 35–44. <https://doi.org/10.2174/1871527314666150821103825>
7. S-adenosylmethionine improves cognitive impairment in D-galactose-induced brain aging by inhibiting oxidative stress and neuroinflammation / Y. Zhang [et al.] // *J. Chem. Neuroanat.* – 2023. – Vol. 128. – P. 102232. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2023.102232>
8. Otero-Losada, M. E. Acute changes in 5-HT metabolism after S-adenosyl-L-methionine administration / M. E. Otero-Losada, M. C. Rubio // *Gen. Pharmacol.* – 1989. – Vol. 20, N 4. – P. 403–406. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(89\)90186-9](https://doi.org/10.1016/0306-3623(89)90186-9)
9. S-Adenosylmethionine (SAME) for neuropsychiatric disorders: A clinical-oriented review of research / A. Sharma [et al.] // *J. Clin. Psychiatry.* – 2017. – Vol. 78, N 6. – P. 656–667. <https://doi.org/10.4088/jcp.16r11113>
10. Дорошенко, Е. М. Биогенные моноамины, их предшественники и метаболиты в мозге крыс при экспериментальной недостаточности кровообращения / Е. М. Дорошенко, В. В. Лелевич // *Нейрохимия.* – 2020. – Т. 37, № 3. – С. 240–248.
11. Zidovudine and Lamivudine as potential agents to combat HIV-associated neurocognitive disorder / S. Mdanda [et al.] // *Drug Dev. Tech.* – 2019. – Vol. 17, N 7. – P. 322–329. <https://doi.org/10.1089/adt.2019.941>
12. Gurevich, E. V. G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions / E. V. Gurevich, R. R. Gainetdinov, V. V. Gurevich // *Pharmacol. Res.* – 2016. – Vol. 111. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.010>
13. The HIV antiretroviral drug efavirenz has LSD-like properties / B. Michael [et al.] // *Neuropsychopharmacology.* – 2013. – Vol. 38, N 12. – P. 2373–2384. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.135>
14. Bertrand, L. Cerebral vascular toxicity of antiretroviral therapy / L. Bertrand, M. Velichkovska, M. Toborek // *J. Neuroimmune Pharmacol.* – 2021. – Vol. 16, N 1. – P. 74–89. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09858-x>

References

1. Rubin L. H., Maki P. M. HIV, depression and cognitive impairment in the era of effective antiretroviral therapy. *Current HIV/AIDS Report*, 2019, vol. 16, no. 1, pp. 82–95. <https://doi.org/10.1007/s11904-019-00421-0>

2. Schneider M. A., Buzdin A. A. Combination of antiretroviral drugs Zidovudine and Efavirenz impairs tumor growths in a mouse model of cancer. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 12, p. 2396. <https://doi.org/10.3390/v13122396>
3. Shafiee A., Seighali N. Alfa based regimens for the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL): a systematic review and meta-analysis. *Virological Journal*, 2023, vol. 20, p. 118. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02077-0>
4. Sukiasyan S. G. Brain and mentality: biological foundations of psychiatry. *Sciences of Europe*, 2022, vol. 90, pp. 42–53 (in Russian).
5. Fu R., Jinnah H., McKay J. L., Miller A. H., Felger J. C., Farber E. W., Sharma S., Whicker N. Cerebrospinal fluid levels of 5-HIAA and dopamine in people with HIV and depression. *Journal of Neurovirology*, 2023, vol. 29, pp. 440–448. <https://doi.org/10.1007/s13365-023-01142-2>
6. De Berardis D., Orsolini L., Serroni N., Girinelli G., Iasevoli F., Tomasetti C. A comprehensive review on the efficacy of S-adenosyl-L-methionine in major depressive disorder. *CNS Neurological Disorder Drug Targets*, 2016, vol. 15, no. 1, pp. 35–44. <https://doi.org/10.2174/1871527314666150821103825>
7. Zhang Y., Ma R., Deng Q., Wang W., Cao Ch., Yu Ch. S-adenosylmethionine improves cognitive impairment in D-galactose-induced brain aging by inhibiting oxidative stress and neuroinflammation. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2023, vol. 128, p. 102232. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2023.102232>
8. Otero-Losada M. E., Rubio M. C. Acute changes in 5-HT metabolism after S-adenosyl-L-methionine administration. *General Pharmacology*, 1989, vol. 20, no. 4, pp. 403–406. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(89\)90186-9](https://doi.org/10.1016/0306-3623(89)90186-9)
9. Sharma A., Gerbarg P., Bottiglieri T., Massoumi L., Carpenter L., Lavretsky H., Muskin Ph., Brown R., Mischoulon D. S-Adenosylmethionine (SAMe) for neuropsychiatric disorders: A clinical-oriented review of research. *Journal of Clinical Psychiatry*, 2017, vol. 78, no. 6, pp. 656–667. <https://doi.org/10.4088/jcp.16r11113>
10. Doroshenko E. M., Lelevich V. V. Biogenic monoamines, their precursors and metabolites in the brain of rats with experimental circulatory insufficiency. *Neirokhimiya* [Neurochemistry], 2020, vol. 37, no. 3, pp. 240–248 (in Russian).
11. Mdanda S., Ntshangase S., Singh S. D., Naicker T., Kruger H. G., Baijnath S., Govender Th. Zidovudine and Lamivudine as potential agents to combat HIV-associated neurocognitive disorder. *Drug Development Technologies*, 2019, vol. 17, no. 7, pp. 322–329. <https://doi.org/10.1089/adt.2019.941>
12. Gurevich E. V., Gainetdinov R. R., Gurevich V. V. G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. *Pharmacology Resourse*, 2016, vol. 111, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.010>
13. Gatch M. B., Kozlenkov A., Huang R., Yang W., Nguyen J., González-Maeso J., Rice K. C., France Ch., Dillon G. The HIV antiretroviral drug efavirenz has LSD-like properties. *Neuropsychopharmacology*, 2013, vol. 38, no. 12, pp. 2373–2384. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.135>
14. Bertrand L., Velichkovska M., Tobore M. Cerebral vascular toxicity of antiretroviral therapy. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2021, vol. 16, no. 1, pp. 74–89. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09858-x>

Информация об авторах

Филина Нина Ивановна – ст. преподаватель. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). E-mail: nina-filina-2017@mail.ru

Курбат Михаил Николаевич – канд. мед. наук, доцент, заведующий лабораторией. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, 230009, г. Гродно, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-8518-2450>. E-mail: vwmisha@mail.ru

Information about the authors

Nina I. Filina – Senior lecturer. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: nina-filina-2017@mail.ru

Mikhail N. Kurbat – Ph. D. (Med.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230009, Grodno, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-8518-2450>. E-mail: vwmisha@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616-036.22:578.835.1(476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-224-236>

Поступила в редакцию 18.01.2024

Received 18.01.2024

**Н. В. Поклонская, Т. В. Амвросьева, З. Ф. Богущ, Ю. А. Шилова,
Ю. Б. Колтунова, И. В. Бельская**

*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Республика Беларусь*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВИРУСОВ ЕСНО30, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В БЕЛАРУСИ НА ПРОТЯЖЕНИИ ПОСЛЕДНИХ 25 ЛЕТ

Аннотация. В работе приведены результаты наиболее полного молекулярно-эпидемиологического исследования одного из самых эпидемически значимых как в глобальном масштабе, так и на территории Беларуси энтеровирусов (ЭВ) – вируса ЕСНО30, включая описание его эволюционной траектории и путей географического распространения.

Цель работы – молекулярно-эпидемиологический анализ вируса ЕСНО30, циркулировавшего в Республике Беларусь с 1997 по 2021 г.

Установлено, что за весь период наблюдения ЕСНО30 был вторым по распространенности типом ЭВ, уступая только вирусу Коксаки В5. Периоды наиболее активной его циркуляции совпадали с годами эпидемических подъемов заболеваемости энтеровирусными инфекциями (ЭВИ). Среди клинических форм инфекции, вызванной ЕСНО30, преобладали кишечные и неврологические. Идентифицировано 10 циркулировавших в Беларуси различных его геновариантов, которые входили в три генотипа вируса, имевших глобальное распространение, – ЕСНО30_E, ЕСНО30_F и ЕСНО30_H. Во время трех эпидемических подъемов вызванной ЕСНО30 заболеваемости имела место параллельная циркуляция двух различных геновариантов, принадлежавших к одному (2013–2014 гг.) или различным (1997, 2017–2018 гг.) генотипам. Одновременно циркулирующие геноварианты имели различную эволюционную траекторию и/или филогеографию.

Полученные результаты имеют важное значение для понимания эпидемиологических процессов, лежащих в основе формирования заболеваемости ЭВИ в Республике Беларусь.

Ключевые слова: энтеровирус, энтеровирусная инфекция, ЕСНО30, молекулярная эпидемиология, генотип

Для цитирования: Молекулярная эпидемиология вирусов ЕСНО30, циркулирующих в Беларуси на протяжении последних 25 лет / Н. В. Поклонская [и др.] // Вестн. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 224–236. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-224-236>

**Natalia V. Paklonskaya, Tamara V. Amvrosieva, Zoya F. Bogush, Yulia A. Shilava,
Yulia B. Kaltunova, Ina V. Belskaya**

Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF ECHOVIRUS 30 IN BELARUS OVER THE LAST 25 YEARS

Abstract. The article presents the results of the most complete molecular epidemiology study of one of the most epidemically significant enteroviruses (EV), both globally and in Belarus – Echovirus 30, including a description of its evolutionary trajectory and routes of geographic distribution.

The purpose of the presented work was to study a molecular epidemiology of Echovirus 30 in the Republic of Belarus from 1997 to 2021.

During the observation period, Echovirus 30 was the second most common type of EV after Coxsackievirus B5. The highest Echovirus 30 activity was registered at the time of enteroviral morbidity epidemic upsurge. Intestinal and neurological forms predominated in the spectrum of Echovirus 30 clinical presentation. We identified 10 different genetic variants of Echovirus 30 that circulated in Belarus, which were included in three global Echovirus 30 genotypes – ECHO30_E, ECHO30_F and ECHO30_H. At the time of morbidity epidemic rises in 1997, 2013–2014, and 2017–2018 there was a parallel circulation of two different genetic variants of the virus belonging to the same (2013–2014) or different (1997, 2017–2018) genotypes. Simultaneously circulating genetic variants of Echovirus 30 had different evolutionary trajectory and/or routes of geographic distribution.

The obtained results are important for understanding the epidemiological processes underlying the enteroviral morbidity in the Republic of Belarus.

Keywords: enterovirus, enterovirus infection, Echovirus 30, molecular epidemiology, genotype

For citation: Paklonskaya N. V., Amvrosieva T. V., Bogush Z. F., Shilova Y. A., Kaltunova Y. B., Belskaya I. V. Molecular epidemiology of Echovirus 30 in Belarus over the last 25 years. *Vestsi Natsyynal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 224–236 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-224-236>

Введение. Энтеровирусы (ЭВ) входят в сем. Picornaviridae, которое объединяет 68 родов и 158 видов вирусов. ЭВ человека принадлежат к четырем видам Enterovirus A–D, которые включают более 100 различных типов патогенных агентов и вместе с тремя видами риновирусов входят в род *Enterovirus* [1]. Все ЭВ – мелкие, безоболочечные вирусы, геном которых представлен одноцепочечной +РНК размером около 7 500 нт [2]. Уровень генетической изменчивости ЭВ чрезвычайно высок [3] и поддерживается как за счет точечных мутаций (генетический дрейф) [4], так и за счет рекомбинации (генетический шифт) [5], вследствие чего в пределах отдельных типов ЭВ выделяются различные геногруппы, генотипы и геноварианты [6], которые циркулируют среди людей одновременно и/или сменяя друг друга с течением времени. Значительное генетическое многообразие является одной из причин, по которой различные типы ЭВ могут иметь разные паттерны циркуляции – от регулярно регистрируемых вспышек различного масштаба, до широкого бессимптомного носительства. В основе эпидемиологии энтеровирусной инфекции (ЭВИ) лежит множество факторов, которые могут быть связаны как с биологическими и социальными особенностями населения, так и с биологическими характеристиками возбудителя, которые предопределяются его генетической структурой, а также с различными климатическими, природными и другими внешнесредовыми факторами. Поэтому молекулярная эпидемиология ЭВ, в основе которой лежат появление, распространение, изменения и смена различных генотипов ЭВ, является предметом пристального внимания ученых во всем мире.

Некоторые типы ЭВ вызывают наибольший интерес вследствие их широкого распространения, значительного вклада в формирование групповой заболеваемости, а также тяжести клинических проявлений, которыми сопровождается вызываемая ими болезнь. К числу таких ЭВ можно отнести в первую очередь Enterovirus A71 [7], вирус ЕСНО30 [8–10] и Enterovirus D68 [11], а также ряд других. И если Enterovirus A71 и Enterovirus D68 до настоящего времени крайне редко обнаруживались в нашей стране, то из всего спектра циркулирующих в Беларуси вирусов ЕСНО30 относится, безусловно, к наиболее эпидемически значимым ЭВ. Данный возбудитель был этиологическим агентом двух наиболее крупных вспышек ЭВИ – в 1997 г. в Гомеле [12] и в 2003 г. в Минске [13] (пострадало более 600 и 1500 человек соответственно, а преобладающей клинической формой был серозный менингит). Помимо этого, вирус ЕСНО30 занимает одно из ведущих мест в рейтинге доминирующих типов ЭВ и довольно часто обнаруживается у пациентов с различными клиническими формами ЭВИ, в первую очередь – с серозным менингитом [14].

Цель исследования – молекулярно-эпидемиологический анализ вируса ЕСНО30, циркулировавшего в Республике Беларусь с 1997 по 2021 г.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследований послужили нуклеотидные последовательности полного гена *VPI* или его фрагмента, 85 изолятов ЕСНО30, обнаруженных у пациентов с ЭВИ или в пробах сточной воды в период с 1997 по 2021 г.

Для выделения вирусов в культурах клеток RD, BGM использовали стандартную методику. Выделенные цитопатические агенты идентифицировали с помощью реакции нейтрализации микрометодом («Инструкция по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций», рег. № 133-1204 от 12.04.2005) с использованием панели коммерческих иммунных группо- и типоспецифических в отношении ЭВ сывороток производства НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов (г. Москва). В тех случаях, когда из пробы не удалось выделить полноценный вирус, проводили генетический анализ вирусной РНК, обнаруженной в образце биологического материала.

Детекцию ЭВ методом ОТ-ПЦР проводили с использованием методик, разработанных в лаборатории [15, 16], а также коммерческих тест-систем АмплиСенс® Enterovirus-FL (Россия), «Тест-системы для выявления энтеровирусов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов реакции «ЭВ-ПЦР». РНК из проб выделяли с помощью набора «НК-экстра» (все – производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Республика Беларусь). Нуклеотидную последовательность полного гена *VPI* или его фрагмента определяли, используя несколько комплектов праймеров («Молекулярно-эпидемиологический мониторинг энтеровирусной инфекции: инструкция по применению», рег. № 165-1208 от 11.06.2009). Секвенирование ДНК проводили методом терминации цепи с последующим анализом на ДНК-анализаторе

SEQ8000. Компьютерный анализ последовательностей (множественное выравнивание, определение эволюционных расстояний, выбор оптимальной модели эволюции, филогенетическую реконструкцию методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood (ML)) [17] и определение достоверности ее топологии) выполняли с помощью программного продукта MEGA (Molecular evolutionary genetics analysis) версии 7.0 [18]. Референсные последовательности были получены из базы данных Genbank, а также с использованием интернет-ресурса BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

Филогенетическое дерево с временной шкалой и анализом географического распространения изолятов было реконструировано методом Монте-Карло для марковских цепей (MCMC) с использованием некоррелированной модели логнормальных расслабленных часов [19], входящих в компьютерный пакет программ BEAST, версия 1.10.4 [20]. Калибровку осуществляли на основании дат идентификации изолятов и штаммов, включенных в реконструкцию, в качестве модели эволюции использовали общую обратимую во времени модель (general time reversible (GTR)) с учетом гамма-распределения нуклеотидных замен и инвариантных сайтов. Длина цепей MCMC составила 100 млн, образцы отбирались каждые 100 тыс. шагов. Файл трассировки, созданный с помощью байесовской филогенетической реконструкции, был визуализирован и проанализирован в Tracer, версия 1.7 [21]. Сходимость параметров рассматривали при наличии значений эффективного размера выборки (ESS), превышающих 200. С максимальной достоверностью клады дерева (Maximum Clade Credibility, MCC) были суммированы с помощью TreeAnnotator 1.8.4 (часть пакета BEAST 1.10.4), при этом прожиг соответствовал 10 %, а затем визуализированы и отредактированы в FigTree, версия 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Достоверность обнаруживаемых различий оценивали на основании критерия χ^2 , доверительные интервалы долей рассчитывали по распределению Пуассона (через χ^2) [22].

Результаты исследования. В рамках осуществляемого на территории Республики Беларусь эпидемиологического слежения за ЭВИ и лабораторного мониторинга ЭВ в течение 1996–2021 гг. установлен тип 1 385 изолятов ЭВ, циркулировавших в нашей стране. По результатам анализа типового разнообразия ЭВ изоляты ЕСНО30 составили 12,0 [10,3; 14,0] % от всех идентифицированных и заняли второе место в рейтинге доминирующих типов ЭВ, уступая только Коксаки В5.

Результаты эпидемиологического слежения за заболеваемостью ЭВИ свидетельствовали о том, что в Беларуси, как и в других странах мира, имеет место чередование подъемов и спадов заболеваемости с интервалом 2–3 года (рис. 1). Так, в 2003, 2006, 2009, 2013–2014, 2016–2019 гг. имел место рост заболеваемости ЭВИ, тогда как в 2004–2005, 2007–2008, 2011–2012, 2015 и 2020–2021 гг. отмечалось ее снижение. К сожалению, официальная регистрация ЭВИ до 2003 г.

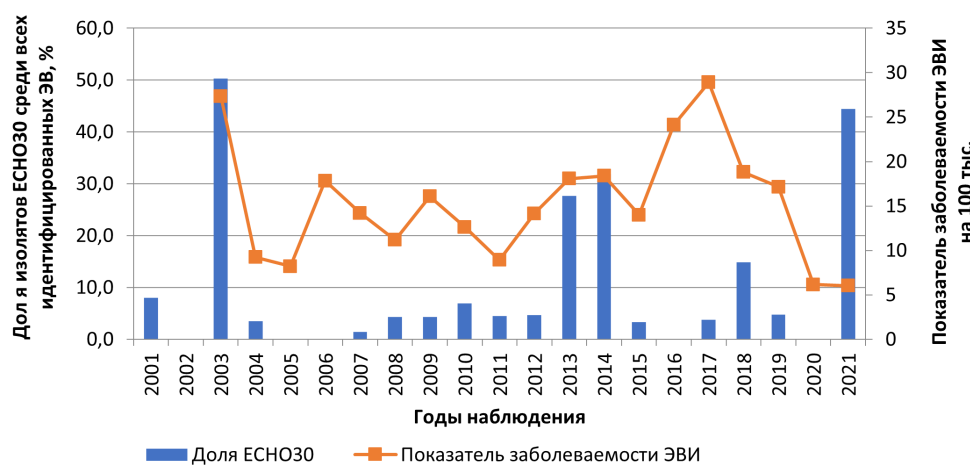


Рис. 1. Доля изолятов ЕСНО30 в общем спектре идентифицированных ЭВ по годам на фоне подъемов и спадов заболеваемости ЭВИ

Fig. 1. Proportion of Echovirus 30 isolates in the total spectrum of identified EVs by year against the backdrop of variations in the enterovirus morbidity

в нашей стране не осуществлялась, поэтому показатель заболеваемости ЭВИ на 100 тыс. населения в 1997–2002 гг. неизвестен. В годы эпидемических подъемов был идентифицирован 521 изолят ЭВ, 133 из них принадлежали к типу ЕСНО30 (25,5 [21,4; 30,3] %), тогда как в сезоны эпидемического благополучия был определен тип 447 возбудителей ЭВИ, в том числе – только 10 изолятов ЕСНО30 (2,2 [1,1; 4,1] %). Сравнение частоты выявления ЕСНО30 в годы эпидемических подъемов и спадов заболеваемости показало, что в периоды ее роста вирус ЕСНО30 обнаруживался достоверно чаще ($\chi^2 = 103,656$; $p < 0,001$).

Для установления спектра клинических проявлений инфекции, вызванной ЕСНО30, были проанализированы данные 425 пациентов с ЭВИ, лабораторно подтвержденной методом ОТ-ПЦР, за период с 2016 по 2020 г. Среди этих пациентов у 23 человек был идентифицирован вирус ЕСНО30. На рис. 2 представлена частота различных клинических проявлений у всех пациентов с лабораторно подтвержденной ЭВИ и у тех, у кого был идентифицирован вирус ЕСНО30. Так, у пациентов с лабораторно подтвержденной ЭВИ, вызванной различными типами ЭВ, основные клинические формы (нейроинфекции, острый гастроэнтерит, ОРВИ и неутонченная ЭВИ) были представлены с сопоставимой частотой – 19,1–28,9 %, реже встречались только экзантемы и кардиты. Спектр клинических проявлений ЭВИ, этиологически связанной с вирусом ЕСНО30, имел заметные отличия. Так, заболевание чаще всего сопровождалось неврологическими проявлениями (серозный менингит, менингоэнцефалит, менингеальный синдром) у 39,1 [7,9; 74,3] % пациентов, острым гастроэнтеритом – у 52,2 [27,0; 91,1] %, достаточно редко – симптомами ОРВИ и неутонченной ЭВИ (у 4,4 [0,1; 24,2] % пациентов). При этом кардиты и экзантемы не зарегистрированы.

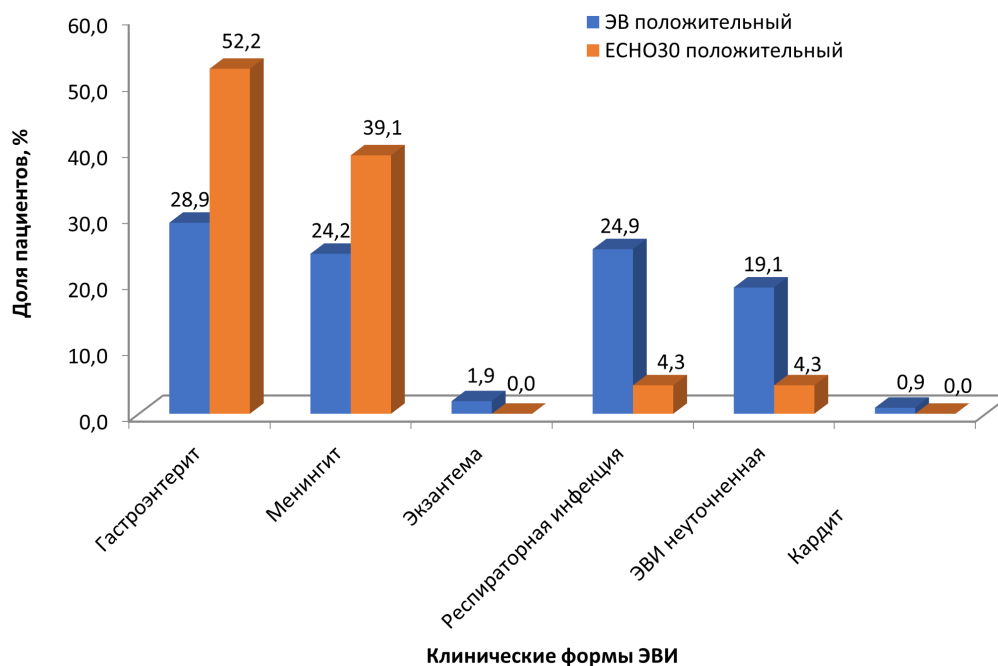


Рис. 2. Частота разных клинических проявлений у пациентов с лабораторно подтвержденной ЭВИ и у тех из них, у кого обнаружен вирус ЕСНО30

Fig. 2. Frequency of different clinical manifestations in patients with laboratory-confirmed enterovirus infection and in those with detected Echovirus 30

Сравнение нуклеотидных последовательностей 85 вирусов ЕСНО30, выделенных за весь период наблюдения в нашей стране, показало, что их различия по гену основного капсидного белка VP1 составляли от 0 до 17,0 %. От прототипного штамма Bastianni они отличались на 15,5–19,1 %. При попарном сравнении нуклеотидных последовательностей между собой установлено, что по степени сходства и периоду циркуляции их можно разделить на 10 групп. Среднее генетическое расстояние (p -расстояние) внутри группы не превышало 2,1 %, между группами – $11,2 \pm 2,0$ % (см. таблицу).

