

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

МИНСК. БЕЛОРУССКАЯ НАУКА. 2017. ТОМ 61. № 5

Выходит шесть номеров в год

Журнал основан в июле 1957 года

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 387 от 18.05.2009.

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

Главный редактор

Владимир Григорьевич Гусаков

Председатель Президиума Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Редакционная коллегия

С. А. Чижик

первый заместитель Председателя Президиума Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
(заместитель главного редактора)

С. Я. Клинин

заместитель Председателя Президиума Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
(заместитель главного редактора)

А. В. Кильчевский

главный ученый секретарь Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
(заместитель главного редактора)

Т. П. Петрович

(ведущий редактор журнала)

И. М. Богдевич – Институт почвоведения и агрохимии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

П. А. Витязь – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

И. Д. Волоотовский – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Беларусь

И. В. Гайшун – Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

С. В. Гапоненко – Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований, Минск, Беларусь

А. Е. Дайнеко – Институт мясо-молочной промышленности Научно-практического центра
Национальной академии наук Беларуси по продовольствию, Минск, Беларусь

И. В. Залуцкий – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

О. А. Ивашкевич – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Н. А. Изобов – Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Н. С. Казак – Институт физики имени Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

А. А. Коваленя – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Ф. Ф. Комаров – Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

И. В. Котляров – Институт социологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

В. А. Лабунов – Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники, Минск, Беларусь

А. П. Ласковнев – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

- О. Н. Левко** – Институт истории Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
А. И. Лесникович – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
В. Ф. Логинов – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
А. А. Махнач – Научно-производственный центр по геологии, Минск, Беларусь
А. А. Михалевич – Институт энергетики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
М. Е. Никифоров – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. А. Орлович – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
О. Г. Пенязков – Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Ю. М. Плескачевский – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Беларусь
Н. С. Сердюченко – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
А. Ф. Смянович – Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии, Минск, Беларусь
Л. М. Томильчик – Институт физики имени Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
С. А. Усанов – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Л. В. Хотылева – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. А. Хрипач – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
И. П. Шейко – Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству, Жодино, Беларусь

Р е д а к ц и о н н ы й с о в е т

- Ж. И. Алферов** – Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
К. П. Валуцкас – Национальный институт рака, Вильнюс, Литва
С. Воденичаров – Болгарская академия наук, София, Болгария
И. М. Дунин – Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, Лесные Поляны, Россия
Н. Желев – Медицинский биотехнологический центр молекулярной и клеточной технологии Абергейского университета, Данди, Шотландия
Н. Н. Казанский – Институт лингвистических исследований Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия
А. Карклинш – Институт почвоведения и растениеводства Латвийского сельскохозяйственного университета в Елгаве, Елгава, Латвия
С. П. Карпов – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
М. Ларссон – Университетский центр Алба Нова Стокгольмского университета, Стокгольм, Швеция
А. Г. Наумовец – Национальная академия наук Украины, Киев, Украина
И. Д. Рашаль – Институт биологии Латвийского университета, Рига, Латвия
В. А. Садовничий – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
А. Г. Тарарико – Национальная академия аграрных наук Украины, Киев, Украина
Л. Трипольская – Литовский центр аграрных и лесных наук, Вильнюс, Литва
Тьяу Ван Минь – Вьетнамская академия наук и технологий, Ханой, Вьетнам
А. Цайлингер – Институт квантовой оптики и квантовой информатики Австрийской академии наук, Вена, Австрия
В. Ф. Чехун – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиологии имени Р. Е. Кавецкого Национальной академии наук Украины, Киев, Украина
Чжао Лян – Хэнаньская академия наук, Хэнань, Китай

Адрес редакции:

*ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, Минск, Республика Беларусь.
Тел.: +375 17 284-19-19; e-mail: doklady_nanb@mail.ru
doklady.belnauka.by*

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ. 2017. Т. 61, № 5

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор Т. П. П е т р о в и ч
Компьютерная верстка Н. И. К а ш у б а

Сдано в набор 04.10.2017. Выпуск в свет 27.10.2017. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 158 экз. Заказ 206.

Цена: индивидуальная подписка – 10,34 руб.; ведомственная подписка – 25,29 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, 220141, г. Минск.

© «Издательский дом «Беларуская навука».
Доклады НАН Беларуси, 2017

DOKLADY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MINSK. BELARUSKAYA NAVUKA. 2017. Vol. 61. No. 5

Published bimonthly

The journal has been published since July, 1957

Founder – 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. 387.

*The journal included in the List of Journal for Publication of the Results of Dissertation Research
in the Republic of Belarus and in the Database of Russian Science Citation Index (RSCI)*

E d i t o r - i n - C h i e f

Vladimir Grigorievich Gusakov

Chairman of the Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E d i t o r i a l B o a r d

Sergey A. Chizhik

First Vice Chairman of the Presidium of the National Academy, Minsk, Belarus
of Sciences of Belarus (*Associate Editor-in-Chief*)

Sergey Ya. Kilin

Vice Chairman of the Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
(*Associate Editor-in-Chief*)

Aleksandr V. Kilchevsky

Chief Scientific Secretary of the National Academy
of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus (*Associate Editor-in-Chief*)

Tatiana P. Petrovich

(*Lead editor*)

Iosiph M. Bogdevich – Institute for Soil Science and Agrochemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus

Alexey Ye. Daineko – Institute for Meat and Dairy Industry of the Scientific
and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Ivan V. Gaishun – Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Sergey V. Gaponenko – Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, Minsk, Belarus

Oleg A. Ivashkevich – Belarusian State University, Minsk, Belarus

Nikolai A. Izobov – Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Nikolai S. Kazak – B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

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

Vladimir A. Khripach – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Fadei F. Komarov – A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

Igor V. Kotlyarov – Institute of Sociology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Aleksandr A. Kovalenya – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Vladimir A. Labunov – Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, Minsk, Belarus

Aleksandr P. Laskovnev – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Anatoly I. Lesnikovich – Belarusian State University, Minsk, Belarus

Olga N. Levko – Institute of History of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Vladimir F. Loginov – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Anatoly A. Makhnach – Scientific and Practical Center on Geology, Minsk, Belarus
Aleksandr A. Mikhalevich – Institute of Power Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Mikhail Ye. Nikiforov – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Valentine A. Orlovich – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Oleg G. Penyazkov – A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Yury M. Pleskachevsky – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Belarus
Nikolai S. Serduchenko – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Ivan P. Sheiko – Scientific and Practical Center for Animal Breeding, Zhodino, Belarus
Arnold F. Smeyanovich – Republican Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery, Minsk, Belarus
Lev M. Tomilchik – B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Sergey A. Usanov – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Petr A. Vitiaz – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Igor D. Volotovskii – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Iosiph V. Zalutsky – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Editorial Council

Zhores Alferov – Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia
Chau Van Minh – Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam
Vasily F. Chekhun – Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiology of the National Academy of Sciences, Kiev, Ukraine
Ivan M. Dunin – All-Russian Scientific Research Institute of Breeding of the Ministry of Agriculture Economy of the Russian Federation, Lesnye Poliany, Russia
Aldis Karklinsh – Institute of Soil Science and Plant of the Latvia University of Agriculture in Elgava, Jelgava, Latvia
Sergey P. Karpov – Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Nikolai N. Kazansky – Institute for Linguistic Studies of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia
Mats Larsson – Alba Nova University Center of the University of Stockholm, Stockholm, Sweden
Anton G. Naumovets – National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Isaak D. Rashal – Institute of Biology of the University of Latvia, Riga, Latvia
Viktor A. Sadovnichiy – Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
Aleksandr G. Tarariko – National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Ludmila Tripolskaya – Lithuanian Centre of Agricultural and Forest Sciences, Vilnius, Lithuania
Konstantinas P. Valuckas – National Cancer Institute, Vilnius, Lithuania
Stefan Vodenicharov – Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria
Anton Zeilinger – Institute for Quantum Optics and Quantum Information of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria
Zhao Liang – Henan Academy of Sciences, Henan, China
Nikolai Zhelev – Medical Biotechnology Center of Molecular and Cellular Technology of the Abertay University, Dundee, Scotland

Address of the Editorial Office:

*1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Phone: +375 17 284-19-19; e-mail: doklady_nanb@mail.ru
doklady.belnauka.by*

DOKLADY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS. 2017. VOL. 61. No. 5

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor T. P. Petrovich
Computer Imposition N. I. Kashuba

Sent for press 04.10.2017. Output 27.10.2017. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 158 copies. Order 206.
Price: individual subscription – 10,34 BYN, departmental subscription – 25,29 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.
40, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka".
Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus, 2017

ISSN 1561-8323 (print)

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА

Можей Н. П. Связности на нередуцируемых однородных пространствах с неразрешимой группой преобразований.....	7
Белокурский М. С. Частично нерегулярные решения линейных почти периодических дифференциальных систем в критическом резонансном случае	16
Харин А. Ю. Методы анализа эффективности последовательных статистических тестов	22
Васьковский М. М., Кондратёнок Н. В., Прохоров Н. П. Аналог теста Соловея–Штрассена в квадратичных евклидовых кольцах	28
Бенедиктович В. И. Спектральный радиус неотрицательной матрицы.....	33

ИНФОРМАТИКА

Залесский Б. А. Детекторы экстремальных особых точек на изображениях	37
---	----

ФИЗИКА

Моховиков М. А., Комаров Ф. Ф., Власукова Л. А., Мильчанин О. В., Пархоменко И. Н., Вендлер Е., Ковальчук Н. С. Ионно-лучевое формирование нанокластеров ZnSe и ZnS в слоях диоксида кремния	42
Толкачев В. А. Положение частоты 0–0-перехода в диффузном электронно-колебательном спектре	50
Люлькович Е. С., Пуховская С. Г., Иванова Ю. Б., Семейкин А. С., Крук Н. Н. Атропоизомерия 5,10,15,20-тетракис-(3- <i>N</i> -метилпиридил)-порфирина	56

ХИМИЯ

Бритиков В. В., Панкратова Е. В., Усанов С. А. Разностная ЯМР спектроскопия с переносом насыщения в исследовании взаимодействия цитохрома P450cam с 4-фенилимидазолом: обнаружение нового промежуточного состояния комплекса.....	66
--	----

БИОЛОГИЯ

Ермишин А. П., Левый А. В., Воронкова Е. В., Полюхович Ю. В., Лукша В. И., Агеева А. С. Диплоидные гибриды между диким аллотетраплоидным видом картофеля <i>Solanum stoloniferum</i> Schldtl. & Bouchet и диплоидными клонами культурного картофеля <i>S. tuberosum</i> L., имеющие геном В дикого вида	80
Рупасова Ж. А., Павловский Н. Б., Василевская Т. И., Криницкая Н. Б., Павловская А. Г., Пинчукова Ю. М., Лиштван И. И. Влияние погодных условий на изменчивость характеристик биохимического состава плодов интродуцированных сортов <i>Oxycoccus macrocarpus</i> (Ait.) Pers. в условиях Беларуси	90
Долматович Т. В., Булойчик А. А., Гриб С. И. Идентификация генов устойчивости к бурой, стеблевой и желтой ржавчине в сортах яровой мягкой пшеницы (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	97

МЕДИЦИНА

Залуцкий И. В., Лукашевич В. С., Лукьянова Н. Ю., Кондрашова С. Б., Рудниченко Ю. А., Басалай А. А., Чехун В. Ф. Влияние экзогенного лактоферрина на развитие экспериментальной модели карциномы молочной железы.....	103
Красный С. А., Демешко П. Д., Поляков С. Л., Степанович Е. А., Минич А. А. Отдаленные результаты радикальной простатэктомии и адъювантной лучевой терапии у пациентов, страдающих местно-распространенным раком предстательной железы	109
Верещако Г. Г., Чешик И. А., Шалатонин В. И., Чушова Н. В., Горох Г. А., Бакшаева М. А., Козлов А. Е., Цуканова Е. В. Чувствительность клеток крови и эпидидимальных сперматозоидов крыс к воздействию магнитного поля промышленной частоты (50 Гц).....	115

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

Песецкий С. С., Строгонова С. С., Коваль В. Н., Шевченко В. В. Аморфизация полиэтилентерефталата в смесях с ПЭТ-Г, содержащих удлинитель цепи	121
--	-----

ISSN 1561-8323 (print)

CONTENTS*MATHEMATICS*

Mozhey N. P. Connections on non-reductive homogeneous spaces with an unsolvable group of transformations ...	7
Belokursky M. S. Partially irregular solutions of linear almost periodic differential systems in the critical resonance case	16
Kharin A. Yu. Methods for performance analysis of sequential statistical tests.....	22
Vaskouski M. M., Kondratyuk N. V., Prochorov N. P. Analogue of the Solovay–Strassen primality test in quadratic Euclidean domains	28
Benediktovich V. I. Spectral radius of a nonnegative matrix	33

INFORMATICS

Zalesky B. A. Detectors of extremal key points on images.....	37
--	----

PHYSICS

Makhavikou M. A., Komarov F. F., Vlasukova L. A., Milchanin O. V., Parkhomenko I. N., Wendler E., Kovalchuk N. S. Ion-beam synthesis of ZnSe and ZnS nanoclusters in SiO ₂ layers.....	42
Tolkachev V. A. Localization of the 0–0-transition in diffuse vibronic spectra	50
Liulkovich L. S., Pukhovskaya S. G., Ivanova Yu. B., Semeikin A. S., Kruk M. M. Atropoisomerization of 5,10,15,20-tetrakis-(3- <i>N</i> -methylpyridyl)-porphyrin	56

CHEMISTRY

Britikov V. V., Pankratova E. V., Usanov S. A. Saturation transfer difference NMR spectroscopy in studies of the interaction of cytochrome P450cam with 4-phenylimidazole: detection of a novel intermediate state of the complex.....	66
---	----

BIOLOGY

Yermishin A. P., Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukhovich Yu. V., Luksha V. I., Ageeva A. S. Diploid hybrids between the wild allotetraploid potato species <i>Solanum stoloniferum</i> Schldtl & Bouchet and diploid clones of cultivated potato <i>S. tuberosum</i> L. having genome B of wild species	80
Rupasova Zh. A., Pavlovski N. B., Vasilevskaya T. I., Krinitskaya N. B., Pavlovskaya A. G., Pinchukova Yu. M., Lishtvan I. I. Influence of weather conditions on the variability of characteristics of the biochemical composition of fruits of introduced varieties <i>Oxycoccus macrocarpus</i> (Ait.) Pers. in the conditions of Belarus.....	90
Dolmatovich T. V., Bulovichik A. A., Grib S. I. Identification of genes of resistance to brown, stem and yellow rust in spring soft wheat varieties (<i>Triticum aestivum</i> L.).....	97

MEDICINE

Zalutsky J. V., Lukashevich V. S., Lukianova N. Y., Kondrashova S. B., Rudnichenko Yu. A., Basalay A. A., Chekhun V. F. Influence of exogenous lactoferrin on the development of an experimental model of mammary gland carcinoma.....	103
Krasny S. A., Demeshko P. D., Polyakov S. L., Stepanovich E. A., Minich A. A. Long-term results of radical prostatectomy and adjuvant radiotherapy in patients with locally advanced prostate cancer.....	109
Vereschako G. G., Cheshik I. A., Shalatonin V. I., Chueshova N. V., Gorokh G. A., Bakshayeva M. A., Kazlou A. Ya., Tsukanova E. V. Sensitivity of rats blood cells and epididymal spermatozoa to low frequency magnetic fields (50 Hz).....	115

TECHNICAL SCIENCES

Pesetskii S. S., Strogonova S. S., Koval V. N., Shevchenko V. V. Amorphization of polyethylene terephthalate in blends with PET-G containing a chain extender	121
--	-----

ISSN 1561-8323 (print)

МАТЕМАТИКА
MATHEMATICS

УДК 514.765.1

Поступило в редакцию 10.05.2017

Received 10.05.2017

Н. П. Можей*Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
Минск, Республика Беларусь***СВЯЗНОСТИ НА НЕРЕДУКТИВНЫХ ОДНОРОДНЫХ ПРОСТРАНСТВАХ
С НЕРАЗРЕШИМОЙ ГРУППОЙ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ***(Представлено академиком В. И. Корзюком)*

Аннотация. В каком случае однородное пространство допускает инвариантную аффинную связность? Если существует хотя бы одна инвариантная связность, то пространство является изотропно-точным, но обратное неверно. Если однородное пространство является редуکتивным, то пространство всегда допускает инвариантную связность. Целью данной работы является описание инвариантных аффинных связностей на трехмерных нередуکتивных однородных пространствах, их тензоров кривизны и кручения, алгебр голономии. В работе рассматривается случай неразрешимой группы Ли преобразований с разрешимым стабилизатором. Определены основные понятия: изотропно-точная пара, редуکتивное пространство, аффинная связность, тензор кручения, тензор кривизны, алгебра голономии. Приведено в явном виде локальное описание всех трехмерных нередуکتивных однородных пространств с неразрешимой группой преобразований и разрешимым стабилизатором, допускающих инвариантные аффинные связности. Локальная классификация таких пространств эквивалентна описанию соответствующих эффективных пар алгебр Ли. Описаны в явном виде все инвариантные аффинные связности на найденных однородных пространствах, а также тензоры кривизны, кручения, алгебры голономии указанных связностей. **Исследования основаны** на использовании свойств алгебр Ли, групп Ли и однородных пространств и носят, главным образом, локальный характер. Особенностью методики, представленной в работе, является использование чисто алгебраического подхода к описанию однородных пространств и связностей на них, а также сочетание различных методов дифференциальной геометрии, теории групп и алгебр Ли и теории однородных пространств.

Ключевые слова: аффинная связность, однородное пространство, группа преобразований, алгебра Ли, редуکتивное пространство

Для цитирования: Можей, Н. П. Связности на нередуکتивных однородных пространствах с неразрешимой группой преобразований / Н. П. Можей // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 7–15.

Natalya P. Mozhey*Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, Minsk, Republic of Belarus***CONNECTIONS ON NON-REDUCTIVE HOMOGENEOUS SPACES
WITH AN UNSOLVABLE GROUP OF TRANSFORMATIONS***(Communicated by Academician Viktor I. Korzyuk)*

Abstract. When does a homogeneous space allow an invariant affine connection? If at least one invariant connection exists, then the space is isotropy-faithful, but the isotropy-faithfulness is insufficient for the space in order to have invariant connections. If a homogeneous space is reductive, then the space allows an invariant connection. The purpose of the work is to describe invariant affine connections on three-dimensional non-reductive homogeneous spaces together with their curvature and torsion tensors, holonomy algebras. We concerned the case, when the Lie group of transformations is unsolvable and a stabilizer is solvable. The basic notions, such as an isotropy-faithful pair, a reductive space, an affine connection, curvature and torsion tensors, holonomy algebra are defined. A local description of three-dimensional non-reductive homogeneous spaces with an unsolvable Lie group of transformations and a solvable stabilizer, allowing affine connections, is given. A local classification

of homogeneous spaces is equivalent to that of the effective pairs of the Lie algebras. All invariant affine connections on those spaces are described, curvature and torsion tensors, holonomy algebras are found. Studies are based on the use of properties of the Lie algebras, Lie groups and homogeneous spaces. They are mainly local in character.

Keywords: affine connection, homogeneous space, transformation group, Lie algebra, reductive space

For citation: Mozhey N. P. Connections on non-reductive homogeneous spaces with an unsolvable group of transformations. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 7–15 (in Russian).

Введение. Большой вклад в развитие теории связностей внесли работы Э. Картана, А. П. Нордена, П. К. Рашевского, М. Куриты, А. П. Широкова, Э. Б. Винберга, Ш. Кобаяси, К. Номидзу [1] и др. В каком случае однородное пространство допускает инвариантную аффинную связность? Если существует хотя бы одна инвариантная связность, то пространство является изотропно-точным, но обратное неверно. Если однородное пространство является редуктивным, то пространство всегда допускает инвариантную связность. Связности на трехмерных редуктивных пространствах с неразрешимой группой преобразований и разрешимым стабилизатором изучались в [2], целью же данной работы является классификация инвариантных аффинных связностей на трехмерных нередуктивных однородных пространствах. Настоящее сообщение связано и с работой автора о трехмерных нередуктивных однородных пространствах неразрешимых групп Ли, в которой приведен более подробный тематический обзор, а также обоснование применяемых методов; при изложении сохранены обозначения, введенные ранее. В данной работе также изучаются нередуктивные пространства, но внимание сосредоточено на пространствах с неразрешимой группой преобразований и разрешимым стабилизатором.

Основные определения. Пусть M – дифференцируемое многообразие, на котором транзитивно действует группа \bar{G} , $G = \bar{G}_x$ – стабилизатор произвольной точки $x \in M$. Проблема классификации однородных пространств (M, \bar{G}) равносильна классификации (с точностью до эквивалентности) пар групп Ли (\bar{G}, G) (см., напр., [3]). Необходимое условие существования аффинной связности – представление изотропии для G должно быть точным, если \bar{G} эффективна на \bar{G}/G [1]. Пусть $\bar{\mathfrak{g}}$ – алгебра Ли группы Ли \bar{G} , а \mathfrak{g} – подалгебра, соответствующая подгруппе G . Пара $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ называется *изотропно-точной*, если точно изотропное представление подалгебры \mathfrak{g} . Однородное пространство *редуктивно*, если существует разложение $\bar{\mathfrak{g}} = \mathfrak{g} + \mathfrak{m}$, $\mathfrak{g} \cap \mathfrak{m} = 0$, $[\mathfrak{g}, \mathfrak{m}] \subset \mathfrak{m}$, в противном случае пространство не является редуктивным. Там, где это не будет вызывать разночтения, будем отождествлять подпространство, дополнительное к \mathfrak{g} в $\bar{\mathfrak{g}}$, и факторпространство $\mathfrak{m} = \bar{\mathfrak{g}}/\mathfrak{g}$. *Аффинной связностью* на паре $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ называется такое отображение $\Lambda: \bar{\mathfrak{g}} \rightarrow \mathfrak{gl}(\mathfrak{m})$, что его ограничение на \mathfrak{g} есть изотропное представление подалгебры, а все отображение является \mathfrak{g} -инвариантным (см., напр., [4]).

Классификация связностей на нередуктивных пространствах. Будем описывать пару $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ при помощи таблицы умножения алгебры Ли $\bar{\mathfrak{g}}$ с базисом $\{e_1, \dots, e_n\}$ ($n = \dim \bar{\mathfrak{g}}$), причем подалгебра Ли \mathfrak{g} порождается e_1, \dots, e_{n-3} , а $\{u_1 = e_{n-2}, u_2 = e_{n-1}, u_3 = e_n\}$ – базис \mathfrak{m} . Для нумерации подалгебр используем запись $d.n$, а для нумерации пар – запись $d.n.m$, соответствующие приведенным в [5], здесь d – размерность подалгебры, n – номер подалгебры в $\mathfrak{gl}(3, \mathbb{R})$, а m – номер пары $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$.

Т е о р е м а. *Трехмерные нередуктивные однородные пространства, допускающие инвариантную аффинную связность, такие, что $\bar{\mathfrak{g}}$ неразрешима, а \mathfrak{g} разрешима, локально имеют следующий вид:*

1.5.19	e_1	u_1	u_2	u_3	2.7.2	e_1	e_2	u_1	u_2	u_3
e_1	0	e_1	0	u_1	e_1	0	e_1	0	0	$u_1 + e_2$
u_1	$-e_1$	0	0	u_3	e_2	$-e_1$	0	0	0	u_3
u_2	0	0	0	0	u_1	0	0	0	0	0
u_3	$-u_1$	$-u_3$	0	0	u_2	0	0	0	0	0
					u_3	$-u_1 - e_2$	$-u_3$	0	0	0

2.8.7	e_1	e_2	u_1	u_2	u_3	2.17.27	e_1	e_2	u_1	u_2	u_3
e_1	0	λe_1	e_1	0	u_1	e_1	0	0	$2e_1$	e_2	u_1
e_2	$-\lambda e_1$	0	0	u_2	λu_3	e_2	0	0	e_2	0	u_2
u_1	$-e_1$	0	0	0	u_3	u_1	$-2e_1$	$-e_2$	0	u_2	$2u_3$
u_2	0	$-u_2$	0	0	0	u_2	$-e_2$	0	$-u_2$	0	0
u_3	$-u_1$	$-\lambda u_3$	$-u_3$	0	0	u_3	$-u_1$	$-u_2$	$-2u_3$	0	0

2.18.3	e_1	e_2	u_1	u_2	u_3	3.6.2	e_1	e_2	e_3	u_1	u_2	u_3
e_1	0	e_1	0	0	$e_2 + u_1$	e_1	0	0	e_1	e_1	0	u_1
e_2	$-e_1$	0	0	u_1	u_3	e_2	0	0	0	0	u_2	0
u_1	0	0	0	$-u_1$	0	e_3	$-e_1$	0	0	0	0	u_3
u_2	0	$-u_1$	u_1	0	0	u_1	$-e_1$	0	0	0	0	u_3
u_3	$-e_2 - u_1$	$-u_3$	0	0	0	u_2	0	$-u_2$	0	0	0	0
						u_3	$-u_1$	0	$-u_3$	$-u_3$	0	0

3.12.2	e_1	e_2	e_3	u_1	u_2	u_3	3.13.6	e_1	e_2	e_3	u_1	u_2	u_3
e_1	0	$-e_2$	$-e_3$	0	0	u_3	e_1	0	$-\mu e_2$	$(1 - \mu)e_3$	u_1	0	μu_3
e_2	e_2	0	0	e_3	$2e_2$	u_2	e_2	μe_2	0	0	e_3	$2e_2$	u_2
e_3	e_3	0	0	0	e_3	u_1	e_3	$(\mu - 1)e_3$	0	0	0	e_3	u_1
u_1	0	$-e_3$	0	0	$-u_1$	0	u_1	$-u_1$	$-e_3$	0	0	$-u_1$	0
u_2	0	$-2e_2$	$-e_3$	u_1	0	$2u_3$	u_2	0	$-2e_2$	$-e_3$	u_1	0	$2u_3$
u_3	$-u_3$	$-u_2$	$-u_1$	0	$-2u_3$	0	u_3	$-\mu u_3$	$-u_2$	$-u_1$	0	$-2u_3$	0

3.25.30	e_1	e_2	e_3	u_1	u_2	u_3	3.28.2	e_1	e_2	e_3	u_1	u_2	u_3
e_1	0	0	e_2	0	u_1	0	e_1	0	$e_3 - e_2$	$-e_3$	0	u_1	u_3
e_2	0	0	0	0	e_2	u_1	e_2	$e_2 - e_3$	0	0	e_3	$2e_3$	$2e_1 + u_2$
e_3	e_2	0	0	e_2	$2e_3$	u_2	e_3	e_3	0	0	0	$-e_3$	u_1
u_1	0	0	$-e_2$	0	$-u_1$	0	u_1	0	$-e_3$	0	0	$-u_1$	0
u_2	$-u_1$	$-e_2$	$-2e_3$	u_1	0	$2u_3$	u_2	$-u_1$	$-2e_3$	e_3	u_1	0	0
u_3	0	$-u_1$	$-u_2$	0	$-2u_3$	0	u_3	$-u_3$	$-2e_1 - u_2$	$-u_1$	0	0	0

4.19.2	e_1	e_2	e_3	e_4	u_1	u_2	u_3
e_1	0	0	$-e_3$	$-e_4$	0	0	u_3
e_2	0	0	e_4	0	0	u_1	0
e_3	e_3	$-e_4$	0	0	$-e_4$	$-2e_3$	u_2
e_4	e_4	0	0	0	0	$-e_4$	u_1
u_1	0	0	e_4	0	0	u_1	0
u_2	0	$-u_1$	$2e_3$	e_4	$-u_1$	0	$-2u_3$
u_3	$-u_3$	0	$-u_2$	$-u_1$	0	$2u_3$	0

4.21.11	e_1	e_2	e_3	e_4	u_1	u_2	u_3
e_1	0	e_2	$-\mu e_3$	$(1-\mu)e_4$	u_1	0	μu_3
e_2	$-e_2$	0	e_4	0	0	$e_2 + u_1$	0
e_3	μe_3	$-e_4$	0	0	0	$-2e_3$	u_2
e_4	$(\mu-1)e_4$	0	0	0	0	$-e_4$	$e_2 + u_1$
u_1	$-u_1$	0	0	0	0	0	0
u_2	0	$-e_2 - u_1$	$2e_3$	e_4	0	0	$-2u_3$
u_3	$-\mu u_3$	0	$-u_2$	$-e_2 - u_1$	0	$2u_3$	0

5.9.2	e_1	e_2	e_3	e_4	e_5	u_1	u_2	u_3
e_1	0	0	e_3	0	e_5	u_1	0	0
e_2	0	0	0	$-e_4$	$-e_5$	0	0	u_3
e_3	$-e_3$	0	0	e_5	0	0	u_1	0
e_4	0	e_4	$-e_5$	0	0	e_5	$2e_4$	u_2
e_5	$-e_5$	e_5	0	0	0	0	e_5	u_1
u_1	$-u_1$	0	0	$-e_5$	0	0	$-u_1$	0
u_2	0	0	$-u_1$	$-2e_4$	$-e_5$	u_1	0	$2u_3$
u_3	0	$-u_3$	0	$-u_2$	$-u_1$	0	$-2u_3$	0

З а м е ч а н и е. Предполагается, что параметры обозначены греческими буквами и принадлежат \mathbb{R} . В дальнейшем, если на параметры, появляющиеся в процессе классификации, накладываются дополнительные условия, то они записываются после таблицы умножения, в противном случае предполагается, что параметры пробегают все \mathbb{R} .

Найденные алгебры $\bar{\mathfrak{g}}$ являются подалгебрами алгебры 5.9.2 в базисах:

$$4.21.11 - \{e_1 + \mu e_2, -e_3, e_4, -e_5, u_1 + e_3, -u_2, -u_3\}, 4.19.2 - \{e_2, -e_3, -e_4, e_5, u_1, -u_2, u_3\},$$

$$3.28.2 - \{e_2 + e_3, e_4, e_5, u_1, u_2 - 2e_2 - 2e_3, u_3\}, 3.25.30 - \{e_3, e_5, e_4, u_1, u_2, u_3\},$$

$$3.13.6 - \{e_1 + \mu e_2, -e_4, -e_5, u_1, u_2, -u_3\}, 3.12.2 - \{e_2, e_4, e_5, u_1, u_2, u_3\},$$

$$3.6.2 - \{e_4, e_1, e_2, u_2/2, u_1 + e_3, u_3/2\}, 2.17.27 - \{e_4, e_5, u_2, u_1, u_3\},$$

$$2.18.3 - \{e_4, u_2/2 - e_3 - u_1, u_1 + e_3, e_1, u_3/2\}, 2.8.7 - \{-e_4, e_1 + \lambda e_2, u_2/2, u_1 + e_3, -u_3/2\},$$

$$2.7.2 - \{e_4, e_2, u_2/2 - e_2, u_1 + e_3, u_3/2\}, 1.5.19 - \{e_4, u_2/2, u_1 + e_3, u_3/2\}.$$

Далее используется собственный базис пары $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$.

Для получения указанного результата сначала найдены трехмерные изотропно-точные пары (с подробным описанием можно ознакомиться в [5]). Далее выбраны нередуцируемые пары с неразрешимой алгеброй $\bar{\mathfrak{g}}$ и разрешимой подалгеброй \mathfrak{g} и найдены аффинные связности, соответственно, определены пары, допускающие инвариантную связность.

Далее пара $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ называется тривиальной, если существует коммутативный идеал \mathfrak{a} в $\bar{\mathfrak{g}}$, такой, что $\mathfrak{g} \oplus \mathfrak{a} = \bar{\mathfrak{g}}$, такая пара является редуцируемой.

Действительно, рассмотрим, например, случай, когда \mathfrak{g} имеет вид 3.6. Пусть \mathfrak{h} – нильпотентная подалгебра, порожденная e_2 и e_3 , тогда $\bar{\mathfrak{g}}^{(0,0)}(\mathfrak{h}) \supset \mathbb{R}e_2 \oplus \mathbb{R}e_3 \oplus \mathbb{R}u_1$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(0,-1)}(\mathfrak{h}) \supset \mathbb{R}e_1$,

$\bar{\mathfrak{g}}^{(1,0)}(\mathfrak{h}) \supset \mathbb{R}u_2$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(0,1)} \supset \mathbb{R}u_3$ и, с учетом тождества Якоби, получим $[e_1, u_1] = pe_1$, $[u_1, u_2] = 0$, $[u_1, u_3] = pu_3$, $[u_2, u_3] = 0$. При $p = 0$ пара $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ эквивалентна тривиальной паре, являющейся редуктивной, при $p \neq 0$ пара $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ эквивалентна паре 3.6.2 при помощи отображения $\pi: \bar{\mathfrak{g}}_2 \rightarrow \bar{\mathfrak{g}}$, $\pi(e_i) = e_i$, $i = 1, 3$, $\pi(u_1) = pu_1$, $\pi(u_2) = u_2$, $\pi(u_3) = pu_3$. Поскольку $\dim D^2 \bar{\mathfrak{g}}_1 = 1$, а $\dim D^2 \bar{\mathfrak{g}}_2 = 3$, эти пары не эквивалентны.

В случае 3.12 \mathfrak{h} порождена вектором e_1 . Поскольку $\bar{\mathfrak{g}}^{(0)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_1 \oplus \mathbb{R}u_1 \oplus \mathbb{R}u_2$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(1)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}u_3$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(-1)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_2 \oplus \mathbb{R}e_3$, в силу тождества Якоби имеем $[u_1, u_2] = -p_2u_1 + p_1u_2$, $[u_1, u_3] = 2p_1u_3$, $[u_2, u_3] = 2p_2u_3$, $[e_2, u_1] = p_1e_2 + p_2e_3$, $[e_2, u_2] = 2p_2e_2$, $[e_3, u_1] = 2p_1e_3$, $[e_3, u_2] = p_1e_2 + p_2e_3$. Если $p_1 = p_2 = 0$, то $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ эквивалентна тривиальной паре, а иначе она эквивалентна 3.12.2 при помощи $\pi: \bar{\mathfrak{g}}_2 \rightarrow \mathfrak{g}$, где при $p_1 \neq 0, p_2 = 0$: $\pi(e_1) = e_1$, $\pi(e_2) = e_3$, $\pi(e_3) = e_2$, $\pi(u_1) = p_1u_2$, $\pi(u_2) = p_1u_1$, $\pi(u_3) = p_1u_3$; при $p_1 = 0, p_2 \neq 0$: $\pi(e_i) = e_i$, $\pi(u_j) = p_2u_j$, $i, j = 1, 3$; при $p_1 \neq 0, p_2 \neq 0$: $\pi(e_1) = e_1, \pi(e_2) = e_2, \pi(e_3) = p_1e_2 + e_3$, $\pi(u_1) = p_2u_1 + p_1p_2u_2, \pi(u_2) = p_2u_2$, $\pi(u_3) = p_2u_3$. Поскольку $Z(\bar{\mathfrak{g}}_1) = \mathbb{R}u_1 + \mathbb{R}u_2$, а $Z(\bar{\mathfrak{g}}_2) = 0$, пары не эквивалентны.

В случае 3.28 в силу тождества Якоби $[e_2, u_1] = pe_3$, $[e_2, u_2] = 2pe_3$, $[e_2, u_3] = 2pe_1 + u_2$, $[e_3, u_2] = -pe_3$, $[u_1, u_2] = -pu_1$, $[u_1, u_3] = [u_2, u_3] = 0$. При $p = 0$ пара тривиальна, при $p \neq 0$ – эквивалентна 3.28.2 посредством $\pi: \bar{\mathfrak{g}} \rightarrow \bar{\mathfrak{g}}_2$, $\pi(e_i) = e_i$, $\pi(u_i) = (1/p)u_i$, $i = 1, 3$. Так как $\dim D^2 \bar{\mathfrak{g}}_1 \neq \dim D^2 \bar{\mathfrak{g}}_2$, пары не эквивалентны.

