

Список литературы

1. Газета «Казах Зерно. kz» 2009. — № 5 (5). 20 июля.
2. Койшибаев М., Пономарева Л.А. Вредоносность болезней яровой пшеницы с воздушно-капельной инфекцией в Северном Казахстане // Вестн. сельхоз. науки Казахстана. — 2008. — № 8. — С. 15–19.
3. Morgounov A., Rosseva L. and Koyshibayev M. Leaf rust Wheat in Northern Kazakhstan and Siberia incidence virulence and breeding for resistance // Australian Journal of Agricultural Research. — 2007. — № 56. — P. 847–853.
4. Maurhofer M., Keel C., Schider C. et al. Disease control and pest management, Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strains CHAO on its disease suppressive capacity // Phytopathology. — 1992. — № 82. — P. 190–195.
5. Pfender W.F., Kraus J. and Loper J.E. A genomic region from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 required for pirrolnitrin production and inhibition of *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat straw // Phytopathology. — 1993. — № 83. — P. 1223–1228.
6. Надькта В.Д. Перспективы биологической защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов // Защита и карантин растений. — 2004. — № 6. — С. 26–28.
7. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биологические препараты на основе псевдомонад // АГРО XXI. — 2000. — 140 с.
8. Benizri E., Baudon E., Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria // Biocontrol science and technology. — 2001. — № 11. — P. 557–574.
9. Штерншис М.В., Джалилов Ф.С., Андреева И.В. и др. Биопрепараты в защите растений. — Новосибирск, 2000. — 128 с.
10. Кузин А.И., Кириченко П.М., Кузнецова Н.И. и др. Фунгицидные свойства штамма *Bacillus subtilis* // Сельскохозяйственная микробиология в XVIII–XIX веках: Материалы Всерос. конф. — СПб., 2001. — С. 30.

УДК 57.083/619:578.835

Оптимизация duplex-ПТР метода для выявления провируса лейкоза крупного рогатого скота

Каирова М.Ж.¹, Сарина Н.И.²¹ РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК, Астана;² РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, Астана

Duplex-ПТР әдісін қою үшін ИФТ-да позитивті, «сұр», яғни күмән тудыратын, аумақтағы және негативті нәтиже көрсеткен ІҚМ қанынан бөлінген ДНК-үлгілері алынды. Зерттеу нәтижесінде көрсетілгендей, әзірленген ПТР әдісі ИФТ-да кейбір позитивті, «сұр» аумақтағы және негативті үлгілерден ІҚМ лейкоз провирусын анықтауға мүмкіндік береді, сонымен қатар ІҚМ α -Globin генинің ішкі бақылауына сәйкес келетін ПТР-өнімдері ДНК үлгілерінен айқындалды. ІҚМ геномінде интеграцияланған провирустың геномы әр түрлі мөлшерде болуы мүмкін. Сол себепте әзірленген duplex-ПТР әдісінде ДНК-нің және провирустың генине негізделген праймерлердің концентрациясы ішкі бақылау гендеріне спецификалы праймерлердің концентрациясына қарағанда жоғары болуы тиіс.

For the duplex-PCR analysis we used ELISA-positives, ELISA-indeterminate and ELISA-negative DNA hosts samples that were isolated from a blood of cows. Our results showed that developed in this work duplex-PCR method may be applied to detect Bovine leukemia provirus in some ELISA-positive, ELISA-indeterminate and ELISA-negatives hosts. What is more PCR-products corresponded to internal control α -Globin gene of cattle may be amplified by the duplex-PCR method. Depend on viral DNA copy number integrated in host's genome an increased DNA concentration in a PCR mix can be applied with increasing of concentration of pair primers that is targeted to proviral *env* gene in compare to pair primers are targeted to internal control gene to improve the duplex-PCR amplification.

Лейкоз крупного рогатого скота (ЛКРС) является широко распространенным заболеванием и наносит огромный ущерб, связанный с гибелью и преждевременной выбраковкой высокопродуктивных коров, снижением продуктивности, качества молока и рождением телят с иммунодефицитами [1].

ЛКРС — хроническая инфекционная болезнь, вызываемая РНК-содержащим вирусом лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС или BLV — bovine leukosis virus) из семейства *Retroviridae*. Лейкозом болеет крупный рогатый скот (КРС) всех возрастов, но в основном молочных пород. Вначале заболевание протекает бессимптомно, а затем переходит в персистентный лимфоцитоз (persistent lymphocytosis (PL)) и (или) образует опухолевидные разрастания в кроветворных и других органах и тканях. Клинически болезнь проявляется чаще у животных в возрасте старше 4 лет [2].