Генетические характеристики групп изолятов ЕСНО30

Genetic characteristics of groups of ECHO30 isolates

Группа ЕСНО30	Годы циркуляции	Кол-во изолятов		Среднее генетическое расстояние, %	
		Всего	Полная нуклеотидная последовательность гена <i>VPI</i>	в группе	между группами
E30_BY1	1997	2	2	0,4	11,2 ± 2,0
E30_BY2	1997	3	2	0,8	
E30_BY3	2002	2	2	0,3	
E30_BY4	2003–2004	16	9	1,6	
E30_BY5	2006–2007	2	2	0,4	
E30_BY6	2009	1	1	–	
E30_BY7	2012–2014	35	6	2,1	
E30_BY8	2012	1	1	–	
E30_BY9	2017–2018	8	4	0,6	
E30_BY10	2018–2021	16	7	0,9	

Для молекулярно-эпидемиологического анализа было выбрано 35 изолятов, представлявших все 10 групп, для которых была установлена полная нуклеотидная последовательность гена *VPI*, так как именно этот регион генома ЭВ используется для генотипирования. Дополнительно в филогенетическую реконструкцию были включены референсные последовательности 89 изолятов и штаммов ЕСНО30, циркулировавших в других странах, которые ранее были генотипированы разными авторами, в том числе прототипные штаммы ЕСНО30 Bastianni (AF311938) и ЕСНО30 Giles (AF081342). В качестве внешней группы была использована нуклеотидная последовательность прототипного штамма ЕСНО21 Farina (AU302547). Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия [19], представлено на рис. 3. Как оказалось, все группы вирусов ЕСНО30, циркулировавших в Беларуси, объединялись в 10 монофилетических кластеров в составе трех генотипов – ЕСНО30_Е, ЕСНО30_F и ЕСНО30_Н по ранее принятой классификации [23]. К генотипу ЕСНО30_Н относились геноварианты вируса E30_BY1 (1997 г.), E30_BY7 (2013–2014 гг.), E30_BY8 (2013 г.), E30_BY9 (2017–2018 гг.). В состав генотипа ЕСНО30_F входили белорусские геноварианты E30_BY2 (1997–1998 гг.), E30_BY3 (2002 г.), E30_BY5 (2006–2007 гг.). В общий кластер генотипа ЕСНО30_Е группировались геноварианты E30_BY4 (2003–2004 гг.), E30_BY6 (2009 г.), E30_BY10 (2018–2021 гг.).

Для изучения географической и временной динамики циркуляции ЕСНО30 в Беларуси была проведена филогенетическая реконструкция на основе алгоритма Байеса с использованием метода МСМС и некоррелированной модели логнормальных расслабленных часов (рис. 4).

Результаты филогенетического анализа показали, что геновариант E30_BY1, идентифицированный в 1997 г. в Беларуси, был первым в мировом масштабе выявленным геновариантом генотипа ЕСНО30_Н (рис. 5). Ближайший общий предок геноварианта E30_BY1 и ветви, давшей начало геноварианту, циркулировавшему в 1999–2000 гг. на территории Украины, датируется на территории Беларуси 1994-м годом (вероятность 70 %). В 1995 г. также на территории Беларуси произошло разделение генетических ветвей, одна из которых дала начало геноварианту вируса, обнаруженного в 1998 г. в Азербайджане (вероятность 72 %). В дальнейшем генотип ЕСНО30_Н циркулировал на территории Китая, откуда, по-видимому, был занесен в Россию в 2007 г. (вероятность 99 %). Белорусский геновариант E30_BY8 (2013 г.) имеет ближайшего общего предка, датированного 2010-м годом, с вирусами ЕСНО30, циркулировавшими в России в 2011 г. (вероятность 65 %), что, вероятно, было следствием его заноса оттуда. Геновариант E30_BY7, циркулировавший в тот же период, имеет ближайшего общего предка с геновариантом E30_BY9, локализованного на территории Беларуси и датированного 2010-м годом (вероятность 98 %), который с вероятностью 100 % был занесен с территории Китая.

В состав генотипа ЕСНО30_F (рис. 6) вошли три белорусских геноварианта – E30_BY2, E30_BY3, E30_BY5. Геновариант E30_BY2 циркулировал в 1997 г. вместе с геновариантом E30_BY1

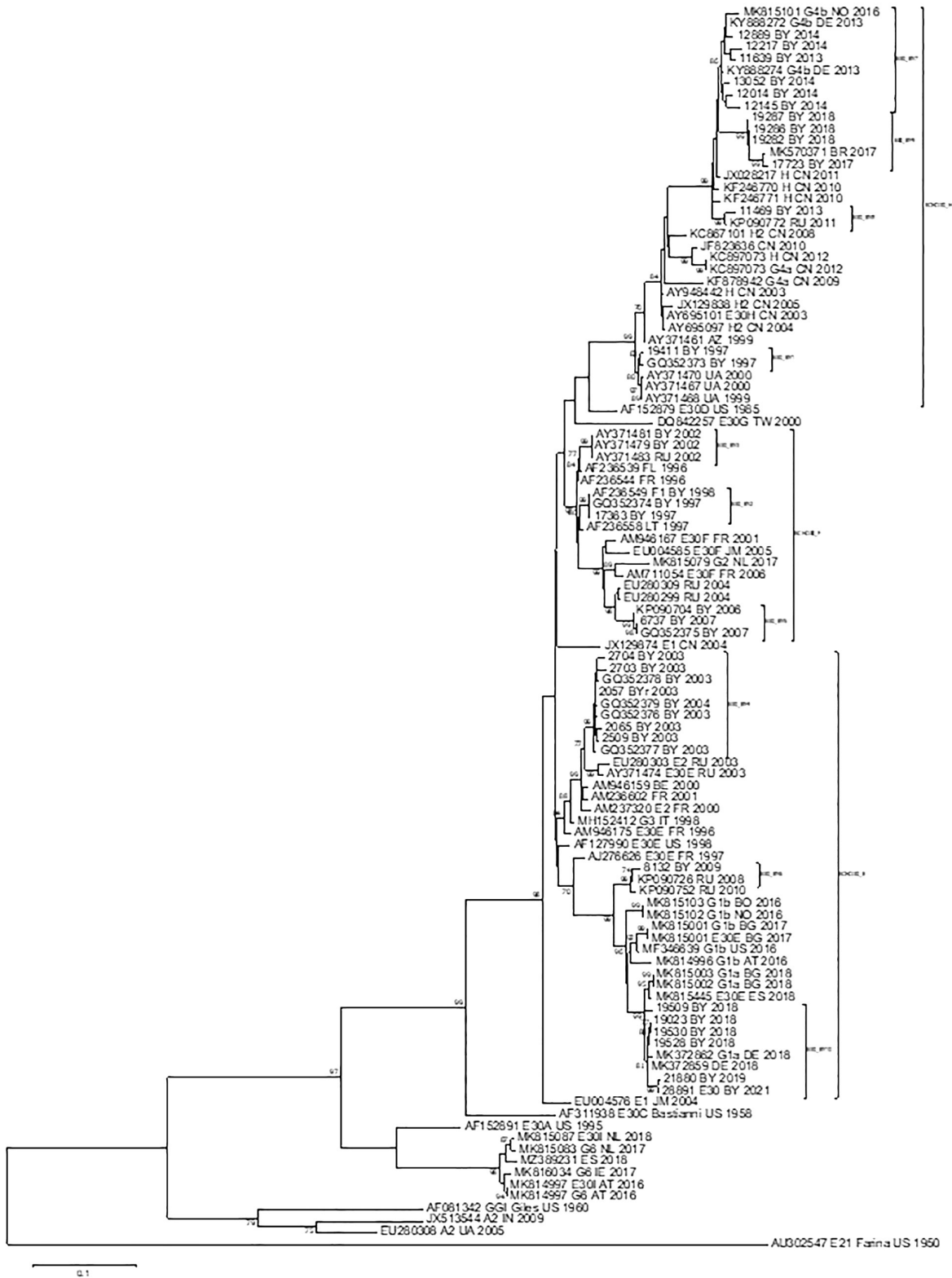


Рис. 3. Филогенетическая реконструкция методом максимального правдоподобия нуклеотидных последовательностей гена, кодирующего основной капсидный белок VP1, 124 изолятов и штаммов ECHO30, внешняя группа – вирус ECHO21. В узлах древа – значения бутстреппинга (1 000 псевдореplikатов), внизу слева – шкала генетического расстояния

Fig. 3. Phylogenetic analysis by maximum likelihood of VP1 complete sequences (876 nts) of ECHO30 (N = 124). The bootstrap values (1 000 pseudoreplikates) are shown at nodes for relevant groups. The Farina strain of E21 AY302547 (not shown) was used as an outgroup. The genetic distance scale is at bottom left

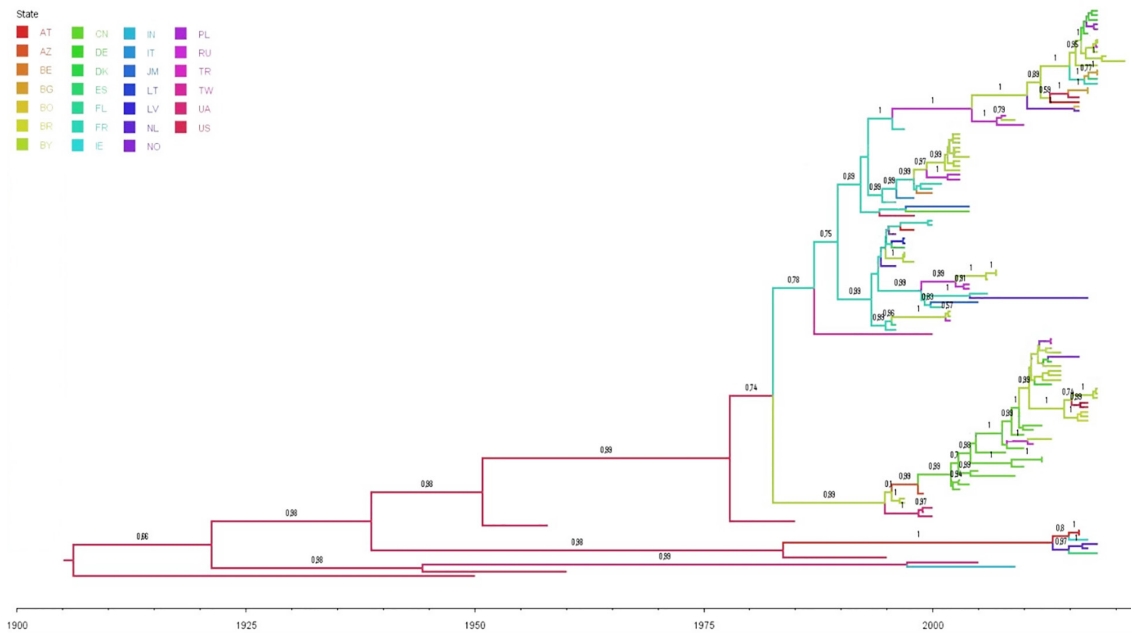


Рис. 4. Древо с максимальной достоверностью клад, построенное с помощью байесовского анализа 125 нуклеотидных последовательностей ECHO30, длина ветвей соответствует шкале времени (внизу), апостериорная вероятность группирования представлена на ветвях дерева. Цвет ветвей указывает на наиболее вероятную страну происхождения, цветовое обозначение стран – на легенде в левом верхнем углу

Fig. 4. Maximum clade credibility tree for Bayesian coalescent analysis from 125 E30 sequences. Branches are in time scale (years). Posterior probabilities are shown at branches. The color of the branches represents the most probable country of origin (the legend is at top right)

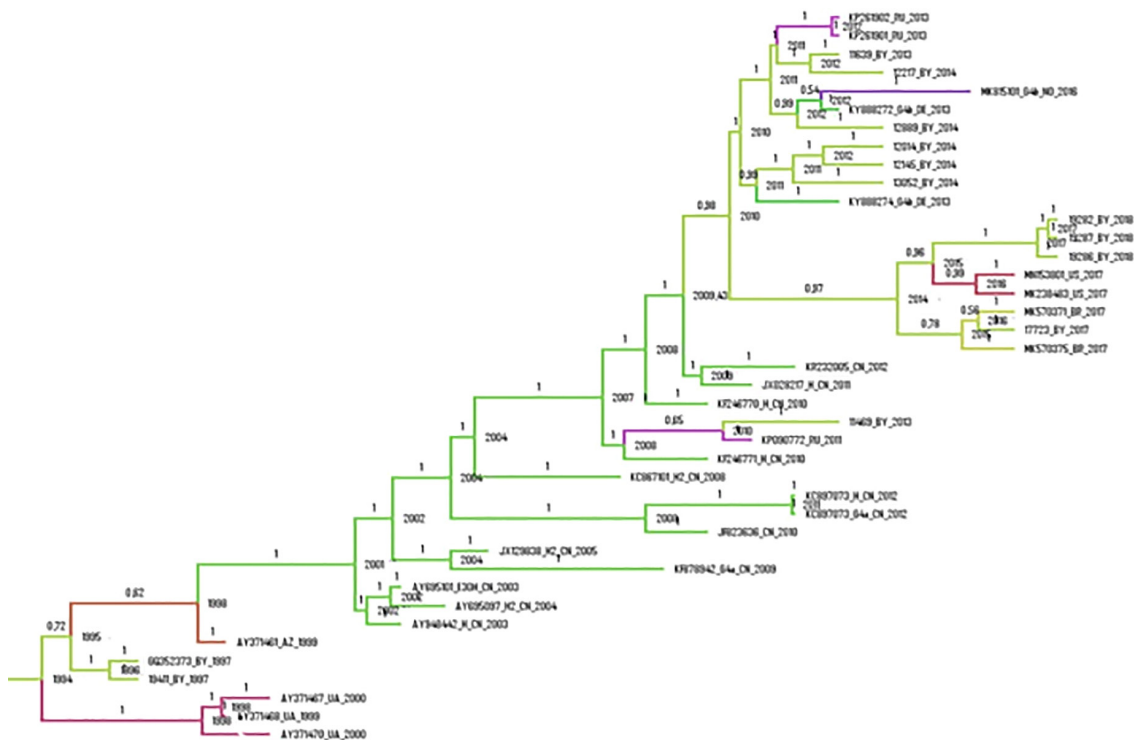


Рис. 5. Древо с максимальной достоверностью клад генотипа ECHO30_H. В узлах дерева – годы расхождения ветвей от общего предка. Цвет ветвей указывает на наиболее вероятную страну происхождения (легенда на рис. 4), цифры на ветвях – значения вероятности происхождения

Fig. 5. Maximum clade credibility tree of ECHO30_H genotype. Years of divergence from common ancestors are at the nodes of the tree. The color of the branches represents the most probable country of origin (the legend is in Fig. 4), the numbers on the branches indicate the probability of origin

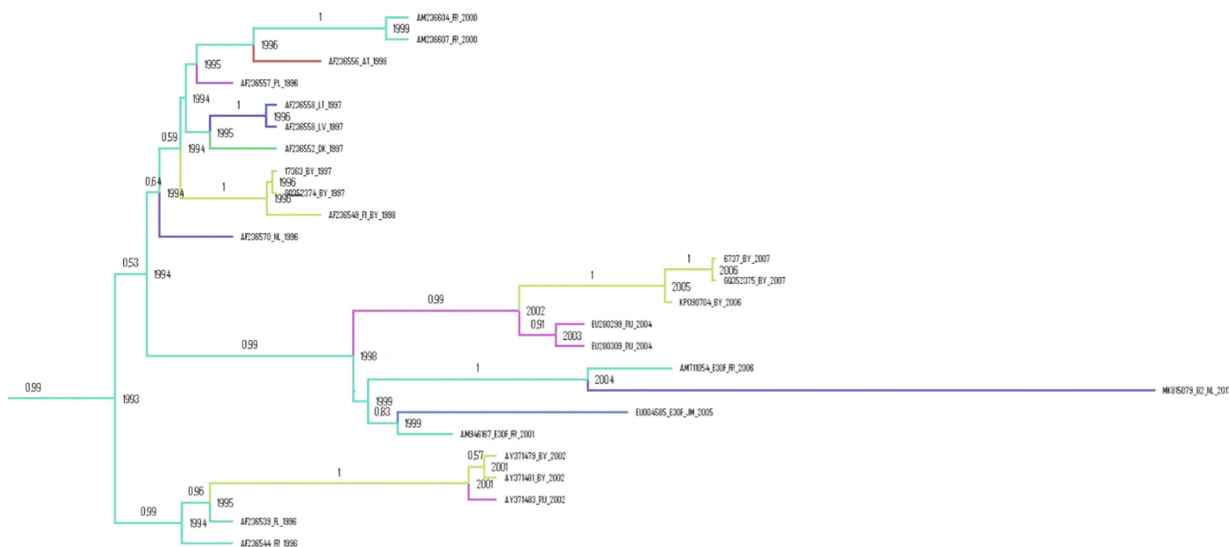


Рис. 6. Древо с максимальной достоверностью клад генотипа ECHO30_F. В узлах древа – годы расхождения ветвей от общего предка. Цвет ветвей указывает на наиболее вероятную страну происхождения (легенда на рис. 4), цифры на ветвях – значения вероятности происхождения

Fig. 6. Maximum clade credibility tree of ECHO30_F genotype. Years of divergence from common ancestors are at the nodes of the tree. The color of the branches represents the most probable country of origin (the legend is in Fig. 4), the numbers on the branches indicate the probability of origin

(генотип ECHO30_H) во время вспышки серозного менингита в Гомеле. Данный геновариант с вероятностью 95 % возник на территории Франции, расхождение ветвей от ближайшего общего предка имело место в 1994 г. Геновариант E30_BY3 обнаруживался на территории нашей страны в 2002 г., не вызвав, однако, ухудшения эпидситуации по заболеваемости ЭВИ. С вероятностью 66 % он имел ближайшего общего предка с вирусами из Франции, датируемого 1995-м годом. С территории Беларуси он был занесен в Россию (вероятность наличия общего предка, датируемого 2001-м годом, с вирусами из России, 81 %). И наконец, геновариант E30_BY5, представители которого циркулировали в Беларуси в 2006–2007 гг., попал к нам в страну с территории России. Данный геновариант имел ближайшего общего предка, датируемого 2002-м годом, с российскими изолятами, циркулировавшими в 2003–2004 гг. (вероятность 64 %).

К генотипу ECHO30_E (рис. 7) относились три белорусских геноварианта ECHO30 – E30_BY4, E30_BY6, E30_BY10. Следует отметить, что кластер, соответствующий данному генотипу, разделился на два субкластера. В один из них вошел белорусский геновариант E30_BY4, в другой – E30_BY6 и E30_BY10 (апостериорная вероятность 100 %). Геновариант E30_BY4 вызвал крупнейший в нашей стране подъем заболеваемости серозным менингитом на территории Минска, Минской и Брестской областей в 2003 г. и продолжал выявляться в 2004 г. Согласно данным филогенетической реконструкции, генетическая ветвь, приведшая к возникновению геноварианта E30_BY4, сформировалась в 1998 г. на территории Франции (вероятность 99 %), а затем, в 1999 г., на территории Беларуси произошло разделение двух генетических линий, одна из которых дала начало геноварианту E30_BY4, а другая распространилась на территорию России, где была обнаружена в 2003 г. К генотипу ECHO30_E относились также геноварианты E30_BY6 и E30_BY10, циркулировавшие в 2009 и 2018–2021 гг. соответственно. Геновариант E30_BY6 был представлен всего одним изолятом, выделенным в Беларуси в 2009 г., и имел российское происхождение (вероятность 94 %). Реконструкция филогеографии геноварианта до его появления на территории Беларуси имеет низкую вероятность, поэтому сделать обоснованное предположение о путях его распространения до появления в нашей стране не представляется возможным. При этом именно с территории Беларуси в 2016 г. он распространился на территорию Германии и Польши (вероятность 93 %), а в 2017 г. – на территорию Турции (вероятность 100 %).

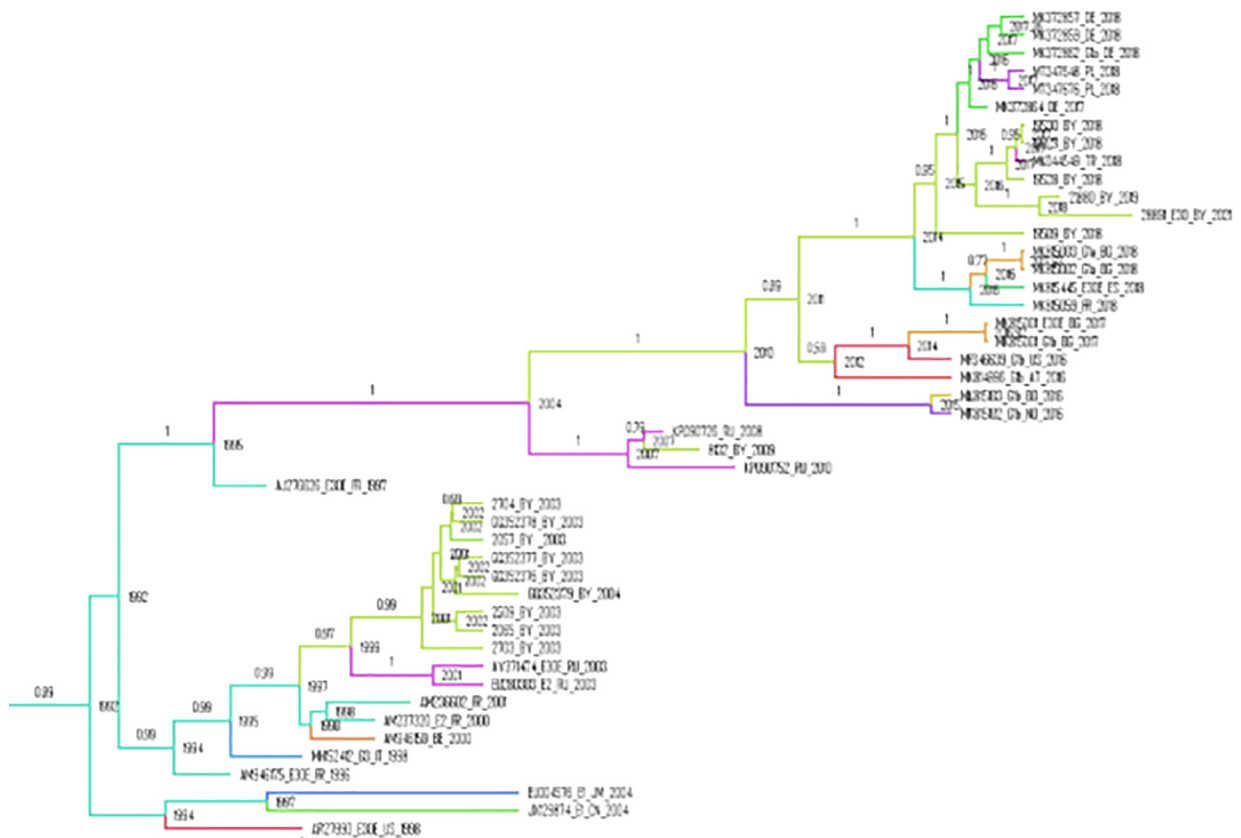


Рис. 7. Древо с максимальной достоверностью клад генотипа ЕСНО30_Е. В узлах древа – годы расхождения ветвей от общего предка. Цвет ветвей указывает на наиболее вероятную страну происхождения (легенда на рис. 4), цифры на ветвях – значения вероятности происхождения

Fig. 7. Maximum clade credibility tree of ECHO30_E genotype. Years of divergence from common ancestors are at the nodes of the tree. The color of the branches represents the most probable country of origin (the legend is in Fig. 4), the numbers on the branches indicate the probability of origin

Обсуждение. Вирус ЕСНО30 относится к наиболее эпидемически значимым в мировом масштабе типам ЭВ. Согласно установленной доли его изолятов из всех идентифицированных за период наблюдения в Беларуси, он является также одним из самых распространенных типов ЭВ в нашей стране. Сравнение частоты выявления данного типа в годы подъемов и спадов заболеваемости ЭВИ указывало на то, что наиболее активная его циркуляция сопровождалась формированием эпидемических подъемов – доля изолятов, идентифицированных в эти периоды была достоверно выше, чем во время спадов. В спектре клинических проявлений инфекции, вызванной ЕСНО30, преобладали неврологические и кишечные формы. Все это указывает на высокую эпидемическую значимость данного типа ЭВ на территории Беларуси и определяет важность проведения исследований его молекулярной эпидемиологии.