В случае 4.19 \mathfrak{h} порождена вектором e_1 , $\bar{\mathfrak{g}}^{(0)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_1 \oplus \mathbb{R}e_2 \oplus \mathbb{R}u_1 \oplus \mathbb{R}u_2$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(-1)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_3 \oplus \mathbb{R}e_4$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(1)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}u_3$, а $[u_1, u_2] \in \bar{\mathfrak{g}}^{(0)}(\mathfrak{h}), [u_1, u_3] \in \bar{\mathfrak{g}}^{(1)}(\mathfrak{h}), [u_2, u_3] \in \bar{\mathfrak{g}}^{(1)}(\mathfrak{h}), [u_1, u_2] = a_1e_1 + a_2e_2 + \alpha_1u_1 + \alpha_2u_2$, $[u_1, u_3] = \beta_3u_3$, $[u_2, u_3] = \gamma_3u_3$, $[e_2, u_2] = u_1 + pe_2$, $[e_3, u_3] = u_2 - 2pe_1$, $[e_4, u_2] = pe_4, [e_4, u_3] = u_1 + pe_2$. Используя тождество Якоби, получим $a_1 = a_2 = \alpha_1 = \alpha_2 = \beta_3 = \gamma_3 = 0$. При $p = 0$ пара $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ тривиальна, при $p \neq 0$ – эквивалентна паре 4.19.2 посредством $\pi: \bar{\mathfrak{g}}_2 \rightarrow \bar{\mathfrak{g}}$, $\pi(e_i) = e_i, i = 1, 4, \pi(u_1) = (1/p)u_1 + e_2, \pi(u_2) = (1/p)u_2 - 2e_1, \pi(u_3) = (1/p)u_3$. Поскольку $\bar{\mathfrak{g}}_1$ – разрешимая алгебра Ли, а $\bar{\mathfrak{g}}_2$ неразрешима, пары не эквивалентны.

В случае 5.9 \mathfrak{h} порождена векторами e_1 и e_2 , тогда $\bar{\mathfrak{g}}^{(0,0)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_1 \oplus \mathbb{R}e_2$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(1-\lambda,0)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_3$, $\bar{\mathfrak{g}}^{(1,0)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}u_1, \bar{\mathfrak{g}}^{(\lambda,-1)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_4, \bar{\mathfrak{g}}^{(\lambda,0)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}u_2, \bar{\mathfrak{g}}^{(1,-1)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}e_5, \bar{\mathfrak{g}}^{(0,1)}(\mathfrak{h}) = \mathbb{R}u_3$, а $[u_1, u_2] \in \bar{\mathfrak{g}}^{(1+\lambda,0)}(\mathfrak{h}), [u_1, u_3] \in \bar{\mathfrak{g}}^{(1,1)}(\mathfrak{h}), [u_2, u_3] \in \bar{\mathfrak{g}}^{(\lambda,1)}(\mathfrak{h})$. Если $\lambda = 0$, то $[e_4, u_1] = pe_5$, $[e_4, u_2] = 2pe_4, [e_5, u_2] = pe_5$, $[u_1, u_3] = 0, [u_1, u_2] = a_3e_3 + \alpha_1u_1, [u_2, u_3] = \gamma_3u_3$. В силу тождества Якоби $a_3 = 0, \alpha_1 = -p, \gamma_3 = 2p$. При $p = 0$ пара $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ тривиальна, при $p \neq 0$ эквивалентность пар $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ и 5.9.2 доказывается при помощи $\pi: \bar{\mathfrak{g}}_2 \rightarrow \bar{\mathfrak{g}}$, $\pi(e_i) = e_i, i = 1, 5, \pi(u_j) = pu_j, j = 1, 3$. Если же $\lambda \neq 0$, то пара $(\bar{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ тривиальна. Поскольку $\dim D^2 \bar{\mathfrak{g}}_1 = 3, \dim D^2 \bar{\mathfrak{g}}_2 = 6$, пары не эквивалентны.

Остальные случаи рассматриваются аналогично.

Будем описывать аффинную связность через образы базисных векторов $\Lambda(u_1), \Lambda(u_2), \Lambda(u_3)$. Аффинные связности имеют следующий вид:

Пара	Аффинная связность
5.9.2 3.12.2 3.13.6, $\mu \neq 0, 1, -1, 1/2$	$\begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix}$
4.19.2	$\begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$
4.21.11, $\mu \neq 0, 1, 1/2$	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$

4.21.11, $\mu = 1$	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & q_{1,3} \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & -q_{1,3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$
4.21.11, $\mu = 0$	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & p_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & p_{1,3} \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} r_{1,1} & 0 & 0 \\ 0 & r_{1,1} & 0 \\ 0 & 1 & r_{1,1} + p_{1,3} \end{pmatrix}$
4.21.11, $\mu = 1/2$	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & r_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$
3.6.2 2.8.7, $\lambda \neq 0, 1, -1, 1/2$	$\begin{pmatrix} -1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/2 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1/2 & 0 & 0 \end{pmatrix}$
3.13.6, $\mu = 1$	$\begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & q_{1,3} \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & -q_{1,3} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix}$
3.13.6, $\mu = 0$	$\begin{pmatrix} 0 & -1 & p_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & q_{2,3} \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} r_{1,1} & 0 & 0 \\ 0 & r_{1,1} + p_{1,3} - q_{2,3} & r_{2,3} \\ 0 & -1 & r_{1,1} + p_{1,3} \end{pmatrix}$
3.13.6, $\mu = -1$	$\begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & p_{2,3} \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ -p_{2,3} & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix}$
3.13.6, $\mu = 1/2$	$\begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & r_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix}$
3.25.30	$\begin{pmatrix} 0 & -1 & p_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & q_{1,3} \\ 0 & -1 & p_{1,3} \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} r_{1,1} & -q_{1,3} & r_{1,3} \\ 0 & r_{1,1} & 0 \\ 0 & -1 & r_{1,1} + p_{1,3} \end{pmatrix}$
3.28.2	$\begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & -2 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix}$
2.7.2	$\begin{pmatrix} -1/2 & p_{1,2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1/2 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} q_{1,1} & q_{1,2} & 0 \\ 0 & q_{2,2} & 0 \\ 0 & 0 & q_{1,1} \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1/2 & p_{1,2} & 0 \end{pmatrix}$
2.8.7, $\lambda = 1$	$\begin{pmatrix} -1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & p_{2,3} \\ 0 & 0 & 1/2 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ -p_{2,3} & 0 & 0 \\ -1/2 & 0 & 0 \end{pmatrix}$

2.8.7, $\lambda = 0$	$\begin{pmatrix} -1/2 & 0 & p_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/2 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & q_{2,3} \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} r_{1,1} & 0 & r_{1,3} \\ 0 & r_{2,2} & 0 \\ -1/2 & 0 & r_{1,1} + p_{1,3} \end{pmatrix}$
2.8.7, $\lambda = -1$	$\begin{pmatrix} -1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/2 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & q_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & r_{1,2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ -1/2 & 0 & 0 \end{pmatrix}$
2.8.7, $\lambda = 1/2$	$\begin{pmatrix} -1/2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1/2 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & r_{2,3} \\ -1/2 & 0 & 0 \end{pmatrix}$
2.17.27	$\begin{pmatrix} -1 & 0 & p_{1,3} \\ 0 & 0 & p_{2,3} \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & q_{1,3} \\ -1 & 0 & q_{2,3} \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} r_{1,1} & -q_{1,3} & r_{1,3} \\ -p_{2,3} & r_{1,1} + p_{1,3} - q_{2,3} & r_{2,3} \\ -1 & 0 & r_{1,1} + p_{1,3} \end{pmatrix}$
2.18.3	$\begin{pmatrix} 0 & p_{1,2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} q_{1,1} & q_{1,2} & 0 \\ 0 & q_{1,1} + p_{1,2} & 0 \\ 0 & 0 & q_{1,1} \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & p_{1,2} + 1 & 0 \end{pmatrix}$
1.5.19	$\begin{pmatrix} -1/2 & p_{1,2} & p_{1,3} \\ 0 & 0 & p_{2,3} \\ 0 & 0 & p_{1,1} + 1 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} q_{1,1} & q_{1,2} & q_{1,3} \\ 0 & q_{2,2} & q_{2,3} \\ 0 & 0 & q_{1,1} \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} r_{1,1} & r_{1,2} & r_{1,3} \\ -p_{2,3} & r_{2,2} & r_{2,3} \\ -1/2 & p_{1,2} & r_{1,1} + p_{1,3} \end{pmatrix}$

для некоторых $p_{i,j}, q_{i,j}, r_{i,j} \in \mathbb{R}$ (при $i, j = \overline{1, 3}$).

Тензор *кручения* $T \in \text{Inv } T_2^1(\mathfrak{m})$ и тензор *кривизны* $R \in \text{Inv } T_3^1(\mathfrak{m})$ имеют вид $T(x_m, y_m) = \Lambda(x)y_m - \Lambda(y)x_m - [x, y]_m$, $R(x_m, y_m) = [\Lambda(x), \Lambda(y)] - \Lambda([x, y])$ для всех $x, y \in \overline{\mathfrak{g}}$. Алгебра Ли \mathfrak{h}^* группы *голономии* инвариантной связности $\Lambda: \overline{\mathfrak{g}} \rightarrow \mathfrak{gl}(3, \mathbb{R})$ на паре $(\overline{\mathfrak{g}}, \mathfrak{g})$ – это подалгебра алгебры Ли $\mathfrak{gl}(3, \mathbb{R})$ вида $V + [\Lambda(\overline{\mathfrak{g}}), V] + [\Lambda(\overline{\mathfrak{g}}), [\Lambda(\overline{\mathfrak{g}}), V]] + \dots$, где V – подпространство, порожденное множеством $\{[\Lambda(x), \Lambda(y)] - \Lambda([x, y]) \mid x, y \in \overline{\mathfrak{g}}\}$. Положим \mathfrak{a} равной подалгебре в $\mathfrak{gl}(3, \mathbb{R})$ порожденной $\{[\Lambda(x) \mid x \in \overline{\mathfrak{g}}]\}$. Будем говорить, что связность нормальна, если $\mathfrak{h}^* = \mathfrak{a}$.

В случаях 3.25.30, 2.7.2, 2.17.27, 1.5.19 $\overline{\mathfrak{g}}$ не является полупростой, ее радикал коммутативен, в случаях 4.21.11 ($\mu = 0$), 3.13.6 ($\mu = 0, -1$), 2.8.7 ($\lambda = 0, -1$), 2.18.3 $\overline{\mathfrak{g}}$ также не является полупростой, ее радикал некоммутативен, в этих случаях тензоры кривизны и кручения, алгебры голономии могут быть ненулевыми. В случаях 5.9.2, 4.19.2, 4.21.11 ($\mu \neq 0, 1, 1/2$), 3.12.2, 3.13.6 ($\mu \neq 0, 1, -1, 1/2$), 3.6.2, 3.28.2, 2.8.7 ($\lambda \neq 0, 1, -1, 1/2$) тензоры кривизны и кручения, алгебры голономии всегда нулевые; в случаях 4.21.11 ($\mu = 1$), 3.13.6 ($\mu = 1$), 2.8.7 ($\lambda = 1$) тензор кривизны всегда нулевой, а тензор кручения может быть ненулевым; в случаях 4.21.11 ($\mu = 1/2$), 3.13.6 ($\mu = 1/2$), 2.8.7 ($\lambda = 1/2$) тензоры кривизны и алгебры голономии могут быть ненулевыми, а тензор кручения всегда нулевой.

Действительно, пусть здесь и далее

$$\Lambda(u_1) = \begin{pmatrix} p_{1,1} & p_{1,2} & p_{1,3} \\ p_{2,1} & p_{2,2} & p_{2,3} \\ p_{3,1} & p_{3,2} & p_{3,3} \end{pmatrix}, \Lambda(u_2) = \begin{pmatrix} q_{1,1} & q_{1,2} & q_{1,3} \\ q_{2,1} & q_{2,2} & q_{2,3} \\ q_{3,1} & q_{3,2} & q_{3,3} \end{pmatrix}, \Lambda(u_3) = \begin{pmatrix} r_{1,1} & r_{1,2} & r_{1,3} \\ r_{2,1} & r_{2,2} & r_{2,3} \\ r_{3,1} & r_{3,2} & r_{3,3} \end{pmatrix}$$

для некоторых $p_{i,j}, q_{i,j}, r_{i,j} \in \mathbb{R}$ (при $i, j = \overline{1, 3}$). Рассмотрим, например, локально однородное пространство 5.9.2, однозначно определены $\Lambda(e_i), i = \overline{1, 5}$, так как ограничение отображения Λ на \mathfrak{g} есть изотропное представление подалгебры, отображение Λ является \mathfrak{g} -инвариантным, следовательно, $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_1)] = \Lambda([e_1, u_1]) \Rightarrow [\Lambda(e_1), \Lambda(u_1)] = \Lambda(u_1)$, имеем $p_{1,1} = p_{2,1} = p_{2,2} = p_{2,3} = p_{3,1} = p_{3,2} = p_{3,3} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_1)] = \Lambda([e_2, u_1]) \Rightarrow [\Lambda(e_2), \Lambda(u_1)] = 0, p_{1,3} = 0$. Так как

$[\Lambda(e_4), \Lambda(u_1)] = \Lambda(e_5)$, имеем $p_{1,2} = -1$. Если $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_2)] = 0$, то $q_{3,1} = q_{3,2} = q_{1,3} = q_{2,3} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_3), \Lambda(u_2)] = \Lambda(u_1)$, $q_{2,1} = 0$, $q_{2,2} = q_{1,1} - 1$. Так как $[\Lambda(e_4), \Lambda(u_2)] = 2\Lambda(e_4)$, $q_{1,2} = 0$, $q_{3,3} = q_{1,1} + 1$. Если $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_3)] = \Lambda(u_3)$, то $r_{1,1} = r_{1,2} = r_{1,3} = r_{2,1} = r_{2,2} = r_{2,3} = r_{3,3} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_3)] = 0$, имеем $r_{3,1} = 0$. Так как $[\Lambda(e_4), \Lambda(u_3)] = \Lambda(u_2)$, $q_{1,1} = 0$, $r_{3,2} = -1$. Получим, что связность имеет вид, указанный в таблице (так как для остальных базисных векторов условия выполняются). Тензоры кривизны и кручения получаются нулевыми. Таким образом, алгебра голономии также нулевая.

Рассмотрим теперь случай 3.13.6. При $\mu = 1$ из $[\Lambda(e_3), \Lambda(u_1)] = \Lambda([e_3, u_1]) \Rightarrow [\Lambda(e_3), \Lambda(u_1)] = 0$ получаем $p_{3,1} = p_{3,2} = 0$, $p_{3,3} = p_{1,1}$, $p_{2,1} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_1)] = \Lambda(e_3)$, $p_{1,2} = -1$, $p_{1,1} = p_{2,2}$. Так как $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_1)] = \Lambda(u_1)$, $p_{1,1} = p_{2,3} = p_{1,3} = 0$. Если $[\Lambda(e_3), \Lambda(u_2)] = \Lambda(e_3)$, то $q_{3,1} = q_{3,2} = 0$, $q_{3,3} = q_{1,1} + 1$, $q_{2,1} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_2)] = 2\Lambda(e_2)$, $q_{1,2} = 0$, $q_{1,1} = q_{2,2} + 1$. Так как $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_2)] = 0$, $q_{2,3} = 0$. Если $[\Lambda(e_3), \Lambda(u_3)] = \Lambda(u_1)$, то $r_{3,1} = 0$, $r_{3,2} = -1$, $r_{3,3} = r_{1,1}$, $r_{2,1} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_3)] = \Lambda(u_2)$, $q_{1,1} = 0$, $r_{1,2} = -q_{1,3}$, $r_{1,1} = r_{2,2}$. Так как $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_3)] = \Lambda(u_3)$, $r_{1,1} = r_{1,3} = r_{2,3} = 0$. Получим, что связность имеет вид, указанный в таблице. Тензор кривизны – нулевой, а тензор кручения $T(u_1, u_2) = T(u_1, u_3) = 0$, $T(u_2, u_3) = \Lambda(u_2)(u_3)_m - \Lambda(u_3)(u_2)_m - [u_2, u_3]_m = (2q_{1,3}, 0, 0)$, алгебра голономии нулевая.

При $\mu = 1/2$ из $[\Lambda(e_3), \Lambda(u_1)] = \Lambda([e_3, u_1]) \Rightarrow [\Lambda(e_3), \Lambda(u_1)] = 0$ получаем $p_{3,1} = p_{3,2} = 0$, $p_{3,3} = p_{1,1}$, $p_{2,1} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_1)] = \Lambda([e_2, u_1]) \Rightarrow [\Lambda(e_2), \Lambda(u_1)] = \Lambda(e_3)$, $p_{1,2} = -1$, $p_{1,1} = p_{2,2}$. Так как $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_1)] = \Lambda(u_1)$, $p_{1,1} = p_{2,3} = p_{1,3} = 0$. Если $[\Lambda(e_3), \Lambda(u_2)] = \Lambda(e_3)$, то $q_{3,1} = q_{3,2} = 0$, $q_{3,3} = q_{1,1} + 1$, $q_{2,1} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_2)] = 2\Lambda(e_2)$, $q_{1,2} = 0$, $q_{1,1} = q_{2,2} + 1$. Так как $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_2)] = 0$, имеем $q_{1,3} = q_{2,3} = 0$. Если $[\Lambda(e_3), \Lambda(u_3)] = \Lambda(u_1)$, то $r_{3,1} = 0$, $r_{3,2} = -1$, $r_{3,3} = r_{1,1}$, $r_{2,1} = 0$. Поскольку $[\Lambda(e_2), \Lambda(u_3)] = \Lambda(u_2)$, $q_{1,1} = r_{1,2} = 0$, $r_{1,1} = r_{2,2}$. Так как $[\Lambda(e_1), \Lambda(u_3)] = (1/2)\Lambda(u_3)$, $r_{1,1} = 0$, $r_{2,3} = 0$. Получим, что связность имеет вид, указанный в таблице. Тензор кривизны $R(u_1, u_2) = R(u_1, u_3) = 0$,

$$R(u_2, u_3) = [\Lambda(u_2), \Lambda(u_3)] - \Lambda([u_2, u_3]) = \begin{pmatrix} 0 & 0 & -3r_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}.$$

Тензор кручения получился нулевым. Алгебра голономии при $r_{1,3} \neq 0$ не совпадает с алгеброй, порожденной множеством $V = \{[\Lambda(x), \Lambda(y)] - \Lambda([x, y]) \mid x, y \in \bar{\mathfrak{g}}\}$ (т. е. алгебра голономии не

является совершенной), $\mathfrak{h}^* = \left\{ \begin{pmatrix} 0 & p_1 & p_2 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \mid p_1, p_2 \in \mathbb{R} \right\}$. Связность не является нормальной, так как

$\Lambda(\bar{\mathfrak{g}}) \supset \Lambda(\mathfrak{g})$, т. е. $\mathfrak{a}_{\bar{\mathfrak{g}}}$ по крайней мере трехмерна и $\mathfrak{h}^* \neq \mathfrak{a}_{\bar{\mathfrak{g}}}$. При $r_{1,3} = 0$ алгебра голономии нулевая.

Аналогично, при $\mu \neq 1, 1/2, 0, -1$ тензоры кривизны и кручения нулевые, а при $\mu = 0, -1$ тензоры кривизны и кручения имеют вид:

Пара	Тензор кривизны
3.13.6, $\mu = 0$	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & -q_{2,3} + 2p_{1,3} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & -2p_{1,3} + q_{2,3} & -r_{2,3} + p_{1,3}^2 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix},$ $\begin{pmatrix} -2r_{1,1} & 0 & 0 \\ 0 & q_{2,3} - 2r_{1,1} - 2p_{1,3} & -4r_{2,3} + q_{2,3}^2 \\ 0 & 0 & q_{2,3} - 2r_{1,1} - 2p_{1,3} \end{pmatrix}$
3.13.6, $\mu = -1$	$\begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 3p_{2,3} \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} p_{2,3} & 0 & 0 \\ 0 & -2p_{2,3} & 0 \\ 0 & 0 & p_{2,3} \end{pmatrix}, \begin{pmatrix} 0 & 0 & 0 \\ 3p_{2,3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$

Пара	Тензор кручения
3.13.6, $\mu = 0$	$(0, 0, 0), (p_{1,3} - r_{1,1}, 0, 0), (0, 2q_{2,3} - r_{1,1} - p_{1,3}, 0)$
3.13.6, $\mu = -1$	$(0, 0, 0), (0, 2p_{2,3}, 0), (0, 0, 0)$

Здесь тензор кривизны R описан через $R(u_1, u_2), R(u_1, u_3), R(u_2, u_3)$, а тензор кручения T – через $T(u_1, u_2), T(u_1, u_3), T(u_2, u_3)$. Остальные случаи рассматриваются аналогично.

Прямыми вычислениями получаем, что других трехмерных нередуцируемых пар с неразрешимой \bar{g} и разрешимой g , допускающих инвариантные аффинные связности, кроме представленных в теореме, не существует.

Заключение. Приведено в явном виде локальное описание всех трехмерных нередуцируемых однородных пространств с неразрешимой группой преобразований и разрешимым стабилизатором, допускающих инвариантные аффинные связности. Локальная классификация таких пространств эквивалентна описанию соответствующих эффективных пар алгебр Ли. Описаны все инвариантные аффинные связности на найденных однородных пространствах, а также тензоры кривизны, кручения, алгебры голономии указанных связностей. Исследования основаны на использовании свойств алгебр Ли, групп Ли и однородных пространств и носят, главным образом, локальный характер. Особенностью методики, представленной в работе, является использование чисто алгебраического подхода к описанию однородных пространств и связностей на них, а также сочетание различных методов дифференциальной геометрии, теории групп и алгебр Ли и теории однородных пространств.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему учителю Борису Петровичу Комракову за постановку задачи и полезные замечания.

Acknowledgements. The author is grateful to his teacher Boris Petrovich Komrakov for posing the problem and for useful remarks.

Список использованных источников

1. Кобаяси, Ш. Основы дифференциальной геометрии: в 2 т. / Ш. Кобаяси, К. Номидзу. – М.: Наука, 1981.
2. Можей, Н. П. Трехмерные редуцируемые пространства неразрешимых групп Ли / Н. П. Можей // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 1. – С. 7–17.
3. Онищик, А. Л. Топология транзитивных групп Ли преобразований / А. Л. Онищик. – М.: Физ.-мат. лит., 1995. – 344 с.
4. Nomizu, K. Invariant affine connections on homogeneous spaces / K. Nomizu // Amer. J. Math. – 1954. – Vol. 76, N 1. – P. 33–65. doi.org/10.2307/2372398
5. Можей, Н. П. Трехмерные изотропно-точные однородные пространства и связности на них / Н. П. Можей. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2015. – 394 с.

References

1. Kobayashi Sh., Nomizu K. *Foundations of differential geometry*. New York, Interscience Publishers, 1963. 340 p.
2. Mozhey N. P. Three-dimensional reductive homogeneous spaces of unsolvable Lie groups. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 1, pp. 7–17. (in Russian).
3. Onishchik A. L. *Topology of transitive transformation groups*. Moscow, Fizmatlit Publishing Company, 1995. 384 p. (in Russian).
4. Nomizu K. Invariant affine connections on homogeneous spaces. *American Journal of Mathematics*, 1954, vol. 76, no. 1, pp. 33–65. doi.org/10.2307/2372398
5. Mozhey N. P. *Three-dimensional isotropically-faithful homogeneous spaces and connections on them*. Kazan, Publisher University of Kazan, 2015. 394 p. (in Russian).

Информация об авторе

Можей Наталья Павловна – канд. физ.-мат. наук, доцент. Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники (ул. П. Бровки, 6, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mozheynatalya@mail.ru.

Information about the author

Mozhey Natalya Pavlovna – Ph. D. (Physics and Mathematics), Assistant Professor. Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics (6, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mozheynatalya@mail.ru.

М. С. Белокурский

Гомельский государственный университет имени Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь

ЧАСТИЧНО НЕРЕГУЛЯРНЫЕ РЕШЕНИЯ ЛИНЕЙНЫХ ПОЧТИ ПЕРИОДИЧЕСКИХ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ СИСТЕМ В КРИТИЧЕСКОМ РЕЗОНАНСНОМ СЛУЧАЕ

(Представлено академиком Н. А. Изобовым)

Аннотация. Получены необходимые и достаточные условия, при выполнении которых линейная почти периодическая дифференциальная система имеет частично нерегулярные почти периодические решения в критическом резонансном случае.

Ключевые слова: частично нерегулярные решения, линейные дифференциальные системы, почти периодические системы, критический резонансный случай

Для цитирования: Белокурский, М. С. Частично нерегулярные решения линейных почти периодических дифференциальных систем в критическом резонансном случае / М. С. Белокурский // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 16–21.

Maksim S. Belokursky

Francisk Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus

PARTIALLY IRREGULAR SOLUTIONS OF LINEAR ALMOST PERIODIC DIFFERENTIAL SYSTEMS IN THE CRITICAL RESONANCE CASE

(Communicated by Academician Nikolai A. Izobov)

Abstract. The necessary and sufficient conditions, under which a linear almost periodic differential system has partially irregular almost periodic solutions in the critical resonance case, were obtained.

Keywords: partially irregular solutions, linear differential systems, almost periodic systems, critical resonant case

For citation: Belokursky M. S. Partially irregular solutions of linear almost periodic differential systems in the critical resonance case. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 16–21 (in Russian).

Пусть D – компактное подмножество \mathbb{R}^n , а $AP(\mathbb{R} \times D, \mathbb{R}^n)$ – пространство функций $f: \mathbb{R} \times D \rightarrow \mathbb{R}^n$ таких, что каждая $f(t, x) \in AP(\mathbb{R} \times D, \mathbb{R}^n)$ является непрерывной по совокупности переменных и почти периодической по t равномерно относительно $x \in D$. Следуя [1, с. 60], через $\text{Mod}(f)$ обозначим частотный модуль функции f , т. е. наименьшую аддитивную группу вещественных чисел, содержащую множество показателей Фурье (частот) функции f . Под частотным модулем разрешенной относительно производной системы почти периодических уравнений будем понимать модуль частот её правой части. Я. Курцвейль, О. Вейвода в [2] показали, что системы обыкновенных почти периодических дифференциальных уравнений могут иметь сильно нерегулярные почти периодические решения, т. е. такие решения, пересечение частотного модуля которых с модулем частот системы тривиально. А. К. Деменчук изучал почти периодические решения, частотный модуль которых содержит только некоторые частоты системы, в работах [3–5] и др. Такие решения названы частично нерегулярными [4, гл. 2].

В данном сообщении исследуется вопрос существования частично нерегулярных почти периодических решений линейной почти периодической системы в критическом резонансном случае, когда среди собственных чисел усреднения матрицы коэффициентов имеются чисто мнимые с простыми элементарными делителями. Случай, когда среди собственных чисел имеются чисто мнимые с простыми элементарными делителями был исследован в [4, с. 149] и [6].

Рассмотрим линейную систему

$$\frac{dx}{dt} = A(t)x + \varphi(t), \quad \text{Mod}(A) \cap \text{Mod}(\varphi) = \{0\}, \quad x \in \mathbb{R}^n, \quad (1)$$

предполагая почти периодичность матрицы коэффициентов $A(t)$ и вынуждающей силы $\varphi(t)$ с тривиальным пересечением их частотных модулей. Для системы (1) почти периодические решения с модулем вынуждающей силы называются нерегулярными вынужденными [4, с. 137]. Выясним вопрос о существовании нерегулярных по отношению к $\text{Mod}(A)$ почти периодических решений $x(t)$ системы (1), т. е. таких что $(\text{Mod}(x) + \text{Mod}(\varphi)) \cap \text{Mod}(A) = \{0\}$, в критическом резонансном случае.

Для решения поставленной задачи, следуя [3], предварительно выполним редукцию системы (1) к системе меньшей размерности. Пусть $x(t)$ – почти периодическое решение системы (1), нерегулярное по отношению к частотному модулю матрицы коэффициентов. Тогда согласно [4, с. 37] вектор $x(t)$ удовлетворяет системе

$$\frac{dx}{dt} = \hat{A}x + \varphi(t), \quad [A(t) - \hat{A}]x = A_*(t)x = 0, \quad \hat{A} = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T A(t) dt. \quad (2)$$

Поскольку частотный модуль матрицы $A_*(t)$ содержится в $\text{Mod}(A)$ и $\text{Mod}(x) \cap \text{Mod}(A) = \{0\}$, то из второй системы в силу [4, с. 41, 43] вытекает, что матрица $A_*(t)$ имеет неполный столбцовый ранг, т. е. выполняется условие

$$\text{rank}_{\text{col}} A_* = d < n. \quad (3)$$

В таком случае найдется постоянная неособенная $n \times n$ -матрица Q_{A_*} такая, что у матрицы $A_*(t)Q_{A_*}$ первые $n - d = s$ столбцов нулевые, а остальные столбцы линейно независимы. Тогда замена переменных $x = Q_{A_*}y$ приводит систему (2) к системе $\frac{dy}{dt} = By + \psi(t)$, $B_*(t)y = 0$, где $B = Q_{A_*}^{-1} \hat{A} Q_{A_*}$; $\psi(t) = Q_{A_*}^{-1} \varphi(t)$; $B_*(t) = A_*(t)Q_{A_*}$.

Согласно исходному предположению полученная система также имеет почти периодическое решение $y(t) = Q_{A_*}^{-1} x(t)$, $\text{Mod}(y) = \text{Mod}(x)$. Столбцы матрицы $B_*(t)$ с номерами $n - d + 1, \dots, n$ линейно независимы. Поэтому из равенства $B_*(t)y = 0$ согласно [4, с. 41] вытекает, что соответствующие компоненты почти периодического решения с заданным свойством частот должны быть нулевыми, т. е. $y(t) = \text{col}(y_1(t), \dots, y_{n-d}(t), 0, \dots, 0)$. Это означает, что последняя система примет вид

$$\frac{dy^{[s]}}{dt} = B^{[s,s]}y^{[s]} + \psi^{[s]}(t), \quad B_{[n-s,s]}y^{[s]} + \psi_{[n-s]}(t) = 0, \quad y_{[n-s]} = 0, \quad (4)$$

где $y = \text{col}(y^{[s]}, y_{[n-s]})$, $y^{[s]} = \text{col}(y_1, \dots, y_s)$, $y_{[n-s]} = \text{col}(y_{s+1}, \dots, y_n)$, $B^{[s,s]}$, $B_{[n-s,s]}$ – соответственно верхний и нижний блоки $n \times s$ -матрицы, полученной из матрицы B вычеркиванием последних d столбцов (нижние индексы указывают размерности блоков); $\psi(t) = \text{col}(\psi^{[s]}(t), \psi_{[n-s]}(t))$.

Первая система из (4) имеет почти периодическое решение $y^{[s]}(t) = (Q_{A_*}^{-1})^{[s,n]} x(t)$, где $(Q_{A_*}^{-1})^{[s,n]}$ – первые s строк матрицы $Q_{A_*}^{-1}$. Так как $y(t) = Q_{A_*}^{-1} x(t)$, $y(t) = \text{col}(y^{[s]}(t), 0, \dots, 0)$, то $\text{Mod}(y^{[s]}) = \text{Mod}(x)$. Как следует из (4), вектор $y^{[s]}(t)$ удовлетворяет тождеству

$$B_{[n-s,s]}y^{[s]}(t) + \psi_{[n-s]}(t) \equiv 0. \quad (5)$$

Таким образом, если система (1) имеет почти периодическое решение $x(t)$, нерегулярное по отношению к $\text{Mod}(A)$, то выполняются условия (3), (5), где $y^{[s]}(t)$ – почти периодическое решение первой системы из (4) с аналогичным свойством частот.

Справедливо и обратное утверждение. Покажем, что при выполнении условия (3) нерегулярное по отношению к $\text{Mod}(A)$ почти периодическое решение системы (4) является также решением системы (1). Поскольку $y^{[s]}(t)$ – решение первой системы из (4), удовлетворяющее тождеству (5),

то $y(t) = \text{col}(y^{[s]}(t), \dots, 0)$ является решением всей системы (4). В силу условия (3) существует невырожденное преобразование $x = Q_{A^*} y$ такое, что вектор $x(t) = Q_{A^*} \text{col}(y^{[s]}(t), 0, \dots, 0)$ является почти периодическим решением системы (2), а значит, и системы (1), при этом $\text{Mod}(x) = \text{Mod}(y^{[s]})$.

Итак, имеет место

Л е м м а [4]. Для того чтобы система (1) имела почти периодическое нерегулярное по отношению к $\text{Mod}(A)$ решение $x(t)$, необходимо и достаточно, чтобы:

1) столбцовый ранг матрицы $A(t) - \hat{A}(t)$ удовлетворял неравенству (3);

2) первая система из (4) имела почти периодическое решение $y^{[s]}(t)$ такое, что $(\text{Mod}(y^{[s]}) + \text{Mod}(\varphi)) \cap \text{Mod}(A) = \{0\}$;

3) выполнялось тождество (5), при этом $x(t) = Q_{A^*} \text{col}(y^{[s]}(t), 0, \dots, 0)$, где Q_{A^*} – постоянная неособенная $n \times n$ -матрица такая, что первые $s = n - d$ столбцов матрицы $[A(t) - \hat{A}(t)]Q_{A^*}$ нулевые.

Перейдем теперь к выяснению условий существования требуемых частично нерегулярных почти периодических решений системы (1). Пусть $\alpha_k \pm i\beta_k$ ($k = 1, \dots, k'$; $k' \leq n$; $i^2 = -1$) – собственные числа матрицы коэффициентов $B^{[s,s]}$ редуцированной системы (4). Как отмечено выше, в работе [6] изучен случай чисто мнимых собственных значений матрицы $B^{[s,s]}$ с простыми элементарными делителями.

Предположим, что имеет место критический резонансный случай, когда среди собственных чисел матрицы $B^{[s,s]}$ имеется пара чисто мнимых кратности два с непростыми элементарными делителями, такая, что

$$\alpha_1 = \alpha_2 = 0, \quad \beta_2 = \beta_1 \in \text{Mod}(\varphi), \quad \alpha_q \neq 0 \quad (q = 3, \dots, k'). \quad (6)$$

Положим $G(t) = S_2^{-1}(t)(J_{B^{[s,s]}} S_2(t) - \dot{S}_2(t))$, $S(t) = S_2^{-1}(t) S_1^{-1}$, где $S_2(t) = \text{diag}[e^{i\beta_1 t}, e^{i\beta_1 t}, e^{-i\beta_1 t}, e^{-i\beta_1 t}, 1, \dots, 1]$, $\dot{S}_2(t)$ – производная матрицы $S_2(t)$, а матрица S_1 приводит матрицу $B^{[s,s]}$ к жордановой нормальной форме, т. е.

$$S_1^{-1} B^{[s,s]} S_1 = J_{B^{[s,s]}} = \text{diag}[J_1, J_2, J_3, \dots, J_{k'}] = \text{diag}[J_1, J_2, J],$$

$$J_1 = \begin{pmatrix} i\beta_1 & 1 \\ 0 & i\beta_1 \end{pmatrix}, \quad J_2 = \begin{pmatrix} -i\beta_1 & 1 \\ 0 & -i\beta_1 \end{pmatrix},$$

где J – жорданова форма, отвечающая остальным собственным значениям матрицы $B^{[s,s]}$. Обозначим через $g_{(j)}(t)$ j -ю строку матрицы $g(t) = S(t)\psi^{[s]}(t)$, а через $S_{(j)}(t)$ j -ю строку матрицы $S(t)$.

Т е о р е м а. Пусть в системе (1) матрица коэффициентов $A(t)$ и вынуждающая сила $\varphi(t)$ – почти периодические с тривиальным пересечением их частотных модулей и для редуцированной системы (4) имеет место критический резонансный случай (6). Тогда:

1) Если система (1) имеет почти периодическое нерегулярное по отношению к $\text{Mod}(A)$ решение $x(t)$, то это решение является нерегулярным вынужденным, т. е. $\text{Mod}(x) \subseteq \text{Mod}(\varphi)$;

2) Для того, чтобы система (1) имела нерегулярное вынужденное почти периодическое решение необходимо и достаточно выполнения условия (3) и оценки

$$\sup_t \left| \int_0^t S_{(2)}(\tau) \psi^{[s]}(\tau) d\tau \right| < \infty, \quad \sup_t \left| \int_0^t \left(\int_0^\tau S_{(2)}(\sigma) \psi^{[s]}(\sigma) d\sigma + S_{(1)} \psi^{[s]}(\tau) \right) d\tau \right| < \infty, \quad (7)$$

а для почти периодического решения $y^{[s]}(t)$ первой системы (4) в случае (6) имело место тождество (5).

