

ВМІСТ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНА В КЛІТИНАХ ЛІНІЇ L1210 ЗА ДІЇ ФОСФОРОТІОАТНИХ АНТИСЕНС–ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДІВ

Л. А. Іваницька, В. В. Стадник, Х. Я. Майор, В. В. Влізло

Інститут біології тварин НААН

У статті наведені дані стосовно впливу антисенс-олігодезоксинуклеотидів, комплементарних до мРНК пріона, на вміст цього білка у клітинах лінії L1210. Показано, що суміш фосфоротіоатних антисенс-олігодезоксинуклеотидів, які комплементарні до кеп-ділянки, старт-кодону та середини відкритої рамки зчитування мРНК пріона, найбільш ефективна і знижує вміст фізіологічного пріона на 98 %. В якості засобів транспортування антисенс-олігодезоксинуклеотидів у клітини ссавців запропоновано мультиламелярні катіонні ліпосоми. Також обговорюються методичні підходи до підвищення ефективності застосування антисенс-терапії шляхом використання хімічних модифікацій нуклеїнових кислот.

Ключові слова: ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ПРІОН, ІНГІБУВАННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА, АНТИСЕНС-ОЛІГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДИ, ЛІПОСОМИ

Початок ХХІ століття характеризується вибухом нових біомедичних розробок, що є наслідком відкриття біологічно активних сполук та генної терапії, які з успіхом можуть бути використані у лікуванні, діагностиці та профілактиці раку, серцево-судинних захворювань, діабету, хвороби Альцгеймера, Паркінсона, різних спадкових патологій. Зокрема, потенціал генної терапії видається багатообіцяючим завдяки здатності корегувати експресію чітко визначеного патологічного гену, не впливаючи на жоден інший, низькій токсичності нуклеїнових кислот та можливості підібрати унікальний і найбільш ефективний підхід до лікування певного захворювання.

Генна терапія може реалізовуватись на різних етапах експресії гена. Конструктивно найпростіше досягти корекції експресії цільового гена на рівні трансляції його мРНК. Інструментами, які застосовують у такому підході є антисенс-технологія та РНК інтерференція. Застосування антисенс-олігонуклеотидів — більш рання технологія, яка полягає у введенні в клітину одноланцюгових олігонуклеотидів, довжиною 15–30 основ, які комплементарні до мРНК — мішені. Антисенс-олігодезоксинуклеотиди (асОДН) зв'язуються з мРНК, стерично блокують трансляцію, при цьому опосередковують гідроліз мРНК під дією РНКазі Н. Висока специфічність дії антисенс-олігонуклеотидів забезпечується вибором унікальних послідовностей в складі цільової мРНК [1].

У деяких випадках виникає потреба пригнічення експресії нормально функціонуючого гена. До цього вдаються у теоретичних дослідженнях з метою встановлення можливих функцій гена та механізмів його регуляції. Окремим випадком, який може мати прикладне значення, є пригнічення експресії гена *prnp*, який кодує у ссавців білок пріон [2]. Клітинний пріон залучений до патогенезу фатальних нейродегенеративних захворювань — трансмісивних спонгіоформних енцефалопатій (ТСЕ). Агентом, що викликає захворювання, виступає патологічний пріон. Ключовою подією у патогенезі ТСЕ є конформаційне перетворення клітинного пріона у патологічну форму [3, 4]. Сучасні наукові уявлення про цей процес переважно фрагментарні, однак достеменно відомо, що патологічний пріон володіє такою ж амінокислотною послідовністю, що й фізіологічний, кодується тим самим геном і транскрибується в одній рамці зчитування [5].

Функції клітинного пріона невідомі, проте доведено, що в патогенезі пріонних інфекцій він є субстратом для реплікації патологічного пріона. Відтак організми, які не містять клітинного пріона, є резистентними до розвитку пріонних інфекцій. Такий підхід реалізовано у створених трансгенних тваринах, в яких нокаутовано ген пріона. Показано, що такі тварини не інфікуються патологічним пріоном [6]. Роботи останніх років свідчать про те, що фізіологічний пріон не є незамінним білком клітини [7, 8], а це є підставою для стратегії боротьби із ТСЕ, яка полягає у вилученні із реакційної суміші фізіологічного пріона, як необхідного субстрату для конверсії [9, 10].