Источником возбудителя ВЛКРС является инфицированное животное, поэтому заражение может происходить при совместном содержании здоровых и инфицированных ВЛКРС животных. В этой связи на первый план ставятся вопросы раннего выявления животных — носителей ВЛКРС.

Некоторые исследования подтверждают факт присутствия антител к ВЛКРС в сыворотке крови человека [3]. Установлено, что работники рынков, непосредственно контактирующие с инфицированным мясом КРС, подвергаются трехкратно повышенному риску заболевания миелоидной лейкемией и высокому риску заболевания раком легких по сравнению с контрольной интактной группой [4]. Последние исследования, проведенные в Южной Корее, показали, что инфекция животных не является причиной заболеваемости человеческой лейкемией и раком легких у корейцев [5].

Основу диагностики ЛКРС составляет серологический метод исследования, т.е. степень реакции иммунодиффузии (РИД) в агарозном геле, но он имеет относительно низкий предел чувствительности. Кроме того, случаи отрицательных ответов в тест-системе РИД при тестировании инфицированных ВЛКРС могут быть связаны с индивидуальными особенностями взаимодействия в системе «вирус-хозяин» [6]. Иммуноферментный анализ (ИФА) является наиболее чувствительным среди серологических реакций и может также применяться для молока [7]. Раннее диагностирование зараженных телят затруднено тем, что антитела к ВЛКРС, передаваемые молозивом, невозможно отличить от антител, возникающих в результате их естественного инфицирования вирусом лейкоза.

Известно, что ВЛКРС присутствует в организме в виде ДНК-копий (провируса), встраиваясь в клеточный геном животного и при этом могут отсутствовать детектируемые антитела к ВЛКРС. Установлено, что транскрипция генома вируса ЛКРС в новых раковых клетках или лейкоцитах периферической крови у инфицированных животных плохо обнаруживается с помощью традиционных методов исследования [8]. Ее обнаружение становится возможным при применении современных молекулярно-биологических методов, в частности, метода ПЦР.

В настоящее время широко проводятся исследования по изучению генотипического разнообразия вируса лейкоза, циркулирующего на сельскохозяйственных предприятиях. Мониторинг эпизоотологической ситуации по лейкозу КРС часто проводят с помощью «nested» ПЦР по гену *env*. Хотя, в зависимости от подхода к генотипированию, количество генотипов вируса несколько варьирует. Так, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДФ) *env* гена позволил выявить 7 генотипов вируса [9]. Современными исследователями изучается не только географическое распределение генотипов ВЛКРС, но и их возможное влияние на результаты серологических исследований.

Как диагностический метод, ПЦР характеризуется высокой специфичностью, которая обусловлена выбором праймеров и чувствительностью. Метод ПЦР может использоваться для диагностики лейкоза крупного рогатого скота наряду с серологическими методами, а также в качестве подтверждающего теста.

Целью настоящей работы является разработка duplex-ПЦР для идентификации провируса лейкоза крупного рогатого скота.

Материалы и методы

Пробы цельной крови были получены у животноводческого предприятия Акмолинской области. Препараты ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови животных по методу, основанному на селективном лизисе эритроцитов крови с помощью слабосолевых растворов согласно нашим модификациям и с помощью набора для выделения ДНК фирмы «Promega». ДНК оценивали по выходу мг/мл биологической жидкости (концентрация) и по «чистоте», оцениваемых как отношение A260 / A280.

В предварительных экспериментах по изучению основных генотипов ВЛКРС, циркулирующих на территории Казахстана, проведен «nested» ПЦР по гену *env* с последующим секвенированием. Далее на основе уже полученных нуклеотидных последовательностей провируса ЛКРС, а также известных последовательностей гена *env* 7 охарактеризованных генотипов (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) был проведен дизайн олигонуклеотидных праймеров, пригодных для идентификации провируса ЛКРС и разработки ПЦР тест-системы.