Д о к а з а т е л ь с т в о. Сначала докажем первое утверждение. Если система (1) имеет почти периодическое нерегулярное по отношению к $\text{Mod}(A)$ решение $x(t)$, то согласно лемме $x(t) = Q_{A^*} \text{col}(y^{[s]}(t), 0, \dots, 0)$, где $y^{[s]}(t)$ удовлетворяет первой системе из (4), при этом $y^{[s]}(t) = y_0^{[s]}(t) + \tilde{y}^{[s]}(t)$, где $y_0^{[s]}(t)$ – почти периодическое решение соответствующей однородной системы; $\tilde{y}^{[s]}(t)$ – частное почти периодическое решение неоднородной системы. Так как со-

ответствующая первой системе из (4) однородная система стационарна и ее матрица коэффициентов имеет собственные числа $\alpha_1 = \alpha_2 = 0$, $\beta_2 = \beta_1 \in \text{Mod}(\varphi)$, $\alpha_q \neq 0$ ($q = 3, \dots, s$), то $\text{Mod}(y_0^{[s]}) \subseteq \text{Mod}(\varphi)$. Пусть $M_{B^{[s,s]}}\{\beta_1\}$ – модуль, образованный числом β_1 . Тогда $\text{Mod}(\tilde{y}^{[s]}) \subseteq (\text{Mod}(\varphi) + M_{B^{[s,s]}}\{\beta_1\})$, откуда в силу (6) следует, что $\text{Mod}(\tilde{y}^{[s]}) \subseteq \text{Mod}(\varphi)$. Следовательно, $\text{Mod}(x) \subseteq \text{Mod}(\varphi)$, т. е. решение $x(t)$ является нерегулярным вынужденным.

Докажем необходимость второго утверждения. Пусть $x(t)$ – почти периодическое нерегулярное по отношению к $\text{Mod}(A)$ решение системы (1). Тогда на основании леммы столбцовый ранг матрицы $A^*(t)$ удовлетворяет неравенству (3) и система (4) имеет почти периодическое решение $y^{[s]}(t) = [Q_{A^*}^{-1}]_{s,n} x(t)$ с таким же свойством частот, что и $x(t)$, где $[Q_{A^*}^{-1}]_{s,n} - s \times n$ -матрица, составленная из первых s строк невырожденной матрицы $Q_{A^*}^{-1}$.

Выполним в первой системе из (4) замену переменных $y^{[s]} = S_1 z^{[s]}$. Тогда получим систему

$$\frac{dz^{[s]}}{dt} = J_{B^{[s,s]}} z^{[s]} + S_1^{-1} \psi^{[s]}(t), \tag{8}$$

которая имеет почти периодическое решение $z^{[s]}(t) = S_1^{-1} y^{[s]}(t)$. Далее замена $z^{[s]} = S_2(t) u^{[s]}$ приводит систему (8) к системе

$$\frac{du^{[s]}}{dt} = S_2^{-1}(t)(J_{B^{[s,s]}} S_2(t) - \dot{S}_2(t)) u^{[s]} + S_2^{-1}(t) S_1^{-1} \psi^{[s]}(t) = G(t) u^{[s]} + S(t) \psi^{[s]}(t) = G(t) u^{[s]} + g(t), \tag{9}$$

где $G(t) = \text{diag}[G_0, G_0, J]$, $G_0 = \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}$, с почти периодическим решением $u^{[s]}(t) = S_2^{-1}(t) z^{[s]}(t) = S_2^{-1}(t) S_1^{-1} y^{[s]}(t) = S(t) [Q_{A^*}^{-1}]_{s,n} x(t)$. Выпишем систему (9) более подробно:

$$\begin{aligned} \frac{du_1^{[s]}}{dt} &= u_2^{[s]} + g_1(t) = u_2^{[s]} + S_{(1)}(t) \psi^{[s]}(t), & \frac{du_2^{[s]}}{dt} &= g_2(t) = S_{(2)}(t) \psi^{[s]}(t), \\ \frac{du_3^{[s]}}{dt} &= u_4^{[s]} + g_3(t) = u_4^{[s]} + S_{(3)}(t) \psi^{[s]}(t), & \frac{du_4^{[s]}}{dt} &= g_4(t) = S_{(4)}(t) \psi^{[s]}(t), \\ \frac{d\tilde{u}^{[s]}}{dt} &= J\tilde{u}^{[s]} + \tilde{g}(t), \end{aligned} \tag{10}$$

где $u^{[s]} = \text{col}(u_1^{[s]}, u_2^{[s]}, u_3^{[s]}, u_4^{[s]}, \tilde{u}^{[s]})$, $g^{[s]} = \text{col}(g_1, g_2, g_3, g_4, \tilde{g}^{[s]})$.

Покажем, что первая и третья, а также вторая и четвертая компоненты решения $u^{[s]}$ системы (10) попарно сопряжены, т. е. $u_4^{[s]} = \overline{u_2^{[s]}}$, $u_3^{[s]} = \overline{u_1^{[s]}}$. Для этого рассмотрим однородную систему

$$\frac{dz^{[s]}}{dt} = J_{B^{[s,s]}} z^{[s]}.$$

Матрица коэффициентов $J_{B^{[s,s]}}$ этой системы имеет жорданову форму. Из [7, с. 324] следует, что первая и третья, а также вторая и четвертая компоненты решения $z^{[s]}$ последней системы попарно сопряжены, т. е. $z_4^{[s]} = \overline{z_2^{[s]}}$, $z_3^{[s]} = \overline{z_1^{[s]}}$. Замена $z^{[s]} = S_2(t) u^{[s]}$ переводит матрицу $J_{B^{[s,s]}}$ в матрицу $G(t)$, которая отличается от $J_{B^{[s,s]}}$ лишь нулевой главной диагональю. Следовательно, сопряжение будет иметь место и для соответствующих компонент решения $\tilde{u}^{[s]}$ системы

$$\frac{du^{[s]}}{dt} = G(t) u^{[s]},$$

т. е. $u_{04}^{[s]} = \overline{u_{02}^{[s]}}$, $u_{03}^{[s]} = \overline{u_{01}^{[s]}}$. Чтобы найти эти компоненты решения запишем последнюю систему более подробно:

$$\frac{du_{01}^{[s]}}{dt} = u_{02}^{[s]}, \quad \frac{du_{02}^{[s]}}{dt} = 0, \quad \frac{du_{03}^{[s]}}{dt} = u_{04}^{[s]}, \quad \frac{du_{04}^{[s]}}{dt} = 0, \quad \frac{d\tilde{u}_0^{[s]}}{dt} = J\tilde{u}_0^{[s]},$$

где $u_0^{[s]} = \text{col}(u_{01}^{[s]}, u_{02}^{[s]}, u_{03}^{[s]}, u_{04}^{[s]}, \tilde{u}_0^{[s]})$. Первые четыре компонента общего решения этой системы с учетом сопряженности имеют вид $\text{col}(c_1 t + c_2, c_1, c_1 t + c_2, c_1)$. Находим методом вариации

произвольных постоянных первые четыре компоненты частного решения системы (9), которые также являются попарно сопряженными:

$$\operatorname{col}(t \int g_2(t) dt + \int (g_1(t) - t g_2(t)) dt, \int g_2(t) dt, t \int g_4(t) dt + \int (g_3(t) - t g_4(t)) dt, \int g_4(t) dt).$$

Из их сопряженности вытекает, что $g_3(t) = \overline{g_1(t)}$, $g_4(t) = \overline{g_2(t)}$. Из сопряженности компонент общего решения однородной системы и частного решения неоднородной системы следует попарная сопряженность первых четырех компонент систем (9) и (10), т. е. $u_4^{[s]} = \overline{u_2^{[s]}}$, $u_3^{[s]} = \overline{u_1^{[s]}}$.

Итак, почти периодические решения первых четырех уравнений системы (10) являются попарно сопряженными и имеют вид

$$u_2^{[s]}(t) = \int_0^t S_{(2)}(\tau) \psi^{[s]}(\tau) d\tau, \quad u_1^{[s]}(t) = \int_0^t \left(\int_0^\tau S_{(2)}(\sigma) \psi^{[s]}(\sigma) d\sigma + S_{(1)}(\tau) \psi^{[s]}(\tau) \right) d\tau,$$

$$u_4^{[s]}(t) = \int_0^t S_{(4)}(\tau) \psi^{[s]}(\tau) d\tau, \quad u_3^{[s]}(t) = \int_0^t \left(\int_0^\tau S_{(4)}(\sigma) \psi^{[s]}(\sigma) d\sigma + S_{(3)}(\tau) \psi^{[s]}(\tau) \right) d\tau.$$

Поэтому согласно [1, с. 79] интегралы, стоящие в правых частях последних равенств, будут ограничены, т. е. выполняются условия (7).

Докажем достаточность второго утверждения. Пусть условия теоремы выполнены. В силу (3) существует линейное преобразование, приводящее (2) к системе (4), где $y_{s+1} = \dots = y_n = 0$. Отметим, что матрица $B^{[s,s]}$ имеет собственные числа (6) по предположению.

Невырожденная замена переменных $y^{[s]} = S(t)u^{[s]}$ приводит первую систему из (4) к системе (10). Согласно [1, с. 79] при выполнении условий (7) первые четыре уравнения из (10) имеют почти периодические решения $u_j^{[s]}(t)$, $j = 1, 4$. Так как вещественные части собственных чисел матрицы J ненулевые, то в силу [1, с. 76] последняя система в (10) имеет единственное почти периодическое решение $\tilde{u}^{[s]}(t)$. Тогда вектор $y^{[s]}(t) = S(t) \operatorname{col}(u_1(t), u_2(t), u_3(t), u_4(t), \tilde{u}^{[s]}(t))$ будет удовлетворять первой системе из (4). С учетом тождества (5) $y(t) = \operatorname{col}(y^{[s]}(t), 0, \dots, 0)$ – почти периодическое решение системы (4). Поэтому согласно лемме $x(t) = Q_{A^*} y(t)$ является решением системы (1), причем в силу первого утверждения $x(t)$ будет нерегулярным вынужденным.

Теорема доказана.

З а м е ч а н и е 1. Условие (7) теоремы содержит интеграл от интеграла. Если пара собственных чисел с непрым делителем будет иметь кратность 3 и более, то условия существования нерегулярного вынужденного почти периодического решения будут аналогичны условиям доказанной выше теоремы с той лишь разницей, что в условии (7) появится интеграл с подынтегральной функцией, которая является интегралом от интеграла и т. д. Таким образом, с возрастанием кратности будет усложняться условие (7).

В качестве примера возьмем линейную квазипериодическую дифференциальную систему

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= -x_1 + x_4 + x_5, & \dot{x}_2 &= s(t)x_1 + (1 + s(t))(x_2 - x_4), \\ \dot{x}_3 &= c(t)(x_1 + x_2 - x_4) + x_5 + \cos t, & \dot{x}_4 &= -2x_1 + x_4 + x_5, \\ \dot{x}_5 &= -c(t)(x_1 + x_2 + x_4) - x_3 + \sin t, & s(t) &\equiv \sin \sqrt{5}t, \quad c(t) \equiv \cos \sqrt{5}t, \end{aligned} \quad (11)$$

в которой пересечения модулей частот коэффициентов и вынуждающей силы тривиально. С помощью теоремы находим нерегулярное периодическое решение системы (11)

$$x = \operatorname{col}(a \sin t - b \cos t, a \cos t + b \sin t, \sin t, (a + b) \sin t + (a - b) \cos t, 0), \quad x \in \mathbb{R}^5,$$

где a, b – произвольные вещественные постоянные. Поскольку частота этого решения совпадает с частотой вынуждающей силы и несоизмерима с частотой коэффициентов системы (11), то оно является нерегулярным вынужденным.

З а м е ч а н и е 2. Если взять более высокую размерность, то подобным образом можно привести пример системы с нерегулярным квазипериодическим (почти периодическим) решением.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Fink, A. M. *Almost Periodic Differential Equations* / A. M. Fink. – Berlin: Springer, 1974. – 336 p. doi.org/10.1007/bfb0070324
2. Курцвейль, Я. О периодических и почти периодических решениях систем обыкновенных дифференциальных уравнений / Я. Курцвейль, О. Вейвода // Чехосл. матем. журнал. – 1955. – Т. 5, № 3. – С. 362–370.
3. Demenchuk, A. K. Partially irregular almost periodic solutions of ordinary differential systems / A. K. Demenchuk // *Math. Bohemica*. – 2001. – Vol. 126, N 1. – P. 221–228.
4. Деменчук, А. К. Асинхронные колебания в дифференциальных системах. Условия существования и управление / А. К. Деменчук. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 186 p.
5. Деменчук, А. К. О частично нерегулярных почти периодических решениях линейных дифференциальных систем в некритическом случае / А. К. Деменчук // *Весті НАН Беларусі. Сер. фіз.-мат. навук.* – 2003. – № 3. – С. 11–16.
6. Белокурский, М. С. Нерегулярные решения линейных почти периодических дифференциальных систем в резонансном случае / М. С. Белокурский // *Тр. Ин-та математики.* – 2013. – Т. 21, № 2. – С. 12–18.
7. Понтрягин, Л. С. Обыкновенные дифференциальные уравнения / Л. С. Понтрягин. – М.: Наука, 1982. – 331 с.

References

1. Fink A. M. *Almost Periodic Differential Equations*. Berlin, Springer, 1974. 336 p. doi.org/10.1007/bfb0070324
2. Kurtsveil' Ya., Veivoda O. On the periodic and almost periodic solutions of systems of ordinary differential equations. *Czechoslovak Mathematical Journal*, 1955, vol. 5, no. 3, pp. 362–370.
3. Demenchuk A. K. Partially irregular almost periodic solutions of ordinary differential systems. *Mathematica Bohemica*, 2001, vol. 126, no. 1, pp. 221–228.
4. Demenchuk A. K. *Asynchronous fluctuations in differential systems. The conditions of existence and control*. Saarbrücken, Lambert Academic Publishing, 2012. 186 p. (in Russian).
5. Demenchuk A. K. On the existence of almost periodic solutions of linear differential systems in noncritical case. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya fizika-matematychnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Physics and Mathematics Series*, 2003, no. 3, pp. 11–16 (in Russian).
6. Belokurskii M. S. Irregular solutions of linear almost periodic differential systems in resonant case. *Trudy Instituta Matematiki = Proceedings of the Institute of Mathematics*, 2013, vol. 21, no. 2, pp. 12–18 (in Russian).
7. Pontryagin L. S. *Ordinary differential equations*. Moscow, Nauka Publ., 1982. 331 p. (in Russian).

Информация об авторе

Белокурский Максим Сергеевич – старший преподаватель. Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины (ул. Советская, 104, 246019, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: drakonsm@ya.ru.

Information about the author

Belokursky Maksim Sergeevich – Senior Lecturer. Francisk Skorina Gomel State University (104, Sovetskaya Str., 246019, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: drakonsm@ya.ru.

А. Ю. Харин

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ СТАТИСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ

(Представлено членом-корреспондентом Л. А. Яновичем)

Аннотация. В работе исследуются последовательные статистические тесты проверки простых гипотез о значениях параметров распределений вероятностей независимых наблюдений, а также наблюдений, образующих цепь Маркова. Предложены методы анализа характеристик эффективности (вероятностей ошибок первого и второго рода, а также среднего числа наблюдений) последовательных статистических тестов, основанные на приближении тестовой статистики и использующие теорию поглощающих цепей Маркова. Предложенные методы позволяют вычислять характеристики эффективности последовательных статистических тестов не только для гипотетической модели данных, но и при отклонениях от этой модели, что может быть использовано при анализе робастности последовательных тестов.

Ключевые слова: последовательный тест, вероятность ошибки, среднее число наблюдений, цепь Маркова

Для цитирования: Харин, А. Ю. Методы анализа эффективности последовательных статистических тестов / А. Ю. Харин // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 22–27.

Alexey Yu. Kharin

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

METHODS FOR PERFORMANCE ANALYSIS OF SEQUENTIAL STATISTICAL TESTS

(Communicated by Corresponding Member Leonid A. Yanovich)

Abstract. Sequential statistical tests for simple hypotheses on parameters of probability distributions of independent observations, as well as of Markov chains are considered in the article. Methods for analysis of performance characteristics (I and II type error probabilities, conditional expected sample sizes) of sequential statistical tests are constructed both on the basis of the approximations of test statistics and on the basis of absorbing Markov chain theory. The proposed methods allow assessing the performance characteristics of sequential statistical tests not only for the hypothetical model of data, but also under deviations from this model, which can be used for robustness analysis of sequential tests.

Keywords: sequential test, error probability, expected number of observations, Markov chain

For citation: Kharin A. Yu. Methods for performance analysis of sequential statistical tests. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 22–27 (in Russian).

Введение. Предложенные А. Вальдом [1] статистические тесты (решающие правила) активно используются при решении задач математической статистики, связанных со статистической проверкой гипотез о значениях параметров вероятностных моделей наблюдаемых данных [2]. Такой способ анализа данных, когда число наблюдений, обеспечивающих заданную точность принятия решений, заранее не фиксировано, зависит от самих наблюдений и является случайной величиной, позволяет в среднем экономить число проводимых наблюдений [3]. Аналитическое вычисление характеристик эффективности последовательных тестов (вероятностей ошибок первого и второго рода, средней длительности наблюдений) является сложной проблемой даже для простейших моделей наблюдений [4]. Кроме того, на практике анализируемые данные часто отклоняются от сделанных модельных предположений [5]: появляются выбросы, ошибки спецификации гипотетических значений параметров, неоднородности, стохастические зависимости и другие искажения [6]. В таких ситуациях необходимо строить так называемые робастные [3] статистические решающие правила, слабо чувствительные к малым искажениям модели, и акту-

альна задача вычисления характеристик эффективности последовательных статистических тестов в таком виде, который позволял бы проводить анализ их робастности при появлении искажений. В данном сообщении предложены методы анализа характеристик эффективности и робастности последовательных статистических тестов для независимых наблюдений и наблюдений с марковской зависимостью.

Модель независимых дискретных наблюдений. Обозначим через $\mathbb{N}, \mathbb{Z}, \mathbb{Z}_+, \mathbb{Q}, \mathbb{R}$ множества натуральных, целых, неотрицательных целых, рациональных и действительных чисел соответственно. Пусть на измеримом пространстве (Ω, F) наблюдаются случайные величины $x_t \in U = \{u_1, \dots, u_M\}$, $t \in \mathbb{N}$, независимые в совокупности и одинаково распределенные. Распределение вероятностей каждой случайной величины дискретно, зависит от параметра $\theta \in \Theta = \{\theta_0, \theta_1\}$, $\theta_0, \theta_1 \in \mathbb{R}$, $\theta_0 \neq \theta_1$, и имеет вид

$$P(u; \theta) = P_\theta \{x_t = u\} = a^{-J(u; \theta)}, \quad t \in \mathbb{N}, \quad u \in U, \quad (1)$$

где $a \in \mathbb{Q}$; $a > 1$; $J(u; \theta) : U \times \Theta \rightarrow \mathbb{Z}_+$ – функция, удовлетворяющая условию нормировки

$$\sum_{u \in U} a^{-J(u; \theta)} = 1. \quad (2)$$

Относительно значения параметра θ распределения вероятностей (1) имеются две простые гипотезы:

$$H_0 : \theta = \theta_0, \quad H_1 : \theta = \theta_1. \quad (3)$$

В приложениях такая модель используется в задачах, когда требуется идентификация одной из двух альтернативных ситуаций.

Обозначим статистику

$$\Lambda_n = \Lambda_n(x_1, \dots, x_n) = \sum_{t=1}^n \lambda_t, \quad (4)$$

где $\lambda_t = \lambda(x_t) = \log_a(P(x_t; \theta_1) / P(x_t; \theta_0)) = J(x_t; \theta_0) - J(x_t; \theta_1) \in \mathbb{Z}$ – логарифмическое отношение правдоподобия, вычисленное по наблюдению x_t . В силу независимости x_t из (4) следует, что Λ_n , $n \in \mathbb{N}$, является однородной цепью Маркова с дискретным временем [7].

В последовательном тесте Вальда [1] при проверке гипотез (3) после n наблюдений ($n = 1, 2, \dots$) принимается решение

$$d_\lambda = d_\lambda(n) = \mathbf{1}_{[C_+, +\infty)}(\Lambda_n) + 2 \cdot \mathbf{1}_{(C_-, C_+)}(\Lambda_n), \quad (5)$$

где $\mathbf{1}_D(\cdot)$ означает индикаторную функцию множества D . Значения $d_\lambda = 0$ и $d_\lambda = 1$ соответствуют прекращению процесса наблюдения и принятию гипотезы H_0 (при $d_\lambda = 0$) или H_1 (при $d_\lambda = 1$) после n наблюдений; при $d_\lambda = 2$ следует сделать $(n + 1)$ -е наблюдение. В (5) $C_-, C_+ \in \mathbb{Z}$, $C_- < C_+$ – параметры теста, называемые порогами, которые в [1] рекомендуется выбирать следующим образом:

$$C_- = [\log_a(\beta_0 / (1 - \alpha_0))], \quad C_+ = [\log_a((1 - \beta_0) / \alpha_0)], \quad (6)$$

где α_0, β_0 – «требуемые» вероятности ошибок первого и второго рода соответственно; $[\cdot]$ – целая часть числа.

Как известно [8], при использовании порогов (6) фактические значения вероятностей ошибок первого и второго рода могут существенно отличаться от задаваемых величин α_0, β_0 . Поэтому задача вычисления вероятностных характеристик последовательного теста (5), (6) является актуальной.

Примем обозначения: $\delta_{i,j}$ – символ Кронекера; \mathbf{I}_k – единичная матрица порядка k ; $\mathbf{0}_{m \times n}$ – $(m \times n)$ -матрица, все элементы которой равны 0; $\mathbf{1}(\cdot)$ – функция единичного скачка; $\mathbf{1}_k$ – k -вектор-столбец, все компоненты которого равны 1. Пусть $t^{(k)}$ – математическое ожидание длительности теста (объема выборки) при условии, что справедлива гипотеза H_k , $k \in \{0, 1\}$; α, β – фактические вероятности ошибок первого и второго рода для теста (5); $N = C_+ - C_-$;

$P^{(k)} = (p_{ij}^{(k)}) = \begin{pmatrix} \mathbf{I}_2 & \vdots & \mathbf{0}_{2 \times N} \\ \text{---} & \vdots & \text{---} \\ R^{(k)} & \vdots & Q^{(k)} \end{pmatrix}$ – $(N + 2) \times (N + 2)$ -матрица, в которой блоки $R^{(k)}, Q^{(k)}$ определены соотношениями

$$p_{ij}^{(k)} = \begin{cases} \sum_{u \in U} \delta_{J(u; \theta_0) - J(u; \theta_1), j-i} P(u; \theta_k), & i, j \in (C_-, C_+), \\ \sum_{u \in U} \mathbf{1}(C_- - i + J(u; \theta_1) - J(u; \theta_0)) P(u; \theta_k), & i \in (C_-, C_+), j = C_-, \\ \sum_{u \in U} \mathbf{1}(J(u; \theta_0) - J(u; \theta_1) + i - C_+) P(u; \theta_k), & i \in (C_-, C_+), j = C_+; \end{cases}$$

$$\pi^{(k)} = (\pi_i^{(k)}), \quad \pi_i^{(k)} = \sum_{u \in U} \delta_{J(u; \theta_0) - J(u; \theta_1), i} P(u; \theta_k), \quad i \in \{C_- + 1, \dots, C_+ - 1\};$$

$$\pi_{C_+}^{(k)} = \sum_{i \geq C_+} \sum_{u \in U} \delta_{J(u; \theta_0) - J(u; \theta_1), i} P(u; \theta_k), \quad \pi_{C_-}^{(k)} = \sum_{i \leq C_-} \sum_{u \in U} \delta_{J(u; \theta_0) - J(u; \theta_1), i} P(u; \theta_k);$$

$$S^{(k)} = \mathbf{I}_N - Q^{(k)}, \quad B^{(k)} = (S^{(k)})^{-1} R^{(k)}; \quad W_{(i)} - i\text{-й столбец матрицы } W.$$

Теорема 1. Если выполнены условия (1)–(3), справедлива гипотеза H_k , $u | S^{(k)} | \neq 0, k \in \{0, 1\}$, то для характеристик эффективности теста (4), (5) справедливы следующие выражения:

$$t^{(k)} = (\pi^{(k)})' (S^{(k)})^{-1} \mathbf{1}_N + 1, \quad \alpha = (\pi^{(0)})' B_{(2)}^{(0)} + \pi_{C_+}^{(0)}, \quad \beta = (\pi^{(1)})' B_{(1)}^{(1)} + \pi_{C_-}^{(1)}.$$

Доказательство основано на теории конечных цепей Маркова с поглощающими состояниями [7]. Достаточно заметить, что последовательность

$$\zeta_n = C_- \cdot \mathbf{1}_{(-\infty, C_-]}(\Lambda_n) + C_+ \cdot \mathbf{1}_{[C_+, +\infty)}(\Lambda_n) + \Lambda_n \cdot \mathbf{1}_{(C_-, C_+)}(\Lambda_n)$$

является однородной цепью Маркова с $N + 2$ состояниями, из которых два состояния (C_- и C_+) являются поглощающими. ■

Модель с произвольным распределением вероятностей независимых наблюдений. Пусть \bar{P}_θ , $\theta \in \Theta$, – фактическое распределение вероятностей каждого из независимых наблюдений $x_1, x_2, \dots \in U \subseteq \mathbb{R}$, которое может не совпадать с модельным распределением P_θ из-за искажений, о которых указано во введении.

Последовательный статистический тест вида (4), (5), основанный на функции

$$\lambda(u) = \log \frac{p_{\theta_1}(u)}{p_{\theta_0}(u)}, \quad u \in U, \quad (7)$$

обозначим $\delta_\lambda = (\tau_\lambda, d_\lambda)$, где $\tau_\lambda = \inf\{n : d_\lambda(n) \in \{0, 1\}\}$ – случайный момент останова теста. Пусть для этого теста

$$\alpha = \alpha(\delta_\lambda) = E_0 \{\bar{P}_0 \{d_\lambda = 1 | \tau_\lambda\}\}, \quad \beta = \beta(\delta_\lambda) = E_1 \{\bar{P}_1 \{d_\lambda = 0 | \tau_\lambda\}\} \quad (8)$$

– фактические значения вероятностей ошибок I и II рода соответственно, где $p_{\theta_0}(u)$, $p_{\theta_1}(u)$ – плотности распределения вероятностей наблюдений по некоторой мере на U при соответствующем значении параметра; $E_\theta \{\cdot\}$ – математическое ожидание по распределению \bar{P}_θ ;

$$t^{(k)} = t^{(k)}(\delta_\lambda) = E_k \{\tau_\lambda\}, \quad k \in \{0, 1\}, \quad (9)$$

– условное математическое ожидание случайного объема выборки τ_λ при верной гипотезе H_k .

Исследуем множество характеристик эффективности $\{\alpha(\delta_\lambda), \beta(\delta_\lambda), t_0(\delta_\lambda), t_1(\delta_\lambda)\}$ последовательного теста δ_λ . В теореме 1 получены точные выражения для характеристик эффективности (8), (9) теста (4), (5) в частном случае, когда функция $\lambda(\cdot)$ имеет решетчатое множество значений и отсутствуют искажения ($\bar{P}_\theta \equiv P_\theta$). В общем случае для теста δ_λ примем обозначения ($k = 0, 1$):

$$Q^{(k)} = (q_{ij}^{(k)}), \quad q_{ij}^{(k)} = \bar{P}_k \{\lambda(x_1) = j - i\}, \quad i, j \in \{C_- + 1, \dots, C_+ - 1\};$$

$$R^{(k)} = (r_{ij}^{(k)}), \quad i \in \{C_- + 1, \dots, C_+ - 1\}, \quad j = C_-, C_+;$$

$$r_{iC_-}^{(k)} = \bar{P}_k \{\lambda(x_1) \leq C_- - i\}, \quad r_{iC_+}^{(k)} = \bar{P}_k \{\lambda(x_1) \geq C_+ - i\};$$

$$\pi^{(k)} = (\pi_i^{(k)}), \quad \pi_i^{(k)} = \bar{P}_k \{\lambda(x_1) = i\}, \quad i \in \{C_- + 1, \dots, C_+ - 1\},$$

$$\pi_{C_-}^{(k)} = \bar{P}_k \{\lambda(x_1) \leq C_-\}, \quad \pi_{C_+}^{(k)} = \bar{P}_k \{\lambda(x_1) \geq C_+\}.$$

Как следует из теории конечных цепей Маркова [7], условие невырожденности $|S^{(k)}| \neq 0$ эквивалентно конечности теста: $\bar{P}_0\{\tau_\lambda < \infty\} = 1$, $\theta \in \Theta$. Известно [3], что это условие выполнено в случае независимых одинаково распределенных наблюдений, за исключением вырожденного случая, когда $\bar{P}_0\{\lambda(x_1) = 0\} = 1$, означающего, что значения параметров θ_0, θ_1 \bar{P}_0 -неразличимы.

Пусть $\lambda(x), \bar{\lambda}(x) : U \rightarrow \mathbb{R}$ – некоторые функции, $\delta_{\lambda}, \delta_{\bar{\lambda}}$ – последовательные тесты вида (4), (5), основанные на этих функциях, $\underline{\Lambda}_n = \sum_{t=1}^n \lambda(x_t)$, $\bar{\Lambda}_n = \sum_{t=1}^n \bar{\lambda}(x_t)$. Определим марковские моменты:

$$\begin{aligned} s_0 &= \inf\{n : \Lambda_n \leq C_-\}, \quad s_1 = \inf\{n : \Lambda_n \geq C_+\}; \\ \underline{s}_0 &= \inf\{n : \underline{\Lambda}_n \leq C_-\}, \quad \underline{s}_1 = \inf\{n : \underline{\Lambda}_n \geq C_+\}; \\ \bar{s}_0 &= \inf\{n : \bar{\Lambda}_n \leq C_-\}, \quad \bar{s}_1 = \inf\{n : \bar{\Lambda}_n \geq C_+\}. \end{aligned}$$

Обозначим: $\bar{\alpha} = \alpha(\delta_{\bar{\lambda}})$, $\bar{\beta} = \beta(\delta_{\bar{\lambda}})$, $\underline{\alpha} = \alpha(\delta_{\lambda})$, $\underline{\beta} = \beta(\delta_{\lambda})$; $Y = \{x \in U : \lambda(x) \in (C_- - C_+, C_+ - C_-)\}$.

Т е о р е м а 2. Пусть для последовательного статистического теста (4), (7), (5) функции $\lambda(\cdot), \bar{\lambda}(\cdot)$ удовлетворяют условиям:

$$\lambda(x) \leq \lambda(x) \leq \bar{\lambda}(x), \quad \forall x \in Y,$$

и

$$t^{(k)} < \infty, \quad t^{(k)}(\delta_{\bar{\lambda}}) < \infty, \quad t^{(k)}(\delta_{\lambda}) < \infty, \quad k = 0, 1.$$

Тогда

$$\underline{\alpha} \leq \alpha \leq \bar{\alpha}, \quad \bar{\beta} \leq \beta \leq \underline{\beta}; \tag{10}$$

и если $\bar{\alpha} - \underline{\alpha} \rightarrow 0$, $\bar{\beta} - \underline{\beta} \rightarrow 0$, то имеют место следующие асимптотические разложения:

$$t_{\pm}^{(k)} \leq t^{(k)} \leq t_{\pm}^{(k)}, \quad k = 0, 1; \quad t_{\pm}^{(k)} = T_{\pm}^{(k)} + o(1),$$

где

$$\begin{aligned} T_{-}^{(0)} &= \bar{\alpha} E_0\{\bar{s}_1 | \bar{s}_1 < \bar{s}_0\} + (1 - \bar{\alpha}) E_0\{\underline{s}_0 | \underline{s}_0 < \underline{s}_1\}, \quad T_{+}^{(0)} = \underline{\alpha} E_0\{\underline{s}_1 | \underline{s}_1 < \underline{s}_0\} + (1 - \underline{\alpha}) E_0\{\bar{s}_0 | \bar{s}_0 < \bar{s}_1\}; \\ T_{+}^{(1)} &= \underline{\beta} E_1\{\underline{s}_0 | \underline{s}_0 < \underline{s}_1\} + (1 - \underline{\beta}) E_0\{\bar{s}_1 | \bar{s}_1 < \bar{s}_0\}, \quad T_{-}^{(1)} = \bar{\beta} E_1\{\bar{s}_0 | \bar{s}_0 < \bar{s}_1\} + (1 - \bar{\beta}) E_1\{\underline{s}_1 | \underline{s}_1 < \underline{s}_0\}. \end{aligned}$$

Д о к а з а т е л ь с т в о состоит в анализе соотношений между введенными марковскими моментами и событиями, связанными с этими моментами. Используются также свойства математического ожидания. ■

Вопросы сходимости верхней и нижней границ в (10) рассмотрены в [9].

Результат теоремы 2 можно использовать в сочетании с результатом теоремы 1 не только для анализа эффективности последовательных тестов проверки параметрических гипотез, но и при анализе робастности (устойчивости теста к малым отклонениям фактической модели наблюдений от гипотетической) в случае «выбросов» в наблюдениях и ошибок спецификации гипотетических значений параметра.

Модель наблюдений, образующих цепь Маркова. Пусть наблюдается однородная цепь Маркова x_1, x_2, \dots , принимающая значения из конечного множества $V = \{0, 1, \dots, M - 1\}$, $2 \leq M < \infty$, с вектором вероятностей начальных состояний $\pi = (\pi_i)$, $i \in V$, и матрицей вероятностей одношаговых переходов $P = (p_{ij})$, $i, j \in V$, соответственно:

$$P\{x_1 = i\} = \pi_i, \quad P\{x_n = j | x_{n-1} = i\} = p_{ij}, \quad i, j \in V.$$

Относительно значений параметров цепи Маркова имеются гипотезы

$$H_0 : \pi = \pi^{(0)}, P = P^{(0)}, \quad H_1 : \pi = \pi^{(1)}, P = P^{(1)},$$

где $\pi^{(0)} = (\pi_i^{(0)})$, $\pi^{(1)} = (\pi_i^{(1)})$ – заданные значения вектора начальных вероятностей, $P^{(0)} = (p_{ij}^{(0)}) \neq P^{(1)} = (p_{ij}^{(1)})$ – заданные матрицы вероятностей одношаговых переходов для соответствующих гипотез.