З огляду на це, метою нашої роботи було знизити рівень експресії фізіологічного пріону шляхом інгібування трансляції його мРНК. Антисенс-технологія дозволяє «вимкнути» ген тимчасово, що дасть можливість дослідити фізіологічний стан організму за відсутності клітинного пріона та розробити адекватну стратегію профілактики та лікування пріонних інфекцій.

Матеріали і методи

Послідовності антисенс-олігодезоксинуклеотидів, комплементарних до мРНК обирали за допомогою алгоритму, який включав аналіз вторинної структури мРНК, з використанням програми mfold (version 2.0; Macfarlane Burnet Centre, Melbourne, Australia, <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1-2.3.cgi>). Вторинну структуру асОДН визначали за допомогою програми GeneRunner (version 3.05;

Hastings Software Inc.). Для досліджень було обрано три послідовності асОДН: 5'-TCT GCT GCT CTG ACA ACG C-3', комплементарний до кеп-ділянки мРНК пріону миші *Mus Musculus*, 5'-AGT AGC CAA GGT TCG CCA T-3', комплементарний до старт-кодону та 5'-ATG CTT GAG GTT GGT T-3', комплементарний до частини відкритої рамки зчитування (ORF).

Приготування ліпосом. Ліпіди (фосфатидилхолін: холестерол:стеариламін у співвідношенні 8:7:1, кінцева концентрація ліпідів 80 мг/мл) розчиняли у 5–10 мл у суміші хлороформ-метанол (1:1) у колбі об'ємом 10 мл та випарювали під струменем інертного газу. Для усунення залишків органічних розчинників інкубували ніч під вакуумом. Утворену ліпідну плівку гідратували буфером із асОДН (10 мМ ацетату натрію, 150 мМ натрію хлориду та 100 нмоль ОДН, рН 4,5). Обробляли ультразвуком за схемою: 5 циклів по 15 с з інтервалом в 1 хв. Далі суспензію ліпосом з асОДН десять разів заморожували при -20°C протягом 2–3 хв та відтаювали при 40°C протягом 1–2 хв.

Ступінь інкорпорування олігодезоксинуклеотидів у ліпосоми встановлювали методом спектроскопії в ультрафіолетовій області. Під час приготування ліпосом до ацетатного буферу додавали 100 нмоль ОДН, суспензію обробляли ультразвуком. Далі частину ліпосом піддавали заморожуванню–відтаюванню 10 разів. Вимірювали значення оптичної густини суспензії при 260 нм проти ліпосом без ДНК. Як контроль використовували ліпосоми, до яких після обробки ультразвуком та заморожування–відтаювання вносили 100 нмоль ОДН. Після чого одразу реєстрували значення оптичної густини суспензії при 260 нм.

Розмір частинок ліпосомальної емульсії визначали методом динамічного світлорозсіювання при довжинах хвиль твердофазного лазера 420 нм та 620 нм. Далі розраховували розмір частинок за рівнянням Стокса-Ейнштейна в приближенні для сферичних частинок.

Дослідження in vitro проводили на культурі клітин мишачої лімфоцитарної лейкемії лінії L1210. Клітини лінії L1210 культивували в 12-лункових культуральних планшетах у середовищі DMEM із 10 % фетальної бичачої сироватки при 37°C та 5 % CO_2 до досягнення 40–50 % конфлюенту. АсОДН в ліпосомальній емульсії додавали у лунки в 100 нмоль/мл концентрації, після цього клітини інкубували 4 год. Далі клітини відмивали від середовища охолодженим забуференим фосфатами фізіологічним розчином та лізували у буфері для лізису (10 мМ Трис-НСІ рН 7,5, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 50 мМ NaF, 1 % Тритон X-100, 1 мМ ортованадат натрію, 10 мкг/мл лейпептину, 8 мкг/мл апротиніну, 1 мкг/мл пепстатину, 5 мМ бензамідину, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду).