Аmplификацию гена провируса ВЛКРС проводили на приборе DNA Engine Tetrad 2 Cycler (Bio-Rad) с использованием подобранных олигонуклеотидных праймеров (5534 и 4932) (Синтол, Россия). В качестве внутреннего контроля (ВКО) использованы праймеры (alphafs4 и alphars4), специфичные к гену альфаглобина (α -globin) КРС (Синтол, Россия). Состав подобранной нами ПЦР реакционной смеси: dNTPs (2 mmol/l each) 2,5 μ l, 10 \times PCR buffer 2,5 μ l, target DNA (0,05 μ g/ μ l) 5 μ l, Taq DNA

polymerase 1U, 10 pmol primers 0,5 μ l. Общий объем смеси доведен до 25 μ l водой, свободной от нуклеаз. Температурные условия: преденатурация при 95 °C в течение 3 мин, а также 40 циклов: денатурация при 94 °C 30 сек, отжиг при 64 °C 30 сек и элонгация при 72 °C 40 сек. Последняя элонгация проводилась при 72 °C в течение 7 мин. Для визуализации ПЦР-продуктов проведен электрофорез в 2 %-ном агарозном геле при 120V с последующим окрашиванием в растворе этидиум бромид и гелъдокументированием на приборе GelDoc (BioRad, США).

Результаты и их обсуждение

Результаты ПЦР представлены на электрофореграмме (рис. 1), где видно, что использование пары праймеров, специфичных к гену α -Globin, позволило генерировать ампликоны (длиной \approx 900 н.п.) из геномной ДНК, выделенной из крови серопозитивных (131, 140, 131d, 131 Pr, 140 Pr) и одного серосомнительного (152 Pr) образцов КРС, а также у серонегативного образца (14 образец). В негативных контролях (mK , VK , ^{Gl}K), содержащих только реагенты, а также пару праймеров 4932 + 5534 (*V*), или α hafs4 + α hars4 (*Gl*), или смесь обеих пар (*Mix*), ПЦР-продуктов не выявлено. Кроме того, на данном рисунке видно, что при ПЦР с отдельно взятыми BLV-специфичными праймерами и в смеси с α -глобиновыми праймерами у всех серопозитивных ДНК образцов выявлен ампликон, по длине соответствующий 598 н.п. Следует заметить, что при использовании обеих пар праймеров в ПЦР-смеси не всегда образуются четко выраженные продукты (см. на рис.1 дорожки *Mix* с 140 Pr и 152 Pr образцами). Поэтому мы продолжили работу по оптимизации условий duplex-ПЦР с использованием смеси праймеров 4932 + 5534 и α hafs4 + α hars4, которые были лучшими парами праймеров для детекции вируса ЛКРС. Использование образцов ДНК, выделенных двумя различными методами (14, 131, 140, 131d и 140d образцы выделены по модифицированному методу, а 131 Pr, 140 Pr и 152 Pr — коммерческим набором) не показало различий при проведении duplex-ПЦР.