Обозначим:

$$\lambda_1 = \log \frac{\pi_{x_1}^{(1)}}{\pi_{x_1}^{(0)}}, \lambda_k = \log \frac{P_{x_{k-1}, x_k}^{(1)}}{P_{x_{k-1}, x_k}^{(0)}}, k > 1; \Lambda_n = \sum_{k=1}^n \lambda_k, n \in \mathbb{N}. \quad (11)$$

Аналогично (5) построим последовательный тест проверки гипотез H_0, H_1 , согласно которому при заданных порогах $C_-, C_+ \in \mathbb{R}, C_- < 0, C_+ > 0$, гипотеза H_0 принимается после n наблюдений, если $\Lambda_n \leq C_-$, гипотеза H_1 принимается, если $\Lambda_n \geq C_+$, иначе процедура проверки продолжается, то есть выполняется $(n + 1)$ -е наблюдение. Последовательность случайных векторов $(\Lambda_n, x_n)'$, $n \in \mathbb{N}$, является цепью Маркова. В самом деле, в силу определения $\Lambda_n, n \in \mathbb{N}$, а также в силу марковости $x_n, n \in \mathbb{N}$, условное распределение зависит лишь от ближайшей предыстории $(\Lambda_{n-1}, x_{n-1})'$:

$$P\{\Lambda_n, x_n \mid \Lambda_{n-1}, \Lambda_{n-2}, \dots, \Lambda_1, x_{n-1}, x_{n-2}, \dots, x_1\} = P\{\Lambda_n, x_n \mid \Lambda_{n-1}, x_{n-1}\}.$$

Пусть $\pi^{(0)}, P^{(0)}, \pi^{(1)}, P^{(1)}$ таковы, что существуют числа $a \in \mathbb{R}, m_i, m_{ij} \in \mathbb{Z}, i, j \in V$, такие что

$$\log \frac{\pi_i^{(1)}}{\pi_i^{(0)}} = m_i a, \log \frac{P_{ij}^{(1)}}{P_{ij}^{(0)}} = m_{ij} a.$$

Пусть для теста (4), (11), (5) пороги $C_-, C_+ \in \mathbb{Z}$, и введем следующие обозначения: $t^{(k)}$ – ожидаемая длина наблюдаемой последовательности до момента принятия одной из гипотез при условии, что справедлива гипотеза $H_k, k \in \{0, 1\}$; α, β – вероятности ошибок первого и второго рода;

$$W^{(k)} = (w_{ij}^{(k)}) = \begin{pmatrix} \mathbf{I}_2 & \vdots & \mathbf{0}_{2 \times MN} \\ \text{---} & \vdots & \text{---} \\ R^{(k)} & \vdots & Q^{(k)} \end{pmatrix} -$$

$(MN + 2)(MN + 2)$ -матрица, блоки $R^{(k)}, Q^{(k)}$ которой определены поэлементно следующими соотношениями ($s, t \in V$):

$$w_{Mi+s, Mj+t}^{(k)} = \delta_{m_{st}, j-i} P_{st}^{(k)}, i, j \in (C_-, C_+),$$

$$w_{Mi+s, Mj+t}^{(k)} = \begin{cases} \sum_{t \in V} \mathbf{1}(i + m_{st} - C_+), j = C_+, i \in (C_-, C_+), \\ \sum_{t \in V} \mathbf{1}(C_- - i - m_{st}), j = C_-, i \in (C_-, C_+); \end{cases} \quad (12)$$

$$S^{(k)} = \mathbf{I}_{MN} - Q^{(k)}, B^{(k)} = (S^{(k)})^{-1} R^{(k)}, k \in \{0, 1\};$$

$$\omega^{(k)} = (\omega_i^{(k)}), i \in \{MC_- + 1, \dots, MC_+ - 1\};$$

$$\omega_{Mi+s}^{(k)} = \delta_{m_s, i} \pi_s^{(k)}, i \in (C_-, C_+), s \in V, \quad (13)$$

$$\omega_{MC_-}^{(k)} = \sum_{s \in V} \mathbf{1}(C_- - m_s) \pi_s^{(k)}, \omega_{MC_+}^{(k)} = \sum_{s \in V} \mathbf{1}(m_s - C_+) \pi_s^{(k)}. \quad (14)$$

Т е о р е м а 3. Если имеет место сформулированная выше модель наблюдений, причем $|S^{(k)}| \neq 0, k \in \{0, 1\}$, то для характеристик последовательного теста (4), (11), (5) справедливы следующие выражения:

$$t^{(k)} = (\omega^{(k)})' (S^{(k)})^{-1} \mathbf{1}_{MN} + 1, \alpha = (\omega^{(0)})' B_{(2)}^{(0)} + \omega_{MC_+}^{(0)}, \beta = (\omega^{(1)})' B_{(1)}^{(1)} + \omega_{MC_-}^{(1)}.$$

Д о к а з а т е л ь с т в о состоит в применении теории поглощающих цепей Маркова [7] к последовательности

$$\xi_n = MC_- \cdot \mathbf{1}_{(-\infty, C_-]} \left(\frac{\Lambda_n}{a} \right) + MC_+ \cdot \mathbf{1}_{[C_+, +\infty)} \left(\frac{\Lambda_n}{a} \right) + \left(\frac{\Lambda_n}{a} M + x_n \right) \cdot \mathbf{1}_{(C_-, C_+)} \left(\frac{\Lambda_n}{a} \right), n \in \mathbb{N},$$

являющейся однородной цепью Маркова с $MN + 2$ состояниями, из них два состояния ($\xi_n = MC_-$ и $\xi_n = MC_+$) являются поглощающими. При этом матрица вероятностей одношаговых переходов задана (12), а вектор вероятностей начальных состояний – соотношениями (13), (14). ■

С помощью метода, аналогичного представленному в теореме 2 для случая независимых наблюдений, в случае наблюдений, образующих цепь Маркова, вычисляются характеристики эффективности последовательного теста, когда сделанные предположения о решетчатости распределения вероятностей приращений статистики Λ_n не выполняются.

Теорема 3 может быть также использована для анализа робастности [10] последовательного статистического теста при отклонениях фактических значений параметров (π, P) от гипотетических.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке ГПНИ «Конвергенция-2020».

Acknowledgements. The research is supported by the State Research Program «Convergence-2020».

Список использованных источников

1. Wald, A. *Sequential analysis* / A. Wald. – New York: John Wiley and Sons, 1947. – 212 p.
2. Mukhopadhyay, N. *Applied Sequential Methodologies* / N. Mukhopadhyay, S. Datta, S. Chattopadhyay. – New York: Marcel Dekker, 2004. – 452 p.
3. *Handbook of Sequential Analysis* / ed. by B. Ghosh, P. K. Sen. – New York: Marcel Dekker, 1991. – 637 p.
4. Lai, T. *Sequential analysis: Some classical problems and new challenges* / T. Lai // *Statistica Sinica*. – 2001. – Vol. 11. – P. 303–408.
5. Huber, P. *Robust Statistics* / P. Huber, E. Ronchetti. – New York: Wiley, 2009. doi.org/10.1002/9780470434697
6. Kharin, A. *Robustness analysis for Bayesian sequential testing of composite hypotheses under simultaneous distortion of priors and likelihoods* / A. Kharin // *Austrian Journal of Statistics*. – 2011. – Vol. 40. – P. 65–73.
7. Kemeny, J. G. *Finite Markov Chains* / J. G. Kemeny, J. L. Snell. – New York: Springer, 1960. – 210 p.
8. Харин, А. Ю. Об одном подходе к анализу последовательного критерия отношения правдоподобия для различения простых гипотез / А. Ю. Харин // *Вестник Белорусского государственного университета. Сер. физ.-мат. наук.* – 2002. – № 1. – С. 92–96.
9. Харин, А. Ю. Робастность байесовских и последовательных статистических решающих правил / А. Ю. Харин. – Минск: БГУ, 2013. – 207 с.
10. Kharin, A. Y. *Performance and robustness evaluation in sequential hypotheses testing* / A. Y. Kharin // *Communications in Statistics – Theory and Methods*. – 2016. – Vol. 45(6). – P. 1663–1709.

References

1. Wald A. *Sequential analysis*. New York, John Wiley and Sons, 1947. 212 p.
2. Mukhopadhyay N., Datta S., Chattopadhyay S. *Applied Sequential Methodologies*. New York, Marcel Dekker, 2004. 452 p.
3. Ghosh B., Sen P. K. (eds.) *Handbook of Sequential Analysis*. New York, Marcel Dekker, 1991. 637 p.
4. Lai T. *Sequential analysis: Some classical problems and new challenges*. *Statistica Sinica*, 2001, vol. 11, pp. 303–408.
5. Huber P., Ronchetti E. *Robust Statistics*. New York, Wiley, 2009. doi.org/10.1002/9780470434697
6. Kharin A. *Robustness analysis for Bayesian sequential testing of composite hypotheses under simultaneous distortion of priors and likelihoods*. *Austrian Journal of Statistics*, 2011, vol. 40, pp. 65–73.
7. Kemeny J. G., Snell J. L. *Finite Markov Chains*. New York, Springer, 1960. 210 p.
8. Kharin A. Y. *An approach to performance analysis of the sequential probability ratio test for the simple hypotheses testing*. *Vestnik Belorusskogo Gosudarstvennogo Universiteta. Seriya fiziko-matematicheskikh nauk = Proceedings of the Belarusian State University. Physics and Mathematics Sciences*, 2002, vol. 1, pp. 92–96 (in Russian).
9. Kharin A. Yu. *Robustness of Bayesian and sequential statistical decision rules*. Minsk, Belarusian State University, 2013. 207 p. (in Russian).
10. Kharin A. Y. *Performance and robustness evaluation in sequential hypotheses testing*. *Communications in Statistics – Theory and Methods*, 2016, vol. 45, no. 6, pp. 1663–1709.

Информация об авторе

Харин Алексей Юрьевич – канд. физ.-мат. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: KharinAY@bsu.by.

Information about the author

Kharin Alexey Yur'evich – Ph. D. (Physics and Mathematics), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: KharinAY@bsu.by.

М. М. Васьковский, Н. В. Кондратёнок, Н. П. Прохоров

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

АНАЛОГ ТЕСТА СОЛОВЕЯ–ШТРАССЕНА В КВАДРАТИЧНЫХ ЕВКЛИДОВЫХ КОЛЬЦАХ

(Представлено академиком Н. А. Изобовым)

Аннотация. В произвольных квадратичных евклидовых кольцах построен аналог теста Соловея–Штрассена. Доказано, что построенный аналог теста Соловея–Штрассена позволяет показать, что число N является составным с вероятностью не менее 0,5 за полиномиальное время относительно битовой длины числа N . В тесте Соловея–Штрассена ключевую роль играет вычисление символа Якоби. В работе построен эффективный алгоритм для его вычисления в квадратичных факториальных кольцах. Ключевой идеей доказательства является сведение символа Якоби в квадратичных факториальных кольцах к символу Якоби в целых числах.

Ключевые слова: евклидово кольцо, простые числа, символ Якоби, тест на простоту

Для цитирования: Васьковский, М. М. Аналог теста Соловея–Штрассена в квадратичных евклидовых кольцах / М. М. Васьковский, Н. В. Кондратёнок, Н. П. Прохоров // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 28–32.

Maksim M. Vaskouski, Nikita V. Kondratyionok, Nikolai P. Prochorov

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

ANALOGUE OF THE SOLOVAY–STRASSEN PRIMALITY TEST IN QUADRATIC EUCLIDEAN DOMAINS

(Communicated by Academician Nikolai A. Izobov)

Abstract. An analogue of the Solovay–Strassen primality test in general quadratic Euclidean domains is obtained. We prove that the obtained primality test allows us to prove that N is composite and has a probability of no less than 0.5 in polynomial time with respect to a bit size of the number N . The main part of the Solovay–Strassen primality test analogue is the calculation of the Jacobi symbol. The efficient algorithm for its computing in quadratic unique factorization domains is constructed. The main idea of the proof is to reduce the Jacobi symbol to that in integers.

Keywords: Euclidean domain, primes, Jacobi symbol, primality test

For citation: Vaskouski M. M., Kondratyionok N. V., Prochorov N. P. Analogue of the Solovay–Strassen primality test in quadratic Euclidean domains. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 28–32 (in Russian).

Многие криптосистемы с открытым ключом (RSA, Рабина, Блюма–Гольдвассер и др.) используют в качестве ключей большие простые числа [1, гл. 14, 15]. В связи с этим возникает необходимость строить эффективные алгоритмы тестирования чисел на простоту. В основе любого алгоритма тестирования на простоту лежит некоторый критерий простоты числа. Проверка всех условий критерия простоты гарантирует достоверное знание, является ли число простым, но без предположения о справедливости расширенной гипотезы Римана требует, как правило, экспоненциального числа операций относительно длины числа (в том числе тесты Соловея–Штрассена и Миллера–Рабина [2, гл. 5; 3, гл. 2]). На практике проверяют лишь часть условий критерия, что даёт возможность с некоторой положительной вероятностью доказать, что число является составным. Тест Соловея–Штрассена основан на следующем критерии Эйлера простоты: «натуральное число $n > 1$ является простым тогда и только тогда, когда для любого целого a , взаимно простого с n , выполняется сравнение $a^{(n-1)/2} \equiv \left(\frac{a}{n}\right) \pmod{n}$ » и позволяет с вероятностью не менее 0,5 доказать, что число является составным, за полиномиальное время относительно длины

числа n время. Отметим, что в [4–6] построен и исследован аналог RSA-криптосистемы в квадратичных факториальных кольцах, доказана возможность эффективной реализации в квадратичных евклидовых кольцах, а в [5] доказаны аналоги критериев Эйлера и Миллера в квадратичных факториальных кольцах, предложена эффективная реализация аналога теста Миллера–Рабина в мнимых квадратичных евклидовых кольцах.

Цель работы – построение аналога теста Соловея–Штрассена в произвольных квадратичных евклидовых кольцах. В первом параграфе мы построим эффективный алгоритм вычисления символа Якоби в квадратичных евклидовых кольцах. Во втором параграфе, опираясь на аналог критерия Эйлера [5] и эффективный алгоритм вычисления символа Якоби, мы получаем аналог теста Соловея–Штрассена тестирования простоты в квадратичных евклидовых кольцах, позволяющий доказать, что число N является составным с вероятностью не менее 0,5 за полиномиальное число двоичных операций относительно битовой длины N .

Пусть $m \neq 1$ – целое число, свободное от квадратов. Обозначим через O_K кольцо целых алгебраических элементов квадратичного поля $K = \mathbb{Q}(\sqrt{m})$. Пусть $\omega = \sqrt{m}$, если $m \equiv 2,3 \pmod{4}$, и $\omega = \frac{1 + \sqrt{m}}{2}$, если $m \equiv 1 \pmod{4}$, а $\text{disk}(K) = (\omega - \bar{\omega})^2$ – дискриминант поля K , где $\bar{\omega}$ – сопряженное к ω . Будем предполагать, что O_K – факториальное кольцо. Известно, что $O_K = \mathbb{Z} \oplus \mathbb{Z}[\omega]$ [7, с. 44]. Обозначим через O_K^\times множество всех обратимых элементов O_K с нулем. Пусть $a + b\sqrt{m} \in O_K$, через $Nm(a + b\sqrt{m}) = a^2 - mb^2$ обозначим норму в O_K , обозначим $\left| a + b\sqrt{m} \right|_m = a^2 + m/b^2$. Элемент $a \in O_K$ называется простым, если для любого представления $a = pq$, $p, q \in O_K$, хотя бы одно из чисел p, q обратимо в мультипликативной группе кольца O_K . Пусть \mathcal{P}_K множество всех простых элементов O_K . Обозначим $\mathcal{P}_{1,K} = \{p \in \mathcal{P}_K \mid Nm(p) = \pm 2 \text{ или } p = 2\varepsilon, \varepsilon \in O_K^\times\}$. Для каждого $N \in O_K \setminus O_K^\times$ обозначим через $O_{K,N}$ и $O_{K,N}^\times$ аддитивную группу вычетов по модулю N и мультипликативную группу вычетов по модулю N соответственно.

Для простого числа $p \in O_K$ с нечетной нормой и $a \in O_K$, взаимно простого с p , определяем символ Лежандра $\left[\frac{a}{p} \right]$ равным 1, если в кольце O_K разрешимо сравнение $x^2 \equiv a \pmod{p}$, и равным -1 в противном случае. Для любого $N \in O_K$ с нечетной нормой и $a \in O_K$, взаимно простого с N , определяем символ Якоби $\left[\frac{a}{N} \right]$ как произведение символов Лежандра $\prod_{k=1}^n \left[\frac{a}{p_k} \right]$, где $N = \prod_{k=1}^n p_k$, p_k – простые числа кольца O_K (полагаем $\left[\frac{a}{N} \right] = 1$, если N – обратимый элемент кольца O_K). Для взаимно простых нечетного $b \in \mathbb{Z}$ и целого $a \in \mathbb{Z}$ через $\left(\frac{a}{b} \right)$ будем обозначать символ Якоби в кольце \mathbb{Z} .

Эффективный алгоритм вычисления символа Якоби.

Предложение 1. Пусть $a \in O_K$, $\beta \in \mathbb{Z}$ взаимно простые. Если β нечетное, то $\left[\frac{\alpha}{\beta} \right] = \left(\frac{Nm(\alpha)}{\beta} \right)$; если $Nm(\alpha)$ нечетное, то $\left[\frac{\beta}{\alpha} \right] = \left(\frac{\beta}{Nm(\alpha)} \right)$.

Доказательство. Пусть $\alpha = \prod_{k=1}^n p_k$, $\beta = \prod_{j=1}^m q_j$, p_k – простые числа кольца O_K либо элементы O_K^\times , q_j – простые числа кольца \mathbb{Z} либо ± 1 , тогда $\left[\frac{\alpha}{\beta} \right] = \prod_{j=1}^m \prod_{k=1}^n \left[\frac{p_k}{q_j} \right]$, $\left[\frac{\beta}{\alpha} \right] = \prod_{j=1}^m \prod_{k=1}^n \left[\frac{q_j}{p_k} \right]$. В силу мультипликативности нормы в кольце O_K достаточно доказать, что для любых k, j выполняются равенства $\left[\frac{p_k}{q_j} \right] = \left(\frac{Nm(p_k)}{q_j} \right)$, $\left[\frac{q_j}{p_k} \right] = \left(\frac{q_j}{Nm(p_k)} \right)$. Не нарушая общности, можно считать, что q_j из первого равенства и p_k из второго равенства не являются обратимыми соответственно в \mathbb{Z} и O_K .

Докажем второе равенство. Согласно критерию Эйлера [5], имеем $\left[\frac{q_j}{p_k} \right] = q_j^{\frac{Nm(p_k)-1}{2}} \pmod{p_k}$.

Если $p_k \in \mathbb{Z}$, то $Nm(p_k) = p_k \bar{p}_k$ является простым числом в \mathbb{Z} [5] и тогда по критерию Эйлера

$\left(\frac{q_j}{Nm(p_k)}\right) \equiv q_j^{\frac{Nm(p_k)-1}{2}} \pmod{p_k \bar{p}_k}$. Если $\left(\frac{q_j}{Nm(p_k)}\right) = 1$, то $q_j^{\frac{Nm(p_k)-1}{2}} \equiv 1 \pmod{p_k}$, т. е. $\left[\frac{q_j}{p_k}\right] = 1$. Если $\left(\frac{q_j}{Nm(p_k)}\right) = -1$, то $q_j^{\frac{Nm(p_k)-1}{2}} \equiv -1 \pmod{p_k}$ и тогда $\left[\frac{q_j}{p_k}\right] = -1$. Предположим, что $p_k \in \mathbb{Z}$, тогда $\left(\frac{q_j}{Nm(p_k)}\right) = \left(\frac{q_j}{p_k^2}\right) = 1$ и $\left[\frac{q_j}{p_k}\right] \equiv q_j^{\frac{p_k-1}{2}} = \left(q_j^{\frac{p_k+1}{2}}\right)^{p_k-1} \equiv 1 \pmod{p_k}$ в силу малой теоремы Ферма.

Докажем первое равенство. Предположим, что q_j является простым в O_K , тогда из [7, предложения 2.1 и 2.21] вытекает справедливость равенства $p_k^{q_j} \equiv \bar{p}_k \pmod{q_j}$. Согласно критерию Эйлера, имеем $\left[\frac{p_k}{q_j}\right] \equiv p_k^{\frac{q_j-1}{2}} \pmod{q_j}$, $\left(\frac{Nm(p_k)}{q_j}\right) \equiv (p_k \bar{p}_k)^{\frac{q_j-1}{2}} \pmod{q_j}$. Таким образом, $\left[\frac{p_k}{q_j}\right] \equiv \left(\frac{Nm(p_k)}{q_j}\right) \pmod{q_j}$, и как следствие $\left[\frac{p_k}{q_j}\right] = \left(\frac{Nm(p_k)}{q_j}\right)$. Предположим, что q_j не является простым в O_K . Если $q_j = q^2$, где q – некоторое простое в O_K , то согласно [7, предложение 2.1] выполняется $q_j \mid \text{disk}(K)$, и как следствие $q_j \mid m$. Пусть $p_k = a + b\sqrt{m}$, тогда $4Nm(p_k) \equiv (2a)^2 \pmod{q_j}$. Поэтому $\left(\frac{Nm(p_k)}{q_j}\right) = 1 = \left[\frac{p_k}{q}\right] \left[\frac{p_k}{q}\right] = \left[\frac{p_k}{q}\right]$. Остаётся рассмотреть случай $q_j = q\bar{q}$ для некоторого простого $q \in O_K$. Используя уже доказанное второе равенство настоящего предложения, имеем

$$\left[\frac{p_k}{q_j}\right] = \left[\frac{p_k}{q}\right] \left[\frac{p_k}{\bar{q}}\right] = \left[\frac{p_k}{q}\right] \left[\frac{\bar{p}_k}{q}\right] = \left[\frac{Nm(p_k)}{q}\right] = \left(\frac{Nm(p_k)}{Nm(q)}\right) = \left(\frac{Nm(p_k)}{q_j}\right).$$

Предложение доказано.

Т е о р е м а 1. Для любых взаимно простых $\alpha = a + b\omega$, $\beta = c + d\omega \in O_K$, таких, что $|Nm(\beta)|$ нечетно и больше 1, выполняется равенство $\left[\frac{\alpha}{\beta}\right] = \left(\frac{Nm(\alpha)}{g}\right) \left(\frac{d_1^2 a - bc_1 d_1}{Nm(\beta_1)}\right)$, где $\beta_1 = \beta / g$, $c_1 = c / g$, $d_1 = d / g$, $g = (c, d) \in \mathbb{N}$.

Д о к а з а т е л ь с т в о. Докажем, что $(d_1, \beta_1) = 1$. Предположим противное, т. е. существует простое $p \in O_K$ такое, что $p \mid d_1$, $p \mid \beta_1 = c_1 + d_1\omega$. Если $p \in \mathbb{Z}$, то $p \mid c_1$, что противоречит условию $(c_1, d_1) = 1$. Следовательно, $p \in O_K \setminus \mathbb{Z}$. Отсюда вытекает, что $p_1 = Nm(p)$ делит d_1 и делит $Nm(\beta_1) = c_1^2 + c_1 d_1(\omega + \bar{\omega}) + d_1^2 \omega \bar{\omega}$. Так как p_1 простое в \mathbb{Z} , то p_1 делит c_1 , что противоречит условию $(c_1, d_1) = 1$.

Используя предложение 1, получаем

$$\left[\frac{\alpha}{\beta}\right] = \left[\frac{\alpha}{g}\right] \left[\frac{\alpha}{\beta_1}\right] = \left(\frac{Nm(\alpha)}{g}\right) \left[\frac{a + b\omega}{c_1 + d_1\omega}\right] = \left(\frac{Nm(\alpha)}{g}\right) \left[\frac{d_1}{\beta_1}\right] \left[\frac{d_1 a + d_1 b\omega}{c_1 + d_1\omega}\right] = \left(\frac{Nm(\alpha)}{g}\right) \left[\frac{d_1}{\beta_1}\right] \left[\frac{d_1 a - c_1 b}{\beta_1}\right] = \left(\frac{Nm(\alpha)}{g}\right) \left[\frac{d_1^2 a - d_1 c_1 b}{\beta_1}\right] = \left(\frac{Nm(\alpha)}{g}\right) \left(\frac{d_1^2 a - bc_1 d_1}{Nm(\beta_1)}\right),$$

что и требовалось доказать.

Теперь сформулируем алгоритм вычисления символа Якоби $\left[\frac{\alpha}{\beta}\right]$ для взаимно простых $\alpha = a + b\omega$, $\beta = c + d\omega \in O_K$, таких, что $|Nm(\beta)|$ нечетное и больше 1.

А л г о р и т м 1. Входные данные: $\alpha = a + b\omega$, $\beta = c + d\omega \in O_K$ такие, что $|Nm(\beta)|$ нечетное и больше 1. Выходные данные: значение символа Якоби $\left[\frac{\alpha}{\beta}\right]$.

Шаг 1. Вычислить $g = (c, d)$, $A = Nm(\alpha)$, $B = Nm(\beta_1)$, $C = d_1^2 a - bc_1 d_1$, где $\beta_1 = \frac{\beta}{g} = c_1 + d_1\omega$.

Шаг 2. Вычислить значение символа Якоби $\left[\frac{\alpha}{\beta}\right]$ по формуле $\left[\frac{\alpha}{\beta}\right] = \left(\frac{A}{g}\right)\left(\frac{C}{B}\right)$, используя алгоритм вычисления символа Якоби в кольце целых чисел.

З а м е ч а н и е 1. Корректность работы алгоритма вытекает из теоремы 1, при этом временная сложность алгоритма 1 определяется сложностью алгоритма Евклида и алгоритма вычисления символа Якоби в кольце целых чисел, т. е. составляет $O(\log^2 N)$ двоичных операций, где $|\alpha|_m \leq N, |\beta|_m \leq N$.

Аналог теста Соловея–Штрассена в кольце O_K . В дальнейшем будем предполагать, что кольцо O_K является евклидовым относительно нормы $Nm(a) = a\bar{a}$.

Предложение 2 [6]. Если кольцо O_K является евклидовым, то операции сложения, умножения, деления с остатком в кольце O_K имеют такую же сложность, как и в кольце целых чисел, т. е. для любого натурального N и любых $a, b \in O_K, |a|_m \leq N, |b|_m \leq N$, любая из указанных операций над числами a, b может быть выполнена за $O(f(N))$ битовых операций, где $f(n)$ – оценка числа битовых операций, необходимых для выполнения аналогичной операции в кольце целых чисел над любыми числами $c, d \in \mathbb{Z}, |c| \leq \sqrt{N}, |d| \leq \sqrt{N}$.

Предложение 3 [5]. Пусть $N \in O_K \setminus O_K^\times$ не делится ни на какое простое $p \in \mathcal{P}_{1,K}$. Число N является простым в O_K тогда и только тогда, когда для любого $a \in O_{K,N}^\times$ выполняется сравнение

$$a^{\frac{|Nm(N)|-1}{2}} \equiv \left[\frac{a}{N}\right] \pmod{N}.$$

З а м е ч а н и е 2. Число $N \in O_K \setminus O_K^\times$ будем называть псевдопростым по основанию $a \in O_{K,N}^\times$, если выполняется сравнение из предложения 3. Легко видеть, что множество $H_{K,N}$ всех $a \in O_{K,N}^\times$, для которых N является псевдопростым по основанию a , образует подгруппу группы $O_{K,N}^\times$. Если $N \in O_K \setminus O_K^\times$ не является простым, то из предложения 3 вытекает, что $H_{K,N}$ – собственная подгруппа группы $O_{K,N}^\times$ и согласно теореме Лагранжа выполняется неравенство $|H_{K,N}| \leq |O_{K,N}^\times| / 2$.

Следующий алгоритм является аналогом теста Соловея–Штрассена в кольце O_K .

А л г о р и т м 2 (проверка простоты в кольце O_K). Входные данные: число $N \in O_K \setminus O_K^\times$.

Шаг 1. Проверить наличие делителей из $\mathcal{P}_{1,K}$ числа N .

Если $Nm(N)$ нечетно, то делителей из $\mathcal{P}_{1,K}$ нет, в этом случае перейти к шагу 2.

Если $Nm(N)$ четно и $|Nm(N)| > 4$, то ответ: « N – составное».

Если $|Nm(N)| = 4$ и $\text{disk}(K) \equiv 5 \pmod{8}$, то ответ: « N – простое».

Если $|Nm(N)| = 4$ и $\text{disk}(K) \not\equiv 5 \pmod{8}$, то ответ: « N – составное».

Если $|Nm(N)| = 2$, то ответ: « N – простое».

Шаг 2. Выбрать случайное $a \in O_{K,N}^\times$ и вычислить $(a, N) = d$.

Если $|Nm(d)| > 1$, то ответ: « N – составное».

Если $|Nm(d)| = 1$, то проверить справедливость сравнения $a^{\frac{|Nm(N)|-1}{2}} \equiv \left[\frac{a}{N}\right] \pmod{N}$.

Если данное сравнение не выполняется, то ответ: « N – составное». В противном случае ответ: «неизвестно» и необходимо повторить шаг 2 алгоритма с другим значением a .

Корректность работы алгоритма вытекает из [7, предложение 2.1] и предложения 3, а из замечания 2 вытекает справедливость следующей теоремы.

Т е о р е м а 2. Пусть $N \in O_K$ – составное число, тогда разовое применение алгоритма 2 дает ответ « N – составное» с вероятностью не менее 0,5.

Т е о р е м а 3. Временная сложность алгоритма 2 составляет $O(\log^3 |N|_m)$ двоичных операций.

Д о к а з а т е л ь с т в о. Из предложения 2 вытекает, что $a^{\frac{|Nm(N)|-1}{2}} \pmod{N}$ можно найти с помощью бинарного алгоритма возведения в степень за $O(\log^3 |N|_m)$ двоичных операций.

Так как кольцо O_K является евклидовым, то существует постоянная $\alpha_K < 1$ такая, что для любых $a, b \in O_K$ найдутся $q, r \in O_K$, удовлетворяющие условиям $a = bq + r$ и $|Nm(r)| \leq \alpha_K |Nm(b)|$ [6; 8]. Отсюда и из предложения 2 вытекает, что наибольший общий делитель (a, N) можно найти

с помощью алгоритма Евклида за $O(\log^3|N|_m)$ двоичных операций. Согласно замечанию 1 символ Якоби $\left[\frac{a}{N}\right]$ можно вычислить за $O(\log^2|N|_m)$ двоичных операций. Таким образом, сложность алгоритма 2 составляет $O(\log^3|N|_m)$ двоичных операций, что и требовалось доказать.

Список использованных источников

1. Криптология / Ю. С. Харин [и др.]. – Минск: БГУ, 2013. – 511 с.
2. Введение в теоретико-числовые методы криптографии / М. М. Глухов [и др.]. – СПб.: Лань, 2011. – 401 с.
3. Kranakis, E. *Primality and cryptography* / E. Kranakis. – New Haven: Yale University, 1986. – 235 p.
4. Vaskouski, M. Analogue of the RSA-cryptosystem in quadratic unique factorization domains / M. Vaskouski, N. Kondratyونok // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2015. – Vol. 59, N 5. – P. 18–23.
5. Vaskouski, M. Primes in quadratic unique factorization domains / M. Vaskouski, N. Kondratyонok, N. Prochorov // J. Number Theory. – 2016. – Vol. 168. – P. 101–116. doi.org/10.1016/j.jnt.2016.04.022
6. Васьковский, М. М. Полиномиальная эквивалентность вычисления функции Эйлера RSA-модуля и поиска секретного ключа в квадратичных евклидовых кольцах / М. М. Васьковский // CSIST'16. Международный конгресс по информатике: Информационные системы и технологии: материалы международного конгресса. – Минск: БГУ, 2016. – С. 427–430.
7. Lemmermeyer, F. *Reciprocity laws: from Euler to Eisenstein* / F. Lemmermeyer. – Springer, 2000. – 514 p.
8. Vaskouski, M. Shortest division chains in unique factorization domains / M. Vaskouski, N. Kondratyонok // J. Symbolic Computation. – 2016. – Vol. 77. – P. 175–188. doi.org/10.1016/j.jsc.2016.02.003

References

1. Kharin Yu. S., Agievich S. V., Vasil'ev D. V., Matveev G. V. *Cryptology*. Minsk, Belarusian State University, 2013. 511 p. (in Russian).
2. Glukhov M. M., Kruglov I. A., Pichkur A. B., Cheremushkin A. V. *Introduction to number theoretical methods in cryptography*. Saint-Petersburg, Lan' Publ., 2011. 401 p. (in Russian).
3. Kranakis E. *Primality and cryptography*. New Haven, Yale University, 1986. 235 p.
4. Vaskouski M., Kondratyонok N. Analogue of the RSA-cryptosystem in quadratic unique factorization domains. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 5, pp. 18–23. (in Russian).
5. Vaskouski M., Kondratyонok N., Prochorov N. Primes in quadratic unique factorization domains. *Journal of Number Theory*, 2016, vol. 168, pp. 101–116. doi.org/10.1016/j.jnt.2016.04.022
6. Vaskouski M. M. Polynomial equivalence of computing Euler's function from RSA modulus and searching for private key in Euclidean quadratic domains. *CSIST'16. Mezhdunarodnyi kongress po informatike: Informatsionnye sistemy i tekhnologii: materialy mezhdunarodnogo kongressa* [CSIST'16. International congress on computer science: information systems and technologies: Proceedings of the International Scientific Congress]. Minsk, Belarusian State University, 2016, pp. 427–430 (in Russian).
7. Lemmermeyer F. *Reciprocity laws: from Euler to Eisenstein*. Springer, 2000. 514 p.
8. Vaskouski M., Kondratyонok N. Shortest division chains in unique factorization domains. *Journal of Symbolic Computation*, 2016, vol. 77, pp. 175–188. doi.org/10.1016/j.jsc.2016.02.003

Информация об авторах

Васьковский Максим Михайлович – доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vaskovskii@bsu.by.

Кондратёнок Никита Васильевич – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nkondr2006@rambler.ru.

Прохоров Николай Петрович – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nprohorovminsk@mail.ru.

Information about the authors

Vaskouski Maksim Mihailovich – Assistant Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vaskovskii@bsu.by.

Kondratyонok Nikita Vasilyevich – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nkondr2006@rambler.ru.

Prochorov Nikolai Petrovich – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nprohorovminsk@mail.ru.

ISSN 1561-8323 (print)
УДК 519.173

Поступило в редакцию 18.09.2017
Received 18.09.2017

В. И. Бенедиктович

Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

СПЕКТРАЛЬНЫЙ РАДИУС НЕОТРИЦАТЕЛЬНОЙ МАТРИЦЫ

(Представлено академиком И. В. Гайшуном)

Аннотация. В данной работе доказывается гипотеза о спектральном радиусе неотрицательной матрицы, имеющей равномерное разбиение.

Ключевые слова: матрица смежности, спектральный радиус, равномерная матрица частных

Для цитирования: Бенедиктович, В. И. Спектральный радиус неотрицательной матрицы / В. И. Бенедиктович // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 33–36.

Vladimir I. Benediktovich

Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

SPECTRAL RADIUS OF A NONNEGATIVE MATRIX

(Communicated by Academician Ivan V. Gaishun)

Abstract. In this article we prove a conjecture about a spectral radius of a nonnegative matrix.

Keywords: adjacency matrix, spectral radius, equitable quotient matrix

For citation: Benediktovich V. I. Spectral radius of a nonnegative matrix. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 33–36 (in Russian).

Пусть M – вещественная квадратичная матрица порядка n и пусть $\sigma(M) = \{\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_n\}$ – множество ее собственных значений или спектр матрицы M . Очевидно, что если матрица M не является симметрической, то ее собственные значения, вообще говоря, могут быть комплексными числами. Мы будем предполагать, что имеет место следующее упорядочение модулей собственных значений: $|\lambda_1| \geq |\lambda_2| \geq \dots \geq |\lambda_n|$. Спектральный радиус $\rho(M)$ матрицы M определяется как наибольший модуль ее собственных значений, т. е. при нашем упорядочении $\rho(M) = |\lambda_1|$. Матрица (или вектор) M называется *неотрицательной* (*неотрицательным*), если неотрицательны все ее (его) компоненты. При этом используется обозначение: $M \geq 0$.

Если матрица M является неотрицательной, то из теории Перрона–Фробениуса [1] следует, что спектральный радиус $\rho(M)$ является собственным значением матрицы M и, кроме того, существует неотрицательный собственный вектор $b \geq 0$, соответствующий собственному значению $\rho(M)$, т. е. справедливо равенство $Mb = \rho(M)b$. Пусть далее $\chi_M(\lambda) = \det(\lambda I_n - M)$ является *характеристическим многочленом* матрицы M .

О п р е д е л е н и е 1. Пусть M – вещественная квадратичная матрица порядка n , имеющая следующую блочную структуру:

$$M = \begin{pmatrix} M_{11} & \cdots & M_{1t} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ M_{t1} & \cdots & M_{tt} \end{pmatrix}, \quad (1)$$

где диагональные блоки M_{ii} являются квадратичными матрицами порядков n_i для любого $i \in \{1, 2, \dots, t\}$ и $n = n_1 + \dots + n_t$. Для любых $i, j \in \{1, 2, \dots, t\}$ пусть b_{ij} обозначает среднюю сумму строк матрицы M_{ij} , т. е. b_{ij} равно сумме всех компонент в блочной матрице M_{ij} , деленной на число ее строк. Тогда квадратичная матрица $B(M) = (b_{ij})_{t \times t}$ порядка t называется *матрицей частных матрицы M* .

Если дополнительно для каждой пары i, j блочная матрица M_{ij} имеет постоянную сумму компонент строк, тогда матрица $V(M)$ называется *равномерной матрицей частных* матрицы M .

Недавно в [2] была доказана следующая теорема.