Вміст фізіологічного пріона за дії асОДН визначали методом імуноблотингу. У лізатах клітин лінії L1210 визначали концентрацію білка за методом Лоурі [11]. Далі проводили електрофоретичне розділення білків лізатів клітин у системі Леммлі [12] в 12 % поліакриламідному гелі. Перенесення білків з поліакриламідного гелю на полівінілдифторидну мембрану здійснювали у камері для трансферу Transblot (Bio Rad, USA). По закінченню переносу білків мембрану інкубували 1 год за кімнатної температури у 5 % знежиреному молоці (5 % сухе знежирене молоко, 50 мМ Трис-НСІ, 150 мМ NaCl, 0,05 % Tween). Для детекції фізіологічного пріона використовували мишачі анти-пріонові антитіла 6Н4 (Prionics, Швейцарія) у розведенні 1:5000. Із першими антитілами мембрану інкубували 12 год при $+4^{\circ}\text{C}$. На наступному етапі проводили інкубацію мембрани із козячими антимишачими антитілами, кон'югованими із лужною фосфатазою (Sigma, Німеччина) в розведенні 1:10000. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням хемілюмінесцентного субстрату для лужної фосфатази CDP-Star (Sigma, Німеччина). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, США) та набору для проявки плівок (Kodak).

Результати й обговорення

Антисенс-олігодезоксинуклеотиди є надзвичайно специфічними інструментами для маніпуляцій із цільовою мРНК. Однак успішне застосування асОДН на практиці в значній мірі залежить не лише від нуклеотидної послідовності, але й від вторинної та третинної структур обох учасників взаємодії: і асОДН, і мРНК. Сучасні біоінформативні методи та технології дозволяють досить вірогідно прогнозувати конформацію біомолекул. Використаний алгоритм дозволяє передбачити вторинну структуру мРНК та визначити оптимальні та субоптимальні конформації, застосовуючи підхід мінімізації вільної енергії зв'язків. На основі цих калькуляцій програма Vienna RNA пропонує всі термодинамічно можливі варіанти вторинної структури мРНК [13].

Дані стосовно вторинної структури мРНК цільового білка є надзвичайно важливими у дизайні ефективних послідовностей антисенс-олігодезоксинуклеотидів. Акцент ставиться на однопанцюгові ділянки мРНК, особливо дестабілізовані петлі, які є сайтами для потенційних асОДН. У дослідженнях ми обрали послідовності асОДН, які комплементарні, відповідно, кеп-ділянці, старт-кодону та середині відкритої рамки зчитування. АсОДН, які приєднуються до кепу мРНК, блокують її трансляцію у два шляхи: опосередковують її РНКазо-Н залежний гідроліз та перешкоджають приєднанню факторів трансляції [14].

Старт-кодон та нуклеотидні послідовності перед ним відіграють значну роль в ініціації трансляції, тому блокування цієї ділянки антисенс-олігонуклеотидами практично незворотно інгібує синтез білка. АсОДН, комплементарні до ділянки відкритої рамки зчитування, стерично перешкоджають пересуванню рибосом та індукують деградацію мРНК.

Застосування асОДН в дослідницькій діяльності та клініці гальмується рядом біологічних бар'єрів. По-перше, нуклеїнові кислоти є сильно гідрофільними молекулами із значною густиною негативного заряду на поверхні молекули, що ускладнює їх проникнення через мембрану всередину клітини. По-друге, молекули ДНК чутливі до дії нуклеаз у фізіологічних рідинах організму та всередині клітини. Час півжиття немодифікованих ОДН *in vivo* складає близько 1 год [15]. З метою полегшення проникнення ОДН у клітину використовують ліпосоми. У нашій роботі ми застосовували катіонні ліпосоми, які склались із фосфатидилхоліну, холестерину та стеариламіну. У цій системі холестерин застосовується для надання стабільності ліпідному бішару, що важливо для цілісності внутрішнього вмісту ліпосоми. Невеликі молекули холестерину, які розташовуються переважно між гідрофобними ділянками фосфатидилхоліну, перешкоджають внутрішньосферичним «фліп-флоп» переходам молекул [16] і таким чином надають «жорсткості» оболонці ліпосоми. Аліфатичний первинний амін стеариламін сприяє ефективнішій іммобілізації ОДН в ліпосомах шляхом електростатичних взаємодій аміногрупи та фосфатних груп нуклеїнової кислоти.