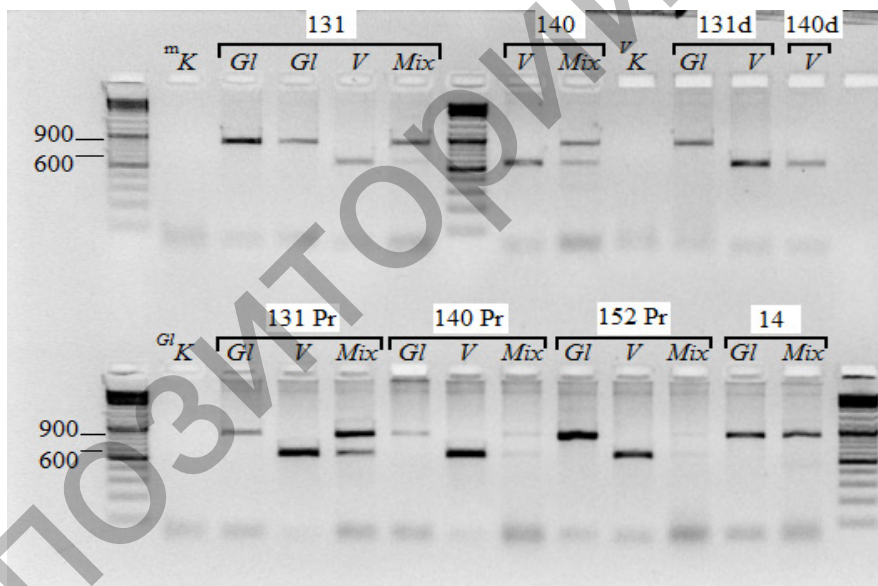


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными к вирусу BLV (*V*) и гену α -Globin (*Gl*): mK , VK , ^{Gl}K — негативный контроль (H_2O) со смесью двух пар праймеров в концентрации 100 nM α -Globin + 100 nM BLV и с отдельно взятыми парами праймеров той же концентрации, соответственно; 14 — ДНК крови серонегативного животного, в концентрации 0,05 μ g/ μ l; 131, 140 — препарат ДНК из крови отдельных серопозитивных КРС, выделенный по модифицированной нами методике, в концентрации 0,05 μ g/ μ l; 131d, 140d — тот же эксперимент, но с концентрацией ДНК 0,03 μ g/ μ l; 131 Pr, 140 Pr, 152 Pr — та же реакционная ПЦР-смесь, но ДНК выделена набором фирмы «Promega» и взята в концентрации 0,05 μ g/ μ l; 152 Pr — образец ДНК серонегативного животного, выделенный по прописи «Promega» и в концентрации 0,05 μ g/ μ l; *Gl* — ПЦР с праймерами, специфичными к гену α -Globin; *V* — ПЦР с праймерами, специфичными к гену вируса BLV; *Mix* — ПЦР с двумя парами праймеров, специфичных к генам α -Globin и вируса BLV

В целях подбора оптимальной концентрации каждой пары праймеров для duplex-ПЦР использованы следующие концентрации: 100 нМ α -Globin + 100 нМ BLV (Mix^1), 100 нМ α -Globin + 200 нМ BLV (Mix^2), 200 нМ α -Globin + 200 нМ BLV (Mix^3), а также Mix^4 содержал ту же концентрацию праймеров, что и Mix^2 , но в ПЦР-смесь добавлена ДНК в концентрации 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Результаты ПЦР амплификации (рис. 2) образцов ДНК (131 Pr, 140 Pr, 152 Pr, 60 и 12) показали, что увеличение концентрации BLV праймеров до 200 нМ в смеси Mix^2 позволило получить четко выраженные ПЦР-продукты обоих генов, в сравнении с Mix^1 , где имеется одинаковое (100 нМ) содержание смеси данных праймеров. Что касается ПЦР-продуктов, полученных в смеси Mix^3 , то выявлено, что эквивалентное увеличение концентраций обеих пар праймеров в реакционной смеси все же приводит к большему получению ПЦР-продуктов, соответствующих контрольному гену α -Globin, чем ампликонов, по длине соответствующих гену провируса BLV (см. рис. 2, Mix^3 с 131 Pr, 140 Pr, 152 Pr). В негативном контроле (К) и серонегативном образце (14) ДНК продуктов амплификации провируса BLV не было обнаружено. При ПЦР с использованием праймеров в концентрации 100 нМ α -Globin + 200 нМ BLV (Mix^2) и при увеличении концентрации ДНК в смеси (см. рис. 2, Mix^4 с 131 Pr, 140 Pr, 152 Pr) наблюдалась наработка визуально эквивалентного количества ампликонов, соответствующих генов. Это свидетельствует о существовании корреляции между исходными концентрациями ДНК и используемых праймеров и возможности улучшения ПЦР амплификации гена провирусной ЛКРС путем увеличения концентрации ДНК до 250–500 нг в ПЦР смеси.