Молекулярная эпидемиология и филогенетика ЕСНО30 активно изучалась разными авторами как в масштабе отдельных стран, так и на глобальном уровне [9, 10, 23–25]. Впервые результаты подобных исследований, проведенные в 2001–2002 гг., позволили выявить две глобальные геногруппы в пределах типа, одна из которых объединяла изоляты, выделенные в 1950–1980-х годах и к настоящему времени исчезла из циркуляции, а вторая включала генотипы (субтипы, линии, кластеры), часть из которых продолжает циркулировать и в настоящее время [25]. Тогда же было высказано предположение об основном паттерне молекулярной эпидемиологии ЕСНО30, согласно которому имеет место глобальное распространение и преобладание одной генетической линии (геногруппы), которая сменяется следующей с течением времени. В 2009 г. была представлена работа, в которой были выделены отдельные генотипы ЕСНО30_А – ЕСНО30_Н в пределах геногруппы II [23]. В последующем, вплоть до недавнего времени, в исследованиях молекулярной

эпидемиологии ЕСНО30 разными авторами была использована именно эта классификация. Она же была взята за основу при проведении настоящих исследований. Далее эти исследования получили развитие, и было показано, что из 8 генотипов ЕСНО30 продолжается параллельное глобальное распространение четырех (ЕСНО30_А, ЕСНО30_Е, ЕСНО30_F, ЕСНО30_Н), а еще четыре исчезли из циркуляции [24]. Представленные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что за последние 25 лет на территории Беларуси имела место циркуляция трех из четырех глобально циркулирующих генотипов ЕСНО30. В 2021 г. вышла работа, посвященная молекулярной эпидемиологии ЕСНО30, вызвавших значительный эпидемический подъем заболеваемости в 2016–2018 гг. на территории стран Евросоюза. По ее итогам была идентифицирована новая геногруппа вируса ЕСНО30 – геногруппа III [10]. Эволюционное расстояние между входившими в нее изолятами и вирусами различных ранее известных генотипов геногруппы II (ЕСНО30_А, Е, F, Н) было достаточно велико, и на филогенетической реконструкции геногруппа III была представлена отдельным кластером, не входящим в геногруппу II. В Республике Беларусь циркуляция геногруппы III до настоящего времени не регистрировалась.

Первые работы, посвященные молекулярной эпидемиологии ЕСНО30, сформировали теорию, согласно которой периоды эпидемических подъемов заболеваемости, вызванной ЕСНО30, сопровождаются активной циркуляцией одного генетического геноварианта. Это представление противоречит полученным нами данным о генетической характеристике этиологических агентов вспышки 1997 г. в Гомеле [26], которые, очевидно, принадлежали к разным геновариантам вируса и характеризовались значительным эволюционным расстоянием. Такие же результаты были получены другими авторами при изучении молекулярной эпидемиологии вызвавших вспышку во Франции в 2000 г. ЕСНО30, которые принадлежали к разным субтипам вируса. Представленные в настоящей работе результаты (см. рис. 3) свидетельствуют о том, что этиологические агенты вспышки в Гомеле принадлежали к двум геновариантам, которые относились к различным генотипам – ЕСНО30_Н и ЕСНО30_F и имели совершенно разную эволюционную историю и филогеографию. Так, если геновариант E30_BY2 сформировался на территории Западной Европы, а близкородственные ему изоляты в тот же период времени выявлялись на территории множества европейских государств, то геновариант E30_BY1, по-видимому, впервые появился в нашей стране незадолго до вспышки 1997 г. Аналогичная ситуация, когда во время эпидемического подъема заболеваемости регистрировалась параллельная циркуляция двух различных геновариантов ЕСНО30, имела место в 2013 и 2017–2018 гг. Так, циркулировавшие одновременно в 2013 г. геноварианты E30_BY7 и E30_BY8 были объединены общей эволюционной историей и принадлежали к одному генотипу ЕСНО30-Н, однако отличались филогеографией: геновариант E30_BY7 был занесен в Беларусь непосредственно из Китая, тогда как геновариант E30_BY8, согласно данным филогенетической реконструкции, имел российское происхождение. Геноварианты E30_BY9 и E30_BY10, циркулировавшие в 2017–2018 гг., принадлежали к разным генотипам – ЕСНО30_Н и ЕСНО30_Е соответственно, имели разную эволюционную историю и филогеографию. В глобальных исследованиях, проведенных на территории Евросоюза, также было показано, что в 2016–2018 гг. регистрировалась параллельная циркуляция нескольких различных геновариантов вируса ЕСНО30 на одной и той же территории [10]. Это, по мнению авторов, опровергает предположение о том, что эпидемический подъем заболеваемости обусловлен селекцией наиболее трансмиссивного и/или вирулентного варианта вируса, и может быть объяснено накоплением неиммунного контингента среди детей, которые еще не сталкивались с возбудителем, и молодых взрослых, иммунный ответ у которых исчез со временем. Еще одним объяснением может быть накопление мутаций вирусами вследствие стратегии ускользания от распознавания иммунной системой. Результаты включения в представленный в настоящей работе анализ референсных последовательностей ЕСНО30 из Западной Европы, которые были получены авторами при расследовании эпидемического подъема 2018 г., показали, что белорусские геноварианты также входили в некоторые генетические клады, циркулировавшие в различных европейских странах в 2016–2018 гг. и вызвавшие эпидемический подъем заболеваемости. Так, согласно результатам филогенетической реконструкции, белорусский геновариант E30_BY7 соответствовал европейской кладе G4b, геновариант E30_BY9 – кладе G4a, а геновариант E30_BY10 – кладе G1a, вызвавшей в 2018 г. эпидемический подъем заболеваемости во многих странах Евросоюза.

Заключение. В настоящей работе представлено наиболее полное молекулярно-эпидемиологическое исследование одного из самых эпидемически значимых ЭВ – вируса ЕСНО30 на территории Беларуси за последние 25 лет, включающее описание его эволюционной траектории и путей географического распространения.

Показано, что за весь период наблюдения вирус ЕСНО30 был вторым по распространенности типом ЭВ, уступая только вирусу Коксаки В5. При этом периоды наиболее активной его циркуляции совпадали с годами эпидемических подъемов заболеваемости ЭВИ. Среди клинических форм инфекции, вызванной ЕСНО30, преобладали кишечные и неврологические. За последние 25 лет на территории Беларуси регистрировалась циркуляция 10 различных геновариантов ЕСНО30, которые принадлежали к трем генотипам вируса, имеющим глобальное распространение, – ЕСНО30_E, ЕСНО30_F и ЕСНО30_H.

Три из четырех эпидемических подъемов заболеваемости, вызванных вирусом ЕСНО30 (1997, 2013–2014 и 2017–2018 гг.), были обусловлены параллельной циркуляцией двух геновариантов, принадлежащих к одному (2013–2014 гг.) или различным (1997, 2017–2018 гг.) генотипам вируса. Одновременно циркулирующие геноварианты имели различную эволюционную траекторию и/или филогеографию. Установлено, что все геноварианты ЕСНО30, которые регистрировались за период наблюдения, попадали на территорию Беларуси из трех регионов: Западной Европы, России, Китая. Обнаружено и обратное распространение геновариантов из Беларуси на территорию других стран.

Полученные нами результаты имеют важное значение для понимания эпидемиологических процессов, лежащих в основе формирования заболеваемости ЭВИ в Республике Беларусь. Помимо этого, представленные данные позволяют заполнить пробелы в глобальных исследованиях молекулярной эпидемиологии ЕСНО30. Вместе с тем полученная информация, безусловно, является неполной, так как освещает только один аспект молекулярной эволюции данного возбудителя, связанный с генетическим дрейфом, и не принимает во внимание его генетическую вариативность, возникающую вследствие рекомбинации, что диктует необходимость дальнейшего продолжения и расширения исследований, посвященных молекулярной эпидемиологии ЭВ.

Список использованных источников

1. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses / P. Simmonds [et al.] // *Arch. Virol.* – 2020. – Vol. 165, N 3. – P. 793–797. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6>
2. Pallansch, M. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses / M. Pallansch, R. Roos // *Fields Virol.* – 5th ed. – Philadelphia, 2007. – P. 839–893.
3. Lukashev, A. N. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses / A. N. Lukashev, Y. A. Vakulenko // *J. Gen. Virol.* – 2017. – Vol. 98, N 12. – P. 2968–2981. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000966>
4. Sanjuán, R. From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses / R. Sanjuán // *PLoS Pathogens.* – 2012. – Vol. 8, N 5. – P. e1002685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002685>
5. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process / C. Muslin [et al.] // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11, N 9. – P. 859. <https://doi.org/10.3390/v11090859>
6. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? / A. N. Lukashev [et al.] // *Rev. Med. Virol.* – 2018. – Vol. 28, N 6. – Art. e2002. <https://doi.org/10.1002/rmv.2002>
7. Global emergence of Enterovirus 71: a systematic review / G. Nayak [et al.] // *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* – 2022. – Vol. 11, N 1. – Art. 78. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00258-4>
8. A decade of enterovirus genetic diversity in Belgium / E. Wollants [et al.] // *J. Clin. Virol.* – 2019. – Vol. 121. – Art. 104205. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104205>
9. Epidemiology of Echovirus 30 infections detected in a University Hospital in Catalonia, Spain, in 1995–2020 / M. Del Cuerdo [et al.] // *Microorganisms.* – 2022. – Vol. 10, N 3. – Art. 592. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030592>
10. Molecular epidemiology and evolutionary trajectory of emerging Echovirus 30, Europe / K. S. M. Benschop [et al.] // *Emerg. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 27, N 6. – P. 1616–1626. <https://doi.org/10.3201/eid2706.203096>
11. Holm-Hansen, C. C. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review / C. C. Holm-Hansen, S. E. Midgley, T. K. Fischer // *Lancet. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 16, N 5. – P. e64–e75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
12. Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus / T. V. Amvrosieva [et al.] // *Cent. Eur. J. Public Health.* – 2001. – Vol. 9, N 3. – P. 154–157.
13. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents / T. V. Amvrosieva [et al.] // *Cent. Eur. J. Public Health.* – 2006. – Vol. 14, N 2. – P. 67–73. <https://doi.org/10.21101/cejph.a3369>
14. Молекулярная эпидемиология энтеровирусов, вызывающих тяжелые неврологические формы инфекции / Н. В. Поклонская [и др.] // *Вест. НАН Беларуси. Сер. мед. наук.* – 2017. – № 3. – С. 29–36.

15. Использование различных модификаций метода ПЦР при диагностике энтеровирусных инфекций / Н. В. Поклонская [и др.] // Мед. новости. – 2004. – № 1. – С. 91–93.
16. Модифицированный метод гнездовой полимеразной цепной реакции в одной пробирке для детекции энтеровирусов / Н. В. Поклонская [и др.] // Клини. лаб. диагностика. – 2004. – № 4. – С. 4.
17. Felsenstein, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach / J. Felsenstein // J. Mol. Evol. – 1981. – Vol. 17, N 6. – P. 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
18. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Mol. Biol. Evol. – 2016. – Vol. 33, N 7. – P. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
19. Relaxed phylogenetics and dating with confidence / A. J. Drummond [et al.] // PLoS Biol. – 2006. – Vol. 4, N 5. – P. e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>
20. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 / M. A. Suchard [et al.] // Virus Evol. – 2018. – Vol. 4, N 1. – Art. vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
21. Posterior summarization in Bayesian Phylogenetics using Tracer 1.7 / A. Rambaut [et al.] // Syst. Biol. – 2018. – Vol. 67, N 5. – P. 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
22. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц; пер. с англ. Ю. А. Данилова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
23. Bailly, J. L. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene / J. L. Bailly, A. Mirand, C. Henquell // Infect. Genet. Evol. – 2009. – Vol. 9, N 4. – P. 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.04.009>
24. Global phylogenetics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages / C. Lema [et al.] // Virology. – 2019. – Vol. 531. – P. 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
25. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages / G. Palacios [et al.] // J. Virol. – 2002. – Vol. 76, N 10. – P. 4940–4949. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4940-4949.2002>
26. Молекулярная характеристика и филогенетический анализ энтеровирусов, вызвавших вспышки и сезонные подъемы заболеваемости в разных регионах Республики Беларусь / Т. В. Амвросьева [и др.] // Журн. микробиол. – 2006. – № 3. – С. 17–21.

References

1. Simmonds P., Gorbalenya A. E., Harvala H., Hovi T., Knowles N. J., Lindberg A. M. [et al.]. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Archives of Virology*, 2020, vol. 165, no. 3, pp. 793–797. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6>
2. Pallansch M., Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. *Fields Virology. 5th ed.* Philadelphia, 2007, pp. 839–893.
3. Lukashov A. N., Vakulenko Y. A. Molecular evolution of types in non-polio enteroviruses. *Journal of General Virology*, 2017, vol. 98, no. 12, pp. 2968–2981. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000966>
4. Sanjuán R. From molecular genetics to phylodynamics: evolutionary relevance of mutation rates across viruses. *PLoS Pathogens*, 2012, vol. 8, no. 5, p. e1002685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002685>
5. Muslin C., Mac Kain A., Bessaud M., Blondel B., Delpyroux F. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 9, p. 859. <https://doi.org/10.3390/v11090859>
6. Lukashov A. N., Vakulenko Y. A., Turbabin N. A., Deviatkin A. A., Drexler J. F. Molecular epidemiology and phylogenetics of human enteroviruses: Is there a forest behind the trees? *Reviews in Medical Virology*, 2018, vol. 28, no. 6, art. e2002. <https://doi.org/10.1002/rmv.2002>
7. Nayak G., Bhuyan S. K., Bhuyan R., Sahu A., Kar D., Kuanar A. Global emergence of Enterovirus 71: a systematic review. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 2022, vol. 11, no. 1, art. 78. <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00258-4>
8. Wollants E., Beller L., Beuselinck K., Bloemen M., Lagrou K., Reynders M., Van Ranst M. A decade of enterovirus genetic diversity in Belgium. *Journal of Clinical Virology*, 2019, vol. 121, art. 104205. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.104205>
9. Del Cuerpo M., Gonzalez de Audicana J., Fernandez-Garcia M. D., Marín P., Esteban M., Español M., Cabrerizo M., Rabella N. Epidemiology of Echovirus 30 infections detected in a University Hospital in Catalonia, Spain, in 1995–2020. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 3, p. 592. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030592>
10. Benschop K. S. M., Broberg E. K., Hodcroft E., Schmitz D., Albert J., Baicus A. [et al.] Molecular epidemiology and evolutionary trajectory of emerging Echovirus 30, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 2021, vol. 27, no. 6, pp. 1616–1626. <https://doi.org/10.3201/eid2706.203096>
11. Holm-Hansen C. C., Midgley S. E., Fischer T. K. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet. Infectious diseases*, 2016, vol. 16, no. 5, pp. e64–e75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
12. Amvrosieva T. V., Titov L. P., Mulders M., Hovi T., Dyakonova O. V., Votyakov V. I. [et al.]. Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus. *Central European Journal of Public Health*, 2001, vol. 9, no. 3, pp. 154–157.
13. Amvrosieva T. V., Paklonskaya N. V., Biazruchka A. A., Kazinetz O. N., Bohush Z. F., Fisenko E. G. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Central European Journal of Public Health*, 2006, vol. 14, no. 2, pp. 67–73. <https://doi.org/10.21101/cejph.a3369>
14. Paklonskaya N. V., Amvros'eva T. V., Lozyuk S. K., Shilova Yu. A., Bogush Z. F., Biskina N. M. Molecular epidemiology of enteroviruses causing severe neurological infection forms. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya medytsynskikh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2017, no. 3, pp. 29–36 (in Russian).
15. Paklonskaya N. V., Amvrosieva T. V., Dzyakanava O. V., Shcherbakova O. B. The use of various modifications of the PCR method in the diagnosis of enteroviral infections. *Meditsinskie novosti = Medical news*, 2004, no. 1, pp. 91–93 (in Russian).

16. Poklonskaya N. V., Amvros'eva T. V., D'yakonova O. V., Shcherbakova O. B., Voilokova R. Ya. Modified one-tube nested polymerase chain reaction method for detection of enteroviruses. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian clinical laboratory diagnostics*, 2004, no. 4, pp. 46–47 (in Russian).
17. Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, vol. 17, no. 6, pp. 368–376. <https://doi.org/10.1007/BF01734359>
18. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
19. Drummond A. J., Ho S. Y., Phillips M. J., Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 2006, vol. 4, no. 5, p. e88. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>
20. Suchard M. A., Lemey P., Baele G., Ayres D. L., Drummond A. J., Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 2018, vol. 4, no. 1, art. vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
21. Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G., Suchard M. A. Posterior summarization in Bayesian Phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 2018, vol. 67, no. 5, pp. 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
22. Glanz S. A. *Primer of Biostatistics. 4th ed.* New York, McGraw-Hill Inc., 1997. 473 p.
23. Bailly J. L., Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Chambon M., Charbonné F., Traoré O., Peigue-Lafeuille H. Phylogeography of circulating populations of human echovirus 30 over 50 years: nucleotide polymorphism and signature of purifying selection in the VP1 capsid protein gene. *Infection, genetics and evolution*, 2009, vol. 9, no. 4, pp. 699–708. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.04.009>
24. Lema C., Torres C., Van der Sanden S., Cisterna D., Freire M. C., Gómez R. M. Global phylodynamics of Echovirus 30 revealed differential behavior among viral lineages. *Virology*, 2019, vol. 531, pp. 79–92. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.02.012>
25. Palacios G., Casas I., Cisterna D., Trallero G., Tenorio A., Freire C. Molecular epidemiology of echovirus 30: temporal circulation and prevalence of single lineages. *Journal of Virology*, 2002, vol. 76, no. 10, pp. 4940–4949. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.4940-4949.2002>
26. Amvros'eva T. V., Poklonskaya N. V., Bezruchko A. A., Fisenko E. G. Molecular characterization and phylogenetic analysis of enteroviruses inducing the outbreaks and seasonal rises of morbidity in different regions of the Republic of Belarus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*, 2006, no. 3, pp. 17–21 (in Russian).

Информация об авторах

Поклонская Наталья Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6431-5050>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Амвросьева Тамара Васильевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-7309-152X>. E-mail: amvrosieva@gmail.com

Богуш Зоя Федоровна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: labsanvir@gmail.com

Шилова Юлия Александровна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-4521-6599>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Колтунова Юлия Борисовна – мл. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-6488-9422>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Бельская Инна Валерьевна – науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-4044-6827>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Information about the authors

Natalia V. Paklonskaya – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6431-5050>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Tamara V. Amvrosieva – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Laboratory. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-7309-152X>. E-mail: amvrosieva@gmail.com

Zoya F. Bogush – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: labsanvir@gmail.com

Yulia A. Shilava – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-4521-6599>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Yulia B. Kaltunova – Junior Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-6488-9422>. E-mail: labsanvir@gmail.com

Ina V. Belskaya – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-4044-6827>. E-mail: labsanvir@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 574.2:539.16.04
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-237-248>

Поступила в редакцию 14.02.2024
Received 14.02.2024

А. Н. Никитин¹, М. В. Кудин², С. А. Калиниченко², Т. В. Ласько³,
О. А. Шуранкова³, Е. В. Мищенко³

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Полесский государственный радиационно-экологический заповедник, г. Хойники, Республика Беларусь

³Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

ПОСТРОЕНИЕ ПРОГНОЗА НАКОПЛЕНИЯ ¹³⁷Cs ДРЕВЕСНЫМИ РАСТЕНИЯМИ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫМИ КУЛЬТУРАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА РЕШАЮЩИХ ДЕРЕВЬЕВ

Аннотация. Изучены закономерности накопления ¹³⁷Cs в стволовой древесине сосновых насаждений и в урожае сельскохозяйственных культур с использованием метода градиентного бустинга на решающих деревьях и SHAP-анализа. Для сосновых насаждений в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС выявлена нелинейная связь коэффициента перехода с высотой над уровнем моря, а также с вегетационными индексами, указывающими на общее состояние насаждений, их биологическую продуктивность и обеспеченность калием. В агроэкосистемах на территории Гомельской и Могилевской областей подтверждено влияние на коэффициент перехода вида растения и концентрации K⁺ в почвенном растворе. Использование интерпретируемого метода машинного обучения позволило определить характер влияния дефицита почвенной влаги на накопление ¹³⁷Cs сельскохозяйственными растениями, а также показать сохранение вклада трансфолиарного поступления радионуклида при низких уровнях загрязнения почвы на этапе отдаленных последствий радиоактивных выпадений. Применение метода градиентного бустинга на решающих деревьях и интерпретация модели с помощью SHAP-анализа обеспечили более глубокое понимание сложных взаимосвязей факторов, влияющих на поступление ¹³⁷Cs в растения, что открывает перспективы для повышения точности прогноза загрязнения растительных ресурсов радионуклидами.

Ключевые слова: экологические факторы, почвенно-растительная система, цезий-137, вегетационные индексы, машинное обучение, решающие деревья, SHAP-анализ

Для цитирования: Построение прогноза накопления ¹³⁷Cs древесными растениями и сельскохозяйственными культурами с использованием метода решающих деревьев / А. Н. Никитин [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 237–248. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-237-248>

Aleksander N. Nikitin¹, Maksim V. Kudin², Sergey A. Kalinichenko², Tamara V. Lasko³,
Olga A. Shurankova³, Egor V. Mishchanka³

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Polesie State Radioecological Reserve, Choiniki, Republic of Belarus

³Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

FORECASTING THE ACCUMULATION OF ¹³⁷Cs BY TREES AND CROPS USING THE DECISION TREE METHOD

Abstract. The article provides a profound analysis of the accumulation of the radionuclide ¹³⁷Cs in the stems of pine trees and harvest of crops, employing decision tree methods and SHAP analysis. In pine forests situated in the Chernobyl exclusion zone, a nonlinear relationship between the aggregated transfer factor and elevation above sea level is identified, along with the influence of vegetation indices pointing to overall stand condition, biological productivity, and potassium deficiency. In agroecosystems situated in Gomel and Mogilev regions, the impact of plant species, K⁺ concentration in the soil solution on aggregated transfer factor is confirmed. Interpretable machine learning method shows dependence of aggregated transfer factor from soil moisture and the persistence of transfoliar contamination at low soil pollution levels at late stage after Chernobyl catastrophe. The application of decision trees and SHAP analysis offers a deeper understanding of complex interactions in the “soil-plant” system, opening perspectives for effective monitoring and management of radioactive contamination in diverse natural and agricultural environments.