Існує цілий ряд способів виготовлення ліпосом, які мають на меті вмістити якомога більшу кількість «вантажу» у частинку при якнайменших її розмірах. У нашій роботі ми спробували оптимізувати методіку приготування ліпосом. На рис. 1 відображена діаграма, яка характеризує ступінь інкорпорування антисенс-олігодезоксинуклеотидів у ліпосоми залежно від того чи застосовувалось заморожування-відтаювання.

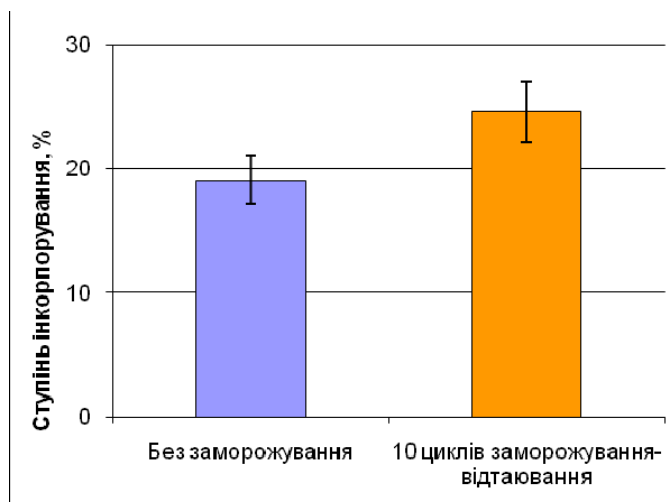


Рис. 1. Вплив умов приготування ліпосом на кількість зв'язаної ДНК

Як бачимо без заморожування-відтаювання у внутрішній простір ліпосоми потрапляє близько $19,1 \pm 0,6$ % внесених олігонуклеотидів. 10 циклів заморожування-відтаювання підвищує це значення до $26 \pm 1,1$ %. Таким чином застосування такої маніпуляції сприяє більш ефективному використанню внутрішнього об'єму ліпосоми.

Використання ліпосомальних емульсій *in vivo* можливе лише при певних розмірах частинок, які визначаються діаметром просвіту капілярів та розмірам самих клітин. Зменшення розміру ліпосом досягається обробкою ультразвуком. Дана операція диспергує великі ліпідні краплі та сфери у дрібніші частинки. Застосування 5 циклів ультразвукової обробки дозволяє отримати ліпосоми діаметром 420 нм. Це значення є цілком прийнятним, оскільки ефекторні клітини в організмі ссавців значно більші.

Завдання ліпосом та й інших носіїв нуклеїнових кислот також полягає у захисті ДНК від нуклеаз. Підвищити стабільність ОДН в сироватці можна шляхом введення модифікацій у фосфодіестерний зв'язок та у нуклеотидні основи. Найбільш оптимальною модифікацією асОДН є їх фосфоротіоатні похідні. Фосфоротіоатні ОДН містять атом Сульфуру замість Оксигену в залишку фосфорної кислоти. Це забезпечує стабільність ОДН в присутності нуклеаз. Треба зазначити, що повна заміна фосфодіестерних зв'язків на фосфоротіоатні значно посилює неспецифічні взаємодії та знижує розчинність таких молекул у воді. Оскільки деградація ДНК у сироватці відбувається, переважно, внаслідок 3'-екзонуклеазної активності компонентів крові та всередині клітини існують 5'-екзонуклеази [17], ми вирішили застосувати фосфоротіоатну модифікацію трьох крайніх зв'язків між нуклеотидами із обох кінців олігонуклеотидів. Таким чином, зберігається висока афінність взаємодії асОДН та мРНК-

мішені, практично відсутні неспецифічні реакції із білками, а екзонуклеазна активність сироватки значно редується.