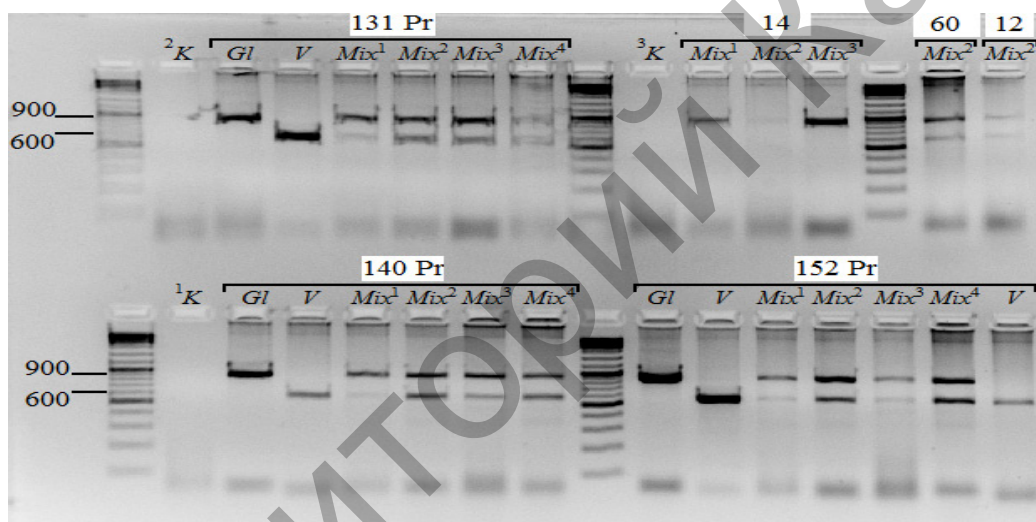


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами, специфичными к вирусу BLV (*V*) и гену α -Globin (*Gl*): ¹К, ²К, ³К — негативный контроль (H_2O) со смесью праймеров в концентрации 100 нМ α -Globin + 100 нМ BLV, 100 нМ α -Globin + 200 нМ BLV и 200 нМ α -Globin + 200 нМ BLV, соответственно; 131 Pr, 140 Pr — ДНК крови отдельных ИФА-положительных КРС, выделенная по прописи фирмы «Promega» и в концентрации 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 152 Pr — то же, но ИФА-сомнительный образец, находящийся в серой зоне; 12 — тот же эксперимент с серонеположительным животным, но ДНК выделена модифицированным методом; 60 — ДНК крови сероположительного животного, выделенная модифицированным методом; 14 — ДНК крови ИФА-негативного КРС; *Gl* — ПЦР с праймерами, специфичными к гену α -Globin; *V* — ПЦР с праймерами, специфичными к гену α -Globin; Mix^1 , Mix^2 , Mix^3 — ПЦР с участием двух пар праймеров в концентрации 100 нМ α -Globin + 100 нМ BLV, 100 нМ α -Globin + 200 нМ BLV и 200 нМ α -Globin + 200 нМ BLV, специфичных к генам КРС α -Globin и провируса BLV соответственно; Mix^4 — ПЦР с участием двух пар праймеров, в концентрации 100 нМ α -Globin + 200 нМ BLV и при концентрации ДНК 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

В целях оценки воспроизводимости результатов оптимизации условий duplex-ПЦР проведена амплификация с использованием смеси праймеров в концентрации 100 нМ α -Globin + 200 нМ BLV (Mix^2) и образцов ДНК, выделенных от 23 животных.

По результатам ИФА у 23 исследуемых животных были выявлены следующие 12 сероположительных образцов: 42, 46, 52, 97, 102, 108, 109, 131, 138, 140, 144 и 158, а также 6 серосомнительных — 2, 12, 116, 146, 151, 152 и пять ИФА-негативных образцов — 56, 60, 83, 120 и 121. Результаты же элек-

трофореза (рис. 3) демонстрируют, что у 11 из 12 исследуемых серопозитивных ДНК-образцов происходит амплификация ПЦР-продуктов длиной в 598 н.п., соответствующий провирусу ЛКРС. Все ИФА-серосомнительные образцы по результатам ИФА при ПЦР анализе показали наличие провируса лейкоза КРС, кроме 116-го образца (OD=0,409). После ПЦР анализа из 5 ИФА-негативных образцов выявлено наличие гена *env* провируса ЛКРС у 3 образцов (см. рис. 3 А и Б, 60, 83, 120 и 121). Причем количество амплифицированного гена провирусной ДНК у 121 образца было незначительным с соответствующим слабым свечением (см. рис. 3 Б, 121), что связано с низкокопийностью ДНК провируса, интегрированного в геном животного.

В предварительных экспериментах ИФА-позитивный (OD=0,593) образец 138 при ПЦР с отдельно взятой парой праймеров (4932f и 5534r), специфичных к гену провируса BLV, также показал негативный для лейкоза результат (данные не предоставлены), как и при duplex-ПЦР (см. рис.3 Б, 138). Это можно объяснить тем фактом, что при диагностировании зараженных телят можно обнаружить наличие антител ВЛКРС, которые передаются молозивом матери, и их невозможно отличить от антител, возникающих при инфицировании животного. Кроме того, известно, что поли- и моноклональные антитела против поверхностного вирусного лейкозного белка gp51 обладают вируснейтрализующей активностью, подавляют синцитийобразующую активность вируса, препятствуют его выходу из клеток и вызывают лизис инфицированных клеток в присутствии комплемента [10]. Недостатком ИФА-тест-систем является наличие перекрестной реакции с другими антигенными детерминантами [7].