Keywords: ecological factors, soil-plant system, cesium-137, vegetation indices, machine learning, decision trees, SHAP-analysis

For citation: Nikitin A. N., Kudin M. V., Kalinichenko S. A., Lasko T. V., Shurankova O. A., Mishchanka E. V. Forecasting the accumulation of ¹³⁷Cs by trees and crops using the decision tree method. *Vesti Natsyyanal'noi akademii nauk Belarusi. Seryya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 237–248 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-237-248>

Введение. Выявление и количественное описание эффектов воздействия отдельных экологических факторов на различные параметры состояния экосистем представляет собой сложную задачу в силу одновременного влияния всего комплекса условий окружающей среды и их изменения во времени и пространстве. Эдафические, климатические, биотические и антропогенные факторы имеют разную силу и направленность влияния на определяемый показатель, а их эффект может зависеть от этапа вегетационного периода, исходного состояния экосистемы и воздействия других факторов. Задачу осложняют корреляционные связи различной силы между экологическими факторами.

Одним из подходов к решению данной задачи является постановка экспериментов с созданием условий, в которых изменяется только один из факторов. Сильной стороной данного подхода является возможность однозначной интерпретации эффекта воздействия изучаемого фактора. Однако постановка подобных экспериментов предполагает наличие априорных знаний о силе влияния всех экологических факторов и отбор наиболее существенных. Для получения ответа на вопрос о взаимодействии двух факторов требуется значительное увеличение количества вариантов опыта, а взаимодействие трех и более факторов исследовать практически невозможно. Особую сложность представляет создание моделей естественных экосистем для проведения подобных экспериментов.

Наблюдения за естественными экосистемами или производственными посевами позволяют получить информацию об изменении целевого параметра их состояния в ответ на действие комплекса экологических факторов при минимальных затратах. Однако интерпретация данной информации, выделение факторов, оказывающих существенное влияние, поиск эффектов взаимодействия факторов, построение количественных моделей являются сложными задачами. Для их решения целесообразно использовать методы машинного обучения, допускающие возможность интерпретации построенной модели.

Решающие деревья (decision trees) являются семейством моделей машинного обучения, работа которых основана на построении набора применяемых к входным параметрам последовательных двузначных правил, позволяющих оценить значение целевой переменной. Решающие деревья применяются для решения задач как классификации, так и регрессии. Несмотря на кажущуюся простоту, использование ансамблей решающих деревьев позволяет решать сложные задачи и обеспечивать максимально возможную точность прогноза. В случае большого количества входных параметров и существенного шума в данных ансамбли решающих деревьев часто оказываются единственным работающим подходом. Еще одним преимуществом методов, базирующихся на решающих деревьях, является простота интерпретации работы моделей. Данное обстоятельство позволяет использовать их не только для прогноза целевой переменной, но и для раскрытия закономерностей влияния входных параметров на ее значение.

Одним из наиболее мощных вариантов моделей рассматриваемого семейства является градиентный бустинг на решающих деревьях. В нем реализована идея последовательной линейной комбинации алгоритмов. При этом каждый последующий алгоритм нацелен на уменьшение ошибок предыдущего. Данный метод способен находить сложные нелинейные взаимосвязи между переменными различной природы, что делает его подходящим для решения задачи исследования – определения влияния комплекса экологических факторов на целевой параметр состояния экосистемы.

Различные варианты метода решающих деревьев находят свое применение в экологических исследованиях. Его применяют для моделирования динамики и пространственной структуры популяций [1]. В работе [2] показано, что метод решающих деревьев позволяет построить более точную модель годовой и сезонной продуктивности луговых экосистем по сравнению с регрессионными моделями. На примере биомассы фитопланктона некоторых речных экосистем Китая были показаны преимущества метода случайных деревьев для выявления основных экологических факторов, влияющих на этот параметр состояния экосистемы [3]. В этом же исследовании для описания характера влияния отобранных факторов на биомассу фитопланктона был использован SHAP-анализ.

В исследовании [4] метод градиентного бустинга на решающих деревьях был успешно применен для построения модели баланса углерода в различных экосистемах и для отбора наиболее

значимых климатических факторов, влияющих на него. Аналогичный подход был использован для прогноза зараженности (на основании характеристик воды) устриц болезнетворными бактериями *Vibrio parahaemolyticus* [5] и распространенности (в зависимости от климатических факторов) листерии в пастбищных экосистемах [6]. Метод градиентного бустинга на решающих деревьях в комбинации с различными техниками интерпретации моделей был успешно применен в исследовании экологии бентосных беспозвоночных в водоемах США [7].

Прогноз перехода радиоактивных изотопов Cs из почвы в растения является довольно сложной задачей в связи с динамичным изменением их распределения по формам нахождения в почве и с зависимостью их корневого поступления от обеспеченности растений калием [8]. Вместе с тем от надежности данного прогноза зависит эффективность защитных мер, применяемых на загрязненных радионуклидами территориях. Согласно нашей гипотезе, использование метода решающих деревьев с интерпретацией полученных моделей с помощью SHAP-анализа позволит выявить особенности влияния основных экологических факторов на накопление ^{137}Cs растениями лесных экосистем и агроэкосистем на этапе отдаленных последствий чернобыльской катастрофы. До настоящего времени подобный подход не использовался в радиоэкологических исследованиях.

Цель настоящей работы – оценка возможности использования метода градиентного бустинга на решающих деревьях для анализа эффектов воздействия различных экологических факторов на коэффициент перехода ^{137}Cs в древесные растения и сельскохозяйственные культуры.

Объекты и методы исследования. Данные по накоплению ^{137}Cs сельскохозяйственными культурами сформированы по результатам анализа растительных образцов, отобранных в 2019–2020 гг. в фазы технической спелости в производственных посевах методом учетных площадок, и сопряженных образцов почвы. Подбор сельскохозяйственных предприятий для отбора образцов осуществляли исходя из плотности загрязнения территории и структуры посевных площадей в наиболее загрязненных районах Гомельской и Могилевской областей. Всего набор данных включает 271 наблюдение. В число обследованных культур вошли: люцерна, клевер, тимофеевка, сурепица, сурепка, лядвенец, овес (зерно и зеленая масса), кукуруза (зерно и зеленая масса), ячмень (зерно), озимая рожь (зерно), озимая пшеница (зерно) и яровая пшеница (зерно), морковь, картофель, лук (перо и репка), свекла столовая и свекла кормовая, горох (зерно и зеленая масса), пайза, озимая тритикале, подсолнечник (семена и зеленая масса), гречиха, лен (семя и волокно), просо (зерно и зеленая масса), бобово-злаковые смеси и злаковые смеси. По каждой культуре пробы были отобраны на 3–33 участках. Образцы отбирали преимущественно на супесчаных и песчаных почвах, 12 участков имели суглинистую почву, на почвах органического происхождения было заложено 15 участков.

Данные по накоплению ^{137}Cs в неокоренной древесине сосны собраны на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника (ПГРЭЗ) в 2011–2022 гг. Для обследования отбирали насаждения спелого и приспевающего классов возраста. Закладку временных пробных площадей и их описание выполняли в соответствии с общепринятыми методами [9]. Отбор образцов почвы и древесины осуществляли в соответствии с [10]. Всего набор данных включал 1033 наблюдения. Распределение пробных площадей по типам леса и типам лесорастительных условий соответствовало типологической структуре ПГРЭЗ. Практически 2/3 составляли сосняки мшистые, на черничные приходилось 15,2 % пробных площадей, на орляковые – 10,8, на вересковые – 4,7, на кисличные – 1,9, на лишайниковые, брусничные, папоротниковые, снытевые, длинномошные и таволговые – менее 1 %. На тип лесорастительных условий A_2 приходилось 70,4 % пробных площадей, на тип B_3 – 13,8, на тип B_2 – 10,8, на типы C_2 и A_3 – менее 1,5 %.

Плотность загрязнения почвы ^{137}Cs на пробных площадях в сосновых экосистемах варьировалась от 33 до 10 496 кБк/м² (среднее арифметическое – 559 кБк/м²), а удельная активность радионуклида в отобранных образцах неокоренной древесины составляла 18–34 214 Бк/кг (среднее арифметическое – 1 120 Бк/кг). Критериями возможности заготовки древесины для различных целей являлись уровни 740 и 1 480 Бк/кг (РДУ/ЛХ-2001), которым отвечало 68,4 и 86,7 % обследованных участков соответственно.

В отобранных образцах почвы определяли основные агрохимические показатели: содержание органического вещества, pH в солевой вытяжке, содержание подвижных калия и фосфора, содержание обменных аммония, кальция и магния, гидrolитическую кислотность, обменную емкость и степень насыщенности основаниями [11]. Удельную активность ^{137}Cs в отобранных образцах почвы и растений определяли с помощью γ -спектрометрического комплекса Canberra на основе полупроводникового Ge(Li) коаксиального детектора с расширенным энергетическим диапазоном, используя стандартные подходы [12]. Коэффициент перехода (Кп) ^{137}Cs из почвы в анализируемые органы растений рассчитывали как отношение удельной активности радионуклида в высушенном до воздушно-сухого состояния образце растения к плотности загрязнения почвы данным радионуклидом: $(\text{Бк/кг}):(\text{кБк/м}^2)$ или $\times 10^{-3} \text{ м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$.

Поскольку доля глинистой фракции в механическом составе почвы непосредственно не определялась, было принято, что в песчаных почвах она составляет 5 %, в супесчаных – 15, в суглинистых – 30 %. Концентрации K^+ и Cs^+ в почвенном растворе оценивали с использованием моделей [13] и [13–15] соответственно.

Для оценки состояния лесных экосистем использовали данные дистанционного зондирования Sentinel-2 [16] уровня 2A, цифровая модель поверхности [17]. Для анализа спектрального отклика полого лесных экосистем данные Sentinel-2 были отобраны из области интереса – в круге радиусом 40 м, центрированном относительно центра пробной площадки. С целью получения более однородной выборки данных по спектральной светимости участков для анализа отобраны снимки Sentinel-2 за июнь 2018 г. В анализ отбирали только те снимки, для которых вероятность облачного покрова в радиусе 5 км вокруг области интереса составляла менее 3 %. В качестве исходного набора входных параметров модели использованы следующие вегетационные индексы: NDVI, EVI, GNDVI, CVI, NDWI, SAVI, ARVI, MSAVI2, MSARVI2, NDSI³⁻⁴, RVI, DVI, VARI, CMR, FMR, BAI, COMVI³⁻⁵⁻²⁻⁴⁻¹¹. Анализировали среднее и максимальное значения, а также среднеквадратичное отклонение данных индексов в области интереса.

Содержание влаги в верхнем слое почвы сельскохозяйственных угодий оценивали с помощью данных дистанционного зондирования SMAP [18] с пространственным разрешением 9 км. Использовали медианы влажности верхнего 5-сантиметрового слоя почвы (доля от полной влагоемкости) с апреля по август, отдельно в первых двух декадах июня и в третьей декаде июня.

Для моделирования зависимости Кп от факторов окружающей среды использовали метод градиентного бустинга на решающих деревьях в реализации LightGBM [19]. Стратегия построения модели включала следующие этапы:

1. Отбор параметров, позволяющих снизить неопределенность модели. На первом шаге в число параметров модели включали все анализируемые факторы. На следующих шагах производилось обучение модели и параметры последовательно исключали. Критерием исключения параметра являлось минимальное уменьшение среднеквадратичной ошибки модели, обученной без него.

2. Оптимизация гиперпараметров модели методом байесова поиска [20] с использованием пакета Bayesian Optimization для Python.

3. Построение финальной версии модели градиентного бустинга на решающих деревьях, использующей отобранные входные параметры.

4. Анализ влияния отдельных факторов на Кп с использованием метода SHapley Additive exPlanations (SHAP) в реализации [21, 22]. Данный метод, основанный на теории игр, определяет влияние каждого из параметров модели на результат, что позволяет провести графический анализ особенностей воздействия каждого из факторов на определяемую величину. Для анализа взаимного влияния двух факторов использовали цветовое кодирование. Синим цветом обозначали низкие значения дополнительного параметра, красным – высокие.

Для оценки точности модели использовали подход Leave-One-Out. Для предупреждения переобучения модели использовали раннюю остановку на основании динамики изменения ошибки на случайно отобранной тестовой выборке, составлявшей 30 % от объема данных.

Результаты и их обсуждение. *Лесные экосистемы.* Кп ^{137}Cs из почвы в неокоренную древесину сосны на обследованных пробных площадях варьируются в широком диапазоне –

от $0,07 \cdot 10^{-3}$ до $19,01 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$ со средним значением $2,19 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$ и медианой $1,63 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$. Высокая вариабельность показателя накопления характерна также для типов леса и типов лесорастительных условий. Это указывает на то, что разработанные для лесохозяйственной деятельности системы лесной классификации не в полной мере отражают изменение комплекса факторов, влияющих на поведение ^{137}Cs в системе «почва–растение» в условиях ПГРЭЗ, где не ведется уход за лесом.

Мультиспектральные данные дистанционного зондирования Земли сегодня широко используются для оперативного анализа состояния растительного и почвенного покрова. Из спектрального отклика крон сосновых экосистем может быть выделена информация для оценки различных параметров состояния насаждения. Наиболее распространенным методическим подходом при этом является расчет вегетационных индексов, связанных с той или иной характеристикой растительного покрова. Различные вегетационные индексы (средние, максимальные значения и их среднеквадратичные отклонения в пределах пробной площади) в настоящей работе используются в качестве входных параметров модели решающих деревьев.

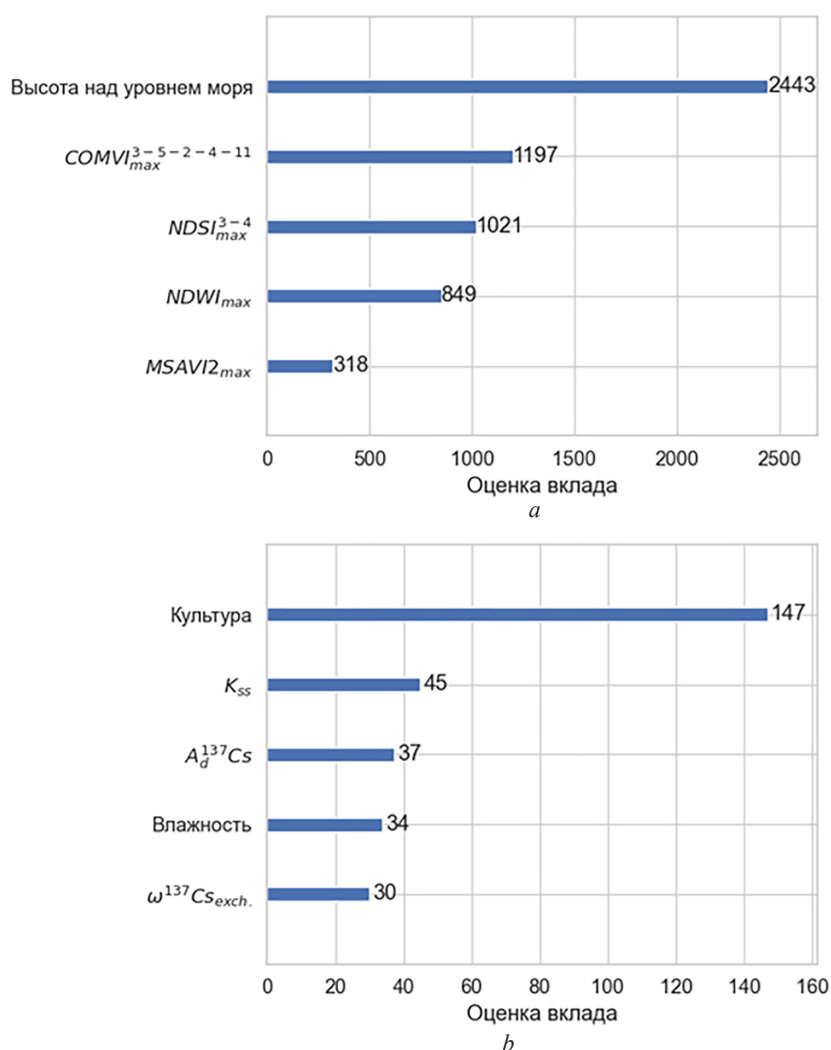


Рис. 1. Значимость факторов в моделях коэффициентов перехода ^{137}Cs из почвы в неокоренную древесину сосны (a) и урожай сельскохозяйственных культур (b). $COMVI_{max}^{3-5-2-4-11}$, $NDSI_{max}^{3-4}$, $NDWI_{max}$, $MSAVI2_{max}$ – максимальные значения соответствующих вегетационных индексов; K_{ss} – концентрация K^+ в почвенном растворе, моль/л; $A_d^{137}\text{Cs}$ – плотность загрязнения почвы ^{137}Cs , кБк/м²; $\omega^{137}\text{Cs}_{exch.}$ – доля ^{137}Cs в ионообменной форме, %

Fig. 1. Significance of factors in the models of the ^{137}Cs aggregated transfer factor from soil to pine logs (a) and crop yield (b). $COMVI_{max}^{3-5-2-4-11}$, $NDSI_{max}^{3-4}$, $NDWI_{max}$, $MSAVI2_{max}$ – maximum values of the relevant vegetation indices; K_{ss} – K^+ concentration in the soil solution, mol/l; $A_d^{137}\text{Cs}$ – contamination density of the soil with ^{137}Cs , kBq/m²; $\omega^{137}\text{Cs}_{exch.}$ – fraction of ^{137}Cs in ion exchangeable form, %

На первом этапе отобраны параметры с наиболее существенным вкладом в результат моделирования: $Elevation_{mean}$ – средняя высота участка над уровнем моря, $COMVI_{max}^{3-5-2-4-11}$ – максимальное значение разработанного авторами исследования вегетационного индекса [23], $NDSI_{max}^{3-4}$ – максимальное значение нормализованного разностного спектрального индекса (зеленый-красный), $NDWI_{max}$ – максимальное значение нормализованного разностного индекса увлажнения, $MSAVI2_{max}$ – максимальное значение измененного вегетационного индекса с поправкой на почву.

Относительный вклад данных параметров в модель представлен на рис. 1, а. Результаты показывают, что высота участка над уровнем моря оказывает наиболее сильное влияние на Кп с большим отрывом от вклада вегетационных индексов.

Изучение влияния высоты над уровнем моря на Кп для условий ПГРЭЗ (рис. 2, а) показало, что наиболее низкие значения этого показателя (на 0,4–0,8 ниже среднего) наблюдаются на участках, расположенных на высоте 130–140 м. На пониженных участках (ниже 130 м) происходит резкое увеличение Кп. При высоте более 140 м Кп ниже на 0,2–0,4 единицы среднего по породе значения. Высота над уровнем моря отражает положение лесной экосистемы на элементе рельефа. Участки на повышенных элементах испытывают дефицит влаги, на пониженных – расположены на гидроморфных и полугидроморфных почвах.

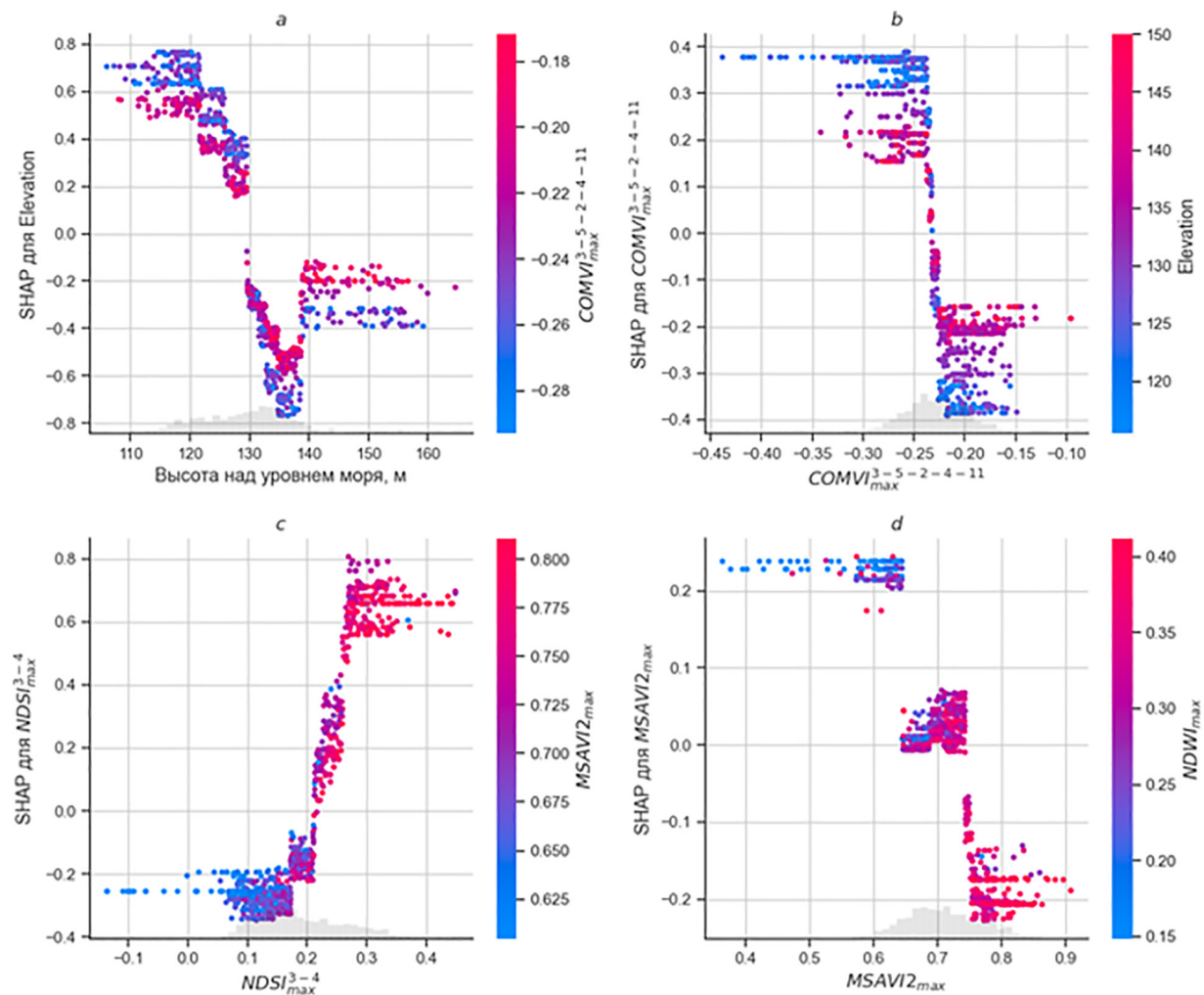


Рис. 2. Оценка связи высоты над уровнем моря и отобранных вегетационных индексов с коэффициентом перехода ^{137}Cs из почвы в неокоренную древесину сосны на основании анализа SHAP

Fig. 2. Assessing the relationship between elevation above sea level and selected vegetation indices with the ^{137}Cs aggregated transfer factor from soil to pine logs based on the SHAP analysis

На фоне влияния других параметров модели Кп резко увеличивается при значениях индекса $\text{COMVI}^{3-5-2-4-11}_{\max}$ менее $-0,24$ (рис. 2, *b*). Низкие значения индекса $\text{COMVI}^{3-5-2-4-11}$ должны свидетельствовать о дефиците калия в почве. Поскольку дефицит калия является одним из известных факторов увеличения интенсивности поглощения изотопов цезия растениями, обнаруженная связь вполне согласуется с современными представлениями о поведении ^{137}Cs в системе «почва–растение». Анализ SHAP позволяет выявить взаимодействие между различными факторами. В частности, из рис. 2, *b* видно, что при высоте участков более 135 м над уровнем моря взаимосвязь Кп с индексом $\text{COMVI}^{3-5-2-4-11}_{\max}$ менее существенная – размах значений Кп составляет около 0,4 ед., тогда как на пониженных участках размах Кп при изменении анализируемого вегетационного индекса составляет около 0,8 ед.