Ефективність застосування запропонованої системи, яка складалась із ліпосом з імобілізованими в них фосфоротіоатними асОДН, для зниження вмісту фізіологічного пріона, була перевірена на клітинах лінії L1210. Ця лінія клітин суспензійна, що є складнішим випадком для трансфекції, ніж моношарові лінії, і характеризується високим базовим рівнем синтезу пріона, тому є хорошою моделлю для скринінгу речовин з антипріонною активністю.

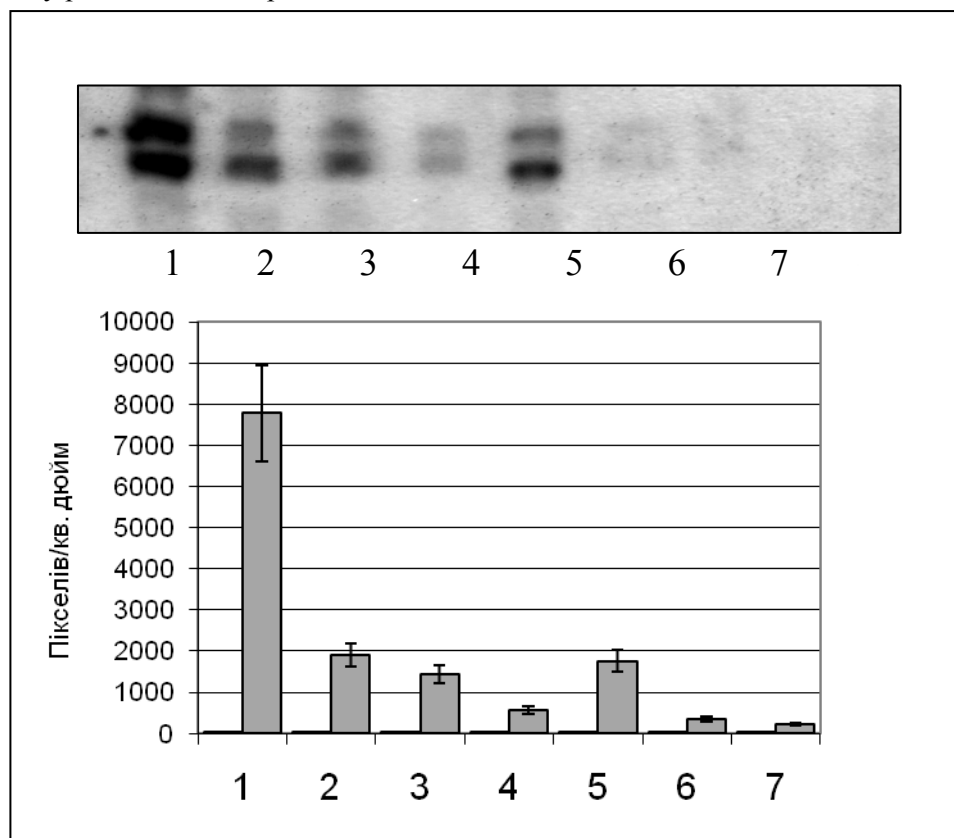


Рис. 2. Вплив різних асОДН, інкорпорованих у ліпосоми, на експресію фізіологічного пріона у клітинах лінії L1210.

Примітки: 1 — контроль; 2 — суміш специфічних немодифікованих асОДН; 3 — суміш неспецифічних послідовностей фосфоротіоатних асОДН; 4 — фосфоротіоатні асОДН1, комплементарні до старт-кодону мРНК пріона, 5 — фосфоротіоатні асОДН2, комплементарні до кеп-ділянки мРНК пріона; 6 — фосфоротіоатні асОДН3, комплементарні до відкритої рамки зчитування мРНК пріона; 7 — суміш фосфоротіоатних асОДН1,2,3.