Т е о р е м а 1 [2]. Пусть $M = (m_{ij})_{n \times n}$ является симметрической матрицей, которая имеет блочную структуру (1), $V = V(M)$ является ее матрицей частных и $\mu_1 \geq \mu_2 \geq \dots \geq \mu_m$ все собственные значения матрицы V . Тогда $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_m$ являются собственными значениями матрицы M тогда и только тогда, когда матрица V является равномерной матрицей частных матрицы M .

Кроме того, анализируя значения спектральных радиусов матрицы смежности, матрицы Лапласа, беззнаковой матрицы Лапласа, матрицы расстояний, матрицы Лапласа расстояний и беззнаковой матрицы Лапласа расстояний полного многодольного графа, в той же статье [2] была выдвинута следующая гипотеза.

Г и п о т е з а. Пусть M является неотрицательной матрицей, и $V(M)$ является равномерной матрицей частных M . Тогда наибольшее собственное значение матрицы $V(M)$ совпадает с наибольшим собственным значением матрицы M .

Далее мы устанавливаем справедливость вышеуказанной гипотезы, что обобщает хорошо известное утверждение для матриц смежности неориентированных графов [3].

Т е о р е м а 2. Пусть M является неотрицательной матрицей, а $V(M)$ – равномерной матрицей частных матрицы M . Тогда спектральный радиус матрицы $V(M)$ равен спектральному радиусу матрицы M .

Д о к а з а т е л ь с т в о. Далее для краткости обозначим через $V = V(M)$. По определению равномерной матрицы частных V для любых i, j , таких что $1 \leq i, j \leq t$ сумма всех компонент i -й строки матрицы M_{ij} равна b_{ij} . Это означает, что для любого k , такого что $n_1 + \dots + n_{i-1} < k \leq n_1 + \dots + n_i$ справедливо следующее равенство:

$$m_{k, n_1 + \dots + n_{j-1} + 1} + \dots + m_{k, n_1 + \dots + n_j} = b_{ij}.$$

Пусть $P_{n \times t}$ является характеристической матрицей размера $n \times t$ разбиения строк (и столбцов) матрицы M со столбцами, образованными характеристическими векторами блоков матрицы M . Другими словами, на ij -м месте матрицы P находится 1 или 0 в зависимости от того, содержится ли i -я строка матрицы M в блоках M_{j1}, \dots, M_{jt} или нет. Поэтому в силу структуры (1) матрицы M матрица P имеет следующий вид:

$$P = \begin{pmatrix} \left. \begin{matrix} 1 & 0 & \vdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & 0 & \vdots & 0 \end{matrix} \right\} n_1 & & & \\ & 0 & \left. \begin{matrix} 1 & \vdots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & \vdots & 0 \end{matrix} \right\} n_2 & & \\ & 0 & 0 & \vdots & 0 \\ & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ & 0 & 0 & \vdots & 0 \\ & 0 & 0 & \vdots & \left. \begin{matrix} 1 \\ \vdots \\ 1 \end{matrix} \right\} n_t \\ & 0 & 0 & \vdots & \end{pmatrix}.$$

Заметим, что столбцы матрицы P являются попарно ортогональными и, следовательно, они линейно независимы.

Кроме того, покажем, что справедливо следующее равенство:

$$MP = PV.$$

В самом деле, найдем элемент на kl -м месте произведения матриц MP для любых k, l , таких что $1 \leq k \leq n, 1 \leq l \leq t$. Пусть $n_1 + \dots + n_{i-1} < k \leq n_1 + \dots + n_i$, тогда по определению равномерной матрицы частных B

$$(MP)_{kl} = m_{k,n_1+\dots+n_{l-1}+1} + \dots + m_{k,n_1+\dots+n_l} = b_{il}.$$

С правой стороны, по определению характеристической матрицы P на kl -м месте произведения матриц PB находится элемент $(PB)_{kl} = b_{il}$.

Пусть теперь θ является максимальным собственным значением матрицы B , которая также является неотрицательной, поскольку ее компонентами являются суммы неотрицательных компонент матрицы $M \geq 0$. Тогда по теории Перрона–Фробениуса существует неотрицательный собственный вектор $x \geq 0$, такой что

$$Bx = \theta x.$$

Следовательно, имеем цепочку равенств

$$M(Px) = P(Bx) = P(\theta x) = \theta(Px),$$

где $Px \neq 0$, так как столбцы матрицы P линейно независимы. Следовательно, θ является собственным значением матрицы M и, в частности, $\theta = \rho(B) \leq \rho(M)$.

Пусть теперь $\theta = \rho(M) \geq 0$ является спектральным радиусом матрицы M . Поскольку $\chi_M(\lambda) = \chi_{M^T}(\lambda)$, где M^T – транспонированная с M матрица, то $\theta \geq 0$ является спектральным радиусом транспонированной матрицы $M^T \geq 0$. Это означает, что существует неотрицательный собственный вектор $y \geq 0$, такой что

$$M^T y = \theta y.$$

Тогда имеем

$$y^T M = \theta y^T,$$

откуда следует, что

$$(y^T P)B = (y^T M)P = \theta(y^T P),$$

где вектор $y^T P \neq 0$ в силу строения матрицы P и того, что $y \geq 0$. Положим $z^T = y^T P$, тогда последнее равенство можно записать в следующем виде:

$$\theta z^T = z^T B = z^T (B^T)^T = (B^T z)^T.$$

Из которого получаем равенство

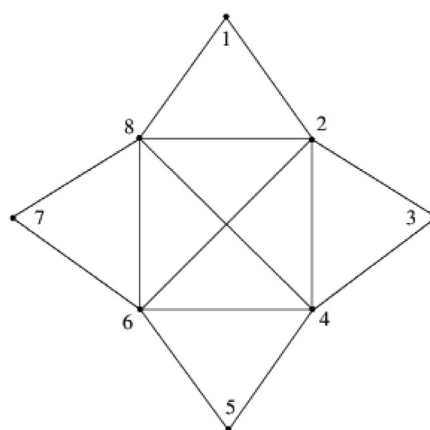
$$B^T z = \theta z,$$

что означает, что θ является собственным значением матрицы B^T . Но в силу равенства $\chi_B(\lambda) = \chi_{B^T}(\lambda)$, имеем, что θ является собственным значением матрицы B и, в частности, $\theta = \rho(M) \leq \rho(B)$. Следовательно, окончательно мы имеем равенство $\rho(B) = \rho(M)$.

Теорема 2 доказана.

Отметим, что для матрицы с отрицательными компонентами утверждение теоремы 2, вообще говоря, неверно. Рассмотрим пример из [4]. Матрица Лапласа $L = L(G)$, соответствующая графу на рисунке, имеет вид

$$L(G) = \begin{pmatrix} 2 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 2 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & -1 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 2 & 0 & 0 & -1 & -1 \\ -1 & -1 & 0 & 0 & 5 & -1 & -1 & -1 \\ 0 & -1 & -1 & 0 & -1 & 5 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & -1 & -1 & -1 & -1 & 5 & -1 \\ -1 & 0 & 0 & -1 & -1 & -1 & -1 & 5 \end{pmatrix}.$$



Граф G , чья матрица Лапласа имеет равномерное разбиение вершин $V(G) = V_1 \cup V_2$, где $V_1 = \{1; 3; 5; 7\}$ и $V_2 = \{2; 4; 6; 8\}$

The graph G , whose Laplace matrix has an equal partition of vertices $V(G) = V_1 \cup V_2$, where $V_1 = \{1; 3; 5; 7\}$ and $V_2 = \{2; 4; 6; 8\}$

Можно непосредственно проверить, что спектр этой матрицы равен

$$\sigma(L) = \{0; 4 - \sqrt{6}; 4 + \sqrt{6}; 2; 4; 6; 4 + \sqrt{6}; 4 + \sqrt{6}\}$$

и, значит, $\rho(L(G)) = 4 + \sqrt{6}$.

С другой стороны, равномерная матрица частных, соответствующая равномерному разбиению π множества вершин $V(G)$ на доли $V_1 = \{1; 3; 5; 7\}$, $V_2 = \{2; 4; 6; 8\}$, имеет вид

$$L_\pi = \begin{pmatrix} 2 & -2 \\ -2 & 2 \end{pmatrix}.$$

Нетрудно проверить, что спектр этой равномерной матрицы частных равен $\sigma(L_\pi) = \{0; 4\}$ и, значит, спектральный радиус $\rho(L_\pi) = 4$, который меньше $\rho(L(G))$.

Благодарности. Работа профинансирована Институтом математики НАН Беларуси в рамках Государственной программы фундаментальных исследований «Конвергенция» и Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (грант № Ф16РА-003).

Acknowledgements. The work is sponsored by the Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus within the framework of the State Program of Fundamental Research “Convergence” and by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grant no. Ф16РА-003).

Список использованных источников

1. Гантмахер, Ф. Р. Теория матриц / Ф. Р. Гантмахер. – М.: Физматлит, 2004. – 560 с.
2. Spectrum of a class of matrices and its applications [Electronic resource] / L. You [et al.] – Mode of access: <https://arxiv.org/abs/1612.00648>.
3. Godsil, C. D. Algebraic graph theory / C. D. Godsil, G. F. Royle. – NY: Springer-Verlag, 2001. doi.org/10.1007/978-1-4613-0163-9
4. Barrett, W. Equitable Decompositions of Graphs with Symmetries / W. Barrett, A. Francis, B. Webb // Linear Algebra and its Applications. – 2017. – Vol. 513. – P. 409–434. doi.org/10.1016/j.laa.2016.10.017

References

1. Gantmakher F. R. *Matrix Theory*. Moscow, Fizmatlit Publ., 2000. 560 p.
2. You L., Yang M., Li J., Ren L. *Spectrum of a class of matrices and its applications*. Available at: <https://arxiv.org/abs/1612.00648>.
3. Godsil C. D., Royle G. F. *Algebraic graph theory*. NY, Springer-Verlag, 2001. doi.org/10.1007/978-1-4613-0163-9
4. Barrett W., Francis A., Webb B. Equitable Decompositions of Graphs with Symmetries. *Linear Algebra and its Applications*, 2017, vol. 513, pp. 409–434. doi.org/10.1016/j.laa.2016.10.017

Информация об авторе

Бенедиктович Владимир Иванович – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник. Институт математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vbened@im.bas-net.by.

Information about the author

Benediktovich Vladimir Ivanovich – Ph. D. (Physics and Mathematics), Leading researcher. Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vbened@im.bas-net.by.

ISSN 1561-8323 (print)

ИНФОРМАТИКА
INFORMATICS

УДК 004

Поступило в редакцию 12.04.2017

Received 12.04.2017

Б. А. Залесский*Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь***ДЕТЕКТОРЫ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ОСОБЫХ ТОЧЕК НА ИЗОБРАЖЕНИЯХ***(Представлено членом-корреспондентом А. В. Тузиковым)*

Аннотация. Представлены детекторы особых (ключевых, характерных) точек-экстремумов, предназначенных для описания, анализа и сравнения изображений с помощью локальных дескрипторов, которые вычисляются в окрестностях найденных точек. Отличие предлагаемых детекторов от известных состоит в том, что они находят особые точки путем поиска локальных экстремумов функции, задающей ту или иную локальную характеристику исходного изображения в каждой его точке. Большинство известных в настоящее время детекторов решают задачу поиска особых точек иным способом. Каждый такой детектор использует построенную для него функцию-характеристику изображения, значение которой в каждом пикселе сравнивается с наперед заданным числовым порогом. Если значение выбранной функции-характеристики больше заданного порогового значения, точка считается особой, в противном случае – обычной. Пороговое значение, как правило, устанавливается с помощью обучения детектора на широком классе обучающих изображений. Некоторые известные детекторы выделяют особые точки путем поиска локальных экстремумов, однако не на исходном изображении, а на его градиентных преобразованиях. Одним из недостатков использования известных детекторов (помимо использования дорогостоящего в вычислительном смысле процесса обучения) является неравномерное распределение особых точек на изображении. Нередко на изображениях возникают большие области, на которых вообще нет особых точек, что приводит к невозможности обнаружения или распознавания этих областей. Предлагаемый класс детекторов позволяет во многих случаях избежать появления областей без особых точек.

Ключевые слова: изображение, ключевые точки, детекторы особых точек, обнаружение и распознавание объектов

Для цитирования: Залесский, Б. А. Детекторы экстремальных особых точек на изображениях / Б. А. Залесский // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 37–41.

Boris A. Zalesky*United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***DETECTORS OF EXTREMAL KEY POINTS ON IMAGES***(Communicated by Corresponding Member Alexander V. Tuzikov)*

Abstract. Extremal key-point detectors are presented to describe, analyze and compare images by local descriptors that are determined in neighborhoods of the detected key-points. The proposed detectors select key-points, providing local extremal values of the function that characterizes local properties of the original image at each pixel. The majority of commonly used detecting algorithms are looking for key-points in another way. They mark a pixel as a key-point if the value of the function-criterion at this pixel exceeds a predetermined threshold value. The remaining known algorithms find key-points that are the local extremal values of the functions defined on gradient transforms of the image. One of the drawbacks of the known detectors (in addition to the use of learning procedures expensive in the computational sense) is a non-uniform distribution of key-points on the image. Often large image areas may be left with no key-points, making their detection or recognition impossible. The proposed extremal detectors allow one in many cases to avoid the appearance of image areas not filled with key-points.

Keywords: images, key-points, key-point detectors, object detection and recognition

For citation: Zalesky B. A. Detectors of extremal key points on images. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 37–41 (in Russian).

Введение. В настоящее время многие задачи анализа, сравнения и распознавания изображений решаются с помощью сопоставления их локальных характеристик последовательно применяемыми алгоритмами: сначала выделяющими так называемые особые точки (key-points) – детекторами; затем задающими числовые характеристики локальных окрестностей выделенных ключевых точек – дескрипторами; и наконец устанавливающими соответствия между наборами характеристик разных изображений (matchers).

Одними из первых алгоритмов указанного типа, успешно применяемых для решения задач компьютерного зрения, были SIFT и HOG [1; 2], в первом из которых используется детектор ключевых точек, основанный на анализе гессиана разности сглаженных в разной степени копий исходного изображения, а во втором ключевыми считаются все точки регулярной решетки. Через год появился SURF [3], детектор которого использует вейвлетное приближение гессиана для выделения ключевых точек. Затем были опубликованы алгоритмы FAST [4], STAR [5], BRISK [6], KAZE [7], AKAZE [8] и другие вместе с их многочисленными модификациями и улучшениями. Результаты сравнительного анализа детекторов приведены в [9].

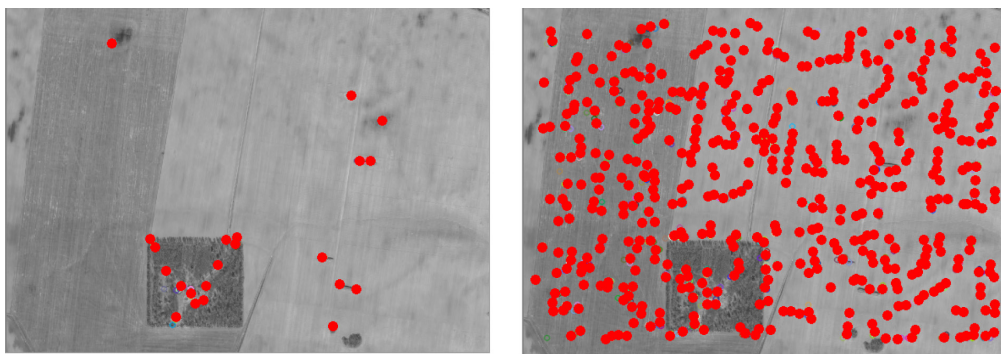
Известные детекторы особых точек обладают рядом общих недостатков: они чувствительны к изменению яркости и контраста изображений (таблица), распределение найденных особых точек на изображении часто бывает неравномерным – нередко возникают области на изображениях, не содержащие ни одной особой точки (рисунок). Такие области не могут быть обнаружены или распознаны с помощью упомянутых алгоритмов.

Предлагаются детекторы особых точек, основанные на поиске локальных экстремумов функций-характеристик непреобразованных изображений. Приведены результаты сравнительного анализа свойств известных и предложенных детекторов.

Экстремальные детекторы особых точек. Анализ известных детекторов показал, что они выделяют недостаточное количество особых точек на нерезких изображениях или изображениях с малым градиентом. На рисунке приведена часть спутникового изображения пахотных земель, на котором известные детекторы оставили большие области без особых точек. Пустые области невозможно найти, распознать или сравнить.

Предлагаемые ниже алгоритмы поиска особых точек-экстремумов находят пиксели, в которых та или иная функция, характеризующая локальные свойства изображения, достигает своего экстремума. Их отличие от известных алгоритмов состоит в использовании интегральных локальных характеристик от самого изображения, а не от его градиентных преобразований. Это позволяет находить информативные особые точки на изображении в окрестностях с малым или вообще нулевым градиентом, при этом нет необходимости использовать пороговые значения.

Рассмотрим моментные экстремальные детекторы особых точек. Несмотря на то что в настоящее время моменты широко используются при обработке изображений, до сих пор они не использовались для экстремального выделения особых точек. Обозначим через $S = \{(x, y)\}$, $x = 0, \dots, m - 1$, $y = 0, \dots, n - 1$, множество пикселей $\mathbf{p} = (x, y)$ полутонового $\mathbf{I} = \{I(\mathbf{p})\}$, $\mathbf{p} \in S$, или



a

b

Особые точки, найденные детектором AKAZE (a) и одним из предложенных алгоритмов (b)

Key points found by detector AKAZE (a) and by one of proposed detectors (b)

цветного $\mathbf{I} = \{I_R(\mathbf{p}), I_G(\mathbf{p}), I_B(\mathbf{p})\}$, $\mathbf{p} \in S$, изображения, и пусть $O_k(\mathbf{p})$ – окрестность пиксела \mathbf{p} , которую для простоты будем считать либо кругом радиуса k , либо квадратом со стороной $2k$ с центром в пикселе \mathbf{p} . Напомним, что локальные абсолютные центрированные моменты полутонового изображения задаются соотношением $\beta_r(\mathbf{p}) = \beta_r(\mathbf{I}, \mathbf{p}) = \sum_{\mathbf{q} \in O_k(\mathbf{p})} |I(\mathbf{q}) - m(\mathbf{p})|^r$, где $m(\mathbf{p}) = k^{-1} \sum_{\mathbf{q} \in O_k(\mathbf{p})} I(\mathbf{q})$ – среднее значение. Абсолютный центрированный момент порядка r цветного изображения равен $\beta_r(\mathbf{p}) = \beta_r(\mathbf{I}, \mathbf{p}) = \beta_r(\mathbf{I}_R, \mathbf{p}) + \beta_r(\mathbf{I}_G, \mathbf{p}) + \beta_r(\mathbf{I}_B, \mathbf{p})$. Изображения являются функциями дискретного аргумента, поэтому определение локального экстремума, которое можно использовать для поиска экстремальных особых точек (ЭОТ) отличается от общепринятого. По существу, для поиска ЭОТ используются локальные экстремумы в заранее выбранной окрестности $O_\ell(\mathbf{p})$ каждого пиксела \mathbf{p} (не обязательно совпадающей с $O_k(\mathbf{p})$).

Теоретически, для фиксированного $r > 0$ экстремальные моментные особые точки \mathbf{p}_r° находятся как пиксели, обеспечивающие невырожденные локальные максимумы момента $\beta_r(\mathbf{p})$ в окрестностях $O_\ell(\mathbf{p})$ фиксированной формы и размера, в случае, если эти локальные экстремумы лежат на заданном удалении от границы окрестности. Иными словами для заданных: степени момента r , радиусов k, ℓ окрестностей O_k, O_ℓ и максимального удаления $\tau (\tau \leq \ell)$ локального экстремума от центра окрестности – ЭОТ образуют множество

$$\chi(\mathbf{I}) = \chi_{r,k,\ell,\tau}(\mathbf{I}) = \left\{ \mathbf{p}_r^\circ \in S \mid \right. \\ \left. \exists \mathbf{q} \in S : \mathbf{p}_r^\circ \in O_\ell(\mathbf{q}), \left| \mathbf{p}_r^\circ - \mathbf{q} \right| \leq \tau, \forall \mathbf{u} \in O_\ell(\mathbf{q}), \beta_r(\mathbf{p}_r^\circ) \geq \beta_r(\mathbf{u}), \exists \mathbf{v} \in O_\ell(\mathbf{q}) : \beta_r(\mathbf{p}_r^\circ) > \beta_r(\mathbf{v}) \right\}. \quad (1)$$

Вторая часть условия $\exists \mathbf{v} \in O_\ell(\mathbf{q}) : \beta_r(\mathbf{p}_r^\circ) > \beta_r(\mathbf{v})$ используется для того, чтобы избежать выбора неинформативных особых точек из однородных областей изображений. Словами условие (1) может быть сформулировано следующим образом: пиксел \mathbf{p}_r° является экстремальной особой точкой, если существует окрестность $O_\ell(\mathbf{q})$ с центром в \mathbf{q} , содержащая \mathbf{p}_r° , в котором значение $\beta_r(\mathbf{p}_r^\circ)$ является локальным максимумом, при этом \mathbf{p}_r° удален от центра окрестности \mathbf{q} на расстояние, не превосходящее $\tau (\tau \leq \ell)$, и β_r не является константой в $O_\ell(\mathbf{q})$.

Практически, в некоторых случаях выделенное множество ЭОТ $\chi_r(\mathbf{I})$ приходится прореживать – оставлять из нескольких расположенных близко равноценных особых точек одну, например, случайным образом или по какому-либо дополнительному критерию. Процедура прореживания особых точек используется в большинстве известных детекторов.

Выделение ЭОТ может осуществляться с помощью моментов β_r любых порядков, однако, использование первых моментов четных степеней β_2, β_4 и модуля неабсолютного момента 3-й степени $|\alpha_3|$ наиболее предпочтительно с вычислительной точки зрения потому, что данные функции могут быть вычислены быстро с помощью интегрального изображения [10], а проведенный сравнительный анализ ЭОТ, найденных с помощью β_r , показал, что использование $r = 2, 4$ и $|\alpha_3|$ дает примерно одинаковые результаты, причем обычная дисперсия β_2 в большинстве случаев обеспечивает наилучшие наборы точек.

Результаты вычислительных экспериментов. Для исследования свойств предложенных экстремальных детекторов были использованы аэрофотоснимки и космические изображения, так как задача повышения качества дешифрирования изображений данного типа с помощью упомянутого вначале статьи подхода на основе особых точек особенно актуальна. Был проведен поиск соответствующих областей на кадрах видеопоследовательностей, полученных бортовыми камерами самолета и квадрокоптера, а также на космических снимках. Для тестирования были выбраны детекторы SIFT, SURF, ORB, AKAZE, реализованные в библиотеке OpenCV 3.1.0, и предложенный нами экстремальный детектор. Для большей объективности проводимого тестирования после выделения особых точек указанными детекторами во всех экспериментах был использован один и тот же дескриптор LATCH, который считается в настоящее время одним из лучших. Затем поиск соответствий областей изображений осуществлялся известным knn-алгоритмом.

Сравнение между собой экстремальных детекторов, основанных на использовании моментов $\beta_2, |\alpha_3|, \beta_4$, показало, что в среднем β_2 -детектор нашел на кадрах тестовых видеопоследова-

тельностью с точностью до статистической погрешности одинаковое количество ЭОТ (всего на 2,3 % больше, чем $|\alpha_3|$ -детектор, и на 1,5 % больше, чем β_4 -детектор). Количество найденных с помощью kpp-алгоритма соответствий (так называемых *good matches*) между наборами моментных особых точек сравниваемых изображений тоже оказалось практически одинаковым. При этом следует заметить, что вычисление β_2 -детектора с помощью интегральных изображений требует примерно в три раза меньше операций, чем вычисление β_4 -детектора.

Обычно при сравнении детекторов особых точек сравниваются количество найденных точек и число установленных соответствий (*good matches*) между наборами точек сравниваемых изображений. В дополнении к этим характеристикам приведем результаты проверки корректности автоматического установления соответствия между областями сравниваемых пар изображений с помощью алгоритма RANSAC на основе ЭОТ и известных алгоритмов. Результаты получены на видеопоследовательностях, снятых с борта самолета и квадрокоптера. Напомним схему экспериментов. Сначала находятся особые точки известными и разработанными алгоритмами, затем вычисляются характеристики всех найденных точек алгоритмом LATCN. После этого устанавливаются соответствия между наборами точек двух сравниваемых изображений kpp-алгоритмом и находятся проективные преобразования, совмещающие каждую пару сравниваемых изображений с алгоритмом RANSAC.

Для краткости результаты экспериментов приведены в следующей таблице для одной видеопоследовательности, снятой с борта квадрокоптера.

Результаты экспериментов

Results of Experiments

Характеристика Characteristic	ORB	SIFT	SURF	AKAZE	β_2 -детектор β_2 -detector
<i>Видео 1920 × 1080</i>					
Особые точки	3373	695	2751	163	26468
Соотв. точек	446	156	564	38	807
Соотв. кадров, %	100	100	100	100	100
<i>Видео 1920 × 1080 с гауссовым шумом 10 %</i>					
Особые точки	7434	812	3801	155	28658
Соотв. точек	640	88	428	20	479
Соотв. кадров, %	100	100	100	50	100
<i>Видео 1920 × 1080 с гауссовым сглаживанием 10 %</i>					
Особые точки	2	46	220	22	14590
Соотв. точек	0	22	77	11	796
Соотв. кадров, %	0	80	100	0	100

На видеопоследовательности, снятой с борта самолета и сглаженной гауссовым ядром, только предложенный экстремальный детектор β_2 позволил установить 100 % правильных соответствий между областями кадров. Алгоритмы ORB, AKAZE, SIFT не нашли ни одного правильного соответствия, причем первые два алгоритма не нашли ни одной особой точки.

Преимущество β_r было особенно заметно при совмещении областей слабоконтрастных спектральных космических снимков, полученных с Landsat 8. В большинстве случаев известные детекторы находили всего несколько особых точек, либо вообще не находили ни одной, в то время как β_r позволяли успешно решить задачу совмещения областей (рисунок).

Заключение. Предложенные детекторы находили на каждом из тестовых изображений большее число особых точек, чем известные. Среднее число соответствий особых точек на парах изображений, содержащих общую часть сцены, для них также оказалось большим, чем для известных детекторов. Преимущество предложенных детекторов оказалось более заметным при работе со слабоконтрастными изображениями, имеющими слабовыраженные градиентные особенности. Здесь известные детекторы нередко не находили необходимого минимального количества особых точек (или вообще не находили ни одной), которые позволили бы корректно сравнить

или распознать изображения, а также их области, в то время как предложенные – обнаруживали достаточно особенностей, позволяющих решить эту задачу (таблица). К тому же, предложенные детекторы, в отличие от большинства известных, могут быть быстро вычислены с помощью интегральных изображений. Таким образом, проведенный сравнительный анализ свойств предложенных детекторов особых точек, основанных на вычислении локальных экстремумов первых абсолютных центрированных моментов изображений, с известными детекторами, показал их применимость для решения задач обработки и распознавания изображений.

Список использованных источников

1. Lowe, D. Object recognition from local scale invariant features / D. Lowe // Proc. Int. Conf. on Computer Vision ICCV. – Corfu, 1999. – P. 1150–1157. doi.org/10.1109/iccv.1999.790410
2. Dalah, N. Histograms of Oriented Gradients for Human Detection / N. Dalah, B. Triggs // IEEE Comp. Soc. Conf. on Computer Vision and Pattern Recognition CVPR'05. – San Diego, 2005. – Vol. 1. – P. 886–893. doi.org/10.1109/cvpr.2005.177
3. Bay, H. Surf: Speeded up robust features / H. Bay, T. Tuytelaars, L. Van Gool // Proc. 9th Europ. Conf. on Computer Vision ECCV. – Graz, 2006. – P. 404–417. doi.org/10.1007/11744023_32
4. Rosten, E. Faster and better: a machine learning approach to corner detection / E. Rosten, R. Porter, T. Drummond // IEEE TPAMI. – 2010. – Vol. 32, N 1. – P. 105–119. doi.org/10.1109/tpami.2008.275
5. Agrawal, M. CenSurE: Center surround extremas for realtime feature detection and matching / M. Agrawal, K. Konolige, M. R. Blas // Lecture Notes in Computer Science. – 2008. – Vol. 5305. – P. 102–115. doi.org/10.1007/978-3-540-88693-8_8
6. Leutenegger, S. BRISK: Binary Robust invariant scalable keypoints / S. Leutenegger, M. Chli, R. Y. Siegwart // Proc. IEEE Int. Conf. on Computer Vision ICCV. – Barcelona, 2011. – P. 2548–2555. doi.org/10.1109/iccv.2011.6126542
7. Alcantarilla, P. KAZE Features / P. Alcantarilla, A. Bartoli, J. Davison // Proc. Eur. Conf. on Computer Vision ECCV. – Firenze, 2012. – P. 214–227. doi.org/10.1007/978-3-642-33783-3_16
8. Alcantarilla, P. Fast Explicit Diffusion for Accelerated Features in Nonlinear Scale Spaces / P. Alcantarilla, J. Nuevo, A. Bartoli // Proc. British Machine Vision Conference BMVC. – Bristol, 2013. doi.org/10.5244/C.27.13
9. Comparative Assessment of Point Feature Detectors and Descriptors in the Context of Robot Navigation / A. Schmidt [et al.] // J. of Automation, Mobile Robotics & Intelligent Systems. – 2013. – Vol. 7, N 1. – P. 11–20.
10. Viola, P. Robust real-time face detection / P. Viola, M. J. Jones // Int. J. of Computer Vision. – 2004. – Vol. 57, N 2. – P. 137–154. doi.org/10.1023/b:visi.0000013087.49260.fb

References

1. Lowe D. Object recognition from local scale invariant features. *Proceedings of the 7th IEEE International Conference on Computer Vision ICCV*, Corfu, 1999, pp. 1150–1157. doi.org/10.1109/iccv.1999.790410
2. Dalah N., Triggs B. Histograms of Oriented Gradients for Human Detection. *IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition CVPR'05*, San Diego, 2005, vol. 1, pp. 886–893. doi.org/10.1109/cvpr.2005.177
3. Bay H., Tuytelaars T., Van Gool L. Surf: Speeded up robust features. *Proceedings of the 9th European Conference on Computer Vision ECCV*, Graz, 2006, pp. 404–417. doi.org/10.1007/11744023_32
4. Rosten E., Porter R., Drummond T. Faster and better: a machine learning approach to corner detection. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2010, vol. 32, no. 1, pp. 105–119. doi.org/10.1109/tpami.2008.275
5. Agrawal M., Konolige K., Blas M. R. CenSurE: Center surround extremas for realtime feature detection and matching. *Lecture Notes in Computer Science*, 2008, vol. 5305, pp. 102–115. doi.org/10.1007/978-3-540-88693-8_8
6. Leutenegger S., Chli M., Siegwart R. Y. BRISK: Binary Robust invariant scalable keypoints. *Proceedings of the 13th IEEE International Conference on Computer Vision ICCV*, Barcelona, 2011, pp. 2548–2555. doi.org/10.1109/iccv.2011.6126542
7. Alcantarilla P., Bartoli A., Davison J. KAZE Features. *Proceedings of the 12th European Conference on Computer Vision ECCV*, Firenze, 2012, pp. 214–227. doi.org/10.1007/978-3-642-33783-3_16
8. Alcantarilla P., Nuevo J., Bartoli A. Fast Explicit Diffusion for Accelerated Features in Nonlinear Scale Spaces. *Proceedings of the 24th British Machine Vision Conference BMVC*. Bristol, 2013. doi.org/10.5244/C.27.13
9. Schmidt A., Kraft M., Fularz M., Domagała Z. Comparative Assessment of Point Feature Detectors and Descriptors in the Context of Robot Navigation. *Journal of Automation, Mobile Robotics & Intelligent Systems*, 2013, vol. 7, no. 1, pp. 11–20.
10. Viola P., Jones M. J. Robust real-time face detection. *International Journal of Computer Vision*, 2004, vol. 57, no. 2, pp. 137–154. doi.org/10.1023/b:visi.0000013087.49260.fb

Информация об авторе

Залеский Борис Андреевич – д-р физ.-мат. наук, ведущий лабораторией. Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 6, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zalesky@newman.bas-net.by.

Information about the author

Zalesky Boris Andreevich – D. Sc. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zalesky@newman.bas-net.by.

ФИЗИКА
PHYSICS

УДК 539.2:669; 538.9

Поступило в редакцию 10.07.2017

Received 10.07.2017

**М. А. Моховиков¹, член-корреспондент Ф. Ф. Комаров¹, Л. А. Власукова²,
О. В. Мильчанин¹, И. Н. Пархоменко², Э. Вендлер³, Н. С. Ковальчук⁴**

¹*Институт прикладных физических проблем имени А. Н. Севченко*

Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

²*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

³*Йенский университет имени Фридриха Шиллера, Йена, Германия*

⁴*Открытое акционерное общество «Интеграл», Минск, Республика Беларусь*

**ИОННО-ЛУЧЕВОЕ ФОРМИРОВАНИЕ НАНОКЛАСТЕРОВ ZnSe
И ZnS В СЛОЯХ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ**

Аннотация. В работе продемонстрирована возможность одновременного формирования в слоях SiO₂ наноразмерных кластеров ZnSe и ZnS. Использовались «горячие» (550 °С) условия имплантации ионов Se, Zn и S с последующей высокотемпературной обработкой (900 °С, 30 мин). Было изготовлено две серии образцов: первая имплантировалась ионами Se и Zn, вторая – ионами Se, Zn и S. Установлено, что формирование слоев с наноразмерными (от 2 до 20 нм) кластерами в оксидной матрице происходит уже в процессе «горячей» имплантации примесей. Последующая термообработка приводит к существенной структурной перестройке слоев с кластерами. В отожженных образцах в области максимальной концентрации внедренных примесей формируются крупные кристаллиты (до 90 нм), в то время как в приповерхностной области диоксида кремния наблюдаются мелкие преципитаты. Методом комбинационного рассеяния света и в образцах сразу после имплантации, и в отожженных образцах зарегистрировано формирование кластеров кристаллической фазы ZnSe (для первой серии) и кластеров фаз ZnSe + ZnS (для второй серии).

Ключевые слова: ионная имплантация при повышенной температуре, кристаллические нанокластеры, прямозонные полупроводники ZnSe и ZnS, комбинационное рассеяние света, просвечивающая электронная микроскопия

Для цитирования: Ионно-лучевое формирование нанокластеров ZnSe и ZnS в слоях диоксида кремния / М. А. Моховиков [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 42–49.

**Maksim A. Makhavikou¹, Fadei F. Komarov¹, Liudmila A. Vlasukova², Oleg V. Milchanin¹, Irina N. Parkhomenko²,
Elke Wendler³, Natalia S. Kovalchuk⁴**

¹*A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University,
Minsk, Republic of Belarus*

²*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

³*Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Germany*

⁴*Joint Stock Company «INTEGRAL» Holding Management Company, Minsk, Republic of Belarus*

ION-BEAM SYNTHESIS OF ZnSe AND ZnS NANOCCLUSERS IN SiO₂ LAYERS

Abstract. We have studied the formation of ZnSe and ZnS precipitates in silicon dioxide by ion implantation at 550 °C and subsequent annealing at 900 °C for 30 min in the Ar atmosphere. Two sets of samples have been prepared: the first set of samples has been implanted with Se and Zn ions and the second set of samples – with Se, Zn and S ions. The analysis of XTEM images shows that the “hot” implantation leads to the formation of extended layers containing nanoclusters (with size of 20 nm). Subsequent annealing results in a significant structural transformation of layers with nanoclusters. For annealed samples, large crystallites (up to 90 nm) are observed at the depth of maximum impurity concentration, while small clusters are registered in the subsurface layer of silicon dioxide. Raman spectroscopy proves the formation of ZnSe and ZnSe + ZnS crystal phases for deposited and annealed samples of the first and second sets.

Keywords: «hot» ion implantation, crystalline nanoclusters, direct-band-gap semiconductors of ZnSe and ZnS phases, Raman spectroscopy, transmission electron microscopy

For citation: Makhavikou M. A., Komarov F. F., Vlasukova L. A., Milchanin O. V., Parkhomenko I. N., Wendler E., Kovalchuk N. S. Ion-beam synthesis of ZnSe and ZnS nanoclusters in SiO₂ layers. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 42–49 (in Russian).