Индекс NDSI^{3-4} (нормализованный разностный спектральный индекс зеленый–красный) связан с плотностью растительного покрова и плотностью фотосинтетических органов на единицу поверхности почвы. $\text{NDSI}^{3-4}_{\max} > 0,26$ приводит к росту Кп на 0,6 ед. и более выше среднего по породе значения (рис. 2, *c*). В разреженных насаждениях при $\text{NDSI}^{3-4}_{\max} < 0,18$ Кп несколько ниже средних значений. Вероятно, более острая внутривидовая конкуренция за ресурсы, включая калий, в перегушенных насаждениях приводит к сильному увеличению интенсивности накопления ^{137}Cs в стволовой древесине сосны.

Измененный вегетационный индекс с поправкой на почву (MSAVI2) является альтернативой более распространенному нормализованному разностному вегетационному индексу (NDVI). Он позволяет более точно оценить состояние фотосинтетического аппарата и биологическую продуктивность растительного покрова, особенно если в области интереса имеются свободные от растений участки. Все обследованные сосняки можно разделить на три группы на основании связи индекса MSAVI2_{\max} с Кп (рис. 2, *d*). При его значении от 0,63 до 0,73 Кп близок к среднему для породы значению. Однако при пониженных значениях MSAVI2_{\max} , характерных для лесных экосистем с низкой биологической продуктивностью, уровень накопления ^{137}Cs в стволовой древесине сосны возрастает. В наиболее продуктивных сосновых насаждениях при $\text{MSAVI2}_{\max} > 0,75$ Кп на 0,1–0,2 ед. меньше среднего для породы значения.

Вегетационный индекс NDWI указывает на содержание воды в фотосинтетическом аппарате. Его снижение происходит при недостаточной влагообеспеченности. На рис. 2, *d* видна положительная связь между MSAVI2_{\max} и NDWI_{\max} . Это указывает на то, что достаточная влагообеспеченность, поддерживающая высокую биологическую продуктивность лесной экосистемы, снижает Кп ^{137}Cs из почвы в стволовую древесину сосны.

Агроэкосистемы. Кп ^{137}Cs из почвы в урожай сельскохозяйственных культур на обследованных участках составил $(0,003–7,204) \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$. На почвах органического происхождения Кп был приблизительно на порядок выше, чем на минеральных. На почвах минерального происхождения вариабельность Кп составляла $(0,003–0,778) \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$. Из дальнейшего анализа наблюдения на почвах органического происхождения были исключены, поскольку закономерности поведения ^{137}Cs в системе «почва–растение» на них сильно отличаются от таковых в почвах минерального происхождения. Известно, что Кп в значительной мере зависит от культуры и той части растения, в которой определяется содержание радионуклида. Но и для одной культуры или части растения значения Кп могут сильно различаться. Коэффициент вариации Кп в пределах культуры составляет, как правило, 40–60 %.

Отбор наиболее значимых факторов в модели решающих деревьев позволил установить, что на этапе отдаленных последствий выпадения радиоактивных веществ ведущими факторами, влияющими на Кп ^{137}Cs в исследуемые культуры, являются (в порядке убывания значимости): сельскохозяйственная культура > концентрация калия в почвенном растворе > плотность загрязнения почвы ^{137}Cs > влажность почвы в первых двух декадах июня > доля ^{137}Cs в почве в ионообменной форме (см. рис. 1, *b*).

Среднеквадратичная ошибка оценки Кп ^{137}Cs из почвы в сельскохозяйственные культуры с использованием построенной модели после отбора наиболее значимых параметров составила $0,351 \cdot 10^{-3} \text{ м}^2 \cdot \text{кг}^{-1}$; коэффициент детерминации (R^2) – 0,400. Включение в модель только наиболее значимых параметров позволило не только упростить, но и повысить ее точность. В случае

построения модели по полному исходному набору факторов среднеквадратичная ошибка и R^2 составили 0,460 и 0,216 соответственно.

Как показал анализ влияния количественных параметров модели на Кп ^{137}Cs в урожай (рис. 3), наиболее существенное влияние на Кп оказывает культура (качественный параметр), при этом показатели SHAP указывают на то, как изменяется Кп при различных значениях того или иного фактора относительно среднего его значения для культуры на фоне влияния других количественных факторов.

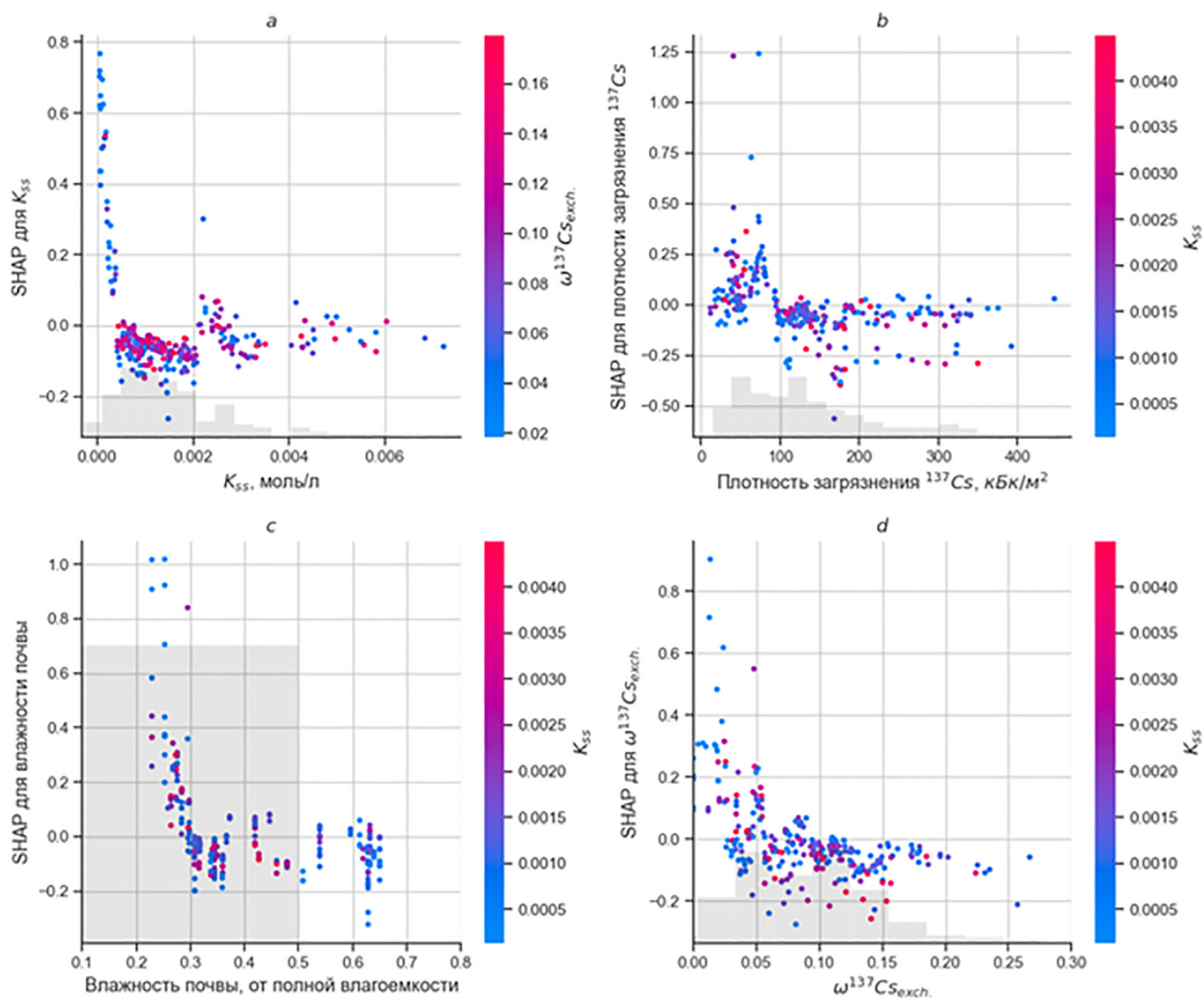


Рис. 3. Оценка связи параметров модели с коэффициентом перехода ^{137}Cs из почвы в урожай сельскохозяйственных культур. K_{ss} – концентрация K^+ в почвенном растворе, моль/л; $\omega^{137}\text{Cs}_{\text{exch}}$ – доля ионообменной формы ^{137}Cs в почве от его валового запаса

Fig. 3. Evaluating the relationship between the model parameters and the ^{137}Cs aggregated transfer factor from soil to crops in agricultural ecosystems. K_{ss} – K^+ concentration in the soil solution, mol/L; $\omega^{137}\text{Cs}_{\text{exch}}$ – fraction of ^{137}Cs in ion-exchangeable form in the soil with respect to its total content

Второй по значимости фактор – содержание K^+ в почвенном растворе – влияет на Кп только при его значении ниже 1 ммоль/л. Увеличение концентрации K^+ от минимальных наблюдаемых значений до 1 ммоль/л приводит к резкому падению Кп (рис. 3, а). При значении этого параметра выше 1 ммоль/л Кп близок к средним для культуры значениям. Наблюдаемая закономерность хорошо согласуется с современными представлениями о механизмах корневого поступления радиоактивных изотопов Cs в растения [24]. Заметное увеличение Кп при развитии дефицита калия обусловлено активацией переносчика K^+ НАК-типа, имеющего высокую степень родства с Cs^+ .

Традиционно для оценки обеспеченности растений калием определяют содержание этого макроэлемента в подвижной или ионообменной форме. При замене концентрации K^+ в почвенном растворе на концентрацию его ионообменной формы точность модели падает (среднеквадратичная ошибка – 0,380; R^2 – 0,351). В настоящей работе концентрацию K^+ в почвенном растворе оценивали не непосредственно, а на основании обычных параметров (механический состав, содержание органического вещества, содержание обменного калия), определяемых при почвенном обследовании, что позволяет рекомендовать именно концентрацию K^+ в почвенном растворе для прогноза перехода ^{137}Cs в сельскохозяйственные культуры.

Плотность загрязнения почвы ^{137}Cs не влияет на K_p при ее значениях выше 90 кБк/м². Однако для низких плотностей загрязнения выявлено аномальное повышение K_p (рис. 3, б). В разрезе отдельных культур наиболее выражено повышение K_p при низких плотностях загрязнения для бобовых (клевер, люцерна) и злаковых культур (озимая и яровая пшеница, озимая рожь, овес, пайза), а также для бобово-злакового разнотравья. В отдельных случаях K_p ^{137}Cs в урожай этих культур повышается на порядок относительно среднего значения при плотности загрязнения ниже 90 кБк/м².

Вероятно, нелинейная связь между плотностью загрязнения почвы радионуклидом и его удельной активностью в растениях обусловлена возрастанием относительного вклада трансфолиарного загрязнения на наименее загрязненных почвах. Интенсивность корневого поступления ^{137}Cs определяется локальным загрязнением, а интенсивность вторичного выпадения радионуклида на надземные части растений обусловлена региональными особенностями загрязнения. Участки для отбора образцов отбирали в наиболее загрязненных районах, где до настоящего времени сохраняются вторичный подъем, атмосферный перенос и переосаждение радиоактивных аэрозолей. В этих условиях на почвах с низким уровнем загрязнения хорошо заметен вклад трансфолиарного поступления.

Значимое влияние на накопление ^{137}Cs растениями оказывает также влагообеспеченность в период активного роста большинства культур (первые две декады июня). Заметное повышение K_p происходит при влажности верхнего 5-сантиметрового слоя почвы менее 30 % от полной влагоемкости (рис. 3, в). Подобное поведение ^{137}Cs в системе «почва–растение» показано нами в экспериментах ранее [25] и объяснено снижением подвижности K^+ при низком содержании влаги в почве, что приводит к его дефициту в ризосфере [26].

Долю ионообменной формы загрязнителя от его валового содержания в почве нередко рассматривают в качестве показателя биологической доступности. Однако в отношении ^{137}Cs на отдаленном этапе радиоактивных выпадений выявлена обратная логарифмическая связь между долей ионообменной формы радионуклида в почве и K_p . Для объяснения этого явления необходимо принять следующее. Во-первых, корневое поступление радиоактивных изотопов Cs происходит из почвенного раствора [27]. Во-вторых, в почвах минерального происхождения сорбция ^{137}Cs из почвенного раствора наблюдается преимущественно на расширенных краевых участках межпакетных пространств слоистых глинистых минералов с последующей фиксацией элемента в межпакетных пространствах [8]. В-третьих, в почвах минерального происхождения основная емкость почвенного поглощающего комплекса формируется за счет глинистых минералов. Поэтому величина сорбции ^{137}Cs глинистыми минералами и емкость почвенного поглощающего комплекса связаны положительной связью. Следовательно, доля радиоактивных изотопов Cs в почвенном поглощающем комплексе и их концентрация в почвенном растворе могут иметь отрицательную связь, проявляющуюся в отрицательной связи между долей ^{137}Cs в ионообменной форме и K_p радионуклида. В почвах с незначительной сорбционной способностью, обусловленной прежде всего низким содержанием слоистых глинистых минералов в механическом составе, доля ионообменной формы ^{137}Cs редко превышает 7 %, при этом K_p радионуклида заметно увеличивается на фоне влияния других факторов. Следует отметить, что замена доли ^{137}Cs в ионообменной форме на оценку коэффициента распределения радионуклида между твердой фазой почвы и почвенным раствором несколько ухудшает точность модели.

Заключение. Построение моделей на решающих деревьях и их интерпретация с помощью SHAP в приложении к наборам данных по накоплению ^{137}Cs различными видами сельскохозяйственных культур и ствольной древесиной сосны позволили как подтвердить известные особенности поведения радионуклида в системе «почва–растение», так и предположить наличие на от-

даленном этапе радиоактивных выпадений новых зависимостей интенсивности его накопления растениями от ряда экологических факторов.

Коэффициент перехода ^{137}Cs из почвы в неокоренную древесину сосны в условиях ПГРЭЗ имеет нелинейную связь с высотой участка над уровнем моря (минимальные значения – 130–140 м). На основании анализа связи коэффициента перехода с наиболее значимыми вегетационными индексами установлена его зависимость от общего санитарного состояния насаждения и биологической продуктивности деревьев, их обеспеченности калием и водой. Разреженность древесного полога, вероятно, ассоциирована со снижением конкуренции за элементы питания и воду, что снижает интенсивность накопления радионуклида. При этом в насаждениях с хорошо развитой кроной деревьев (что обуславливает их высокую биологическую продуктивность) и не испытывающих дефицит влаги коэффициент перехода также ниже, чем в среднем для породы.

В отношении сельскохозяйственных культур подтверждено преобладающее влияние вида растения на коэффициент перехода ^{137}Cs . Также показано, что низкие концентрации K^+ в почвенном растворе (менее 1 ммоль/л) приводят к усилению накопления радионуклида, и влияние этого фактора более сильное, чем содержание подвижной формы калия в почве. Показано повышение накопления ^{137}Cs в урожае при недостатке почвенной влаги на фоне влияния других факторов. Резкое усиление соотношения между удельной активностью радионуклида в урожае и плотностью загрязнения почвы при низких уровнях загрязнения объясняется сохранением трансфолитарного загрязнения. Участие слоистых глинистых минералов в формировании как почвенного катионообменного комплекса, так и специфической сорбции Cs обуславливает обратную связь между коэффициентом перехода радиоактивного изотопа данного элемента в растения на почвах с долей его ионообменной формы ниже 7 %.

Благодарности. Работа выполнена в рамках мероприятий Государственной программы по преодолению последствий катастрофы на Чернобыльской АЭС на 2011–2015 годы и на период до 2020 года, а также Программы совместной деятельности России и Беларуси в рамках Союзного государства по защите населения и реабилитации территорий, пострадавших в результате катастрофы на Чернобыльской АЭС.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the tasks of the State Program for Overcoming the Consequences of the Chernobyl Nuclear Power Plant Accident for 2011–2015 and for the period until 2020, as well as the Joint Program of Russia and Belarus within the framework of the Union State on the Protection of the Population and the Rehabilitation of the Territories Affected by the Chernobyl Nuclear Power Plant Accident.

Список использованных источников

1. Debeljak, M. Decision trees in ecological modelling / M. Debeljak, S. Džeroski // Modelling complex ecological dynamics: An introduction into ecological modelling for students, teachers & scientists / ed.: F. Jopp [et al.]. – Heidelberg, 2011. – P. 197–209.
2. Zhang, B. Modelling the productivity of naturalised pasture in the North Island, New Zealand: a decision tree approach / B. Zhang, I. Valentine, P. Kemp // Ecol. Modelling. – 2005. – Vol. 186, N 3. – P. 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2004.12.016>
3. Prediction of phytoplankton biomass and identification of key influencing factors using interpretable machine learning models / Y. Xu [et al.] // Ecol. Indicators. – 2024. – Vol. 158. – Art. 111320. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.111320>
4. Prediction and analysis of net ecosystem carbon exchange based on gradient boosting regression and random forest / J. Cai [et al.] // Appl. Energy. – 2020. – Vol. 262. – Art. 114566. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.114566>
5. Predictive models for the effect of environmental factors on the abundance of vibrio parahaemolyticus in oyster farms in taiwan using extreme gradient boosting / N. Ndraha [et al.] // Food Control. – 2021. – Vol. 130. – Art. 108353. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108353>
6. Golden, C. E. Comparison between random forest and gradient boosting machine methods for predicting *Listeria* spp. prevalence in the environment of pastured poultry farms / C. E. Golden, M. J. Rothrock, A. Mishra // Food Res. Int. – 2019. – Vol. 122. – P. 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.062>
7. Techniques to improve ecological interpretability of black-box machine learning models / T. Welchowski [et al.] // J. Ag., Biol. Envir. St. – 2021. – Vol. 27, N 1. – P. 175–197. <https://doi.org/10.1007/s13253-021-00479-7>
8. Konoplev, A. Mobility and bioavailability of the Chernobyl-derived radionuclides in soil-water environment: Review / A. Konoplev // Behavior of radionuclides in the environment II: Chernobyl / ed. by A. Konoplev, K. Kato, S. N. Kalmykov. – Singapore, 2020. – P. 157–193. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3568-0_3
9. Мирошников, В. Справочник таксатора / В. Мирошников, О. Труль, В. Ермаков. – Минск: Ураджай, 1980. – 359 с.
10. Радиационный контроль. Обследование лесосек. Порядок проведения: ТКП 239.2010 (02080). Введ. 01.06.2010 / М-во лесн. хоз-ва Респ. Беларусь. – Минск: М-во лесн. хоз-ва Респ. Беларусь, 2010. – 22 с.
11. Практикум по агрохимии: учеб. пособие / О. А. Амелянчик [и др.]; под ред. В. Минеева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 2001. – 689 с.
12. Gilmore, G. R. Practical gamma-ray spectrometry / G. R. Gilmore. – 2nd ed. – John Wiley & Sons, 2008. – 387 p.
13. Tarsitano, D. Evaluating and reducing a model of radiocaesium soil-plant uptake / D. Tarsitano, S. Young, N. Crout // J. Environ. Radioactiv. – 2011. – Vol. 102, N 3. – P. 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2010.11.017>

14. Deriving probabilistic soil distribution coefficients (Kd). Part 2: Reducing caesium Kd uncertainty by accounting for experimental approach and soil properties / Ramírez-Guinart O. [et al.] // *J. Environ. Radioactiv.* – 2020. – Vol. 223–224. – Art. 106407. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106407>
15. Sheppard, S. C. Robust prediction of Kd from soil properties for environmental assessment / S. C. Sheppard // *Hum. Ecol. Risk Assess.* – 2011. – Vol. 17, N 1. – P. 263–279. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106407>
16. Sentinel-2: ESA's optical high-resolution mission for GMES operational services / M. Drusch [et al.] // *Remote Sensing Environ.* – 2012. – Vol. 120. – P. 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.11.026>
17. ALOS World 3D 30-meter DEM. V3.2 [Electronic resource] / JAEA 2021. – Mode of access: <https://doi.org/10.5069/G94M92HB>. – Date of access: 17.11.2021.
18. Version 4 of the SMAP level-4 soil moisture algorithm and data product / R. H. Reichle [et al.] // *J. Adv. Model. Earth Syst.* – 2019. – Vol. 11, N 10. – P. 3106–3130. <https://doi.org/10.1029/2019MS001729>
19. Lightgbm: A highly efficient gradient boosting decision tree [Electronic resource] / G. Ke [et al.] // *Advances in Neural Information Processing Systems 30 (NIPS 2017)* / ed. by I. Guyon [et al.]. – Mode of access: https://proceedings.neurips.cc/paper_files/paper/2017/file/6449f44a102fde848669bdd9eb6b76fa-Paper.pdf. – Date of access: 31.05.2024.
20. Snoek, J. Practical bayesian optimization of machine learning algorithms [Electronic resource] / J. Snoek, H. Larochelle, R. P. Adams // *Proceedings of the 25th International conference on neural information processing systems: in 2 vol.* – Lake Tahoe, Nevada: Curran Associates Inc., 2012. – Vol. 2. – P. 2951–2959. Mode of access: <https://dl.acm.org/doi/10.5555/2999325.2999464>. – Date of access: 31.05.2024.
21. Explainable machine-learning predictions for the prevention of hypoxaemia during surgery / S. M. Lundberg [et al.] // *Nat. Biomed. Engin.* – 2018. – Vol. 2, N 10. – P. 749–760. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0304-0>
22. From local explanations to global understanding with explainable AI for trees / S. M. Lundberg [et al.] // *Nat. Machine Intel.* – 2020. – Vol. 2, N 1. – P. 56–67. <https://doi.org/10.1038/s42256-019-0138-9>
23. Анализ возможности использования спутниковых данных для прогноза параметров перехода радиоактивных изотопов цезия из почвы в древесные растения / А. Н. Никитин А. [и др.] // Восьмой белорусский космический конгресс: материалы, 25–27 окт. 2022 г., г. Минск: в 2 т. / науч. ред.: С. В. Кругликов, И. В. Филиппенко. – Минск, 2022. – Т. 1. – С. 245–249.
24. The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in arabidopsis / Z. Qi [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2008. – Vol. 59, N 3. – P. 595–607. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm330>
25. Экспериментальная оценка влияния режима увлажнения почвы на накопление ¹³⁷Cs побегами яровой пшеницы / А. Н. Никитин [и др.] // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2020. – Т. 65, № 2. – P. 229–238.
26. Nikitin, A. N. Impact of soil moisture on cesium uptake by plants: Model assessment / A. N. Nikitin // *J. Environ. Radioactiv.* – 2021. – Vol. 240. – Art. 106754. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2021.106754>
27. Smolders, E. Concentrations of ¹³⁷Cs and K in soil solution predict the plant availability of ¹³⁷Cs in soils / E. Smolders, K. Van den Brande, R. Merckx // *Environ. Sci. Technol.* – 1997. – Vol. 31, N 12. – P. 3432–3438. <https://doi.org/10.1021/es970113r>