Результаты duplex-ПЦР позволили выявить наличие ампликонов, соответствующих провирусу ЛКРС у ИФА-неопределенных (сомнительных) 2, 12, 146, 151 и 152 образцов, а также у ИФА-негативных 60, 83, 120 и 121, что объясняется установленным фактом, когда провирус BLV может интегрироваться в рассеянные сайты генома хозяина и не транскрибироваться *in vivo* [11], т.е. наблюдается отсутствие детектируемых BLV антител. В сыворотке крови антитела против ВЛКРС появляются обычно через 3–8 недель после заражения [2].

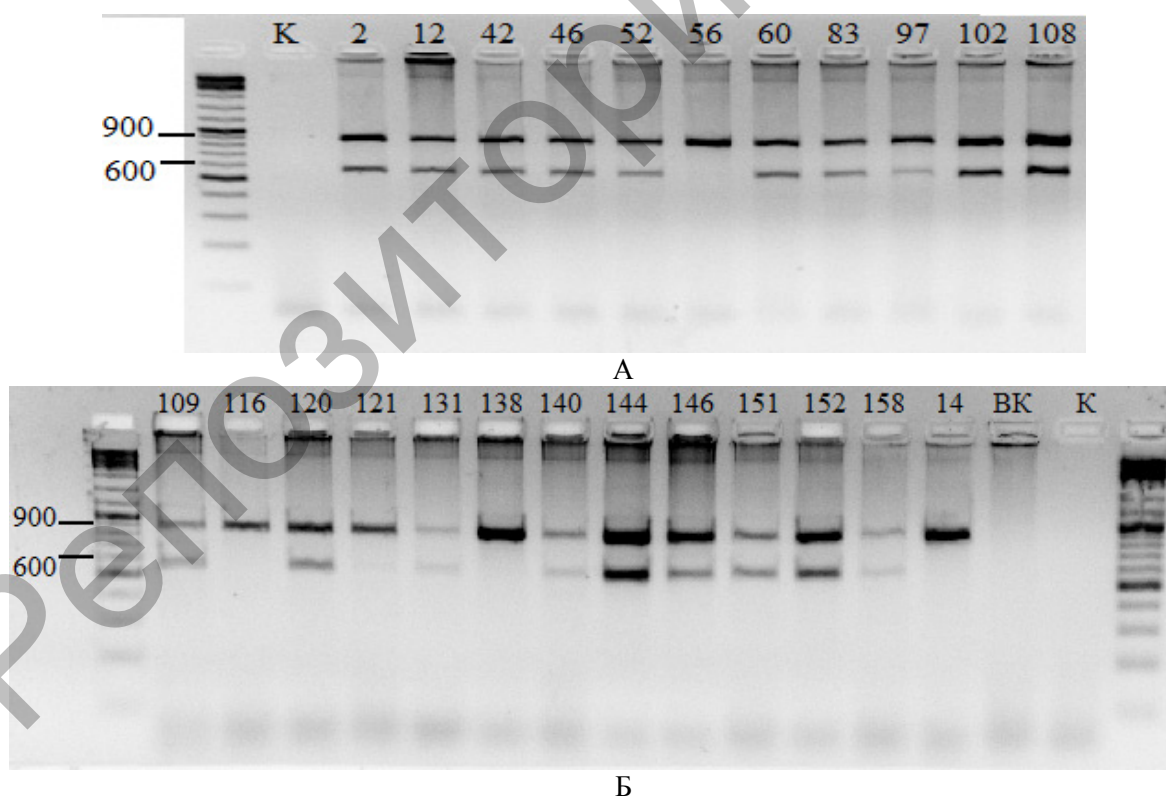


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР со смесью праймеров, специфичных к провирусу BLV и гену α -Globin: А — электрофореграмма с ДНК образцами 2, 12, 42, 46, 52, 56, 60, 83, 97, 102, 108 в концентрации 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Б — то же, но с 109, 116, 120, 121, 131, 138, 140, 144, 146, 151, 152, 158. К — негативный контроль (H_2O); ВК — контрольный образец человеческой ДНК, 14 — ДНК крови серонегативного индивидуума КРС, в концентрации 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Заключение

В настоящее время выделение антигенных компонентов вириона ЛКРС позволило разработать различные серологические и вирусологические методы диагностики лейкоза. При этом диагностика лейкоза КРС является обоснованной при исключении неспецифической реакции иммунного ответа на антигенную стимуляцию и гистохимической идентификации клеток крови [2].