Введение. В последнее время большой интерес вызывают исследования в области создания новых светоизлучающих приборов и структур на основе кремниевой технологии. Основная технологическая проблема заключается в том, что сам кремний является не прямозонным полупроводником и, вследствие этого, имеет низкую квантовую эффективность межзонной излучательной рекомбинации. Поэтому формирование в слоях диоксида кремния включений прямозонных полупроводников A_2B_6 (например, ZnSe и ZnS), характеризующихся высокой вероятностью излучательных переходов и высокой подвижностью носителей заряда, является перспективным подходом для получения источников и приемников видимого и ультрафиолетового света на базе кремниевой технологии [1–3]. С другой стороны, в ряде работ [2; 4] показано, что легирование полупроводников ZnSe или ZnS различными примесями может приводить к увеличению интенсивности и трансформации спектра люминесценции данных соединений. Так, легирование нанокластеров ZnSe примесями марганца (Mn^{2+}) или меди (Cu^{2+}) [2] приводит к смещению спектра фотолюминесценции в длинноволновую область и появлению более интенсивной полосы излучения в видимой области спектра света. В то же время легирование соединения ZnS некоторыми примесями дает возможность получить электролюминофоры с зеленой, красной и синей полосами излучения [4], в результате сложения которых может быть создан электролюминесцентный индикатор с белым излучением. С целью увеличения квантового выхода люминесценции от нанокристаллов перспективным представляется создание структур типа «ядро/оболочка» (“core-shell” structures), когда нанокристалл одного полупроводника (ядро) покрывают тонким слоем другого полупроводника (оболочка) с большей шириной запрещенной зоны. Это позволяет эффективно изолировать возбужденные состояния в материале ядра, устраняя неизлучательные пути релаксации возбуждений и предотвращая фотохимическую деградацию. Так, в [5] авторами показано, что формирование в коллоидных растворах нанопреципитатов со структурой «ядро (из ZnSe)/оболочка (из ZnS)» позволяет получить высокоинтенсивное излучение в видимой области спектра. Такие структуры обладают высокой квантовой эффективностью, что делает их перспективными для создания синих светодиодов и для применения в медицине в качестве биологических меток.

В данной работе представлены результаты исследований состава и структурно-фазовых характеристик слоев диоксида кремния после высокодозных имплантаций ионов Se, Zn и S при повышенной температуре (550 °C), а также после термообработки (900 °C, 30 мин, в атмосфере аргона). Предполагалось одновременно синтезировать в слоях SiO_2 фазы прямозонных полупроводников ZnSe и ZnS, а также оценить возможность формирования на их основе структур «ядро/оболочка».

Материалы и методы исследования. Исходные образцы $SiO_2(600\text{ нм})/Si$ размером $1 \times 1\text{ см}^2$ вырезались из термически оксидированной пластины кремния. Режимы имплантации выбранных примесей разрабатывались на основе анализа результатов компьютерного моделирования по алгоритму Монте-Карло с использованием программного комплекса SRIM-2010 [6]. Энергии ионов Zn, Se и S были выбраны так, чтобы обеспечить локализацию внедренных примесей в одной и той же области слоя диоксида кремния (с максимумами концентраций на глубине порядка 112–114 нм – расчетные R_p для трех типов ионов). Как показано в ряде работ [7; 8], использование «горячих» (400–550 °C) условий при последовательном внедрении нескольких примесей позволяет уже в процессе имплантации получать массивы нанокластеров различных бинарных соединений (как в кремнии, так и в диоксиде кремния), а также снижать уровень дефектности формируемых кластеров. Но повышенная температура при имплантации нескольких типов ионов (а в нашем случае использовалось 3 типа ионов) может приводить и к существенному увеличению диффузионной способности уже внедренных атомов, что должно сказываться на форме концентрационных профилей примеси. Для оценки этих процессов мы проводили исследования состава и структурно-фазовых характеристик образцов как после имплантации трех типов ионов, так и на промежуточной стадии – после имплантации ионов селена и цинка. Было изготовлено две серии образцов. Образцы из первой серии имплантировались двумя типами ионов: $Se^+\downarrow$ (170 кэВ, $3,5 \cdot 10^{16}\text{ см}^{-2}$) и $Zn^+\downarrow$ (150 кэВ, $8 \cdot 10^{16}\text{ см}^{-2}$), образцы из второй серии – тремя типами ионов:

$\text{Se}^+\downarrow$ (170 кэВ , $3,5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$), $\text{Zn}^+\downarrow$ (150 кэВ , $8 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$) и $\text{S}^+\downarrow$ (90 кэВ , $4 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$). Имплантация проводилась в «горячих» условиях – при повышенной ($550 \text{ }^\circ\text{C}$) температуре. Затем имплантированные образцы отжигались в атмосфере аргона ($900 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 мин).

Для анализа распределения внедренной примеси по глубине образцов использовался метод резерфордского обратного рассеяния (РОР). Структурно-фазовые характеристики образцов исследовались методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) в режиме поперечного сечения и комбинационного рассеяния света (КРС).

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены моделированные (без учета повышенной температуры имплантации) и рассчитанные из экспериментальных спектров РОР профили внедренных атомов цинка, селена и серы в образцах первой и второй серии.

В случае «горячей» имплантации двух типов ионов (рис. 1, *a*) наблюдается преимущественная диффузия атомов цинка и селена к поверхности образца, вероятно, за счет повышенной температуры во время имплантации. Об этом свидетельствует снижение концентраций внедренных примесей в сравнении с расчетными (SRIM-2010) и смещение максимумов концентрационных профилей к поверхности. Сравнивая площади под концентрационными профилями, представленными на рис. 1, *a*, можно отметить, что происходит потеря суммарной концентрации (дозы) внедренных атомов цинка и селена. Аналогичная ситуация наблюдается и для образцов второй серии (при имплантации трех примесей) – регистрируется сдвиг концентрационных профилей к поверхности и снижение суммарных концентраций внедренных атомов (рис. 1, *b*). Концентрация атомов серы после имплантации чуть ниже, чем на моделированных профилях. При этом

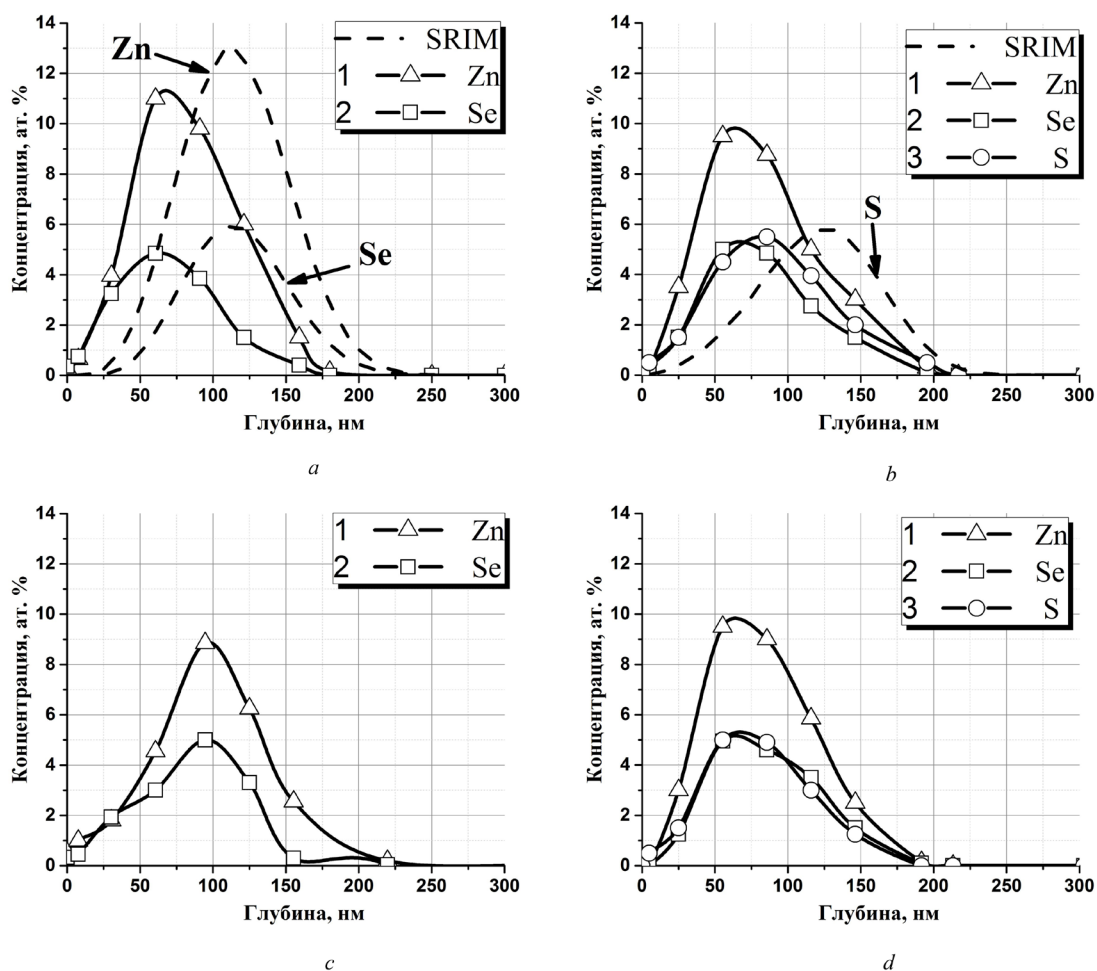


Рис. 1. Концентрационные профили внедренной примеси в слоях SiO_2 после «горячей» ($550 \text{ }^\circ\text{C}$) имплантации ионов Se и Zn (*a, c*) и ионов Se, Zn, S (*b, d*), а также после отжига ($900 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 мин, Ar) (*c, d*)

Fig. 1. Concentration profiles of embedded in SiO_2 layers impurities after “hot” implantation of Se and Zn (*a, c*) and Se, Zn, S (*b, d*) as well as after annealing ($900 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min, Ar) (*c, d*)

в процессе третьей имплантации ионов серы при 550 °С еще большая доля атомов цинка уходит из образца, вместе с тем суммарная концентрация селена практически не изменяется (в сравнении с образцами первой серии). Можно предположить, что в ходе имплантации цинка большая часть уже внедренных атомов селена уходит на формирование связей Zn–Se, поэтому диффузии селена при третьей имплантации (ионами S⁺) не наблюдается. Термообработка образцов первой серии (рис. 1, *c*) приводит к незначительному сдвигу максимумов профилей атомов Zn и Se в глубь слоя диоксида кремния. Интересно, что наблюдаемое снижение концентрации атомов Zn в этом случае больше, чем для образцов второй серии (кривые 1 на рис. 1, *c* и рис. 1, *d*). Мы считаем, что уже во время «горячей» имплантации, а также при последующих термообработках формируются термостабильные связи Zn–Se и Zn–S. В условиях нашего эксперимента в имплантированном слое существует большой избыток атомов цинка в сравнении с примесью селена, поэтому можно предположить, что потери цинка после термообработки происходят за счет доли атомов этой примеси, не связанных с атомами селена. В пользу формирования термостабильных при температуре отжига 900 °С связей Zn–Se и Zn–S говорит и то, что после термообработки не происходит существенных изменений в концентрационных профилях примеси для образцов второй серии (из сравнения рис. 1, *b* и рис. 1, *d*). Следует отметить лишь небольшое смещение концентрационного профиля серы в область максимальных концентраций селена и цинка. Возможно, во второй серии образцов практически все атомы цинка, селена и серы образовали термостабильные связи Zn–Se и Zn–S уже после «горячей» имплантации.

На рис. 2 представлены результаты структурных исследований методом ПЭМ поперечных сечений исследуемых образцов. После двойной (Se↓ + Zn↓) «горячей» имплантации (рис. 2, *a*) наблюдается формирование протяженного слоя (на глубинах от 20 до 140 нм от поверхности), со-

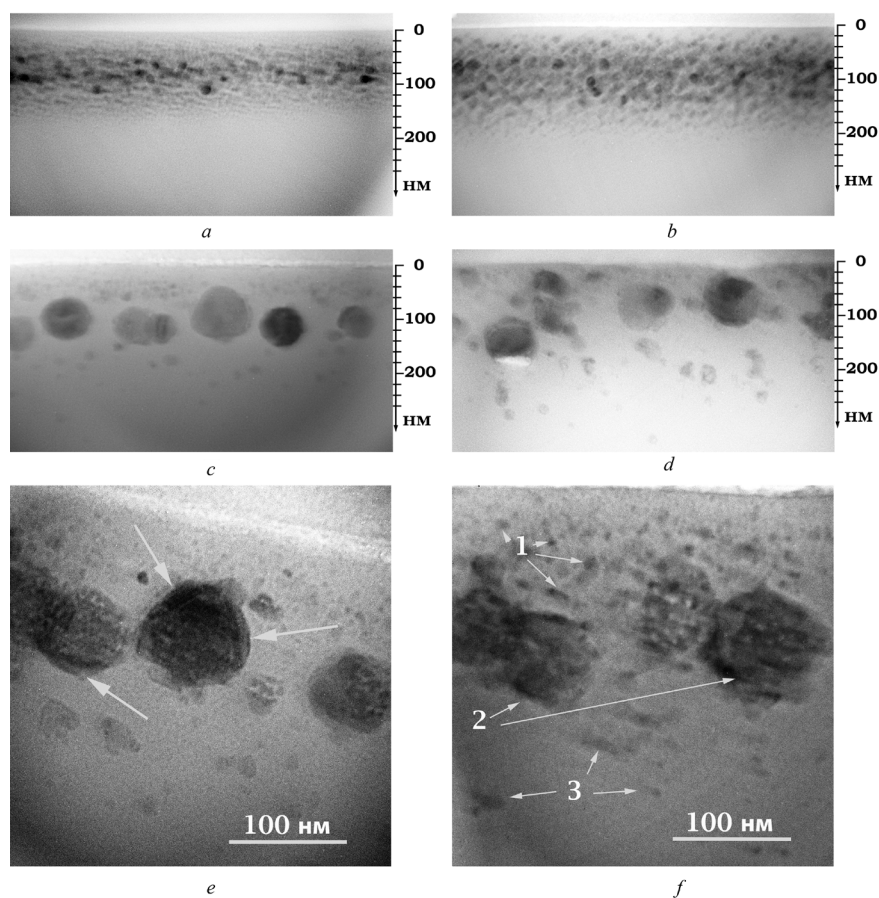


Рис. 2. Светлопольные ПЭМ микрофотографии поперечных сечений слоев SiO₂ после «горячей» (550 °С) имплантации ионов (Se↓ + Zn↓) (*a*, *c*, *e*) и (Se↓ + Zn↓ + S↓) (*b*, *d*, *f*), а также после термообработки (*c*, *d*, *e*, *f*)

Fig. 2. Bright-field TEM cross-section images from SiO₂ layers after “hot” implantation of (Se↓ + Zn↓) (*a*, *c*, *e*) and (Se↓ + Zn↓ + S↓) (*b*, *d*, *f*) ions as well as after annealing (*c*, *d*, *e*, *f*)

держашего мелкие кластеры размером 2–20 нм. В середине этого слоя на глубинах 50–100 нм (область максимальных концентраций имплантированных примесей) размеры кластеров немного больше (от 10 до 20 нм). Для образцов после тройной имплантации ($\text{Se}\downarrow + \text{Zn}\downarrow + \text{S}\downarrow$) также наблюдается формирование протяженного слоя с включениями (кластерами) имплантированной примеси (рис. 2, *b*). В этом случае толщина слоя с кластерами заметно больше (от 10 до 200 нм), что можно объяснить большей суммарной концентрацией (дозой) внедренной примеси. Средние размеры включений порядка 10–20 нм. Термообработка приводит к существенной структурной перестройке в имплантированных областях диоксида кремния. Для наборов образцов с двойной и тройной имплантацией примеси наблюдается сходная картина (рис. 2, *c* ↔ рис. 2, *d*, рис. 2, *e* ↔ рис. 2, *f*). В частности, образуется четко выраженная слоистая структура. Условно можно выделить три слоя (показано на рис. 2, *f*).

Первый слой располагается в приповерхностной области (на глубине 10–60 нм от поверхности) и состоит из большого количества мелких (5–10 нм) кластеров. Второй слой содержит крупные (50–90 нм) ограненные кристаллические преципитаты, залегающие на глубинах от 40 до 180 нм (указано стрелками на рис. 2, *f*). В отдельных крупных кристаллитах регистрируются вторичные дефекты структуры (узкие полосы разного контраста в преципитатах на рис. 2, *c* и рис. 2, *d*), которые возникают в процессе релаксации напряжений в кристаллических матрицах при термообработке. Это наряду с правильными формами границ (огранка кластеров) также подтверждает кристаллическую структуру отдельных крупных включений в матрице диоксида кремния. Можно условно выделить и третий слой (стрелки 3 на рис. 2, *f*), который содержит отдельные выделения (кластеры) внедренной примеси и локализован на глубинах от 200 до 600 нм (граница раздела в структуре SiO_2/Si). Размеры кластеров в этом слое находятся в пределах (2–20) нм, а плотность их существенно ниже, чем в приповерхностной области (первый слой), и резко уменьшается по глубине оксидного слоя. Для образцов после тройной имплантации примеси (рис. 2, *d*) концентрация кластеров в третьем слое в несколько раз выше, чем в образцах с двойной имплантацией (рис. 2, *c*).

Результаты ПЭМ-исследований хорошо согласуются с концентрационными профилями атомов внедренной примеси, полученными методом POP. В области максимума концентрации примеси формируется слой крупных кристаллических преципитатов. Для образцов после тройной имплантации на некоторых крупных кристаллитах из второго слоя можно отметить четко выраженный гранулированный контраст. Размеры этих областей гранулирования (округлые области разного контраста) хорошо согласуются с размерами мелких выделений (5–10 нм), наблюдаемых в этом слое. Гранулированный контраст может свидетельствовать о формировании границ ZnSe/ZnS кластеров, а также отдельных участков структур типа «ядро–оболочка» («core–shell» structures). Из анализа результатов ПЭМ, учитывая сложные структурные перестройки в слоях диоксида кремния (наличие различных по форме и размерам выделений и/или кристаллитов) после термообработки, можно предположить присутствие в имплантированном слое нескольких фаз. Это фазы Zn и ZnSe – в случае двойной имплантации, и фазы Zn, S, ZnSe и ZnS – при тройной имплантации. В последнем случае (образцы второй серии) возможно образование тройных соединений ($\text{ZnS}_x\text{Se}_{1-x}$) [9] на границах сопряжения кластеров ZnSe/ZnS .

Для идентификации сформированных преципитатов использовался метод комбинационного рассеяния света (рис. 3). Для первой серии образцов уже после имплантации (рис. 3, *a*, кривая 1) регистрируются две полосы. Интенсивная узкая полоса вблизи $520\text{--}530\text{ см}^{-1}$ соответствует известной полосе КРС от кремниевой подложки [10]. Вторую узкую полосу с максимумом при $245\text{--}250\text{ см}^{-1}$ можно отнести к рассеянию на продольном оптическом фоне (ЛО-мода) кристаллической фазы ZnSe [11]. После термообработки (рис. 3, *a*, кривая 2) интенсивность данной полосы существенно увеличивается. Кроме того, в спектрах наблюдается полоса при 200 см^{-1} , соответствующая поперечной моде (ТО-мода) оптического фона кристаллического ZnSe, а также полоса при 495 см^{-1} , соответствующая второму порядку ЛО-фона селенида цинка [11]. Резкое возрастание сигнала КРС от фазы ZnSe (суперпозиция пиков поглощения ЛО- и ТО-мод) в этом случае можно связать с большей объемной концентрацией кристаллической фазы ZnSe – за счет формирования крупных кристаллитов с дефектной структурой (из-за чего для кристал-

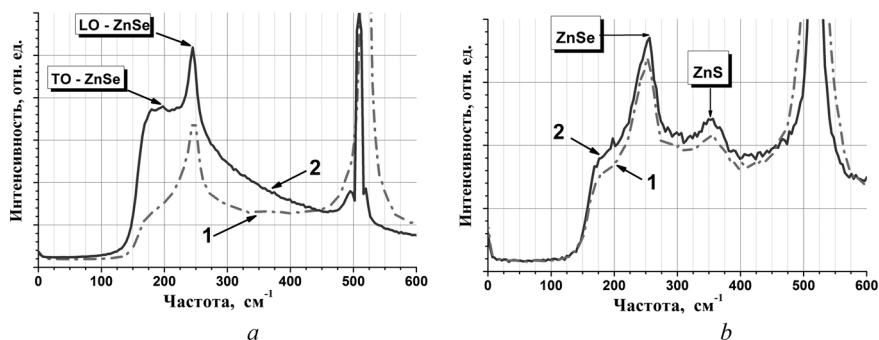


Рис. 3. Спектры КРС от слоев SiO_2 после «горячей» имплантации (кривые 1) в образцы первой (а) и второй (б) серий, а также после термообработок (кривые 2) ($\lambda_{\text{возб}} = 473 \text{ нм}$)

Fig. 3. RS spectra of SiO_2 structures after “hot” implantation (curve 1) for the first (a) and the second (b) series and after annealing (curve 2) ($\lambda_{\text{exc}} = 473 \text{ nm}$)

лического соединения ZnSe возникает рассеяние на поперечной моде оптического фонона). Мы считаем, что для образцов первой серии после термообработки (кривая 2 на рис. 3, а) имеет место и явление резонансного комбинационного рассеяния. Увеличение размера нанокластеров в процессе отжига приводит к «красному» сдвигу спектра поглощения в результате квантово-размерного эффекта. Вследствие этого усиливается поглощение кластерами излучения возбуждающего лазера (473 нм). Это, в свою очередь, объясняет как резкое увеличение сигнала КРС от нанокристаллов соединения ZnSe (появление широкой и интенсивной полосы в диапазоне 170–270 см^{-1}), так и резкое уменьшение сигнала от кремниевой подложки (из сравнения спектров на кривых 1 и 2 вблизи 520 см^{-1}). Отрицать присутствие кластеров элементарного цинка, а также оксида цинка также нельзя, поскольку в спектрах КРС, снятых при комнатной температуре, полосы от этих фаз не проявляются.

Для образцов второй серии сразу после «горячей» имплантации наряду с рассеянием от LO-моды соединения ZnSe (широкая полоса при 230–270 см^{-1}) регистрируется широкая полоса при 330–370 см^{-1} , связанная с присутствием фазы ZnS [12]. Меньшую интенсивность сигнала от фазы ZnS в сравнении с сигналом от фазы ZnSe можно объяснить тем, что кластеры селенида цинка за счет меньшей ширины запрещенной зоны более эффективно поглощают излучение возбуждающего лазера, чем кластеры сульфида цинка. На спектрах образцов второй серии до и после термообработки (из сравнения кривых 1 и 2 на рис. 3, б) не наблюдается существенного изменения в положении полос, связанных с кристаллическими фазами селенида и сульфида цинка. Это позволяет предположить, что после термообработки в образцах не происходит существенных структурно-фазовых изменений. Можно лишь отметить небольшой рост интенсивностей полос, связанных с кристаллическими фазами соединений ZnSe и ZnS , после термообработки, а также снижение интенсивности полосы от кремниевой матрицы (вблизи 520 см^{-1}). Наблюдаемые изменения мы связываем с более существенным поглощением лазерного излучения крупными кластерами соединений A_2B_6 , формируемыми после термообработки. При используемых режимах съемки спектров КРС могло проявиться также рассеяние, связанное с фазой элементарной серы (471 см^{-1} [13]). Однако в спектрах КРС полосы в данном диапазоне зарегистрировано не было. Вероятно, это связано с практически полным переходом атомов серы в бинарное соединение ZnS уже сразу после проведения «горячей» имплантации.

Из сравнения спектров КРС от отожженных образцов первой и второй серии (кривые 2 на рис. 3, а и рис. 3, б) можно заметить, что полоса, связанная с фазой ZnSe , в случае тройной имплантации более широкая и сдвинута в высокочастотную область. Широкая полоса рассеяния от фазы ZnS также сдвинута в высокочастотную область в сравнении со значением (351 см^{-1}), указанным в [9; 14]. Это можно объяснить формированием тройного соединения $\text{ZnS}_x\text{Se}_{1-x}$, причем наблюдаемые сдвиги и уширение полос от фаз ZnSe и ZnS зависят от стехиометрии данного соединения [14]. Тогда появление гранулированного контраста на крупных кристаллитах (рис. 2, е) в образцах второй серии можно объяснить наличием в них фазы тройного соединения на грани-

цах сопряжения фаз ZnSe/ZnS. Для однозначной идентификации химического состава сформированных нанокластеров требуются дополнительные детальные исследования оптических и структурно-фазовых характеристик полученных композитов «SiO₂ + нанокластеры A₂B₆».

Заклучение. В работе продемонстрирована принципиальная возможность одновременного формирования в слоях SiO₂ наноразмерных кластеров прямозонных полупроводников ZnSe и ZnS как сразу после имплантации соответствующих примесей при повышенной температуре (550 °C), так и в результате последующего высокотемпературного отжига (900 °C, 30 мин в арго-не). Структурные исследования методом ПЭМ в технике “cross-section” показали, что в «горячих» условиях имплантации при внедрении примеси в матрице SiO₂ формируются протяженные слои с высокой плотностью нанокластеров размером от 10 до 20 нм, идентифицированных методом КРС как нанокристаллы соединений ZnSe и ZnS. После термообработки в слоях диоксида кремния в области максимума концентрации внедренных примесей формируются крупные ограненные кристаллиты (размером до 90 нм) бинарных соединений селенида и сульфида цинка. Анализ изменений в спектрах КРС имплантированных образцов после термообработки позволяет предположить формирование фазы тройного соединения ZnS_xSe_{1-x} на границах сопряжения фаз ZnSe/ZnS в крупных кристаллитах.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта БРФФИ для молодых ученых № Ф17М-053, а также в рамках договора с БРФФИ № Ф17Д-002.

Acknowledgements. The work is supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grants no. F17M-053 and no. F17D-002).

Список использованных источников

1. Itoh, S. Current status and Future prospects of ZnSe-based light-emitting devices / S. Itoh, K. Nakano, A. Ishibashi // *J. Crystal Growth*. – 2000. – Vol. 214. – P. 1029–1034. doi.org/10.1016/S0022-0248(00)00264-5
2. Yong, K. T. Mn-doped near-infrared quantum dots as multimodal targeted probes for pancreatic cancer imaging / K. T. Yong // *Nanotechnology*. – 2009. – Vol. 20. – 015102. doi.org/10.1088/0957-4484/20/1/015102
3. Effects of strain on the optical and vibrational properties of ZnSe–ZnS_xSe_{1-x} strained-layer superlattices / K. Shahad [et al.] // *J. Luminescence*. – 1990. – Vol. 46. – P. 109–136. doi.org/10.1016/0022-2313(90)90013-2
4. Microwave-assisted aqueous synthesis of transition metal ions doped ZnSe/ZnS core/shell quantum dots with tunable white-light emission / Z. Jie [et al.] // *Appl. Surf. Science*. – 2015. – Vol. 351. – P. 655–661. doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.178
5. Facile synthesis of highly luminescent UV-blue emitting ZnSe/ZnS core/shell quantum dots by a two-step method / D. Bohua [et al.] // *Chem. Commun.* – 2010. – Vol. 46. – P. 7331–7333. doi.org/10.1039/C0CC02042G
6. SRIM [The Stopping and Range of Ions in Matter] (2013) [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.srim.org>
7. Formation of InAs nanocrystals in Si by high-fluence ion implantation / F. Komarov [et al.] // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. – 2008. – Vol. 266. – P. 3557–3564. doi.org/10.1016/j.nimb.2008.06.010
8. Ion-Beam Synthesis of InSb Nanocrystals in Si Matrix / F. Komarov [et al.] // *J. Advanced Materials Research*. – 2013. – Vol. 679. – P. 9–13. doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.679.9
9. Optical Phonons in ZnS_xSe_{1-x} Mixed Crystals / O. Brafman [et al.] // *Phys. Rev. Lett.* – 1967. – Vol. 19. – P. 1120–1123. doi.org/10.1103/PhysRevLett.19.1120
10. Аксянов, И. Г. Комбинационное рассеяние света в мозаичных пленках карбида кремния / И. Г. Аксянов, М. Е. Компан, И. В. Кулькова // *Физика твердого тела*. – 2010. – Т. 52, вып. 9. – С. 1724–1728.
11. Resonant micro-Raman investigations of the ZnSe–LO splitting in II–VI semiconductor quantum wires / G. Lermann [et al.] // *J. Appl. Phys.* – 1997. – Vol. 81. – P. 1446–1450. doi.org/10.1063/1.364181
12. Brafman, O. Raman Effect in Wurtzite- and Zinc-Blende-Type ZnS Single Crystals / O. Brafman, S. S. Mitra // *Phys. Rev.* – 1968. – Vol. 171. – P. 931–934. doi.org/10.1103/PhysRev.171.931
13. Structural properties of solution processed Ge₂₃Sb₇S₇₀ glass materials / M. Waldmann [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2012. – Vol. 22. – P. 17848–17852. doi.org/10.1039/C2JM32235H
14. Kouji, H. Raman Scattering in ZnS_xSe_{1-x} Alloys / H. Kouji, S. Nobuhiko, A. Isamu // *Japanese Journal of Applied Physics*. – 1991. – Vol. 30, N 3. – P. 501–505. doi.org/10.1143/JJAP.30.501

References

1. Itoh S., Nakano K., Ishibashi A. Current status and Future prospects of ZnSe-based light-emitting devices. *Journal of Crystal Growth*, 2000, vol. 214, pp. 1029–1034. doi.org/10.1088/0957-4484/20/1/015102
2. Yong K. T. Mn-doped near-infrared quantum dots as multimodal targeted probes for pancreatic cancer imaging. *Nanotechnology*, 2009, vol. 20, 015102. doi.org/10.1088/0957-4484/20/1/015102
3. Shahad K., Olego D. J., Van De Walle C. G., Cammack D. A. Effects of strain on the optical and vibrational properties of ZnSe–ZnS_xSe_{1-x} strained-layer superlattices. *Journal of Luminescence*, 1990, vol. 46, pp. 109–136. doi.org/10.1016/0022-2313(90)90013-2

4. Jie Z., Qihang C., Wanlu Z., Shiliang M., Liangjie H., Jiatao Z., Guoping C., Ruiqian G. Microwave-assisted aqueous synthesis of transition metal ions doped ZnSe/ZnS core/shell quantum dots with tunable white-light emission. *Applied Surface Science*, 2015, vol. 351, pp. 655–661. doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.05.178
5. Bohua D., Lixin C., Ge S., Wei L. Facile synthesis of highly luminescent UV-blue emitting ZnSe/ZnS core/shell quantum dots by a two-step method. *Chemical Communications*, 2010, vol. 46, pp. 7331–7333. doi.org/10.1039/C0CC02042G
6. SRIM [The Stopping and Range of Ions in Matter] (2013). Available at: <http://www.srim.org>
7. Komarov F., Vlasukova L., Wesch W., Kamarou A., Milchanin O., Grechnyi S., Mudryi A., Ivaniukovich A. Formation of InAs nanocrystals in Si by high-fluence ion implantation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 2008, vol. 266, pp. 3557–3564. doi.org/10.1016/j.nimb.2008.06.010
8. Komarov F., Togambayeva A., Vlasukova L., Parkhomenko I., Milchanin O., Makhavikov M., Tolkyunay M. Ion-Beam Synthesis of InSb Nanocrystals in Si Matrix. *Advanced Materials Research*, 2013, vol. 679, pp. 9–13. doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.679.9
9. Brafman O., Chang I.F., Lengyel G., Mitra S. S., Carnall E. Optical Phonons in ZnS_xSe_{1-x} Mixed Crystals. *Physical Review Letters*, 1967, vol. 19, pp. 1120–1123. doi.org/10.1103/PhysRevLett.19.1120
10. Aksyanov I. G., Kompan M. E., Kul'kova I. V. Raman scattering in mosaic silicon carbide films, *Physics of the Solid State*, 2010, vol. 52, pp. 1850–1854. doi:10.1134/S1063783410090106
11. Lermann G., Bischof T., Materny A., Kiefer W., Kummell T., Bacher G., Forchel A., Landwehr G. Resonant micro-Raman investigations of the ZnSe-LO splitting in II–VI semiconductor quantum wires. *Journal of Applied Physics*, 1997, vol. 81, pp. 1446–1450. doi.org/10.1063/1.364181
12. Brafman O., Mitra S. S. Raman Effect in Wurtzite- and Zinc-Blende-Type ZnS Single Crystals. *Physical Review*, 1968, vol. 171, pp. 931–934. doi.org/10.1103/PhysRev.171.931
13. Waldmann M., Musgraves J. D., Richardson K., Craig B. A. Structural properties of solution processed $Ge_{23}Sb_7S_{70}$ glass materials. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, vol. 22, pp. 17848–17852. doi.org/10.1039/C2JM32235H
14. Kouji H., Nobuhiko S., Isamu A. Raman Scattering in ZnS_xSe_{1-x} Alloys. *Japanese Journal of Applied Physics*, 1991, vol. 30, no. 3, pp. 501–505. doi.org/10.1143/JJAP.30.501

Информация об авторах

Моховиков Максим Александрович – мл. науч. сотрудник. Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 7, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: M.Mohovikov@gmail.com.

Комаров Фадей Фадеевич – член-корреспондент, д-р физ.-мат. наук, зав. лабораторией. Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 7, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: komarovf@bsu.by.

Власукова Людмила Александровна – канд. физ.-мат. наук, зав. лабораторией. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 5, 220064, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vlasukova@bsu.by.

Мильчанин Олег Владимирович – ст. науч. сотрудник. Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 7, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Milchanin@tut.by.

Пархоменко Ирина Николаевна – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 5, 220064, Минск, Республика Беларусь). E-mail: parhomir@yandex.by.

Wendler Elke – профессор. Йенский университет имени Фридриха Шиллера (Max-Wien-Platz 1, D-07743, Jena, Germany). E-mail: elke.wendler@uni-jena.de.

Ковальчук Наталья Станиславовна – канд. техн. наук, зам. главного инженера по серийному производству ОАО «Интеграл» (ул. Казинца, 121а, 220108, Минск, Республика Беларусь). E-mail: 7033696@mail.ru.

Information about the authors

Makhavikau Maksim Alexandrovich – Junior researcher. A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University (7, Kurchatov Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: M.Mohovikov@gmail.com.

Komarov Fadei Fadeevich – Corresponding Member, D. Sc. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University (7, Kurchatov Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: komarovf@bsu.by.

Vlasukova Liudmila Alexandrovna – Ph. D. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. Belarusian State University (5, Kurchatov Str., 220064, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vlasukova@bsu.by.

Milchanin Oleg Vladimirovich – Senior researcher. A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University (7, Kurchatov Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Milchanin@tut.by.

Parhomenko Irina Nikolaevna – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior researcher. Belarusian State University (5, Kurchatov Str., 220064, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: parhomir@yandex.by.

Elke Wendler – Professor. Friedrich-Schiller-Universität (Max-Wien-Platz 1, D-07743, Jena, Germany). E-mail: elke.wendler@uni-jena.de.

Kovalchuk Natalia Stanislavovna – Ph. D. (Engineering), assistant chief engineer. Joint Stock Company «INTEGRAL» Holding Management Company (121a, Kazinets Str., Minsk, 220108, Republic of Belarus). E-mail: 7033696@mail.ru.

Академик В. А. Толкачев

*Институт физики им. Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ПОЛОЖЕНИЕ ЧАСТОТЫ 0–0-ПЕРЕХОДА В ДИФФУЗНОМ ЭЛЕКТРОННО-КОЛЕБАТЕЛЬНОМ СПЕКТРЕ

Аннотация. Тожественностью вероятностей прямого и обратного вертикальных оптических переходов между двумя элементарными франк-кондоновскими состояниями обосновывается возможность установления положения частоты чисто электронного перехода ν_0 по диффузным спектрам поглощения, флуоресценции или фосфоресценции молекул. В такой модели при термически равновесном начальном для электронно-колебательного перехода состоянии сечения переходов $\sigma(\nu)$ удовлетворяют условию $(\sigma(\nu)/\nu)\exp(\mp h\nu/(2kT)) = \varphi(|\nu - \nu_0|)$ (« \rightarrow » – поглощение, « \leftarrow » – испускание, φ – зеркальная относительно ν_0 функция), но лишь в стоковых областях: для $\nu > \nu_0$ в поглощении и $\nu < \nu_0$ в испускании. Приводятся примеры определения 0–0-перехода из диффузных спектров по экстремуму $\varphi(\nu)$ и сравнение с точными, определенными при струйном охлаждении. Частота 0–0-перехода для бесструктурного диффузного спектра, как правило, существенно отличается от частоты максимума спектра. Уширение области экстремума $\varphi(\nu)$ характеризует неоднородность уширения спектра.