References

1. Debeljak M., Džeroski S. Decision trees in ecological modelling. *Modelling complex ecological dynamics: An introduction into ecological modelling for students, teachers & scientists*. Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 197–209. https://doi.org/10.1007/978-3-642-05029-9_14
2. Zhang B., Valentine L., Kemp P. Modelling the productivity of naturalised pasture in the North Island, New Zealand: a decision tree approach. *Ecological Modelling*, 2005, vol. 186, no. 3, pp. 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2004.12.016>
3. Xu Y., Zhang D., Lin J., Peng Q., Lei X., Jin T., Wang J., Yuan R. Prediction of phytoplankton biomass and identification of key influencing factors using interpretable machine learning models. *Ecological Indicators*, 2024, vol. 158, art. 111320. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2023.111320>
4. Cai J., Xu K., Zhu Y., Hu F., Li L. Prediction and analysis of net ecosystem carbon exchange based on gradient boosting regression and random forest. *Applied Energy*, 2020, vol. 262, art. 114566. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.114566>
5. Ndraha N., Hsiao H., Hsieh Y., Pradhan A. K. Predictive models for the effect of environmental factors on the abundance of vibrio parahaemolyticus in oyster farms in taiwan using extreme gradient boosting. *Food Control*, 2021, vol. 130, art. 108353. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108353>
6. Golden C. E., Rothrock M. J., Mishra A. Comparison between random forest and gradient boosting machine methods for predicting Listeria spp. prevalence in the environment of pastured poultry farms. *Food Research International*, 2019, vol. 122, pp. 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.062>
7. Welchowski T., Maloney K. O., Mitchell R., Schmidt M. Techniques to improve ecological interpretability of black-box machine learning models. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 2021, vol. 27, no. 1, pp. 175–197. <https://doi.org/10.1007/s13253-021-00479-7>
8. Konoplev A. Mobility and bioavailability of the Chernobyl-derived radionuclides in soil-water environment: Review. *Behavior of radionuclides in the environment II: Chernobyl*. Singapore, 2020, pp. 157–193. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3568-0_3
9. Miroshnikov V., Trul' O., Ermakov V. *Taxator's handbook*. Minsk, Uradzhai Publ., 1980. 359 p. (in Russian).
10. *Radiation control. Inspection of cutting areas. Procedures*, 239.2010 (02080). 01.06.2010. Minsk, Ministry of Forestry of the Republic of Belarus, 2010. 22 p. (in Russian).
11. Amel'yanchik O. A., Bolysheva T. N., Gomonova N. F., Durygina E. P., Egorov V. S., Egorova E. V. [et al.]. *Workshop on agrochemistry. 2nd ed.* Moscow, Moscow State University Publ., 2001. 689 p. (in Russian).
12. Gilmore G. R. *Practical gamma-ray spectrometry. 2nd ed.* John Wiley & Sons, 2008. 387 p.
13. Tarsitano D., Young S., Crout N. Evaluating and reducing a model of radiocaesium soil-plant uptake. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2011, vol. 102, no. 3, pp. 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2010.11.017>
14. Ramírez-Guinart O., Kaplan D., Rigol A., Vidal M. Deriving probabilistic soil distribution coefficients (Kd). Part 2: Reducing caesium Kd uncertainty by accounting for experimental approach and soil properties. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2020, vol. 223–224, art. 106407. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106407>

15. Sheppard S. C. Robust prediction of Kd from soil properties for environmental assessment. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2011, vol. 17, no. 1, pp. 263–279. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106407>
16. Drusch M., Del Bello U., Carlier S., Colin O., Fernandez V., Gascon F. [et al.]. Sentinel-2: ESA's optical high-resolution mission for GMES operational services. *Remote Sensing of Environment*, 2012, vol. 120, pp. 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.rse.2011.11.026>
17. ALOS World 3D 30-meter DEM. V3.2. *JAEA* 2021. Available at: <https://doi.org/10.5069/G94M92HB> (accessed 17.11.2021).
18. Reichle R. H., Liu Q., Koster R. D., Crow W. T., De Lannoy G. J. M., Kimball J. S. [et al.]. Version 4 of the SMAP level-4 soil moisture algorithm and data product. *Journal of Advances in Modeling Earth Systems*, 2019, vol. 11, no. 10, pp. 3106–3130. <https://doi.org/10.1029/2019MS001729>
19. Ke G., Meng Q., Finley T., Wang T., Chen W., Ma W., Ye Q., Liu T. LightGBM: A highly efficient gradient boosting decision tree. *Advances in Neural Information Processing Systems 30 (NIPS 2017)*. Available at: https://proceedings.neurips.cc/paper_files/paper/2017/file/6449f44a102fde848669bdd9eb6b76fa-Paper.pdf (accessed 31.05.2024).
20. Snoek J., Larochelle H., Adams R. P. Practical Bayesian optimization of machine learning algorithms. *Proceedings of the 25th International conference on neural information processing systems*: in 2 vol. Lake Tahoe, Nevada, Curran Associates Inc., 2012, pp. 2951–2959. Available at: <https://dl.acm.org/doi/10.5555/2999325.2999464> (accessed 31.05.2024).
21. Lundberg S. M., Nair B., Vavilala M. S., Horibe M., Eisses M. J., Adams T., Liston D. E., Low D. K., Newman S., Kim J., Lee S. Explainable machine-learning predictions for the prevention of hypoxaemia during surgery. *Nature Biomedical Engineering*, 2018, vol. 2, no. 10, pp. 749–760. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0304-0>
22. Lundberg S. M., Erion G., Chen H., DeGrave A., Prutkin J. M., Nair B., Katz R., Himmelfarb J., Bansal N., Lee S. From local explanations to global understanding with explainable AI for trees. *Nature Machine Intelligence*, 2020, vol. 2, no. 1, pp. 56–67. <https://doi.org/10.1038/s42256-019-0138-9>
23. Nikitin A. N., Kudin M. V., Cheshik I. A., Shurankova O. A., Mishchenko E. V., Sukhareva D. V., Zhukovskaya E. V., Bli-nova N. V. Analysis of the possibility of using satellite data to predict the parameters of the transfer of radioactive cesium isotopes from soil to trees. *Vos'moi Belorusskii kosmicheskii kongress: materialy kongressa, 25–27 oktyabrya 2022 goda, Minsk. Tom 1* [Eighth Belarusian Space Congress: materials of the congress, October 25–27, 2022, Minsk. Volume 1]. Minsk, 2022, pp. 245–249 (in Russian).
24. Qi Z., Hampton C. R., Shin R., Barkla B. J., White P. J. The high affinity K⁺ transporter AtHAK5 plays a physiological role in planta at very low K⁺ concentrations and provides a caesium uptake pathway in arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 2008, vol. 59, no. 3, pp. 595–607. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm330>
25. Nikitin A. N., Shurankova O. A., Cheshik I. A., Leferd G. A., Mishchenko E. V., Zhukovskaya E. V., Sukhareva D. V. Experimental assessment of influence of soil moisture on the ¹³⁷Cs accumulation in shoots of spring wheat. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2020, vol. 65, no. 2, pp. 229–238 (in Russian).
26. Nikitin A. N. Impact of soil moisture on cesium uptake by plants: Model assessment. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2021, vol. 240, art. 106754. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2021.106754>
27. Smolders E., den Brande K. V., Merckx R. Concentrations of ¹³⁷Cs and K in soil solution predict the plant availability of ¹³⁷Cs in soils. *Environmental Science & Technology*, 1997, vol. 31, no. 12, pp. 3432–3438. <https://doi.org/10.1021/es970113r>

Інфармацыя аб аўтарах

Нікіцін Аляксандр Ніколаевіч – канд. с/х навук, за-меститель дырэктара. Інстытут мікробіялогіі НАН Беларусі (ул. Купрэвіча, 2, 220141, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0002-1369-0093>. E-mail: nikitinale@gmail.com

Кудін Максім Вадзіміравіч – канд. с/х навук, доцент, заместитель дырэктара. Полескіі дзяржаўны радыяцыйна-экалагічны запаведнік (ул. Тэрэшковай, 7, 247618, г. Хойнікі, Рэспубліка Беларусь). <https://orcid.org/0000-0001-6857-2337>. E-mail: max.kudin@mail.ru

Калінічэнка Сяргей Аляксандравіч – канд. біял. навук, доцент, заведучы лабараторыі. Полескіі дзяржаўны радыяцыйна-экалагічны запаведнік (ул. Тэрэшковай, 7, 247618, г. Хойнікі, Рэспубліка Беларусь). E-mail: s-a-k@list.ru

Ласко Тамара Васільевна – ст. науч. супрацоўнік. Інстытут радыябіялогіі НАН Беларусі (ул. Федюнінскага, 4, 246007, г. Гомель, Рэспубліка Беларусь). E-mail: t-lasko@yandex.by

Шуранкова Ольга Аляксандраўна – науч. супрацоўнік. Інстытут радыябіялогіі НАН Беларусі (ул. Федюнінскага, 4, 246007, г. Гомель, Рэспубліка Беларусь). E-mail: shurankova@list.ru

Мішчэнка Егор Віктаравіч – заместитель заведучага лабараторыі. Інстытут радыябіялогіі НАН Беларусі (ул. Федюнінскага, 4, 246007, г. Гомель, Рэспубліка Беларусь). E-mail: egormischenko@gmail.com

Information about the authors

Aleksander N. Nikitin – Ph. D. (Agricult.), Deputy Director. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0002-1369-0093>. E-mail: nikitinale@gmail.com

Maksim V. Kudin – Ph. D. (Agricult.), Associate Professor, Deputy Director. Polesie State Radioecological Reserve (7, Tereshkova Str., 247618, Choiniki, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0001-6857-2337>. E-mail: max.kudin@mail.ru

Sergey A. Kalinichenko – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Polesie State Radioecological Reserve (7, Tereshkova Str., 247618, Choiniki, Republic of Belarus). E-mail: s-a-k@list.ru

Tamara V. Lasko – Senior Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: t-lasko@yandex.by

Olga A. Shurankova – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: shurankova@list.ru

Egor V. Mishchanka – Deputy head of the Laboratory. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: egormischenko@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

UDC 615.32:577.13.3

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-249-253>

Received 01.04.2024

Marharyta A. Vinter, Anastasia S. Shchokolova, Illia S. Kazlouski, Anatoly I. Zinchenko*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***PRODUCTION OF 3',5'-CYCLIC DIADENOSINE MONOPHOSPHATE COMPLEX WITH MG,AL-LAYERED DOUBLE HYDROXIDE**

Abstract. The possibility of using Mg,Al-layered double hydroxide (LDH) for production of nanoparticles comprising molecules of pharmaceutically valuable 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate (cyclic di-AMP) was demonstrated. Experimental conditions were optimized to produce LDH complexes with cyclic di-AMP (average size of 300 nm), which loading capacity in regard to the target compound reached 60 mass %. The fact of cyclic di-AMP release from LDH complex in pH-dependent mode (proceeding slightly slower at pH 7.4 than at pH 4.5) was stated. The obtained results testify in favor of applying the studied nanocomplexes for delayed delivery of cyclic di-AMP to the target immune cells.

Keywords: 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate, Mg,Al-layered double hydroxide, nanoparticle, adjuvant, dinucleotide Mg,Al-layered double hydroxide complex, delayed delivery of drug to target cells

For citation: Vinter M. A., Shchokolova A. S., Kazlouski I. S., Zinchenko A. I. Production of 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate complex with Mg,Al-layered double hydroxide. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 249–253 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-249-253>

М. А. Винтер, А. С. Щёколова, И. С. Казловский, А. И. Зинченко*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ 3',5'-ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИАДЕНОЗИНМОНОФОСФАТА С MG,AL-СЛОИСТЫМ ДВОЙНЫМ ГИДРОКСИДОМ**

Аннотация. Показана возможность использования Mg,Al-слоистого двойного гидроксида (СДГ) для получения наночастиц, включающих молекулы фармацевтически важного 3',5'-циклического диаденозинмонофосфата (цикло-ди-АМФ). Подобраны экспериментальные условия для получения комплексов СДГ с цикло-ди-АМФ (размером порядка 300 нм), емкость которых в отношении цикло-ди-АМФ достигает 60 мас.%. Установлено, что при pH среды 4,5 цикло-ди-АМФ высвобождается из его комплекса с СДГ более активно, чем при pH 7,4. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения изученных наноконкомплексов для пролонгированной доставки цикло-ди-АМФ в иммунные клетки-мишени.

Ключевые слова: 3',5'-циклический диаденозинмонофосфат, Mg,Al-слоистый двойной гидроксид, наночастица, адъювант, комплекс динуклеотида с Mg,Al-слоистым двойным гидроксидом, пролонгированная доставка лекарства в клетки-мишени

Для цитирования: Получение комплексов 3',5'-циклического диаденозинмонофосфата с Mg,Al-слоистым двойным гидроксидом / М. А. Винтер [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 249–253. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-249-253>

Introduction. The likelihood of imminent pandemics caused by respiratory viruses dictates the need to seek new antiviral agents [1].

We have previously proposed [2] to use pharmacologically promising 3',5'-cyclic diadenosine monophosphate (cyclic di-AMP) (Fig. 1) recently discovered in bacteria and archaea [3], as a universal antiviral agent. The compound is involved in the control of many complex physiological processes and acts as an inducer of endogenous interferon [4, 5], which protects human and animal bodies from various infectious agents.

A grave challenge for pharmacological application of this compound is its low stability in the blood stream. In addition, the cyclic di-AMP molecule is negatively charged and, hence can hardly penetrate into immune cells [6]. Various nanoparticle carriers have been proposed to overcome this barrier. Among them, nanoscale inorganic layered double hydroxides (LDH) (Fig. 2) are regarded as the most promising carrier.

LDHs, also called “anionic clays”, represent a family of materials that have attracted a growing interest in recent years due to their technological benefits in catalysis, separation technology, optics, medical science and nanocomposite materials engineering [8].

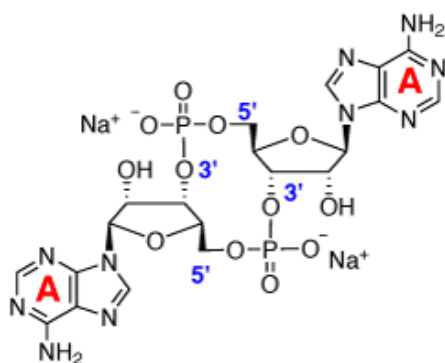


Fig. 1. Structure of cyclic di-AMP (sodium salt)

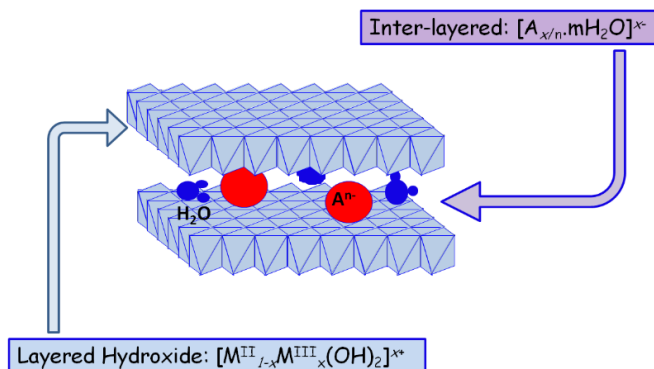


Fig. 2. Structure of LDH [7]

LDHs consist of positively charged metal hydroxide layers, in which the anions (along with water) are stabilized in order to compensate the positive layer charges. The general chemical formula of LDH clays is expressed as $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}(A^{n-})_{x/n} \cdot yH_2O$, where M^{II} is a divalent metal ion, such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , etc., M^{III} is a trivalent metal ion, such as Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , etc. and A^{n-} is an anion of any type with charge n , such as Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^- , etc. [9, 10].

The electrostatic interactions, hydrogen bonds between layers and contents of the gallery cement the architecture, shaping a three-dimensional structure. Diverse combinations of divalent and trivalent cations can form LDHs. For these ions, the only limitation is that their radii are not strikingly different from those of Mg^{2+} and Al^{3+} . The anions occupy the interlayer region of layered crystalline materials.

LDHs are increasingly explored as drug and gene carriers, since they are characterized by low toxicity, enhanced cell penetration capacity and the ability to release transported compounds at reduced pH values, corresponding to pH inside endosomes/lysosomes [11].

Several methods have been described for synthesis of LDHs. Co-precipitation in aqueous solution is the most common procedure for LDH production [12]. The benefit of this technique is that several synthesis parameters can be controlled independently during precipitation process (e. g. temperature and pH of the reaction medium, concentration of the metallic salts and alkaline solution).

In the present study, we prepared artificially a novel bio-inorganic nanohybrid of Mg,Al-LDH and biomolecule (pharmaceutically valuable cyclic di-AMP) as well as assessed application prospects of intercalated LDH as a drug delivery system.

Materials and research methods. Cyclic di-AMP sample was enzymatically synthesized from ATP as previously described [13]. Milli-Q water was used in all experiments.

The nanocomplex of cyclic di-AMP with Mg,Al-LDH was produced by co-precipitation method according to [14], with subsequent crystallization at 75 °C in the presence of ammonium hydroxide. Briefly, 10 ml of salt solution containing 20 mM $Mg(NO_3)_2$ and 10 mM $Al(NO_3)_3$ was added drop-wise with vigorous stirring at room temperature to 10 ml of 10 mM NH_4OH solution comprising 0.25, 0.5, 1 or 2 mM cyclic di-AMP. The reaction slurry was aged at 75 °C for 12 h. The resulting white precipitate was collected by centrifugation (20 000 g for 10 min) and washed with water until no cyclic di-AMP was detected in the supernatant. All the samples were air-dried at 60 °C for 5–6 h. To obtain LDH nanoparticles without cyclic di-AMP the above procedure was performed without addition of cyclic di-AMP to solution of NH_4OH .

Amount of cyclic di-AMP incorporated in nanohybrids was estimated by the following method. A known amount of the nanocomposites was placed in a 10 ml volumetric flask and LDH layers were dissolved with 50 mM HCl solution. Concentration of cyclic di-AMP in the solution was determined by monitoring the absorbance at $\lambda = 259$ nm ($\epsilon = 27\,000$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) with Solar PB2201 spectrophotometer (CJSC Spectroscopy, Optics and Lasers – Modern Developments, Belarus).

The binding capacity of LDH in regard to cyclic di-AMP was calculated according to the following formula:

$$A = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100,$$

where A is the binding capacity, %; m_1 is the amount of cyclic di-AMP intercalated into the LDH nanoparticles; m_2 is the total amount of cyclic di-AMP added into reaction mixture.

The loading capacity of LDH in regard to cyclic di-AMP was calculated according to the formula:

$$E = \frac{m_1}{m_3} \cdot 100,$$

where E is the loading capacity, %; m_1 is the amount of cyclic di-AMP intercalated into the LDH nanoparticles; m_3 is the amount of LDH/cyclic di-AMP nano hybrid.

The size of LDH nanoparticles was measured in collaboration with colleagues from Institute of Bioorganic Chemistry, NAS of Belarus, by method of dynamic light scattering using DynaPro NanoStar (Wyatt Technology, USA) in compliance with the manufacturer's guidelines.

To measure the amount of cyclic di-AMP released from the nano hybrids, the *in vitro* drug release tests were performed at room temperature by stirring a certain amount of powdered LDH/cyclic di-AMP nano hybrids in 10 mM phosphate-citrate buffer solution (pH 4.5 or 7.4, respectively) [15]. 1 ml aliquots of the suspension were sampled at desired time intervals, centrifuged and the cyclic di-AMP contents in supernatant were determined by reading UV absorbance at $\lambda = 259$ nm to calculate the amount of dinucleotide released from the nano hybrids. The percentage released at each time point was expressed as a fraction of the total amount of the dinucleotide.

Experimental data obtained in this research represent confidence range of arithmetic means for 95 % probability level.

Results and its discussion. The initial investigation stage was devoted to synthesis of LDH nanoparticles loaded with cyclic di-AMP. Mixing of aqueous solutions containing Mg^{2+} , Al^{3+} and cyclic di-AMP according to the procedure described in the section "Materials and research methods" resulted in the transparent, slightly opalescent solution. The loading and binding capacity of nanoparticles in regard to the molecules of ligand (cyclic di-AMP) and their size were chosen as the main parameters characterizing the nano products. Results of the experiment illustrated by Fig. 3 testify that increasing the concentration of cyclic di-AMP from 0.25 to 2 mM in the reaction mixture is likely to promote the holding capacity up to 600 mg of cyclic di-AMP/g nanocomplex, reducing concomitantly the loading percentage from 90 to 40.

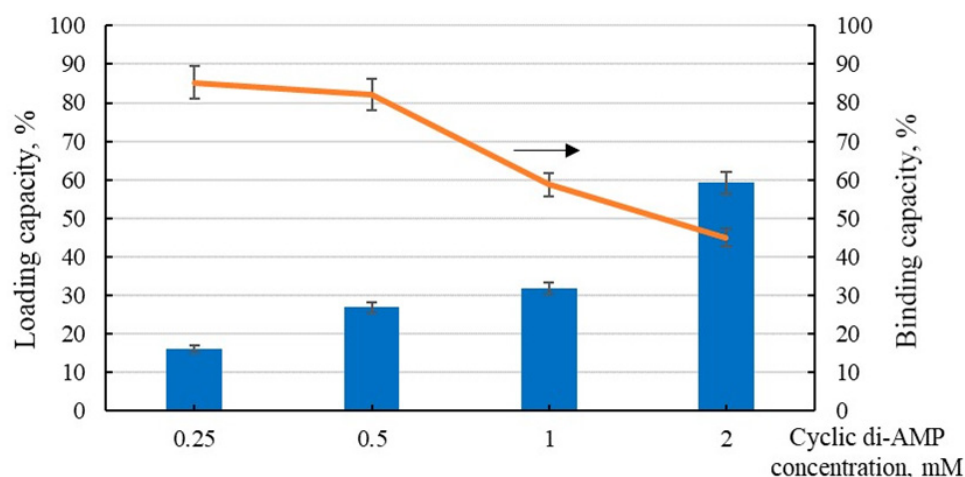


Fig. 3. Binding of cyclic di-AMP to LDH

In order to investigate the prospects of using intercalated LDH nano hybrid as a drug delivery system, deintercalation of cyclic di-AMP was examined under different pH values (7.4 and 4.5). These pH parameters were chosen in line with the data that blood in the vessels is circulating at pH about 7.4, and pH inside the lysosomes is lying in the range from 4 to 5. Sodium citrate-phosphate buffer was applied to provide stable pH values in the appropriate range. Typical kinetic curves of cyclic di-AMP release from the nanocomposites at different pH values are shown in Fig. 4.

The elution curves indicate fast release of cyclic di-AMP into supernatants in all samples, except one incubated in mQ water, regardless of pH value of the solutions.

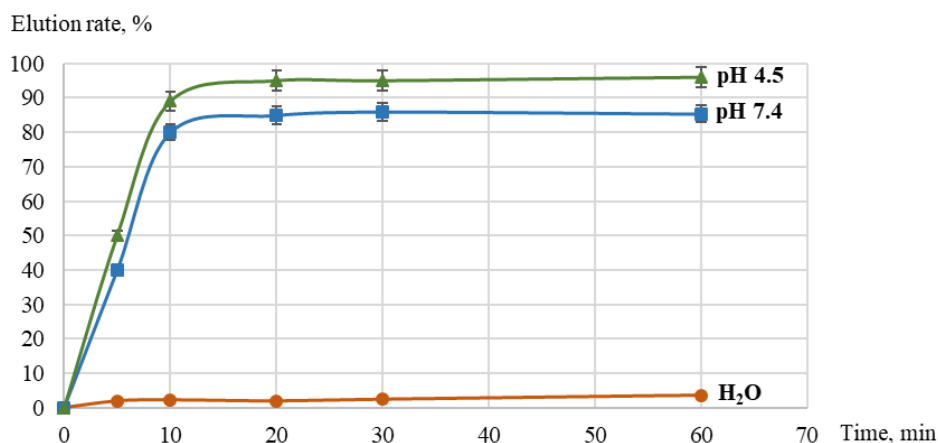


Fig. 4. The release of cyclic di-AMP from complex with LDH in water, in buffer at pH 7.4 and pH 4.5

The obtained results match the literature data stating that the exchange ability of supplied anions tends to augment with increasing charge and decreasing ionic radius. The order of intercalation is as follows: $\text{CO}_3^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{SO}_4^{2-}$ for divalent anions [16]. It seems logical therefore that phosphate ions show high affinity for interlayer space and can readily displace cyclic di-AMP molecules resulting in their fast elution rate even around pH 7.4.

The experimental results show that the nanoparticles of all formed complexes differ in size (Fig. 5).