Отрицательные результаты в серологических тест-системах для выявления ЛКРС могут быть связаны не только с индивидуальными особенностями взаимодействия животного организма и вируса, но и с наличием в геноме хозяина генов противовирусной защиты и наличием в геноме вируса вариантов генов, способных наиболее эффективно воздействовать на клеточные системы организма хозяина, т.е. для более эффективной стратегии выживания [6].

Метод ИФА разработан главным образом на основе использования частично очищенного провирусного гликопротеина gp51 и моноклональных антител к эпитопам gp51 [7]. Установлено, что специфические антитела в крови способны проявлять не только цитотоксическое, но и блокирующее действие, оказывая тем самым эффект утомления опухолевого роста. Это подтверждает, что лейкоз ассоциирован с иммунологическим дефектом организма.

Таким образом, ПЦР тест-системы для выявления патогенов животных могут служить эффективным диагностическим средством и применяться для дополнения и контроля результатов традиционных методов микробиологического и иммунохимического анализов. Для улучшения ПЦР диагностики генетически вариабельных штаммов ВЛКРС может потребоваться более, чем одна пара праймеров, которая позволит подтвердить результаты простого ПЦР и выявить позитивные образцы среди серонегативных и вероятных ложнопозитивных результатов ИФА и РИД [12].

Результаты наших исследований позволили подтвердить наличие гена *env* провируса лейкоза крупного рогатого скота (BLV) в серопозитивных образцах крови, а также довыявить животных-вирусоносителей среди серонегативных и негативных образцов при постановке duplex-ПЦР с целевыми праймерами и праймерами, специфичными к гену КРС α -Globin, использованного в качестве внутреннего контроля.

Для диагностики интегрированного в геном животных провируса BLV предоставляется реальная возможность использования разработанного нами метода duplex-ПЦР. Основываясь на том факте, что количество копий провируса BLV в периферических одноядерных клетках крови у различных серопозитивных животных может быть различным, то, соответственно, для улучшения ПЦР амплификации возможно увеличение финальной концентрации матричной ДНК (до 250–500 нг) при duplex-ПЦР с двухкратно большей концентрацией праймеров, нацеленных на гены провируса, в сравнении с праймерами, специфичными к гену внутреннего контроля.

Список литературы

1. Староселов М.А., Басова Н.Ю. Иммунобиологические показатели инфицированных вирусом лейкоза КРС и больных лейкозом коров в сравнении с интактными // Научный журнал КубГАУ. — 2008. — № 40(6). — С. 10–18.
2. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота / Утв. Минсельхозом РФ от 23.08.2000. N 13–7–2/2130.
3. Johnson E.S., Nicholson L.G., Durack D.T. Detection of antibodies to avian leucosis/sarcoma viruses (ALSV) and reticuloendotheliosis viruses (REV) in humans by ELISA // Cancer Det. Prev. — 1995. — Vol. 19. — P. 394–404.
4. Johnson E.S., Dalmás D., Noss J. et al. Cancer mortality among workers in abattoirs and meatpacking plants: an update // Am. J. Indust. Med. — 1995. — Vol. 27. — P. 389–403.
5. Lee J., Kim Y., Kang Ch. Suk et al. Investigation of the Bovine Leukemia Virus Proviral DNA in Human Leukemias and Lung cancers in Korea // J.Korean Med. Sci. — 2005. — Vol. 20. — P. 603–606.
6. Дробот Е.В. Результаты изучения генотипического разнообразия вируса лейкоза крупного рогатого скота и особенности эпизоотологического и гематологического проявления лейкоза: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Новосибирск, 2007. — 22 с.
7. De Giuseppe A., Feliziani F., Rutili D. et al. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // Clinic. and diag. lab. Immun. — 2004. — Vol. 11. — № 1. — P. 147–151.
8. Jimba M., Takeshima Sh., Matoba K. et al. BLV-CoCoMo-qPCR: Quantitation of bovine leukemia virus proviral load using the CoCoMo algorithm // Retrovirology. — 2010. — Vol. 7. — P. 91–110.
9. Moratorio G., Obal G., Dubra A. et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes // Arch. Virol. — 2010. — Vol. 155. — P. 481–489.