Ключевые слова: частота 0–0-перехода, диффузные спектры, чисто электронный переход, проявление таутомерии, неоднородность уширения

Для цитирования: Толкачев, В. А. Положение частоты 0–0-перехода в диффузном электронно-колебательном спектре / В. А. Толкачев // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 50–55.

Vitaly A. Tolkachev

B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

LOCALIZATION OF THE 0–0-TRANSITION IN DIFFUSE VIBRONIC SPECTRA

Abstract. The feasibility of determination of the 0–0-electronic transition ν_0 for diffuse absorption, fluorescence and phosphorescence spectra is proposed on the basic principle: direct and reverse transition probabilities between two *elemental* molecular states are identical. For the starting state being in thermal equilibrium, the transition cross-sections σ obey the relation $(\sigma(\nu)/\nu)\exp(\mp h\nu/(2kT)) = \varphi(|\nu - \nu_0|)$, φ is the mirror function about ν_0 with « \rightarrow » and $\nu > \nu_0$ for absorption, « \leftarrow » and $\nu < \nu_0$ for emission respectively. Examples are given of ν_0 determined as the extremum of $\varphi(\nu)$ in comparison to the jet-cool spectroscopy data. As a rule, ν_0 differs from the maximum of spectra (ν_{\max}). The width of the area of the extremum of $\varphi(\nu)$ characterizes the inhomogeneity of the spectra.

Keywords: 0–0-transition, diffuse spectra, electronic transition, manifestation of tautomerism, inhomogeneous broadening

For citation: Tolkachev V. A. Localization of the 0–0-transition in diffuse vibronic spectra. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 50–55 (in Russian).

Введение. Частоты электронных переходов являются важнейшими молекулярными характеристиками. Особенно актуальны частоты переходов между основным и нижними возбужденными состояниями молекул, определяющие их энергию и, соответственно, физико-химическую активность. Надежных методов определения этих параметров немного. Лучшим и наиболее точным методом является спектроскопия молекул, охлажденных в расширяющейся сверхзвуковой струе до единиц градусов абсолютной температуры, но этот метод только для газовой фазы, недостижимой подавляющему большинству сложных молекул и молекулярных образований, да и для экстремальной температуры, когда «вымораживаются» многие молекулярные формы и трансформации, актуальные в обычных условиях. Но максимальный научный и прикладной, научно-технологический интерес направлен на конденсированное состояние. Во многих биохимических и технологических процессах молекулярные структуры спектрально проявляются

лишь в узких рамках физико-химических условий, или на отдельных ступенях процессов. В этом случае за отсутствием других данных за частоту электронного перехода и тем самым за высоту электронного уровня возбужденного состояния над основным обычно принимается частота максимума спектра, а в редчайших случаях, при наличии спектров люминесценции и поглощения частоту их хотя бы и качественной «зеркальной» симметрии. В [1] показано, что для строгой, количественной зеркальной симметрии спектров и выполнения соотношения Кеннарда–Степанова существуют соотношения, связывающие спектры испускания и поглощения с частотой чисто электронного перехода. На их основе были получены соотношения, связывающие частоты спектров только поглощения или только флуоресценции с частотой чисто электронного перехода, и даже продемонстрирована возможность определения частоты чисто электронных переходов молекул-флуорофоров в растворах и парах [2; 3]. Однако метод, основанный на предположении идеальной зеркальной симметрии спектров при наблюдаемых на практике существенных отклонениях от этого «правила», не был принят, поскольку теоретическое обоснование его только идеальной зеркальной симметрией не корректно. Здесь предлагается обоснование метода, тестируются и обсуждаются выводы.

Теория явления. В работе [1] получены соотношения для абсорбции

$$\ln \frac{\sigma_a(\nu_0 + \Delta\nu)}{\nu_0 + \Delta\nu} - \frac{h\Delta\nu}{2kT} = \ln \frac{\sigma_a(\nu_0 - \Delta\nu)}{\nu_0 - \Delta\nu} + \frac{h\Delta\nu}{2kT} = \varphi_a(\Delta\nu) \quad (1)$$

и флуоресценции

$$\ln \frac{I(\nu_0 + \Delta\nu)}{(\nu_0 + \Delta\nu)^4} + \frac{h\Delta\nu}{2kT} = \ln \frac{I(\nu_0 - \Delta\nu)}{(\nu_0 - \Delta\nu)} - \frac{h\Delta\nu}{2kT} = \varphi_e(\Delta\nu), \quad (2)$$

связывающие части спектров по обе стороны от частоты чисто электронного перехода ν_0 . Здесь $\sigma_a(\nu)$ – сечение поглощения, $I(\nu)$ – интенсивность флуоресценции, $\Delta\nu = |\nu - \nu_0|$. Обобщающая функция $\varphi(\Delta\nu)$ очевидна. Из них следует, что для определения частоты чисто электронного перехода по экстремуму функции $\varphi(\Delta\nu)$ можно использовать любые части спектров поглощения или флуоресценции по обе стороны от ν_0 [2; 3]. Это не так.

Природа зеркальности спектров поглощения и испускания рассматривалась Блохинцевым еще в начале прошлого века [4] и было показано, что в ее основе лежит равенство коэффициентов Эйнштейна, вероятностей прямых и обратных (*вертикальных*) оптических переходов между электронно-колебательными состояниями молекулы. Но у многоатомных сложных молекул с их многообразными механизмами релаксации, начинающимися сразу же после электронного перехода, конечное в переходе прорелаксировавшее состояние представляет собой уже новую не только электронную, но и ядерную структуру, поэтому зеркальность для реальных, наблюдаемых спектров невозможна, что и проявляется на опыте.

Если же рассматривать элементарную вероятность прямых и обратных переходов между исходным и конечным, условным, франк-кондоновским, дорелаксационным электронно-колебательным состоянием, то вероятность прямого и обратного дипольных оптических переходов между той же парой состояний i, j должна быть равной, поскольку определяется квадратом дипольного момента перехода, не зависящим от направления. В адиабатическом приближении электронно-колебательного перехода она пропорциональна

$$|\langle \Psi_i | \vec{\mu}_{i,j} | \Psi_j \rangle|^2 = |\langle \Psi_j | \vec{\mu}_{j,i} | \Psi_i \rangle|^2,$$

где Ψ_i и Ψ_j – функции начального i и конечного j элементарных состояний колебательных ансамблей молекулы, а $\vec{\mu}_{i,j}$ – электронный дипольный момент перехода между ними, включающий и влияние колебательной структуры на электронную структуру молекулы. Приведенное равенство дает четыре равновероятных элементарных перехода: $i \rightarrow j$ в поглощении и в испускании и два $j \rightarrow i$ там же.

Отсюда для поглощения следует равенство элементарных вероятностей переходов $i \rightarrow j$ и $j \rightarrow i$, и то же в испускании. Но здесь исходные, начальные состояния реальные, стационарные, а конечные, как предположено выше, франк-кондоновские, гипотетические, релаксация ко-

торых протекает после перехода и не влияет на его вероятность и спектр. Таким образом, в пределах или спектра поглощения, или испускания *элементарные* вероятности перехода (коэффициенты Эйнштейна) между парой одинаковых элементарных состояний равны и зеркально симметричны по частоте относительно частоты чисто электронного перехода ν_0 , в которой

$$|\langle \Psi_i | \bar{\mu}_{i,i} | \Psi_i \rangle|^2 = |\langle \Psi_j | \bar{\mu}_{j,j} | \Psi_j \rangle|^2.$$

Наблюдаемая интенсивность перехода на каждой частоте пропорциональна усредненной вероятности, где главную роль играет тепловое распределение по исходным состояниям. Но в антистоксовых областях спектров ($\nu < \nu_0$ в поглощении и $\nu > \nu_0$ – в испускании) для компенсации недостающей для перехода энергии фотона отбираются только «горячие» молекулы, а исключаются более холодные, что нарушает зеркальность проявления элементарных вероятностей переходов и тем самым указывает некорректность фрагментов соотношений (1) и (2), относящихся к антистоксовым областям спектров ($\nu = \nu_0 - \Delta\nu$ – в поглощении и $\nu = \nu_0 + \Delta\nu$ – в испускании). Корректны лишь соотношения для стоксовых частей спектров:

$$\ln \frac{\sigma_a(\nu)}{\nu} - \frac{h\nu}{2kT} = \varphi_a(\Delta\nu), \quad (3)$$

и

$$\ln \frac{I(\nu)}{\nu^4} + \frac{h\nu}{2kT} = \varphi_e(\Delta\nu).$$

Обсуждение результатов. Функции $\varphi(\Delta\nu)$ симметричны относительно ν_0 и их зависимость от частоты при $\nu = \nu_0$ имеет экстремум, который и соответствует частоте чисто электронного перехода. С помощью этих соотношений обработан широкий круг спектров поглощения, флуоресценции и фосфоресценции и в [5] приведены примеры полученных зависимостей и соответствующих частот переходов. Здесь приводятся и другие примеры, иллюстрирующие возможности метода.

На рис. 1, *a* определены 0–0-переходы по спектрам поглощения и флуоресценции раствора 2,5-ди(бифенилил)оксазола в циклогексане. Они совпадают.

Поскольку соотношение (3) для исходного S_0 -состояния, его применение не ограничивается переходом на нижний уровень возбужденного состояния. Оно может быть использовано и для определения 0–0-переходов в более высокие, если не будут нарушены перечисленные выше условия

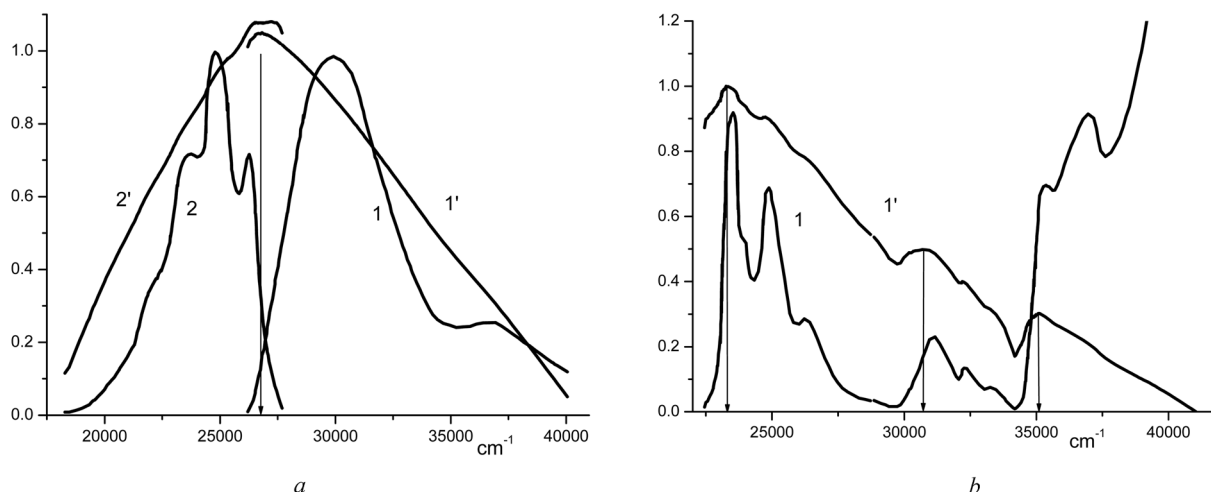


Рис. 1. *a* – спектры раствора 2,5-ди(бифенилил)оксазола в циклогексане [6]: 1 – поглощение, 2 – флуоресценция, 1', 2' – их $\varphi(\nu)$; *b* – пары периксантенноксантина: 1 – спектр поглощения, 1' – $\varphi(\nu)$, $T = 553$ К. Здесь и ниже стрелками помечены 0–0-переходы

Fig. 1. *a* – spectra of 2,5-bis(biphenyl)oxazole solutions in cyclohexane [6]: 1 – absorption, 2 – fluorescence, 1', 2' – corresponding $\varphi(\nu)$; *b* – perixanthoxanthene vapors: 1 – absorption spectrum, 1' – $\varphi(\nu)$, $T = 553$ K. Here and in the following arrows mark 0–0-transitions

его выполнения или не будет затушевывающего области экстремумов перекрытия спектров разных переходов. Пример этого и приведен на рис. 1, *b* на спектре периксантиеноксантина со слабым перекрытием соседних электронных переходов, где стрелками отмечены найденные частоты чисто электронных переходов. Более строгие примеры приведены ниже, в таблице частот чисто электронных переходов, полученных по соотношению (3) и спектроскопией струйно охлажденных молекул и их расхождений с частотой максимума спектра флуоресценции.

Максимумы спектров поглощения и 0–0-переходы [5]
Absorption spectrum maxima and 0–0-transitions [5]

Вещество Substance	ν_j, cm^{-1}	ν_ϕ, cm^{-1}	ν_a^m, cm^{-1}	T, K	$ \nu_j - \nu_\phi , \text{cm}^{-1}$	$ \nu_j - \nu_a^m , \text{cm}^{-1}$
3-Аминофталимид [7]	26563	26670	28500	538	110	1833
1-Аминоантрахинон ¹	21233	21330	23500	493	100	2170
3,6-Диаминофталимид [8]	22148	22200	24400	578	50	2200
1,4-Диоксиантрахинон ¹	19912	19500	21700	473	410	2198
2,5-Дифенилоксазол ¹ [9]	31376	31240	34380	453	140	3980
2,5-Дифенилоксадиазол ¹ [9]	33711	33420	37520	441	290	3800
2,5-Дифенилфуран ¹ [9]	30622	30200	33030	551	420	2830
2,5-Дифенилфуран ¹ [9]	30622	30300	32980	446	320	2680
2-Нафтиламин ¹	28977	28930	30200	388	40	1265
пара-Терфенил [10]	32460	32870	38570	441	410	5700

Примечания: ¹ – Imasaka, T. Critical assessment: Use of supersonic jet spectrometry for complex mixture analysis (IUPAC Technical Report) / T. Imasaka, D. S. Moore, T. Vo-Dinh // Pure and Applied Chemistry. – 2003. – Vol. 75, N 7. – P. 975–998. Здесь ν_j – частота 0–0-перехода струйно охлажденных молекул, ν_ϕ – частота экстремума ϕ -функции, ν_a^m – частота максимума спектра поглощения и T – температура паров при измерении спектра.

Notes: ¹ – Imasaka, T. Critical assessment: Use of supersonic jet spectrometry for complex mixture analysis (IUPAC Technical Report) / T. Imasaka, D. S. Moore, T. Vo-Dinh // Pure and Applied Chemistry. – 2003. – Vol. 75, N 7. – P. 975–998. Here ν_j is 0–0-transition frequency of jet-cooled molecule, ν_ϕ is 0–0-transition frequency by ϕ -function, ν_a^m – frequency of absorption maxima at temperature T .

Из таблицы видно, что частоты чисто электронных переходов по данному методу и струйно охлажденных молекул близки. Различие в большей мере обусловлено различием структур при их температурах. Различие же частот максимума спектров и чисто электронных переходов превышает в среднем 2000 cm^{-1} , что выше погрешностей расчета положения электронных уровней сложных, многоатомных молекул надежными квантово-теоретическими методами. Поэтому использование максимума диффузного спектра как ν_0 некорректно и вопрос актуален.

Соотношение (3) может относиться и к электронным переходам с вкладом колебательного возмущения, которое учитывается условием $|\bar{\mu}_{i,j}| = |\bar{\mu}_{j,i}|$, как, например, n, π^* -переходы (рис. 2, *a*), а также к фосфоресценции (рис. 2, *b*).

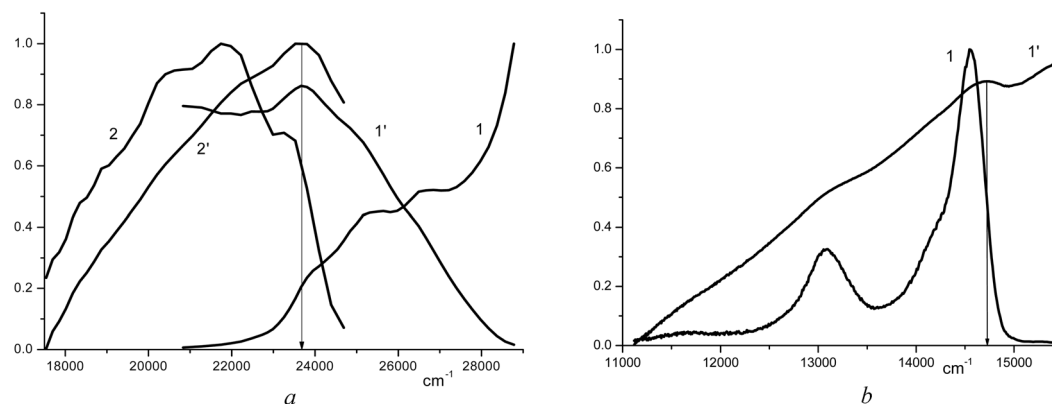


Рис. 2. Спектры (1, 2) и функции $\phi(\nu)$ (1', 2'), 1, 1' – поглощение, 2, 2' – флуоресценция: *a* – антрахинон, пары, $T = 673 \text{ K}$, n, π^* -переход; *b* – Pd-тетрафенилпорфин, фосфоресценция, $T = 77 \text{ K}$

Fig. 2. Spectra (1, 2) and functions $\phi(\nu)$ (1', 2'), 1, 1' for absorption, 2, 2' – for fluorescence: *a* – anthraquinon vapor n, π^* -transition; Pd-tetraphenylporphyrin phosphorescence, $T = 77 \text{ K}$ (*b*)

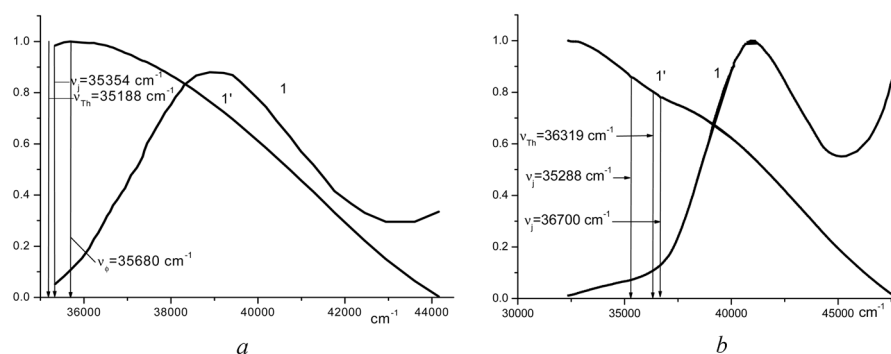


Рис. 3. Спектры поглощения (I), $\phi(\nu)$ (I') и частоты 0–0-перехода: для $\phi(\nu)$ (ν_ϕ), рассчитанные с TD DFT PBE0/6-311+G(d,p)//rb3lyp/aug-cc-pVTZ (ν_{Th}) и полученные при струйном охлаждении (ν_j): a – пары 1,3-диметилурацила, спектр при $T = 483 \text{ K}$ [11], $\nu_j = 35354 \text{ cm}^{-1}$ [12], b – пары урацила, спектр при $T = 501 \text{ K}$ [13], $\nu_j = 35288 \text{ cm}^{-1}$ [14], $\nu_j = 36700 \text{ cm}^{-1}$ [15]

Fig. 3. Absorption spectra (I), $\phi(\nu)$ (I') and 0–0-transition frequencies by $\phi(\nu)$ (ν_ϕ), calculated by TD DFT PBE0/6-311+G(d,p)//rb3lyp/aug-cc-pVTZ (ν_{Th}) and determined by jet-cool spectroscopy (ν_j). 1.3-Dimethyluracil vapor spectrum at $T = 483 \text{ K}$ [11], $\nu_j = 35354 \text{ cm}^{-1}$ [12] (a); uracil vapor spectrum at 501 K [13], $\nu_j = 35288 \text{ cm}^{-1}$ [14], $\nu_j = 36700 \text{ cm}^{-1}$ [15]

Наблюдаемая средняя частота чисто электронного перехода определяется ансамблем конфигураций молекул, степенью неоднородности уширения спектра, поэтому для разных температур или сред она может отличаться как и положение и ширина области экстремума. В частности, данным методом рассмотрен ряд спектров нуклеотидов в растворах и в газовой фазе. На рис. 3, a приведен пример спектров поглощения паров 1,3-диметилурацила, где метод работает, и урацила (рис. 3, b), где экстремум не проявился, хотя имеются данные о частоте 0–0-перехода из спектроскопии при струйном охлаждении. В обоих случаях рассчитанная методом TD DFT частота 0–0-перехода подтверждает данные, полученные струйным методом. Причина отсутствия экстремума кроется в высокой степени таутомеризации урацила, насчитывающего до семи таутомерных форм. При струйном вымораживании до единиц градусов Кельвина остаются самые низкоэнергетические таутомеры с приведенными здесь частотами. Высокие температуры содействуют механизму таутомеризации и на рис. 3, b мы видим составной спектр с обширным длинноволновым плечом, соответствующий полиморфизму урацила в этих условиях и лишь остаточный признак экстремума.

Закключение. Вытекающим из предложенной модели методом только лишь по спектру поглощения или испускания можно определять среднюю частоту 0–0-перехода. Для этого необходимо термически равновесное исходное состояние, отсутствие перекрытия полос спектров, относящихся к разным электронным переходам. Для паров, даже при бесстолкновительной жизни возбужденного состояния спектры флуоресценции дают близкие к получаемым из спектра поглощения данные. Особенно полезной является возможность получения 0–0-переходов из спектра фосфоресценции, поскольку определение положения триплетного уровня другими методами крайне сложное. Подлежит изучению привлекающая возможность оценки неоднородности уширения спектра по уширению экстремума, характеризующего положение 0–0-перехода.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проекты Ф16-103 и Ф16К-051).

Acknowledgements. The work is sponsored by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Projects Ф16-103 and Ф16К-051).

Список использованных источников

1. Казаченко, Л. П. Зеркальная симметрия и контур полос люминесценции и поглощения сложных молекул / Л. П. Казаченко, Б. И. Степанов // Оптика и спектроскопия. – 1957. – Т. 2, № 3. – С. 339–349.
2. Домби, И. О контуре спектров флуоресцирующих растворов / И. Домби, И. Кечкемети, Л. Козма // Оптика и спектроскопия. – 1965. – Т. 18. – С. 710.
3. Толкачев, В. А. Комбинирующие состояния при электронно-колебательных переходах сложных молекул и частота электронного перехода / В. А. Толкачев // Оптика и спектроскопия. – 1966. – Т. 20. – С. 982–988.
4. Блохинцев, Д. Спектры флуоресценции и абсорбции сложных молекул / Д. Блохинцев // ЖЭТФ. – 1939. – Т. 9, № 4. – С. 459–466.

5. Толкачев, В. А. Определение частот 0–0-переходов в диффузных электронно-колебательных спектрах / В. А. Толкачев // Журнал прикладной спектроскопии. – 2017. – Т. 84, № 4. – С. 648–654.
6. Steyer, B. Stimulated and Spontaneous Emission from Laser Dyes in the Vapor Phase / B. Steyer, F. P. Schäfer // Appl. Phys. – 1975. – Vol. 7, N 2. – P. 113–122. doi.org/10.1007/bf00884220
7. Asimov, M. Fluorescence excitation spectra of jet-cooled amino-phthalimides / M. Asimov, N. P. Ernsting // J. Lumin. – 1983. – Vol. 28, N 1. – P. 119–121. doi.org/10.1016/0022-2313(83)90030-3
8. Колебательно индуцированное заимствование поляризации во флуоресценции свободных сложных молекул / Н. А. Борисевич [и др.] // Доклады АН СССР. – 1989. – Т. 305, № 6. – С. 1354–1358.
9. Spectral, Fluorescent, Photochemical and Laser Properties of Some Organic Compound Vapors / G. A. Abakumov [et al.] // Appl. Phys. – 1980. – Vol. 23, N 1. – P. 83–87. doi.org/10.1007/bf00899574
10. Murakami, Jun-ichi. Multiphoton ionization spectrum of p-terphenyl in a supersonic free jet / Jun-ichi Murakami, K. Okuyama, M. Ito // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1982. – Vol. 55, N 11. – P. 3422–3423. doi.org/10.1246/bcsj.55.3422
11. Spectroscopic Studies on Vapor Phase Tautomerism of Natural Bases Found in Nucleic Acids / M. J. Novak [et al.] // Z. Naturforsch. – 1978. – Vol. 33. – P. 876–883.
12. Keto-Enol Tautomer of Uracil and Thymine / Y. Tsuchia [et al.] // J. Phys. Chem. – 1988. – Vol. 92, N 7. – P. 1760–1765. doi.org/10.1021/j100318a013
13. Clark, L. B. Vapor Spectra and Heats of Vaporization of Some Purine and Pyrimidine Bases / L. B. Clark, G. G. Peschel, I. Tinoco // J. Phys. Chem. – 1965. – Vol. 69, N 10. – P. 3615–3618. doi.org/10.1021/j100894a063
14. Electronic spectra of Uracil in a Supersonic Jet / M. Fujii [et al.] // Chem. Phys. Letters. – 1986. – Vol. 126, N 6. – P. 583–587. doi.org/10.1016/s0009-2614(86)80178-6
15. Brady, B. B. The Electronic Spectra of the Pirimidine Basis Uracil and Thymine in a Supersonic Molecular Beam / B. B. Brady, L. A. Peteanu, D. H. Levy // Chem. Phys. Letters. – 1988. – Vol. 147, N 6. – P. 538–543. doi.org/10.1016/0009-2614(88)80264-1

References

1. Kazachenko L. P., Stepanov B. I. Mirror symmetry and the contour of luminescence and absorption bands of complex molecules. *Optika i Spektroskopiya = Optics and Spectroscopy*, 1957, vol. 2, no. 3, pp. 339–349 (in Russian).
2. Dombi I., Kechkemeti I., Kozma L. Contour of spectra of fluorescing solutions. *Optika i Spektroskopiya = Optics and Spectroscopy*, 1965, vol. 18, pp. 710 (in Russian).
3. Tolkahev V. A. Combining states at electron-vibration transitions of complex molecules and electron transition frequency. *Optika i Spektroskopiya = Optics and Spectroscopy*, 1966, vol. 20, pp. 982–988 (in Russian).
4. Blokhintsev D. The Spectra of Fluorescence and Absorption of Complex Molecules. *Journal Physics*, 1939, vol. 1, no. 2, pp. 117–124.
5. Tolkahev V. A. Determination of 0–0 transitions frequency from diffuse electron-vibrational spectra. *Journal of Applied Spectroscopy*, 2017, vol. 84, no. 4, pp. 668–673. doi.org/10.1007/s10812-017-0527-y
6. Steyer B., Schäfer F. P. Stimulated and Spontaneous Emission from Laser Dyes in the Vapor Phase. *Applied Physics*, 1975, vol. 7, no. 2, pp. 113–122. doi.org/10.1007/bf00884220
7. Asimov M., Ernsting N. P. Fluorescence excitation spectra of jet-cooled amino-phthalimides. *Journal of Luminescence*, 1983, vol. 28, no. 1, pp. 119–121. doi.org/10.1016/0022-2313(83)90030-3
8. Borisevich N. A., Gavriluk V. V., Povedailo V. A., Tolkahev V. A. Vibration-induced adoption of polarization in fluorescence of free complex molecules. *Doklady akademii nauk SSSR = Doklady Physics*, 1989, vol. 305, no. 6, pp. 1354–1358 (in Russian).
9. Abakumov G. A., Anisimov Yu. M., Polyakov B. I., Simonov A. P. Spectral, Fluorescent, Photochemical and Laser Properties of Some Organic Compound Vapors. *Applied Physics*, 1980, vol. 23, no. 1, pp. 83–87. doi.org/10.1007/bf00899574
10. Murakami Jun-ichi, Okuyama K., Ito M. Multiphoton ionization spectrum of p-terphenyl in a supersonic free jet. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1982, vol. 55, no. 11, pp. 3422–3423. doi.org/10.1246/bcsj.55.3422
11. Novak M. J., Szczepaniak K., Barski A., Shugar D. Spectroscopic Studies on Vapor Phase Tautomerism of Natural Bases Found in Nucleic Acids. *Zeitschrift fur Naturforschung*, 1978, vol. 33, pp. 876–883.
12. Tsuchia J., Tamura T., Fujii M., Ito M. Keto-Enol Tautomer of Uracil and Thymine. *The Journal of Physical Chemistry*, 1988, vol. 92, no. 7, pp. 1760–1765. doi.org/10.1021/j100318a013
13. Clark L. B., Peschel G. G., Tinoco I. Vapor Spectra and Heats of Vaporization of Some Purine and Pyrimidine Bases. *The Journal of Physical Chemistry*, 1965, vol. 69, no. 10, pp. 3615–3618. doi.org/10.1021/j100894a063
14. Fujii M., Tamura T., Mikami N., Ito M. Electronic spectra of Uracil in a Supersonic Jet. *Chemical Physics Letters*, 1986, vol. 126, no. 6, pp. 583–587. doi.org/10.1016/s0009-2614(86)80178-6
15. Brady B. B., Peteanu L. A., Levy D. H. The Electronic Spectra of the Pirimidine Basis Uracil and Thymine in a Supersonic Molecular Beam. *Chemical Physics Letters*, 1988, vol. 147, no. 6, pp. 538–543. doi.org/10.1016/0009-2614(88)80264-1

Информация об авторе

Толкачев Виталий Антонович – академик, д-р физ.-мат. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tolkahev@imaph.bas-net.by.

Information about the author

Tolkahev Vitaly Antonovich – Academician, D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Chief researcher. B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tolkahev@imaph.bas-net.by.

Е. С. Люлькович¹, С. Г. Пуховская², Ю. Б. Иванова³, А. С. Семейкин², Н. Н. Крук¹

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

²Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Российская Федерация

³Институт химии растворов имени Г. А. Крестова Российской академии наук,
Иваново, Российская Федерация

АТРОПОИЗОМЕРИЯ 5,10,15,20-ТЕТРАКИС-(3-*N*-МЕТИЛПИРИДИЛ)-ПОРФИРИНА

(Представлено академиком С. В. Гапоненко)

Аннотация. Исследованы спектральные характеристики 5,10,15,20-тетра-(3-*N*-метилпиридил)-порфирина в водном растворе и обнаружена временная эволюция спектров поглощения. Установлено, что причиной спектральной эволюции является гетерогенность раствора, обусловленная наличием нескольких атропоизомеров, различающихся положением пиридинных групп относительно средней плоскости тетрапиррольного макроцикла молекулы порфирина благодаря свободному вращению заместителей вокруг связи C_m-C_1 . Показано, что наблюдаемые спектральные превращения отражают перераспределение концентраций атропоизомеров в ходе установления равновесного распределения, которое завершается примерно через 300 ч после приготовления раствора при температуре 290 ± 2 К. Предложено, что явление атропоизомерии следует считать присущим всем 5,10,15,20-тетраарилпорфиринам с асимметричным относительно проходящей через связь C_m-C_1 оси замещением арильных групп. Обсуждены возможности практического использования данного явления.

Ключевые слова: порфирины, спектры поглощения, молекулярная структура, атропоизомерия, конформеры

Для цитирования: Атропоизомерия 5,10,15,20-тетракис-(3-*N*-метилпиридил)-порфирина / Е. С. Люлькович [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 56–65.

Lizaveta S. Liulkovich¹, Svetlana G. Pukhovskaya², Yulia B. Ivanova³, Alexandr S. Semeikin², Mikalai M. Kruk¹

¹Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

²Ivanovo State University of Chemistry and Technology, Ivanovo, Russian Federation

³G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of Russian Academy of Sciences, Ivanovo, Russian Federation

ATROPOISOMERIZATION OF 5,10,15,20-TETRAKIS-(3-*N*-METHYLPYRIDYL)-PORPHYRIN

(Communicated by Academician Sergey V. Gaponenko)

Abstract. The spectral properties of the 5,10,15,20-tetrakis-(3-*N*-methylpyridyl)-porphyrin were studied in the water solution and the temporal evolution of absorption spectra was revealed. The origin of the spectral changes was found to be due to the solution heterogeneity which is based on the coexistence of atropoisomers. These atropoisomers differ in their pyridyl groups, positioning relative to the mean plane of the tetrapyrrolic macrocycle due to an unrestricted rotation of substituents around the C_m-C_1 bond. The observed spectral changes are shown to reflect the redistribution of the atropoisomer concentrations after establishing the equilibrium distribution that is over approximately within 300 hours after the preparation of a solution at a temperature of 290 ± 2 K. The atropoisomerization is suggested to be the inherent property of all 5,10,15,20-tetraarylporphyrins with an asymmetric substitution of aryl groups with respect to the axis passing through the C_m-C_1 bond. The prospects for the practical applications of the revealed phenomenon are discussed.

Keywords: porphyrins, absorption spectra, molecular structure, atropoisomerization, conformers

For citation: Liulkovich L. S., Pukhovskaya S. G., Ivanova Yu. B., Semeikin A. S., Kruk M. M. Atropoisomerization of 5,10,15,20-tetrakis-(3-*N*-methylpyridyl)-porphyrin. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 56–65 (in Russian).

Введение. В основе научного подхода к разработке материалов нового поколения с заданными физико-химическими свойствами и возможностью управления ими лежит глубокое понимание механизмов взаимосвязи «структура–свойство» между строением вещества и его определенными характеристиками [1]. И если в работах середины прошлого века эта взаимосвязь трактовалась как простое соотнесение тех или иных характеристик молекулы с ее химической формулой, то на рубеже тысячелетия эти характеристики анализировались уже с учетом молекулярной конформации системы, взаимного пространственного расположения отдельных фраг-

ментов молекулы и динамики их взаимного движения, которые формируются в том числе в результате кратковременных аperiодических внешних воздействий на систему, например, таких как фотовозбуждение либо температурный скачок. Одним из наиболее ярких примеров установления взаимосвязи «структура–свойство» является выявление механизма внутримолекулярного переноса электрона и формирования канала излучательной дезактивации с большим сдвигом Стокса в органических молекулярных роторах [2].

Мощный импульс изучению взаимосвязи «структура–свойство» в тетрапиррольных соединениях придала в начале 1990-х годов концепция формирования неплоских конформеров и молекулярной подвижности тетрапиррольного макроцикла [3; 4], который до этого, как правило, рассматривался как статичная планарная система в силу ароматичности его π -сопряженной электронной системы. Вместе с тем, даже если собственно тетрапиррольный хромофор не обнаруживает конформационную динамику, его периферические заместители, которые не вовлечены непосредственно в формирование оптических переходов, могут существенно влиять на его спектрально-люминесцентные и фотофизические характеристики. Так, незамещенные арильные фрагменты, присоединенные в *мезо*-положениях тетрапиррольного макроцикла, могут свободно вращаться вокруг одиночной связи C_m-C_1 . Однако если они имеют заместители в *орто*-положении, то вращение арильных фрагментов исключается из-за стерических препятствий, что приводит к совокупности структурных и функциональных последствий для тетрапиррольного хромофора, получившей название *орто*-эффекта [5], проявления которого существенно возрастают, если макроцикл также замещен (объемными) заместителями в C_b положениях пиррольных колец. *Орто*-эффект приводит к формированию жесткой молекулярной структуры, и, если *орто*-заместитель один, либо арильный фрагмент дополнительно замещен в одном из *мета*-положений, то уже на стадии синтеза формируются стабильные атропоизомеры, обладающие различающимися молекулярной структурой и физико-химическими характеристиками из-за асимметрии стерических взаимодействий и электронной коммуникации. Для арильных фрагментов, замещенных в *мета*- и *пара*-положениях, стерические взаимодействия исключены, а электронная коммуникация с макроциклом рассматривалась как усредненная по всем возможным двугранным углам между плоскостями макроцикла и арильных групп, и как следствие, было принято считать, что атропоизомерия этим производным не свойственна.