The proven fact of cyclic di-AMP liberation from LDH complexes evidences in favor of engaging the studied system for delayed delivery of active dinucleotide to the target cells.

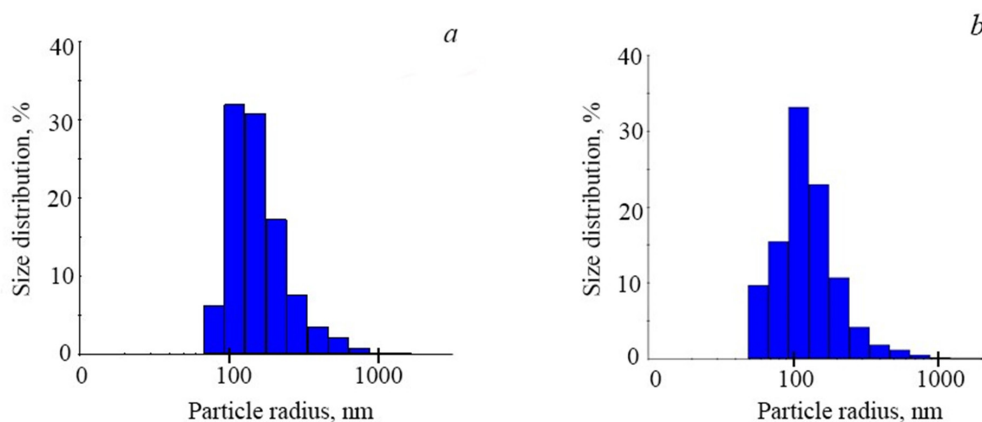


Fig. 5. The size of obtained particles: empty LDH (a); cyclic di-AMP/LDH complex (b)

Conclusion. Earlier we proposed to use the inducer of endogenous interferon cyclic di-AMP as the universal antiviral agent. The advantage of this compound over the other numerous interferon inducers is that cyclic di-AMP represents an element of naturally evolved mechanism ensuring universal protection of vertebrata from attack of multiple viral pathogens. Unfortunately, a molecule of this dinucleotide carries two negative charges presumably complicating its penetration within virus-infected and malignant cells also charged negatively on the surface.

In literature the problem is solved by immobilizing active compounds on positively charged supports, including LDH carriers.

The present study revealed the fact of delayed cyclic di-AMP release from LDH complex in mildly acidic media and indicated the principal possibility of applying the studied nanocomplexes for prolonged delivery of cyclic di-AMP to target immune cells.

References

- Pagani I., Ghezzi S., Alberti S., Poli G., Vicenzi E. Origin and evolution of SARS-CoV-2. *European Physical Journal Plus*, 2023, vol. 138, no. 2, art. 157. <https://doi.org/10.1140/epjp/s13360-023-03719-6>
- Zinchenko A., Vinter M., Kazlovskii I. Interferons and their inducers as the elements to control COVID-19. *Nauka i innovatsii* [Science and innovations], 2023, no. 2, pp. 24–29 (in Russian).
- Yin W., Cai X., Ma H., Zhu L., Zhang Y., Chou S. H., Galperin M. Y., He J. A decade of research on the second messenger c-di-AMP. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, vol. 44, no. 6, pp. 701–724. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa019>
- Deng L., Liang H., Xu M., Yang X., Burnette B., Arina A. [et al.]. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors. *Immunity*, 2014, vol. 41, no. 5, pp. 843–852. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019>
- Ebensen T., Arntz A., Schulze K., Hanefeld A., Guzman C. A., Scherließ R. Pulmonary application of novel antigen-loaded chitosan nanoparticles co-administered with the mucosal adjuvant c-di-AMP resulted in enhanced immune stimulation and dose sparing capacity. *Pharmaceutics*, 2023, vol. 15, no. 4, art. 1238. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041238>
- Wehbe M., Wang-Bishop L., Becker K. W., Shae D., Baljon J. J., He X., Christov P., Boyd K. L., Balko J. M., Wilson J. T. Nanoparticle delivery improves the pharmacokinetic properties of cyclic dinucleotide STING agonists to open a therapeutic window for intravenous administration. *Journal of Controlled Release*, 2021, vol. 330, pp. 1118–1129. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.017>
- Yang Y., Zhao X., Zhu Y., Zhang F. Transformation mechanism of magnesium and aluminum precursor solution into crystallites of layered double hydroxide. *Chemistry of Materials*, 2012, vol. 24, no. 1, pp. 81–87. <https://doi.org/10.1021/cm201936b>
- Matusik J. Special issue: layered double hydroxides (LDH) and LDH-based hybrid composites. *Materials*, 2021, vol. 14, no. 10, art. 2582. <https://doi.org/10.3390/ma14102582>
- Cavani F., Trifiro F., Vaccari A. Hydrotalcite-type anionic clays: preparation, properties and applications. *Catalysis Today*, 1991, vol. 11, pp. 173–301.
- Kumari S., Sharma A., Kumar S., Thakur A., Thakur R., Bhatia S. K., Sharma A. K. Multifaceted potential applicability of hydrotalcite-type anionic clays from green chemistry to environmental sustainability. *Chemosphere*, 2022, vol. 306, art. 135464. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135464>
- Choi S. J., Oh J. M., Choy J. H. Anticancer drug-layered hydroxide nanohybrids as potent cancer chemotherapy agents. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 2008, vol. 69, no. 5–6, pp. 1528–1532. <https://doi.org/10.1016/j.jpcs.2007.10.140>
- Olf H.-W., Torres-Dorante L. O., Eckelt R., Kosslick H. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. *Applied Clay Science*, 2009, vol. 43, no. 3–4, pp. 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.10.009>
- Vinter M. A., Kazlouski I. S., Zinchenko A. I. Construction of bacterial strain forming inclusion bodies, exhibiting diadenylate cyclase activity. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika* [Molecular and applied genetics], 2022, vol. 33, pp. 105–109. <https://doi.org/10.47612/1999-9127-2022-33-76-82>
- Olanrewaju J., Newalkar B. L., Mancino C., Komarneni S. Simplified synthesis of nitrate form of layered double hydroxide. *Materials Letters*, 2000, vol. 45, no. 6, pp. 307–310. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(00\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(00)00123-3)
- Doson R., Elliot D., Elliot U., Dzhons K. *Biochemist's Handbook*. Moscow, Mir Publ., 1991. 543 p. (in Russian).
- Ibrahimova K. A. The synthesis methods and applications of layered double hydroxides – a brief review. *Vestnik Natsional'nogo yadernogo tsentra Respubliki Kazakhstan* [Bulletin of the National Nuclear Center of the Republic of Kazakhstan], 2022, no. 4, pp. 16–29. <https://doi.org/10.52676/1729-7885-2022-4-17-29>

Information about the authors

Marharyta A. Vinter – Postgraduate Student. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

Anastasia S. Shechokolova – Ph. D. (Biol.), Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastindeathnote@gmail.com

Illia S. Kazlouski – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com

Anatoly I. Zinchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). <https://orcid.org/0000-0003-2401-2586>. E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Информация об авторах

Винтер Маргарита Андреевна – аспирант. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rita.vinter.abc@gmail.com

Щеколова Анастасия Сергеевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastindeathnote@gmail.com

Казловский Илья Сергеевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). <https://orcid.org/0000-0003-2401-2586>. E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 599.742.43:591.5
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-254-264>

Поступила в редакцию 24.01.2024
Received 24.01.2024

В. В. Шакун, И. А. Крищук

Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

ЭТОЛОГО-ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ АДАПТАЦИИ БАРСУКА ОБЫКНОВЕННОГО (*MELES MELES*) В ЗОНЕ ОТЧУЖДЕНИЯ И ОТСЕЛЕНИЯ ПОЛЕССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО РАДИАЦИОННО-ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ЗАПОВЕДНИКА

Аннотация. Изучены некоторые аспекты экологии барсука обыкновенного (*Meles meles*) в зоне отчуждения и отселения Полесского радиационно-экологического заповедника (правобережье р. Припять). С помощью фотоловушек выявлены особенности поселений барсука, характер суточной и сезонной активности вида, его внутри- и межвидовые отношения.

Ключевые слова: *Meles meles*, ПГРЭЗ, фотоловушка, поселение, активность, груминг, Красная книга

Для цитирования: Шакун, В. В. Этолого-экологические адаптации барсука обыкновенного (*Meles meles*) в зоне отчуждения и отселения Полесского государственного радиационно-экологического заповедника / В. В. Шакун, И. А. Крищук // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 254–264. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-254-264>

Vasili V. Shakun, Iryna A. Kryshchuk

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources,
Minsk, Republic of Belarus*

ETHOLOGICAL AND ECOLOGICAL ADAPTATIONS OF EURASIAN BADGER (*MELES MELES*) IN THE EXCLUSION AND RESETTLE ZONE OF THE POLESIE STATE RADIATION-ECOLOGICAL RESERVE

Abstract. The article presents the data on some aspects of ecology of eurasian badger (*Meles meles*) in the exclusion and resettlement zone of the “Polesie State Radiation-Ecological Reserve” (right bank of the Pripyat River). Using camera traps, the specific features of badger settlements, the daily and seasonal activity of species, species intraspecific and interspecific relations were revealed.

Keywords: *Meles meles*, PSRER, camera trap, settlement, activity, grooming, Red Book

For citation: Shakun V. V., Kryshchuk I. A. Ethological and ecological adaptations of Eurasian badger (*Meles meles*) in the exclusion and resettlement zone of the Polesie State Radiation-Ecological Reserve. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 254–264 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-254-264>

Введение. В современных условиях для проведения полевых зоологических наблюдений все более популярным методом становится использование фотоловушек. Этот дистанционный и неинвазивный метод позволяет вести наблюдение за многими млекопитающими, ведущими скрытый (норный) образ жизни [1, 2].

Норный образ жизни характерен для большого числа видов млекопитающих [3]. Эта комплексная адаптивная особенность животных направлена на укрытие от неблагоприятных условий среды и врагов, сохранение потомства [4]. Использование барсуком обыкновенным (*Meles meles*) подземных убежищ для отдыха и сна на протяжении всей жизни делает его модельным видом для изучения специфики некоторых аспектов его экологии и этологии. Ввиду того, что барсук включен в список редких и исчезающих диких животных Беларуси [5], изучение аспектов его экологии является необходимым условием для разработки научно обоснованных мер охраны данного вида.

Жизнь барсуков неотъемлемо связана с их поселениями [6]. При этом ведущими факторами, определяющими присутствие барсука в определенной местности, являются обеспеченность кормовыми ресурсами и благоприятные для устройства выводковых нор почвенно-гидрологические условия. Возможность устройства последних объясняет длительное (в течение нескольких деся-

тилений) существование отдельных поселений. В результате активного изменения барсуками среды в поселениях и вокруг них образуются хорошо заметные участки (ямки-покопки, сложные системы троп, запаховые метки), которые привлекают внимание других особей и видов (в частности, енотовидную собаку и лисицу) как в качестве убежищ, так и для выведения потомства. Зафиксированы случаи использования поселения барсука и волком [7].

Несмотря на привязанность к определенному участку обитания, ряд природных факторов (в первую очередь смена кормов и беспокойство, причиняемое хищниками или человеком), может сказываться на изменении активности барсука на различных территориях семейной группы в периоды бодрствования. Изучение сезонной активности *Meles meles* на территории, занимаемой семейной группой, уточнение места и роли этого вида в экосистемах, а также визуализация этих данных имеют важное теоретическое и практическое значение.

Территория ПГРЭЗ является особенной территорией для наблюдения за популяцией барсука. Снижение антропогенного пресса в результате эвакуации населения после аварии на Чернобыльской атомной электростанции способствовало созданию на территории заповедника своеобразного резервата для сохранения, восстановления и приумножения малочисленных, уязвимых и редких видов растений и животных (в том числе барсука).

Характер распределения поселений изучаемого вида на территории ПГРЭЗ, а также некоторые аспекты его биологии и экологии более подробно раскрыты в работах Т. Г. Дерябиной [8, 9], однако сведения о сезонной динамике использования убежищ барсуком и его межвидовых взаимоотношениях с другими норными хищными малочисленны. Это и определяет актуальность нашей работы.

Материалы и методы исследования. Изучены фотоснимки, полученные посредством фотоловушек модели Cuddeback G-5017, которые были установлены на выявленных поселениях барсука в ходе маршрутных обследований на Наровлянском участке ПГРЭЗ, в том числе на территории упраздненных населенных пунктов (у. н. п.) (рис. 1).

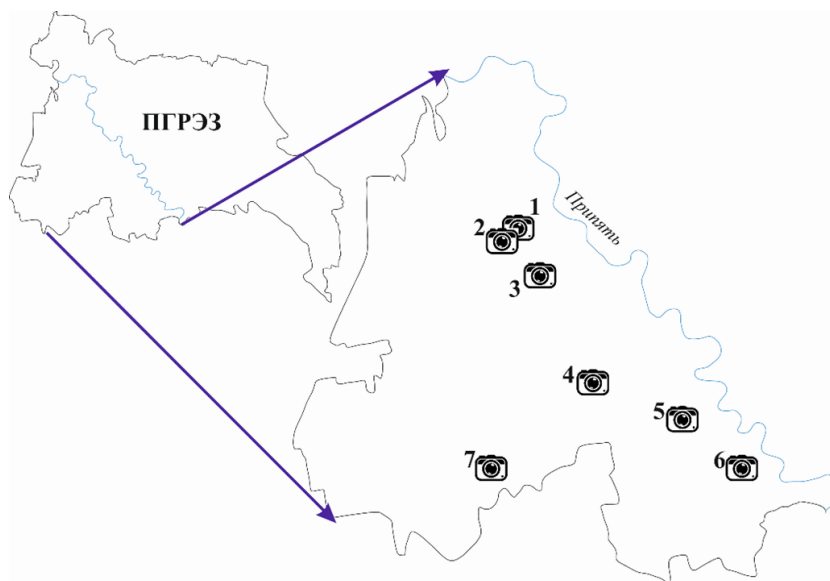


Рис. 1. Схема расположения фотоловушек на выявленных барсучьих поселениях № 1 и № 2 (у. н. п. Вяжище), № 3 (вне у. н. п.), № 4 (у. н. п. Березовка), № 5 (у. н. п. Надточаевка), № 6 (окр. у. н. п. Довляды) и № 7 (у. н. п. Тихин) на территории Наровлянского участка ПГРЭЗ в 2023 г.

Fig. 1. Scheme of photo trap locations at identified badger settlements No. 1 and No. 2 (former settlement Vyazhyscha), No. 3 (outside the settlement), No. 4 (former settlement Berezovka), No. 5 (former settlement Nadochaevka), No. 6 (in the vicinity of the former settlement Dovlyady), No. 7 (former settlement Tikhin) in the Narovlya section of PGRÉZ in 2023

При выборе способа и места установки фотоловушки учитывали в основном особенности поселения барсука и следы его активности (используемые входы, тропы между выходами, площадки для отдыха и игр), что позволяло получить более качественные фотоматериалы, а также характер растительности у места установки фотоловушки, так как с ростом растительного покрова на поселении качество снимков ухудшается.

Для получения фотоматериала использовали такой режим съемки, как серийное фотографирование с различным интервалом. Фотоловушки работали непрерывно с апреля по октябрь 2023 г. Интервалы времени, когда работа прибора прекращалась, были непродолжительны и обусловлены независимыми от исследователей обстоятельствами, так как их проверка осуществлялась один раз в два месяца для смены элементов питания и считывания карт памяти.

В ходе работы фотоловушек было получено 9 270 снимков животных на барсучьих поселениях. Снимки были проанализированы для этолого-экологической характеристики барсука обыкновенного на территории Наровлянского участка ПГРЭЗ.

Результаты и их обсуждение. Барсуки – очень скрытные и осторожные животные, поэтому важную роль в их жизни играют подземные убежища. Некоторые убежища могут существовать на протяжении длительного времени, использоваться несколькими поколениями, при этом они достигают внушительных размеров, имеют десятки входов и протяженность ходов в сотни метров. Выбор места для устройства поселения барсуком определяется в первую очередь благоприятными почвенными условиями. Часть юго-западной территории ПГРЭЗ занимает водноледниковая равнина с ровной, слабо всхолмленной поверхностью с небольшими площадями моренных равнин. Близкое залегание к дневной поверхности грунтовых вод на 70,5 % площади заповедника обусловило многообразие полугидроморфных и гидроморфных почв, что делает данную территорию менее пригодной для обитания *Meles meles* [10]. Тем не менее, по результатам регистраций поселений на территории ПГРЭЗ, барсук является довольно обычным представителем фауны млекопитающих заповедника [11].

Благоприятные условия для устройства поселений барсуком создает наличие на территории ПГРЭЗ заброшенных построек человека в зоне отчуждения. Барсуки роют себе норы под полами полуразрушенных строений, которые комфортно в дальнейшем использовать для жилья, выведения потомства и защиты от хищников. Данные поселения выявляются по внушительным выбросам песка, натоптанным тропам, кормовым пометкам и другим следам жизнедеятельности. По характеру выбросов, количеству входов можно судить об интенсивности использования данного убежища видом, а также о его размере и функциональности.

В 2023 г. путем научных обследований установлены основные типы барсучьих поселений на территории Наровлянского участка ПГРЭЗ. Следует отметить, что выявленные поселения барсука имеют небольшие размеры по сравнению с другими частями ареала вида и ограничены в основном площадью заброшенных строений (полуразрушенные дома, строения и хозяйственные постройки).

В качественном аспекте среди выявленных поселений имеются как простые убежища (временные, с 1–2 входами, поселения, которые используются отдельными животными непродолжительное время, например на протяжении теплого сезона), так и сложные (многолетние или постоянные, с 4–5 и более входами, поселения, которые используются всеми членами семьи на протяжении всего года). Последние с каждым годом обновляются и расширяются, и используются для зимней спячки и выведения потомства. Следует отметить, что в пределах небольшого участка обитания барсука могут в течение теплого сезона использовать несколько поселений. Обусловлено это рядом причин, одной из которых является накопление эктопаразитов в ходах и гнездовых камерах [12]. Кроме того, существенное влияние оказывают социальные факторы. Доминантные особи могут препятствовать размножению подчиненных, в связи с чем последние вынуждены использовать временные убежища для выведения потомства [13].

В условиях ПГРЭЗ нами обследовано и закартировано 7 поселений барсука (рис. 1), каждое из которых является по-своему оригинальным. В результате дистанционных наблюдений за активностью и поведением барсуков представлена описательная характеристика этих поселений.

Известно, что интенсивность роющей деятельности барсука носит сезонный характер. Наиболее активно она проявляется в начале осени (перед спячкой) и в первой половине весны (после пробуждения и выхода из норы) [14]. Барсук является видом с выраженной территориальностью, для которого свойственны маркирование и поддержание границ своего участка, а также активная защита своей территории от чужаков. При этом защищаемым ресурсом является именно пища, а не, к примеру, половые партнеры [15] или межвидовая конкуренция [16].

На основании многочисленных литературных данных, характеризующих образ жизни барсука в различных частях ареала, вид может жить многочисленными семейными группами (от 2

до 25 особей) [17], парами или вести одиночный образ жизни [18]. Однако основной формой внутривидового существования является именно его склонность к групповому образу жизни. При этом в состав типичной группы входит от 2 до 6 взрослых особей и 2–3 молодых, проживающих вместе с ними.

Барсук – преимущественно сумеречное и ночное животное, но может проявлять активность и в дневные часы. Значительное влияние на характер суточной активности оказывают погодные условия (температура воздуха, осадки и ветер) и условия освещенности. Обычно барсук появляется на поверхности незадолго до или сразу после захода солнца с целью поиска пищи, а возвращается перед восходом. В летний период короткие ночи уменьшают время на поиски пищи, поэтому барсук может покинуть свое убежище засветло.

Согласно полученному фотоматериалу, активность барсука на выявленных поселениях в течение суток неравномерна и зависит от сезона года (рис. 2). Число регистраций в сумеречное и ночное время больше всего отмечается в конце апреля – начале мая и в сентябре, что можно объяснить восстановлением энергетических ресурсов весной после спячки и осенью перед залеганием в спячку на зиму.

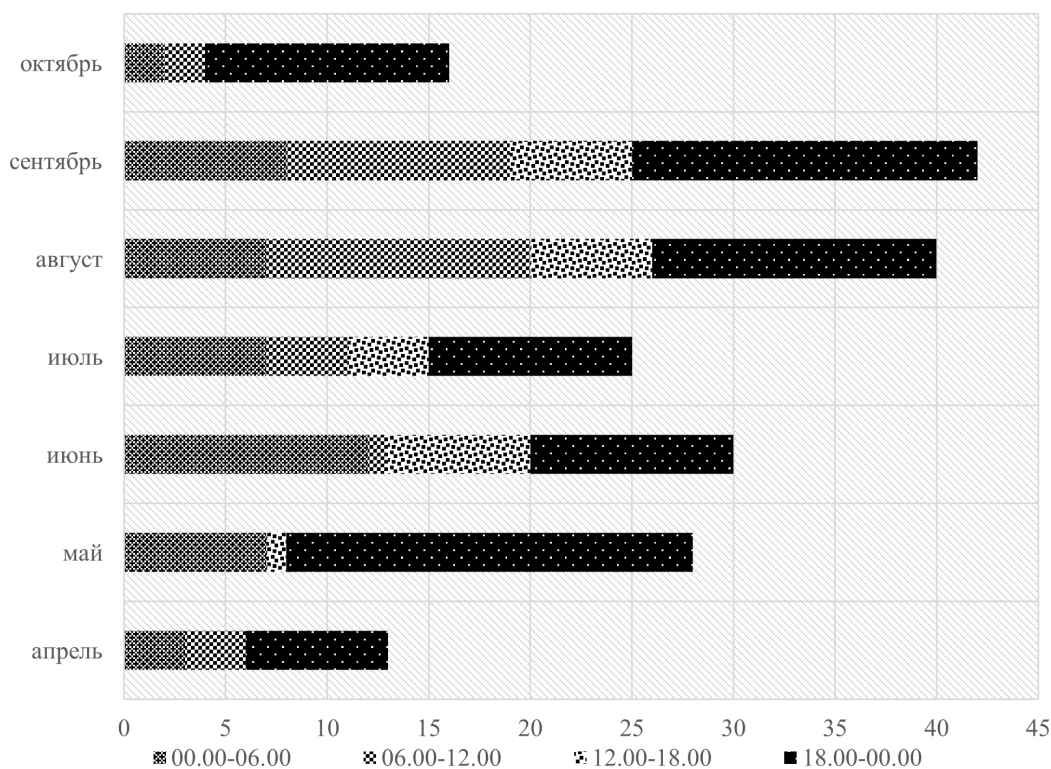


Рис. 2. Суточная активность барсука *Meles meles* у входов поселений с апреля по октябрь 2023 г.

Fig. 2. Daily activity of badger *Meles meles* at settlement entrances from April to October 2023

У входов поселений фотоловушки регистрируют особей барсука обычно с 18.00 до 00.00 и с 02.00 до 06.00, что соответствует времени их выхода на кормежку и возвращения с кормежки. Минимальное число регистраций в ночное время (с 00.00 до 04.00) обусловлено, видимо, тем, что в это время барсук находится вне поселения в поисках корма. При этом следует отметить, что во время поиска корма (в сумеречное и ночное время) барсук может возвращаться с кормежки и вновь выходить на поиск корма, что подтверждается фотоснимками с камер (рис. 3).

Однако для выявления всех факторов, определяющих продолжительность и сезонные изменения суточной активности барсука на исследуемой территории, необходимы дополнительные данные об активности вида в пределах всего участка его обитания.

Известно, что для снижения уровня агрессии, а также для сплочения группы барсуки формируют и поддерживают групповой запах посредством нанесения друг на друга секрета подхво-



Рис. 3. Активность барсука *Meles meles* у входов поселений в сумеречное и ночное время

Fig. 3. Activity of badger *Meles meles* at settlement entrances at dusk and night time

стовой железы [19]. Немаловажную роль в социальных отношениях между особями одной группы играют груминг и игры.