Імуноблот експресії пріона та наступний денситометричний аналіз отриманих даних показали, що менш активним виявився олігонуклеотид, комплементарний до кеп-ділянки мРНК, який знижував вміст пріона на $78 \pm 2,57\%$ ($p \leq 0,05$), натомість дві інші послідовності — на $95 \pm 3,8\%$ ($p \leq 0,05$). Найбільш вдалою є композиція всіх послідовностей фосфоротіоатних асОДН, ефективність якої перевищує 98% ($p \leq 0,05$). Отже, така ж суміш немодифікованих асОДН (стовпець 2) інгібує експресію пріона лише на $75 \pm 3,7\%$, ($p \leq 0,05$). Пояснення впливу неспецифічних фосфоротіоатних асОДН (стовпець 3) на вміст пріона в клітинах L1210 знаходимо в роботі [18]. Автори показали, що деякі короткі одноланцюгові фосфоротіоатні молекули ДНК здатні взаємодіяти із фізіологічним та патологічним пріонами. Однак ця взаємодія не залежить від послідовності нуклеотидів, а в більшій мірі корелює із розміром ОДН. Висловлюється сумнів стосовно можливості використання неспецифічних ОДН для боротьби із пріонними інфекціями. На нашу думку, застосування антисенс-олігодезоксинуклеотидів є перспективним та більш раціональним з огляду на специфічність їх дії, що підтверджується отриманими даними.

Висновки

У результаті проведених досліджень підтверджено правильність біоінформатичного дизайну молекул асОДН, розроблено систему їх транспортування, показано вплив на вміст фізіологічного пріона *in vitro* та встановлено, що в наступних дослідженнях слід використовувати суміш обраних асОДН.

Перспективи подальших досліджень. Надалі наша робота буде сфокусована на способах довготривалого інгібування експресії пріона *in vivo* за допомогою фосфоротиоатних асОДН. Оскільки ступінь інкорпування асОДН в ліпосоми не дуже високий, що веде до великих витрат матеріалів, ми плануємо розробити більш ефективну і економічну систему транспортування ДНК на основі катіоноактивних біосумісних полімерів.

Подяки

Роботу виконано за підтримки Західноукраїнського центру біомедичних досліджень (West-Ukrainian Biomedical Research Center — WUBMRC).

L. A. Ivanytska, V. V. Stadnyk, Ch. Y. Mayor, V. V. Vlizlo

PHYSIOLOGICAL PRION EXPRESSION LEVEL IN L1210 CELLS TREATED BY PHOSPHOROTHIATED ANTISENSE-OLIGODEOXYNUCLEOTIDES

S u m m a r y

The paper presents new data about antisense-oligodeoxynucleotides action on prion expression level in L1210 cells. It is estimated that mix of phosphorothioated asODNs, complementary to cap area, start-codon and middle of the open reading frame of prion mRNA was the most efficient and decreased cellular prion content on 98 %. Multilamellar cationic liposomes are proposed as asODNs delivery vehicles to mammalian cells. Methodological approaches to improving antisense-therapy efficiency via chemical modifications of nucleic acids are discussed.

Л. А. Иваницкая, В. В. Стадник, К. Я. Майор, В. В. Влизло

СОДЕРЖАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИОНА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ L1210 ПРИ ДЕЙСТВИИ ФОСФОРОТИОАТНЫХ АНТИСЕНС-ОЛИГОДЕЗОКСИНУКЛЕОТИДОВ

А н н о т а ц и я

В статье представлены данные относительно влияния антисенс-олигодезоксинуклеотидов, комплементарных к мРНК приона, на содержание этого белка в клетках линии L1210. Показано, что смесь фосфоротиоатных антисенс-олигодезоксинуклеотидов, которые комплементарны к кэп участку, старт-кодону и середине открытой рамки считывания мРНК приона, наиболее эффективна и снижает уровень экспрессии физиологического приона на 98 %. В качестве средств транспортировки асОДН в клетки млекопитающих предложено мультисамельлярные катионные липосомы. Также обсуждаются методические подходы к повышению эффективности антисенс-терапии с помощью химических модификаций нуклеиновых кислот.