С помощью фотоловушек нам удалось зарегистрировать 23 случая груминга и 4 случая аллогруминга, что чаще отмечалось в дневные и ночные часы (рис. 4). Самостоятельная чистка обычно длилась от 2 до 13 мин (в основном это была чистка в области живота и груди для очистки меха от эктопаразитов). Аллогруминг – чистка меха в области плеч и крестца партнера – длился до 6 мин, у взрослых и молодых особей – 16–53 мин.

Барсуки очень чистоплотные животные. На протяжении всего активного сезона барсук несколько раз чистит нору: вытаскивает и меняет подстилку, углубляет ее, выбрасывая весь мусор и грунт недалеко от входов. Благодаря полученному на исследованной территории фотоматериалу на некоторых поселениях удалось проследить за данным процессом (рис. 5).

Продолжительность чистки нор различна. При наблюдении на поселениях № 2–4 отмечены выбросы грунта и занос растительного материала в конце лета и в октябре, что, видимо, связано с подготовкой норы к зимовке (рис. 5, *e–h*). Весной на поселениях № 5 и № 6 отмечена довольно продолжительная чистка нор (от 9–14 мин до 59 мин и 1 ч 6 мин), что можно объяснить расселением молодых особей и образованием новых пар (рис. 5, *a–d*).

Изучены не только внутривидовые, но и межвидовые взаимоотношения барсука с другими видами животных на поселениях, включая случаи совместного их обитания и смены хозяев поселения. Как отмечалось выше, поселения барсука служат убежищами и местами выведения потомства для енотовидной собаки и лисицы. Но, как правило, для этих целей оба вида используют нежилые норы барсука, хотя иногда отмечаются случаи совместного обитания двух и даже всех трех видов в одном и том же поселении [20]. Указывается также, что барсук, енотовидная собака и лисица могут использовать одно и то же поселение в разные сроки, сменяя друг друга [21].

Случаев одновременного совместного обитания указанных видов на всех поселениях с постоянным наблюдением нами не выявлено. Однако с помощью фотоловушек зарегистрировано 75 посещений барсучьих поселений енотовидной собакой (рис. 6, *a–d*) и 3 случая – лисицей (весной) (рис. 6, *e–f*).



Рис. 4. Груминг (a–d) и аллогруминг (e–h) на разнообразных поселениях барсука *Meles meles*
Fig. 4. Grooming (a–d) and allogrooming (e–h) at diverse settlements of badger *Meles meles*

Наибольшее количество посещений поселений № 2–6 енотовидной собакой отмечалось в летний сезон. На поселении № 1 наблюдалась смена его хозяев: в апреле убежище занимал барсук (осуществлял чистку); к концу месяца у входа в нору зафиксирована активность и барсука, и енотовидной собаки; в начале мая барсук покинул поселение, а енотовидная собака осталась для выведения потомства.



Рис. 5. Чистка нор барсуком *Meles meles* на поселениях
Fig. 5. Cleaning of dens by badger *Meles meles* at settlements

Кроме возможных конкурентов (енотовидной собаки и лисицы), отмечено посещение поселений естественными врагами – рысью (4 случая на поселениях № 3 и № 6, расположенных вне заброшенных построек человека) и волком (на поселении № 6) (рис. 7).

Помимо конкурентов и врагов барсука, поселения посещали не только млекопитающие (белки, зайцы, копытные (рис. 8, *a–e*)), но и птицы (рис. 8, *f*). Скорее всего, данных видов привлекали не сами поселения, а следы чистки нор.



Рис. 6. Регистрация енотовидной собаки *Nyctereutes procyonoides* и лисицы *Vulpes vulpes* на барсучьих поселениях № 6 (a, b, e, f) № 3 (c) и № 4 (d)

Fig. 6. Registration of the raccoon dog *Nyctereutes procyonoides* and the fox *Vulpes vulpes* on badger settlements No. 6 (a, b, e, f) No. 3 (c) and No. 4 (d)

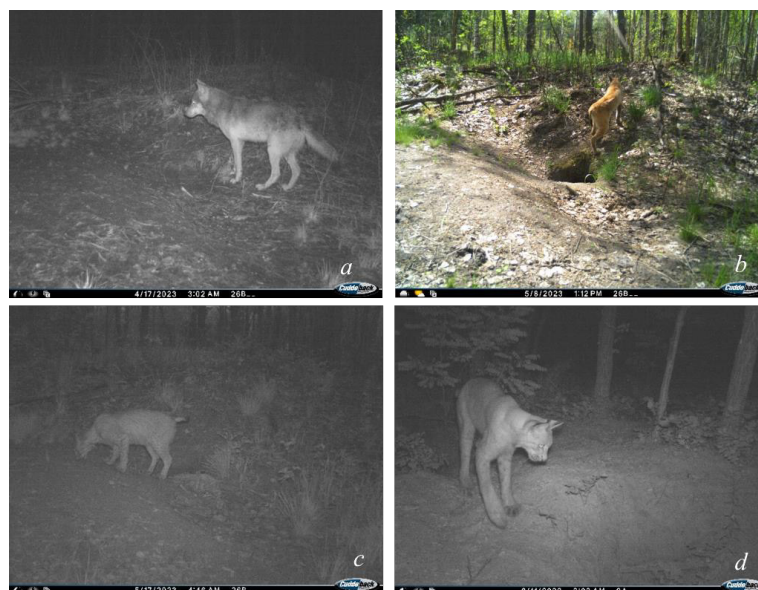


Рис. 7. Регистрация рыси *Lynx lynx* и волка *Canis lupus* на барсучьих поселениях № 6 (a–c) и № 3 (d)

Fig. 7. Registration of lynx *Lynx lynx* and wolf *Canis lupus* on badger settlements No. 6 (a–c) and No. 3 (d)

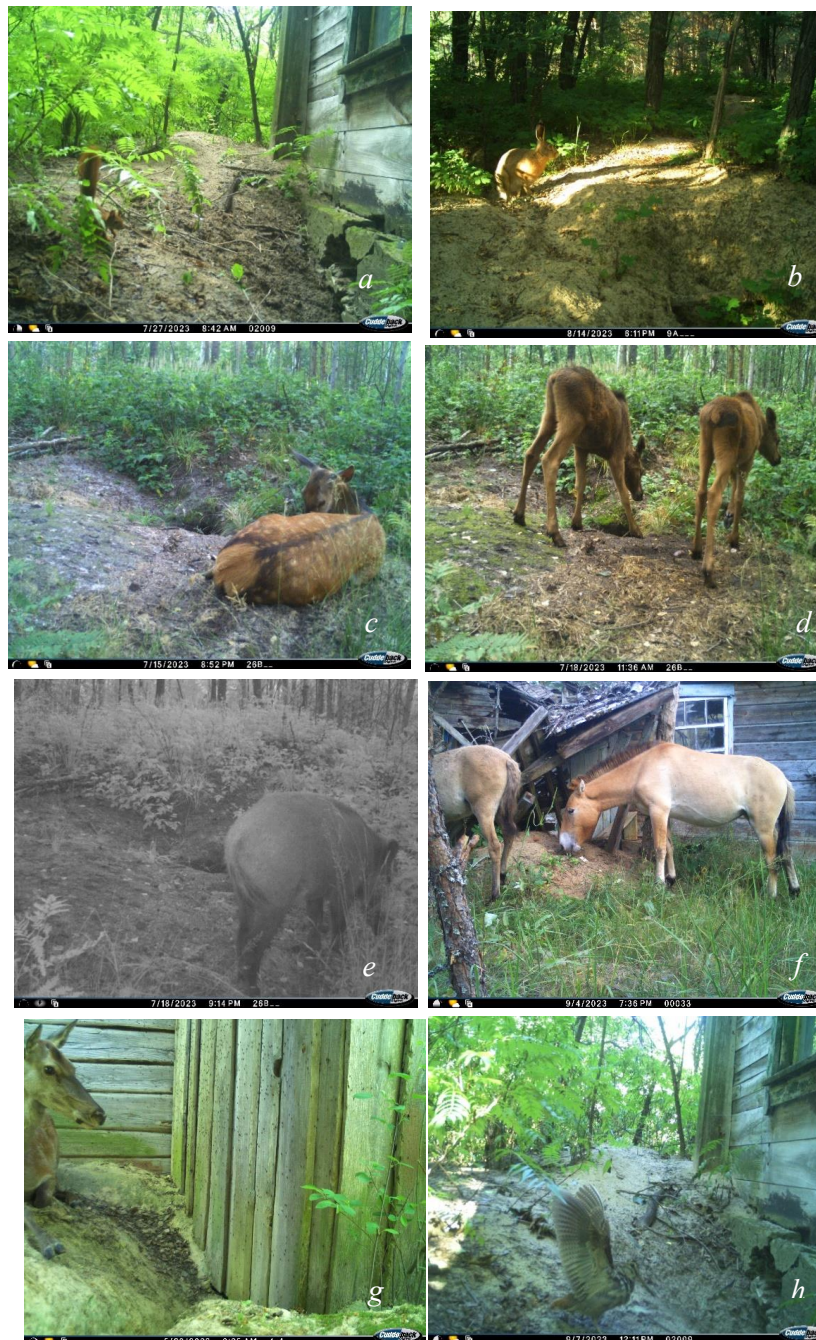


Рис. 8. Различные виды животных, регистрируемые на барсучьих поселениях № 4 (a, h), № 3 (b), № 6 (c–e), № 7 (f) и № 2 (g)

Fig. 8. Different animal species recorded on badger settlements No. 4 (a, h), No. 3 (b), No. 6 (c–e), No. 7 (f) and No. 2 (g)

Заклучение. Барсук обыкновенный (*Meles meles*), являясь важным элементом биогеоценозов, как редкий и исчезающий вид млекопитающих нуждается в организации надлежащих мер охраны в условиях ПГРЭЗ. Необходимым условием сохранения его популяции является продолжение работы по выявлению, картированию и изучению поселений. Анализ структур поселений барсука в зоне отчуждения и отселения ПГРЭЗ (правобережье р. Припять) показал их схожесть с таковыми для ареала вида в целом. Пригодность сложившихся экологических условий ПГРЭЗ обеспечивает сохранение и устойчивое поддержание этого животного на уровне особи, популяции и вида.

Полученные данные о суточной и сезонной активности, формах поведения (социальное, игровое, исследовательское, репродуктивное и др.), особенностях внутри- и межвидовых взаимоотно-

шений уточняют этолого-экологические адаптации барсука обыкновенного в Полесском регионе, в том числе в зоне отчуждения и отселения ПГРЭЗ (правобережье р. Припять), и имеют прямое фундаментальное и практическое значение. Данные о численности и распространении в ПГРЭЗ поселений барсука, который включен в Красную книгу Республики Беларусь, могут быть полезны при установлении специального режима охраны и использования мест обитания данного вида.

Благодарности. Работа выполнена в рамках мероприятия «Выявление и инвентаризация мест обитания диких млекопитающих, включенных в Красную книгу Республики Беларусь» Государственной программы по преодолению последствий катастрофы на Чернобыльской АЭС на 2021–2025 годы.

Авторы благодарны и признательны М. П. Стороженко, М. В. Кудину, Д. К. Гарбаруку за помощь в проведении полевых исследований на территории Наровлянского участка Полесского радиационно-экологического заповедника.

Acknowledgements. The work was carried out within the framework of the event “Identification and inventory of habitats of wild mammals included in the Red Book of the Republic of Belarus” of the State Program for Overcoming the Consequences of the Disaster at the Chernobyl nuclear power plant for 2021–2025.

The authors are very grateful to M. P. Storozhenko, M. V. Kudin, D. K. Garbaruk for their assistance in conducting field research on the territory of the Narovlyansky section of the Polesie Radiation-Ecological Reserve.

Список использованных источников

1. Мойнакбаев, Ж. Эффективность использования фотоловушек в зоологических исследованиях / Ж. Мойнакбаев // *Мировая наука*. – 2020. – № 12 (45). – С. 222–224.
2. Дистанционное наблюдение с помощью фотоловушек в фаунистических исследованиях / И. А. Кришук [и др.] // *Зоологические чтения: сб. науч. ст., посвящ. 125-летию со дня рожд. д-ра биол. наук Ивана Николаевича Сержанова* / ГрГУ им. Янки Купалы; редкол.: О. В. Янчуревич (гл. ред.), А. В. Рыжая. – Гродно, 2023. – С. 151–153.
3. Kinlaw, A. A review of burrowing by semi-fossorial vertebrates in arid environments / A. Kinlaw // *J. Arid. Environ.* – 1999. – Vol. 41, N 2. – P. 127–145. <https://doi.org/10.1006/jare.1998.0476>
4. Sett use in European badgers *Meles meles* / T. J. Roper [et al.] // *Behaviour*. – 2001. – Vol. 138, N 2. – P. 173–187.
5. Красная книга Республики Беларусь. Животные: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды диких животных / редкол.: И. М. Качановский (предс.) [и др.]. – 4-е изд. – Минск: Беларус. Энцыкл., 2015. – 317 с.
6. Feore, S. Habitat effects on the spatial ecology of the European badger *Meles meles* / S. Feore, W. I. Montgomery // *J. Zool.* – 1999. – Vol. 247, N 4. – P. 537–549. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb01015.x>
7. Калецкая, М. Л. Волк и его роль как хищника в Дарвинском заповеднике / М. Л. Калецкая // *Тр. Дарвин. гос. заповедника*. – 1973. – Вып. 11. – С. 41–58.
8. Дерябина, Т. Г. Поселения европейского барсука (*Meles meles* L.) / Т. Г. Дерябина // *Экосистемы и радиация: аспекты существования и развития: сб. науч. тр., посвящ. 25-летию Полес. гос. радиац.-экол. заповедника* / под общ. ред. Ю. И. Бондаря. – Минск, 2013. – С. 309–332.
9. Дерябина, Т. Г. Распространение и численность включенных в Красную книгу Республики Беларусь крупных млекопитающих (зубр, медведь, рысь, барсук) на территории Полесского государственного радиационно-экологического заповедника / Т. Г. Дерябина // *Фаунистические исследования в Полесском государственном радиационно-экологическом заповеднике: сб. науч. тр. / под ред. Г. В. Анципова*. – Гомель, 2008. – С. 19–37.
10. Почвы Полесского государственного радиационно-экологического заповедника / В. В. Лапа [и др.]; под ред. В. В. Лапа, Н. Н. Цыбулько. – Минск: ИВЦ Минфина, 2019. – 97 с.
11. Биологическое разнообразие животного мира Полесского государственного радиационно-экологического заповедника / М. Е. Никифоров [и др.]; под ред. акад. М. Е. Никифорова; Нац. акад. наук Беларуси, НПЦ по биоресурсам, Полес. гос. радиац.-экол. заповедник. – Минск: Беларус. навука, 2022. – 407 с.
12. Руковский, Н. Н. Убежища четвероногих / Н. Н. Руковский. – М.: Агропромиздат, 1991. – 140 с.
13. Roper, T. J. The structure and function of badger setts / T. J. Roper // *J. Zool.* – 1992. – Vol. 227, N 4. – P. 691–694. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb04425.x>
14. Петров, О. В. Роющая деятельность барсука в дубраве «Лес на Ворскле» / О. В. Петров // *Комплексные исследования биогеоценозов лесостепных дубрав* / редкол.: В. С. Ипатов (отв. ред.) [и др.]. – Л., 1986. – С. 113–117.
15. Pigozzi, G. Digging behaviour while foraging by the european badger, *Meles meles*, in a mediterranean habitat / G. Pigozzi // *Ethology*. – 1989. – Vol. 83, N 2. – P. 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1989.tb00523.x>
16. Сидорчук, Н. В. Суточная активность европейского барсука (*Meles meles* Linnaeus, 1758) (Mustelidae, Mammalia) на поселениях в разных популяциях Европейской части России / Н. В. Сидорчук, А. Е. Волченко, В. В. Рожнов // *Поволж. экол. журн.* – 2014. – № 4. – С. 601–610.
17. Woodroffe, R. Badger clans: demographic groups in an antisocial species / R. Woodroffe, D. W. Macdonald // *J. Zool.* – 1992. – Vol. 227, N 4. – P. 696–698. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb04427.x>
18. Spatial organization and demography of badgers (*Meles meles*) in Bialowieza Primeval Forest, Poland, and the influence of earthworms on badger densities in Europe / R. Kowalczyk [et al.] // *Can. J. Zool.* – 2003. – Vol. 81, N 1. – P. 74–87. <https://doi.org/10.1139/z02-233>
19. Fell, R. The social integration of European badger (*Meles meles*) cubs into their natal group / R. Fell, C. Buesching, D. W. Macdonald // *Behaviour*. – 2006. – Vol. 143, N 6. – P. 683–700.
20. Facilitative interactions between the Eurasian badger (*Meles meles*), the red fox (*Vulpes vulpes*) and the invasive raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Bialowieza Primeval Forest, Poland / R. Kowalczyk [et al.] // *Can. J. Zool.* – 2008. – Vol. 86, N 12. – P. 1389–1396. <https://doi.org/10.1139/Z08-127>
21. Сидорчук, Н. В. Европейский барсук в Дарвинском заповеднике. Традиционные и новые методы в изучении экологии и поведения норных хищников / Н. В. Сидорчук, В. В. Рожнов. – М.: Т-во науч. изданий КМК, 2010. – 122 с.

References

1. Moinakbaev Zh. Efficiency of using traps in zoological reserch. *Mirovaya nauka* [World science], 2020, no. 12 (45), pp. 222–224 (in Russian).
2. Krishchuk I. A., Shakun V. V., Solovei I. A., Veligurov P. A., Larchenko A. I., Mashkov E. I. Remote observation with the help of camera traps in faunal research. *Zoologicheskie chteniya: sbornik nauchnykh statei, posvyashchennyi 125-letiyu doktora biologicheskikh nauk Ivana Nikolaevicha Serzhanina* [Zoological readings: a collection of scientific articles dedicated to the 125th anniversary of Doctor of Biological Sciences Ivan Nikolaevich Serzhanin]. Grodno, 2023, pp. 151–153 (in Russian).
3. Kinlaw A. A review of burrowing by semi-fossorial vertebrates in arid environments. *Journal of Arid Environments*, 1999, vol. 41, no. 2, pp. 127–145. <https://doi.org/10.1006/jare.1998.0476>
4. Roper T. J., Ostler J. R., Schmid T. K., Christian S. F. Sett use in European badgers *Meles meles*. *Behaviour*, 2001, vol. 138, no. 2, pp. 173–187.
5. Kachanovskii I. M., Nikiforov M. E., Parfenov V. I., Borodin O. I., Pugachevskii A. V., Baichorov V. M. [et al.]. *Red Book of the Republic of Belarus. Animals: rare and endangered species of wild animals*. Minsk, Belaruskaya Entsyklopedyya Publ., 2015. 317 p. (in Russian).
6. Feore S., Montgomery W. I. Habitat effects on the spatial ecology of the European badger *Meles meles*. *Journal of Zoology*, 1999, vol. 247, no. 4, pp. 537–549. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb01015.x>
7. Kaletskaya M. L. The wolf and its role as a predator in the Darwin Reserve. *Trudy Darvinskogo gosudarstvennogo zapovednika* [Proceedings of the Darwin State Nature Reserve], 1973, vol. 11, pp. 41–58 (in Russian).
8. Deryabina T. G. European Badger settlements (*Meles meles* L.). *Ekosistemy i radiatsiya: aspekty sushchestvovaniya i razvitiya: sbornik nauchnykh trudov, posvyashchennyi 25-letiyu Poleskogo gosudarstvennogo radiatsionno-ekologicheskogo zapovednika* [Ecosystems and radiation: aspects of existence and development: a collection of scientific works dedicated to the 25th anniversary of the Polesie State Radiation-Ecological Reserve]. Minsk, 2013, pp. 309–332 (in Russian).
9. Deryabina T. G. Distribution and number of the large mammals (bison, bear, lynx, badger) included into the Red Book of Belarus Republic in the territory of Paliessie State Radiation and Ecology Reserve. *Faunisticheskie issledovaniya v Poleskom gosudarstvennom radiatsionno-ekologicheskome zapovednike: sbornik nauchnykh trudov* [Faunistic research in the Polesie State Radiation-Ecological Reserve: a collection of scientific papers]. Gomel, 2008, pp. 19–35 (in Russian).
10. Lapa V. V., Tsybul'ko N. N., Tsyribko V. B., Ustinova A. M., Chervan' A. N., Logachev I. A., Kudin M. V., Antipenko O. N. *Soils of Polesye state radiation-ecological reserve*. Minsk, Information and Computing Center of the Ministry of Finance of the Republic of Belarus, 2019. 97 p. (in Russian).
11. Nikiforov M. E., Anisimova E. I., Gomel' K. V., Dombrovskii V. Ch., Zhuravlev D. V., Krishchuk I. A. [et al.]. *Biological diversity of fauna of the Polesky State Radiation and Ecological Reserve*. Minsk, Belaruskaya nauka Publ., 2022. 407 p. (in Russian).
12. Rukovskii N. N. *Sanctuaries of quadrupeds*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1991. 140 p. (in Russian).
13. Roper T. J. The structure and function of badger setts. *Journal of Zoology*, 1992, vol. 227, no. 4, pp. 691–694. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb04425.x>
14. Petrov O. V. Swarming activity of the badger in the oak forest “Les na Vorskla”. *Kompleksnye issledovaniya biogeotsenozov lesostepnykh dubrav* [Comprehensive studies of biogeocenoses of forest-steppe oak forests]. Leningrad, 1986, pp. 113–117 (in Russian).
15. Pigozzi G. Digging behaviour while foraging by the european badger, *Meles meles*, in a mediterranean habitat. *Ethology*, 1989, vol. 83, no. 2, pp. 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1989.tb00523.x>
16. Sidorchuk N. V., Volchenko A. E., Rozhnov V. V. Daily activity of the European badger (*Meles meles* Linnaeus, 1758) (Mustelidae, Mammalia) at settlements in several populations of European Russia. *Povolzhskii ekologicheskii zhurnal = Povolzhskii journal of ecology*, 2014, no. 4, pp. 601–610 (in Russian).
17. Woodroffe R., Macdonald D. W. Badger clans: demographic groups in an antisocial species. *Journal of Zoology*, 1992, vol. 227, no. 4, pp. 696–698. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb04427.x>
18. Kowalczyk R., Zalewski A., Jedrzejewska B., Jedrzejewski W. Spatial organization and demography of badgers (*Meles meles*) in Bialowieza Primeval Forest, Poland, and the influence of earthworms on badger densities in Europe. *Canadian Journal of Zoology*, 2003, vol. 81, no. 1, pp. 74–87. <https://doi.org/10.1139/z02-233>
19. Fell R., Buesching C., MacDonald D. W. The social integration of European badger (*Meles meles*) cubs into their natal group. *Behaviour*, 2006, vol. 143, no. 6, pp. 683–700.
20. Kowalczyk R., Jedrzejewska B., Zalewski A., Jedrzejewski W. Facilitative interactions between the Eurasian badger (*Meles meles*), the red fox (*Vulpes vulpes*) and the invasive raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Bialowieza Primeval Forest, Poland. *Canadian Journal of Zoology*, 2008, vol. 86, no. 12, pp. 1389–1396. <https://doi.org/10.1139/Z08-127>
21. Sidorchuk N. V., Rozhnov V. V. *European badger in the Darwin reserve. Traditional and new methods in studying of ecology and behaviour of denning predators*. Moscow, Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK Publ., 2010. 122 p. (in Russian).

Информация об авторах

Шакун Василий Васильевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: terioforest@tut.by

Кришчук Ирина Александровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ikryshchuk@yandex.by

Information about the authors

Vasili V. Shakun – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: terioforest@tut.by

Iryna A. Kryshchuk – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ikryshchuk@yandex.by