1. *Sahu N. K.* Antisense technology: a selective tool for gene expression regulation and gene targeting / N. K. Sahu, G. Shilakari, A. Nayak, D. V. Kohli // *Curr. Pharm. Biotechnol.* — 2007. — N 5. — P. 291–304.
2. *Oesch B.* A cellular gene encodes scrapie PrP 27–30 protein / B. Oesch, D. Westaway, M. Walchli // *Cell.* — 1985. — Vol. 40. — P. 735–746.
3. *Prusiner S.B.* Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie / S. B. Prusiner // *Science.* — 1982. — Vol. 216, № 45. — P. 136–144.
4. *Chesebro B.* Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases / B. Chesebro // *British Medical Bulletin.* — 2003. — Vol.66. — P. 1–20.
5. *Collinge J.* Creutzfeldt–Jakob disease and other prion diseases. In: J. T. O’Brien, D. Ames, A. Burns; eds. *Dementia* — London: Edward Arnold, 1999.
6. *Bueler H.* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie / H. Bueler, A. Aguzzi, A. Sailer // *Cell.* — 1993. — Vol. 73. — P.1339–1347.
7. *Griffoni C.* The cellular prion protein: biochemistry, topology, and physiologic functions / C. Griffoni, M. Toni, E. Spisni, et al. // *Cell Biochem Biophys.* — 2003. — Vol. 38 (3). — P. 287–304.
8. *Stewart L. A.* Systematic review of therapeutic interventions in human prion disease / L. A. Stewart, L. H. Rydzewska, G. F. Keogh, R. S. Knight // *Neurology.* — 2008. — № 70. — P. 1272–1281.
9. *Nicoll A. J.* Preventing prion pathogenicity by targeting the cellular prion protein / A. J. Nicoll, J. Collinge // *Infect. Disord. Drug Targets.* — 2009. — № 9. — P. 48–57.
10. *Gilch S.* Strategies for eliminating PrP(c) as substrate for prion conversion and for enhancing PrP(Sc) degradation / S. Gilch, M. Nunziante, A. Ertmer, H. M. Schätzl // *Vet. Microbiol.* — 2007. — N123. — P. 377–386.
11. *Lowry O. H.* Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193 (1). — P. 265–275.

12. *Laemmli U. K.* Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. / U. K. Laemmli // *Nature*. — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
13. *Ye Ding* Statistical prediction of single-stranded regions of RNA secondary structure and application to predicting effective antisense target sites and beyond / Ye Ding, C. E. Lawrence // *Nucleic Acids Research*. — 2001. — Vol. 29, N 5. — P. 1034–1046.
14. *Opalinska J. B.* Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications // J. B. Opalinska, A. M. Gewirtz // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2002. — Vol. 1(7). — P. 503–514.
15. *Uhlmann E.* Studies on the Mechanism of Stabilization of Partially Phosphorothioated Oligonucleotides Against Nucleolytic Degradation / E. Uhlmann, A. Rytte, A. Peyman. // *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. — 1997. — Vol. 7. — P. 345–350.
16. *Марголис Л.Б.* Липосомы и их взаимодействие с клетками / Л. Б. Марголис, Л. Д. Бергельсон — М. : Наука, 1986. — 240 с.
17. *Shaw J. P.* Modified deoxyoligonucleotides stable to exonuclease degradation in serum / J. P. Shaw, K. Kent, J. Bird, J. Fishback, B. Froehler // *Nucleic Acids Res.* — 1991. — Vol. 19. — P. 747–750.
18. *Karpuj M. V.* Phosphorothioate oligonucleotides reduce PrP levels and prion infectivity in cultured cells / M. V. Karpuj, K. Giles, S. Gelibter-Niv, M. R. Scott et al. // *Mol. Med.* — 2007. — Vol. 13(3–4). — P. 190–198.

Рецензент: головний науковий співробітник НВЦ з вивчення пріонних інфекцій, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Остапів Д. Д.