Молекулы *орто*-, *мета*- и *пара*-метилзамещенного производных 5,10,15,20-тетрапиридилпорфирина обладают выраженным фотоцитотоксическим эффектом и активно исследуются с целью дальнейшего применения для инактивации бактерий и вирусов [6]. Для литературных данных по спектрально-люминесцентным характеристикам свободного основания *мета*-метилзамещенного производного 5,10,15,20-тетрапиридилпорфирина (далее в тексте – $H_2T(3-N-M\text{Пир})P$) характерен большой разброс измеренных положений максимумов полос поглощения и люминесценции, и их относительных интенсивностей, в отличие таковых для *орто*- и *пара*-метилзамещенных производных, изучавшихся в [7; 8]. Нами было предположено, что наиболее вероятной причиной этого является гетерогенность растворов, обусловленная формированием нескольких *нестационарных* атропоизомеров, различающихся положением метильной группы относительно средней плоскости макроцикла порфирина. С целью проверки гипотезы в настоящей работе детально изучены спектральные характеристики молекул $H_2T(3-N-M\text{Пир})P$ в водном растворе с использованием методов абсорбционной и люминесцентной спектроскопии. В результате исследования впервые установлено, что явление атропоизомерии свойственно всем 5,10,15,20-тетраарилпорфиринам, арильные фрагменты которых имеют асимметрию относительно оси, проходящей через связь C_m-C_1 , вне зависимости от наличия стерических взаимодействий с тетрапиррольным макроциклом.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования использовался тетраидид свободного основания 5,10,15,20-тетра-(3-*N*-метилпиридил)-порфирина (рис. 1), синтезированный по предложенной ранее методике [9].

Электронные спектры поглощения, спектры флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции регистрировали на спектрофотометре CM2203 фирмы «Солар». Все эксперименты выполнены в стандартных кварцевых кюветках 1×1 см с тефлоновой пробкой. Образец поддерживался при заданной температуре в термостатируемом кюветном отделении спектрометра.

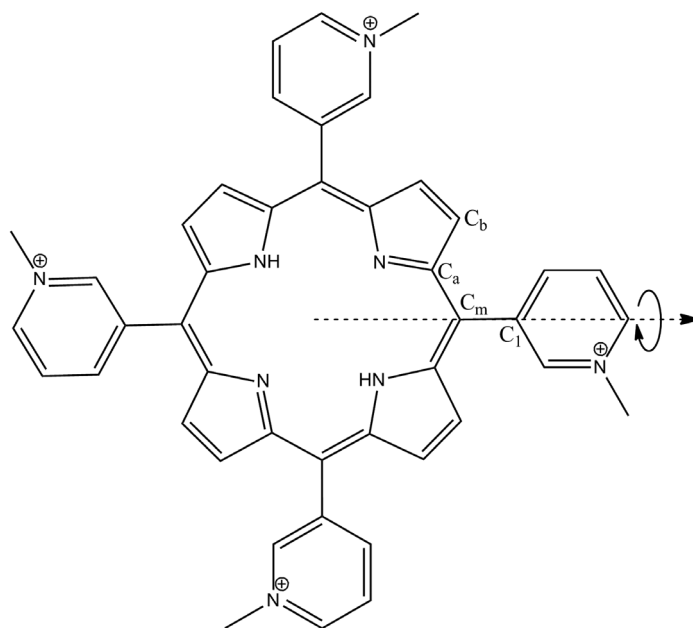


Рис. 1. Молекулярная структура свободного основания 5,10,15,20-тетра-(3-*N*-метилпиридил)-порфирина. Противоионы не показаны

Fig. 1. Molecular structure of the 5,10,15,20-tetrakis-(3-*N*-methylpyridyl)-porphyrin free base. The counter ions are not shown

Результаты и их обсуждение. Электронные спектры поглощения $H_2T(3-N-MПир)P$ в водном растворе, измеренные через определенные промежутки времени в течение нескольких часов после его приготовления, обнаруживают временную эволюцию (рис. 2). Наблюдаемые спектральные изменения, как было показано в [10], не связаны с химическим превращением исследуемых

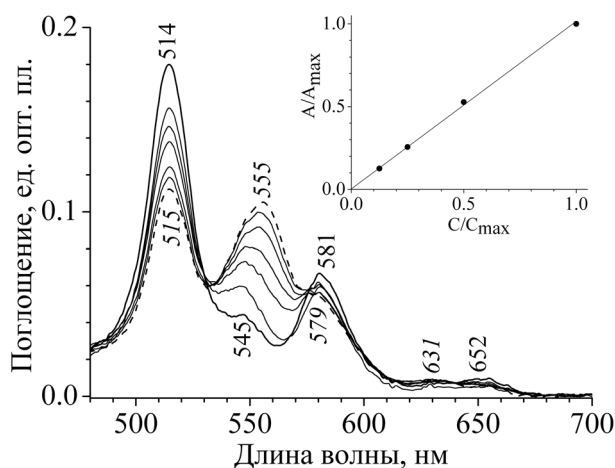


Рис. 2. Электронные спектры поглощения $H_2T(3-N-MПир)P$ в водном растворе. Исходный спектр – жирная линия (максимумы обозначены прямым шрифтом); спектр, снятый через 350 ч после приготовления, – штриховая линия (максимумы обозначены наклонным шрифтом). На вставке дана зависимость поглощения при 514 нм от концентрации ($C_{max} = 5 \cdot 10^{-5} M$)

Fig. 2. Electronic absorption spectra of $H_2T(3-N-MPyr)P$ in water solution. Initial spectrum shown with solid line (maxima denoted with regular type); the spectrum taken at 350 hours after solution preparation shown with dashed line (maxima denoted with italic type). Inset shows the concentration dependence of absorbance at 514 nm ($C_{max} = 5 \cdot 10^{-5} M$)

молекул и носят обратимый характер. Так, увеличение либо уменьшение температуры приводит к изменению формы полос в спектрах поглощения, причем эти изменения не объясняются простой зависимостью объема раствора от температуры, а характеризуются уменьшением поглощения одних полос и появлением (увеличением поглощения) других. Очевидно, что исследуемый раствор является гетерогенным, и наблюдаемые спектральные изменения обусловлены перераспределением концентраций отдельных компонентов. В многочисленных работах отмечается склонность водорастворимых порфиринов к формированию димеров сэндвичеобразной структуры (см., напр., [11]), однако в рассматриваемом случае агрегация молекул порфирина исключается. Такое заключение сделано на основании: а) отличия картины наблюдаемых спектральных сдвигов от таковой, характерной для формирования димеров; б) отсутствия изобестических точек в электронных спектрах поглощения, которые должны обязательно присутствовать при мономер-димерном равновесии в растворе, которое может быть смещено, в том числе и изменением температуры

раствора; в) сохранения линейной зависимости поглощения от концентрации свежеприготовленного раствора в диапазоне рабочих концентраций образцов (рис. 2, вставка).

Отсутствие изобестических точек в электронных спектрах поглощения в ходе временной эволюции однозначно указывает на то, что в растворе одновременно есть не менее трех различных поглощающих центров. Причем эти центры должны быть однотипными, поскольку общий вид электронного спектра поглощения в ходе временной эволюции не изменяется: как свежеприготовленный раствор, так и раствор спустя 325–350 ч после приготовления характеризуются четырехполосными спектрами поглощения в видимой области, которые характерны для молекул свободных оснований. Поэтому наличие протонированных либо депротонированных в ядре тетрапиррольного макроцикла производных исключается, поскольку из-за изменения симметрии молекулы (при присоединении либо диссоциации протона(ов)) они характеризуются принципиально отличающимися электронными спектрами поглощения [7]. Следовательно, данные поглощающие центры по всей видимости представляют собой конформеры свободного основания $H_2T(3-N-M\text{Пир})П$.

Молекула $H_2T(3-N-M\text{Пир})П$, как было указано выше, характеризуется отсутствием стерических взаимодействий между тетрапиррольным макроциклом и периферическими заместителями, поэтому формирование конформерных макроциклических структур, обусловленных лишь сольватационными эффектами, является маловероятным. В то же время возможность вращения пиридинных заместителей вокруг связи C_m-C_1 позволяет метилированному атому азота пиридила располагаться либо с одной, либо с другой стороны плоскости тетрапиррольного макроцикла. Различное взаимное расположение четырех периферических заместителей относительно плоскости тетрапиррольного макроцикла приводит к формированию четырех атропоизомеров. Если обозначить заместитель с атомом азота «над плоскостью макроцикла» как **A**, а заместитель с атомом азота «под плоскостью макроцикла» как **B**, то формируются атропоизомеры **AAAA**, **AAAB**, **AABB** и **ABAB** типов, статистические веса которых будут относиться как 1 : 4 : 2 : 1 [12]. Особенностью данных атропоизомеров по сравнению с атропоизомерами *орто*-арилзамещенных производных является их лабильность из-за отсутствия стерических препятствий со стороны макроцикла. С точки зрения формирования электронных спектров поглощения лабильность конформеров не вносит никаких ограничений на регистрацию индивидуальных характеристик атропоизомеров. Действительно, согласно принципу Франка–Кондона, переход с поглощением кванта света произойдет существенно быстрее, чем молекулярная конформация молекулы изменится в результате вращения арильных фрагментов, время вращательной релаксации которых составляет $\sim 10^{-10}$ с. Для регистрации индивидуальных спектров поглощения атропоизомеров существенным является механизм влияния ориентации арильного фрагмента на дипольные моменты переходов тетрапиррольного макроцикла. Наиболее вероятно, что при таком взаимодействии в результате влияния суммарного дипольного момента периферических заместителей на дипольный момент порфирина, лежащий для невозмущенного макроцикла в его плоскости, «возмущенный» дипольный момент отклоняется от исходного направления вдоль оси, проходящей через атомы азота противоположных пиррольных (пирролениновых) колец. При этом, в зависимости от типа определенного атропоизомера, «возмущенный» дипольный момент может остаться либо в плоскости XU тетрапиррольного макроцикла, либо приобрести составляющую вдоль оси Z , как в случае непланарных порфиринов с высокой степенью искажения, у которых был обнаружен «ортогональный» дипольный момент [13]. Как правило, арильные фрагменты не вовлечены непосредственно в формирование электронных переходов, поэтому оказываемое ими возмущающее действие не должно быть велико. Так, для индивидуальных спектров поглощения стабильных атропоизомеров свободных оснований *орто*, *орто'*-дихлор-*мета*-фенилзамещенных порфиринов размах положений максимума длинноволнового $Q_y(0,0)$ -перехода (полоса I) составляет от 3 до 9 нм, при этом величины коэффициента экстинкции полосы различаются почти на порядок [14]. Для $Q_x(1,0)$ -перехода, характеризующегося наиболее интенсивной полосой в видимой области спектра (полоса IV), размах положений максимума составляет 1 нм, а величины коэффициента экстинкции различаются чуть более чем в 2 раза. В исследуемом нами случае (рис. 2) наблюдаемые в ходе временной эволюции спектральные

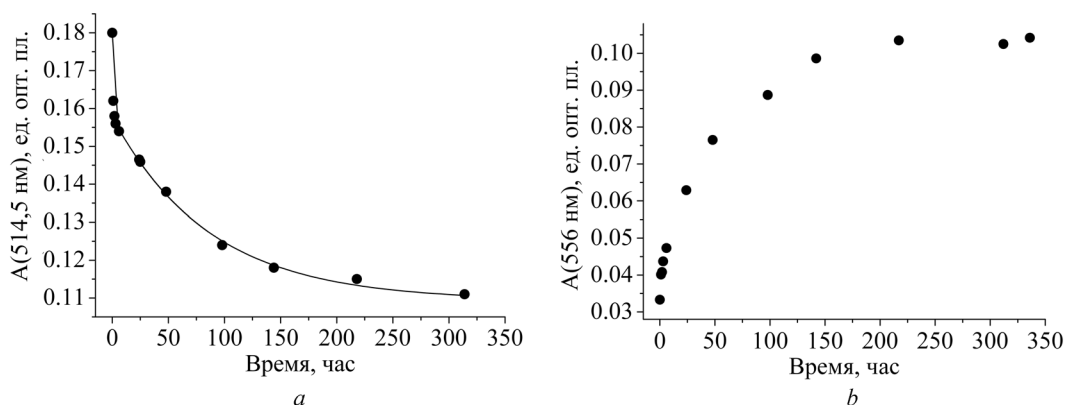


Рис. 3. Кинетика изменения поглощения H₂T(3-N-MПир)П в водном растворе: при 514 нм (а), линией показана теоретическая кривая; при 556 нм (б)

Fig. 3. Kinetics of the absorbance changes of H₂T(3-N-MPy)P in water solution: at 514 nm (a), line represents the theoretical curve; at 556 nm (b)

сдвиги также составляет несколько нм, а величина коэффициента экстинкции в области полос II, III и IV изменяется в несколько раз.

Временная эволюция электронных спектров поглощения отражает процесс установления равновесия между атропоизомерами в растворе. Исходный спектр поглощения, измеренный сразу после приготовления раствора, обусловлен (главным образом) поглощением одного атропоизомера. На это указывает отсутствие зависимости спектра флуоресценции раствора от длины волны возбуждения. Однако, уже через 1 ч после приготовления такая зависимость обнаруживается, что свидетельствует о формировании в наблюдаемом количестве другого(их) атропоизомера(ов). Нами детально исследована динамика спектральных изменений в растворе, находящемся при температуре 290 ± 2 К, во временном диапазоне до 1600 ч после приготовления. Кинетика спектральных изменений анализировалась в области полосы IV исходного атропоизомера при 514 нм, где поглощение уменьшается со временем и в области полосы III для равновесной смеси атропоизомеров при 556 нм, где поглощение растет с течением времени (рис. 3). К 350 ч после приготовления раствора спектральные изменения прекращаются, обе кинетики выходят на постоянный уровень, поэтому временной интервал от 350 до 1600 ч не показан. Следует отметить, что измеренные кинетики спектральных превращений хорошо аппроксимируются двухэкспоненциальной функцией (коэффициент парной корреляции $R^2 = 0,998$) с одинаковыми в пределах погрешности характеристическими временами 0,7 и 72 ч. В то же время веса данных компонентов для двух кинетик отличаются, что отражает различное поглощение смеси атропоизомеров при 514 и 556 нм.

Вероятности формирования атропоизомеров 5,10,15,20-тетраарилпорфиринов в растворе, как показывают результаты экспериментальных исследований [12; 14], несколько отличаются от статистического равновесного распределения, хотя в целом их соотношение сохраняет тенденцию статистического распределения. Отличия вызваны, по-видимому, различием в величинах энергии сольватации атропоизомеров. Формирование сольватной оболочки ионизированных периферических заместителей в водном растворе обеспечивает молекуле порфирина в целом гидрофильные свойства, поскольку собственно тетрапиррольный макроцикл является гидрофобным. Структура и объем сольватной оболочки пиридинных заместителей способны существенно изменить их скорости вращения. Поэтому можно полагать, что сольватация определенно является фактором стабилизации структуры атропоизомера, и соответственно, способствует возможности регистрации индивидуальных характеристик атропоизомеров.

Переходя к анализу кинетики спектральных изменений, сопутствующих установлению равновесия между атропоизомерами, необходимо отметить, что спектр поглощения свежеприготовленного раствора определяется одним статистически наиболее вероятным атропоизомером ААВ типа. Естественно предположить, что конформером, который формируется с характерными

стическим временем 0,7 ч, будет атропоизомер **AABB** типа. Хотя формирование этого атропоизомера сопряжено с «переворотом» одного пиридинного заместителя, равно как и у атропоизомеров **AAAA** и **ABAB** типов, существует две возможности для его формирования: «перевернуться» из положения **A** в **B** может любой из двух соседних с **B** пиридинных фрагментов, и в результате будет сформирован атропоизомер **AABB** типа. В то же время как при переходе **AAAB** → **ABAB**, так и при переходе **AAAB** → **AAAA** существует единственная возможность «переворота» пиридинного заместителя. В этих случаях скорости атропоизомеризации должны быть меньше и одинаковыми между собой из статистических соображений. Влияние эффектов сольватации может дифференцировать скорости атропоизомеризации **AAAB** → **ABAB** и **AAAB** → **AAAA**, однако, различия не должны быть велики. Поэтому предположено, что второй компонент в кинетике изменения поглощения с характеристическим временем 72 ч обусловлен формированием атропоизомеров **AAAA** и **ABAB** типов. Таким образом, при установлении равновесного распределения в растворе вначале формируются атропоизомеры **AABB** типа, а затем атропоизомеры **AAAA** и **ABAB** типов. Существенное различие характеристических времен формирования вышеупомянутых атропоизомеров значительно облегчает выявление их индивидуальных спектральных характеристик, поскольку за время формирования атропоизомера **AABB** типа (~3 ч) изменением концентрации (т. е. формированием) атропоизомеров **AAAA** и **ABAB** типов можно пренебречь.

Таким образом, спектр поглощения атропоизомера **AABB** типа можно получить путем вычитания умноженного на весовой коэффициент исходного спектра поглощения атропоизомера **AAAB** типа из спектра поглощения, измеренного через 3 ч после приготовления раствора и представляющего собой суперпозицию спектров поглощения атропоизомеров **AAAB** и **AABB** типа. Величина весового коэффициента была определена как 0,25 и оказалась равной доле атропоизомера **AABB** типа в статистической равновесной смеси. Следует отметить, что варьирование весового коэффициента в пределах $\pm 0,05$ очень слабо влияло на положение и форму полос в рассчитанном спектре поглощения атропоизомера **AABB** типа. Анализ характера спектральных изменений в течение первых часов после приготовления раствора (рис. 2) позволяет заключить, что по сравнению с исходным атропоизомером **AAAB** типа атропоизомер **AABB** типа обладает большим поглощением в области 545 нм и меньшим в области 514 нм. Рассчитанный спектр поглощения атропоизомера **AABB** типа (рис. 4, *a*, штриховая линия) действительно характеризуется интенсивной полосой поглощения с максимумом при 545 нм и слабыми полосами с максимумами при 517 и 582 нм. Положение максимума длинноволнового электронного перехода из-за слабости поглощения в этой области спектра установить непосредственно не представляется возможным. Однако на основании положений четырехорбитальной модели Гоутермана, которые указывают, что энергетический интервал между электронным и вибронным перехода-

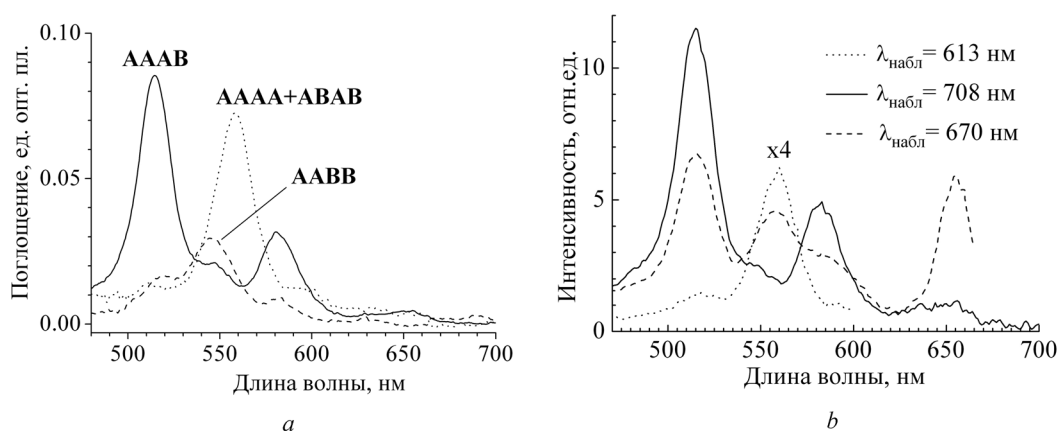


Рис. 4. Индивидуальные спектры поглощения атропоизомеров $H_2T(3-N-MPy)P$ в равновесном растворе (*a*); спектры возбуждения флуоресценции $H_2T(3-N-MPy)P$ в равновесном растворе (*b*)

Fig. 4. Individual absorption spectra of the $H_2T(3-N-MPy)P$ atropoisomers in the equilibrium solution (*a*); spectra of fluorescence excitation of the $H_2T(3-N-MPy)P$ in the equilibrium solution (*b*)

ми одинаков для обоих нижних синглетных состояний, положение максимума длинноволнового $Q_y(0,0)$ -перехода оценено нами как ~ 630 нм.

Аналогично, суммарный спектр поглощения атропоизомеров **АААА** и **АВАВ** типов получается путем вычитания умноженного на весовой коэффициент исходного спектра поглощения атропоизомера **АААВ** типа и рассчитанного спектра поглощения атропоизомера **ААВВ** типа из спектра поглощения, измеренного после установления равновесия в растворе (350 ч). Весовой коэффициент в этом случае принят равным доле атропоизомера **АААВ** типа в статистической равновесной смеси, т. е. 0,5. Как и в предыдущем случае, небольшие изменения весового коэффициента практически не влияли на форму полос рассчитанного спектра поглощения смеси атропоизомеров **АААА** и **АВАВ** типов. Рост поглощения в области 540–570 нм в ходе установления равновесия в растворе (рис. 2) обусловлен большей величиной коэффициента экстинкции полос поглощения атропоизомеров **АААА** и **АВАВ** типов по сравнению с таковым для полос поглощения атропоизомеров **АААВ** и **ААВВ** типов. Увеличение концентрации атропоизомеров **АААА** и **АВАВ** типов приводит к постепенному смещению максимума полосы поглощения раствора от 545 к 555 нм (рис. 2). Однако максимум полосы в суммарном спектре поглощения атропоизомеров **АААА** и **АВАВ** типов находится при 558 нм (рис. 4, а, пунктирная линия). Асимметричная форма и существенно бóльшая полуширина этой полосы по сравнению с формой и полушириной любой из полос в исходном спектре, указывает, что контур сформирован несколькими перекрывающимися полосами. В спектре также наблюдаются слабые полосы поглощения с максимумами при 513 и 601 нм. В области 600–650 нм наблюдается слабое поглощение, однако ввиду малости коэффициента экстинкции трудно сделать однозначное заключение о положении максимумов перекрывающихся полос поглощения.

Молекула $H_2T(3-N-МПир)П$ флуоресцирует, поэтому анализ спектров возбуждения флуоресценции предоставляет возможность получить дополнительные данные для идентификации электронных спектров поглощения отдельных атропоизомеров. Действительно, спектры флуоресценции $H_2T(3-N-МПир)П$, измеренные при возбуждении на одних и тех же длинах волн в ходе установления равновесного распределения, также испытывали временную эволюцию (не показано). По мере увеличения концентрации атропоизомеров **ААВВ**, **АААА** и **АВАВ** типов в суммарном спектре флуоресценции раствора появляются новые спектральные полосы. Фото-возбуждение при 514 нм свежеприготовленного раствора позволяет получить спектр флуоресценции исходного атропоизомера **АААВ** типа. Соответственно, при регистрации флуоресценции в области максимума его вибронной полосы (708 нм) измеряется спектр возбуждения флуоресценции атропоизомера **АААВ** типа, который прекрасно согласуется с его спектром поглощения (рис. 4). Кроме того, на основании данного наблюдения можно заключить, что спектры флуоресценции остальных атропоизомеров характеризуются незначительной интенсивностью, либо какие то из них вообще сдвинуты гипсохромно относительно спектра флуоресценции атропоизомера **АААВ**.

Поэтому спектры возбуждения флуоресценции $H_2T(3-N-МПир)П$, измеренные при регистрации флуоресценции на различных длинах волн в спектральном диапазоне от 615 до 700 нм, обусловлены свечением нескольких атропоизомеров. Это хорошо видно на рис. 4, на котором спектр возбуждения флуоресценции при регистрации на длине волны 670 нм содержит полосы, идентифицированные ранее для разных атропоизомеров. Данный спектр примечателен тем, что полоса длинноволнового электронного перехода имеет интенсивность, сравнимую с другими полосами в видимой области спектра. В то же время в стационарных спектрах поглощения такая особенность не наблюдалась (рис. 2). Это обстоятельство указывает на то, что регистрируемое испускание обусловлено флуоресценцией атропоизомера (смеси атропоизомеров), который (один из которых) до момента испускания претерпел конформационную перестройку. В пользу такой интерпретации свидетельствует тот факт, что при фотовозбуждении на определенных длинах волн (например, 554 и 650 нм) правило Степанова о зеркальной симметрии спектров поглощения и флуоресценции не выполняется. Отношение интенсивностей полос электронного и вибронного переходов в спектре флуоресценции больше единицы, в то время как в спектре поглощения наблюдается обратное соотношение. Меньшая за единицу величина отношения $Q_x(0,0) / Q_x(1,0)$

в спектре поглощения подразумевает, что потенциальные поверхности основного S_0 и возбужденного S_1 состояний смещены относительно друг друга. Величина отношения $Q_x(0,0) / Q_x(0,1)$ в спектре флуоресценции большая за единицу, по нашему мнению, обусловлена конформационными перестройками молекулы порфирина, происходящими за время жизни возбужденного состояния, которые приводят к уменьшению смещения потенциальной поверхности S_1 -состояния относительно потенциальной поверхности основного S_0 -состояния, в результате чего молекулярные конформации этих состояний для данного атропоизомера оказываются близкими.

Спектр возбуждения флуоресценции при регистрации на длине волны 613 нм, соответствующей самому коротковолновому максимуму в суммарном спектре флуоресценции $H_2T(3-N\text{-МПир})П$, практически совпадает с рассчитанным суммарным спектром поглощения атропоизомеров **АААА** и **АВАВ**. Таким образом, деконволюция спектров поглощения раствора $H_2T(3-N\text{-МПир})П$ на индивидуальные спектры поглощения атропоизомеров и измерение спектров возбуждения флуоресценции дают взаимно согласованные результаты.

Заключение. Обнаружена и изучена временная эволюция электронных спектров поглощения 5,10,15,20-тетра-(3-*N*-метилпиридил)-порфирина, обусловленная наличием нескольких атропоизомеров в растворе и отражающая процесс установления их равновесного распределения. Впервые описаны нестационарные атропоизомеры, поскольку для *мета*-замещенных арильных фрагментов отсутствуют стерические препятствия для вращения. Впервые обосновано, что явление атропоизомерии свойственно всем производным 5,10,15,20-тетраарилпорфиринов, у которых арильные фрагменты асимметричны относительно оси, проходящей через связь C_m-C_1 , вне зависимости от наличия стерических взаимодействий с тетрапиррольным макроциклом.

Полученные результаты представляют значительный интерес при создании на базе арилзамещенных порфиринов супрамолекулярных систем с заданными спектрально-люминесцентными свойствами и разработке способов управления этими свойствами.

Результаты существенны для применения арилзамещенных тетрапиррольных фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии: поскольку эффективность фотовозбуждения определяется величиной коэффициента экстинкции длинноволновой полосы поглощения, то стабилизация у локализованных в опухоли сенсibilизаторов атропоизомеров с большим коэффициентом экстинкции приведет к усилению фотодинамического эффекта. Возможно, что высокая фотодинамическая активность созданного на базе 5,10,15,20-тетра-(3-*N*-гидроксифенил)-гидропорфирина препарата обусловлена в некоторой степени атропоизомеризацией в опухолевых тканях, приводящей к росту поглощения длинноволновой полосы, так как в исходном растворе для инъециций коэффициент экстинкции сенсibilизатора сравнительно небольшой [15].

С точки зрения молекулярной электроники исследованное соединение представляет собой прототип оптического молекулярного логического элемента, в котором ориентация каждого из арильных фрагментов может быть рассмотрена как логический «0» или «1». Соответственно, имея возможность стабилизировать определенное положение каждого из арильных заместителей молекулы, можно выполнять с помощью такого элемента логические операции и/либо хранение 4-битной строки данных.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Конвергенция 2020» (подпрограмма «Объединение», задание 3.3). Авторы благодарят за частичную финансовую поддержку Российский фонд фундаментальных исследований (проект № 16-53-00100 Бел_а) и Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований (проект X16P-097).

Acknowledgements. The work has been carried out with the financial support from the State program of scientific research of the Republic of Belarus «Convergence-2020» (subprogram «Coherence», project 3.3). Authors thank Russian Foundation for the Fundamental Research (project no. 16-53-00100 Бел_а) and Belarusian Republican Foundation for the Fundamental Research (project X16P-097) for the partial financial support.

Список использованных источников

1. Steed, J. W. Supramolecular chemistry / J. W. Steed, J. L. Atwood. – Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. – 480 p. doi.org/10.1002/9780470740880
2. Grabowski, Z. R. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on Twisted Intramolecular Charge Transfer states and structures / Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig // Chem. Rev. – 2003. – Vol. 103, N 10. – P. 3899–4032. doi.org/10.1021/cr9407451

3. Senge, M. O. The conformation flexibility of tetrapyrroles – current model studies and photobiological relevance / M. O. Senge // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1992. – Vol. 16, N 1. – P. 3–36. doi.org/10.1016/1011-1344(92)85150-s
4. Nonplanar porphyrins and their significance in proteins / J. A. Shelnutt [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 1998. – Vol. 27, N 1. – P. 31–41. doi.org/10.1039/a827031z
5. Quimby, D. J. Luminescence studies on several tetraarylporphyrins and their zinc derivatives / D. J. Quimby, F. R. Longo // *J. Am. Chem. Soc.* – 1975. – Vol. 97, N 18. – P. 5111–5117. doi.org/10.1021/ja00851a015
6. Meso-substituted cationic porphyrins of biological interest. Photophysical and physicochemical properties in solution and bound to liposomes / N. G. Angeli [et al.] // *Photochem. and Photobiol.* – 2000. – Vol. 72, N 1. – P. 49–56. doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720049mscpob2.0.co2
7. Kalyanasundaram, K. Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyrrolyl-tetrakis(N-methylpyridiniumyl) porphyrins / K. Kalyanasundaram // *Inorganic Chemistry.* – 1984. – Vol. 23, N 16. – P. 2453–2459. doi.org/10.1021/ic00184a019
8. Intramolecular interactions in the ground and excited states of tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrins / F. J. Vergeldt [et al.] // *J. Phys. Chem.* – 1995. – Vol. 99, N 13. – P. 4397–4405. doi.org/10.1021/j100013a007
9. Hambright, P. Synthesis and characterization of new isomeric water-soluble porphyrins. Tetra(2-N-methylpyridyl)porphine and Tetra(3-N-methylpyridyl)porphine / P. Hambright, T. Gore, M. Burton // *Inorg. Chem.* – 1976. – Vol. 15, N 9. – P. 2314–2315. doi.org/10.1021/ic50163a072
10. Крук, Н. Н. Спектральные свойства конформеров тетра-(3-N-метилпиридил)-порфирина в растворах / Н. Н. Крук, Е. С. Люлькович // Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», XII-й съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков, 28–30 июня 2016 г., Минск: сб. науч. работ: в 2 ч. – Минск: БГУ, 2016. – Ч. 2. – С. 54–57.
11. Aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins / R. F. Pasternack [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1972. – Vol. 94, N 13. – P. 4511–4517. doi.org/10.1021/ja00768a016
12. Atropisomers of zinc tetrakis(o-cyanophenyl)porphyrins. The crystal structure of the $\alpha\beta\alpha\beta$ -isomer and the atropisomerization rates / K. Hatano [et al.] // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1987. – Vol. 60, N 6. – P. 1985–1992. doi.org/10.1246/bcsj.60.1985
13. Photophysical and structural properties of saddle-shaped free base porphyrins: evidence for an «orthogonal» dipole moment / I. V. Sazanovich [et al.] // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – Vol. 105, N 32. – P. 7818–7829. doi.org/10.1021/jp010274o
14. Atropisomers of 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfamoyl-phenyl)porphyrins / A. M. Ressurreição [et al.] // *J. of Porph. and Phthal.* – 2007. – Vol. 11, N 1. – P. 50–57. doi.org/10.1142/s1088424607000072
15. Bonnett, R. Chemical aspects of photodynamic therapy / R. Bonnett. – Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. – 305 p.

References

1. Steed J. W., Atwood J. L. *Supramolecular chemistry*. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2000. 480 p. doi.org/10.1002/9780470740880
2. Grabowski Z. R., Rotkiewicz K., Rettig W. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on Twisted Intramolecular Charge Transfer states and structures. *Chemical Reviews*, 2003. vol. 103, no. 10, pp. 3899–4032. doi.org/10.1021/cr940745l
3. Senge M. O. The conformation flexibility of tetrapyrroles – current model studies and photobiological relevance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1992, vol. 16, no. 1, pp. 3–36. doi.org/10.1016/1011-1344(92)85150-s
4. Shelnutt J. A., Xing-Zhi Song, Jian-Guo Ma, Song-Ling Jia, Jentzen W., Medforth C. J., Medforth C. J. Nonplanar porphyrins and their significance in proteins. *Chemical Society Reviews*, 1998, vol. 27, no. 1, pp. 31–41. doi.org/10.1039/a827031z
5. Quimby D. J., Longo F. R. Luminescence studies on several tetraarylporphyrins and their zinc derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 1975, vol. 97, no. 18, pp. 5111–5117. doi.org/10.1021/ja00851a015
6. Angeli N. G., Lagorio M. G., San Roman E. A., Dicoelio L. E. Meso-substituted cationic porphyrins of biological interest. Photophysical and physicochemical properties in solution and bound to liposomes. *Photochemistry and Photobiology*, 2000, vol. 72, no. 1, pp. 49–56. doi.org/10.1562/0031-8655(2000)0720049mscpob2.0.co2
7. Kalyanasundaram K. Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyrrolyl-tetrakis(N-methylpyridiniumyl) porphyrins. *Inorganic Chemistry*, 1984, vol. 23, no. 16, pp. 2453–2459. doi.org/10.1021/ic00184a019
8. Vergeldt F. J., Koehorst R. B. M., van Hoek A., Schaafsma T. J. Intramolecular interactions in the ground and excited states of tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrins. *The Journal of Physical Chemistry*, 1995, vol. 99, no. 13, p. 4397–4405. doi.org/10.1021/j100013a007
9. Hambright P., Gore T., Burton M. Synthesis and characterization of new isomeric water-soluble porphyrins. Tetra(2-N-methylpyridyl)porphine and Tetra(3-N-methylpyridyl)porphine. *Inorganic Chemistry*, 1976, vol. 15, no. 9, pp. 2314–2315. doi.org/10.1021/ic50163a072
10. Kruk N. N., Liulkovich E. S. Spectral properties of tetra-(3-N-methylpyridyl)-porphyrin conformers in solutions. *Trudy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Molekulyarnye, membrannye i kletochnyye osnovy funktsionirovaniya biosistemem», XII s'ezd Belorusskogo obschestvennogo ob'edineniya fotobiologov i biofizikov. Ch. 2* [Proceedings of the International scientific conference «Molecular, membrane and cellular principles of functioning of biosystems», XIIth Congress of Belarusian public association of photobiologists and biophysicists. Part 1]. Minsk, Belarusian State University, 2016, pp. 54–57 (in Russian).

11. Pasternack R. F., Huber P. R., Boyd P., Engasser G., Francesconi L., Gibbs E., Fasella P., Cerio Venturo G., Hinds L. de C. Aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. *Journal of American Chemical Society*, 1972, vol. 94, no. 13, pp. 4511–4517. doi.org/10.1021/ja00768a016
12. Hatano K., Kawasaki K., Munakata S., Iitaka Y. Atropisomers of zinc tetrakis(o-cyanophenyl)porphyrins. The crystal structure of the $\alpha\beta\beta$ -isomer and the atropisomerization rates. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1987, vol. 60, no. 6, pp. 1985–1992. doi.org/10.1246/bcsj.60.1985
13. Sazanovich I. V., Galievsky V. A., van Hoek A., Schaafsma T. J., Malinovskii V. L., Holten D., Chirvony V. S. Photophysical and structural properties of saddle-shaped free base porphyrins: evidence for an «orthogonal» dipole moment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2001, vol. 105, no. 32, pp. 7818–7829. doi.org/10.1021/jp010274o
14. Ressurreição, A.M., Pineiro M., Arnaut L.G., Rocha Gonsalves M. d'A. Atropisomers of 5,10,15,20-tetrakis(2,6-dichloro-3-sulfamoyl-phenyl)porphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2007, vol. 11, no. 1, pp. 50–57. doi.org/10.1142/s1088424607000072
15. Bonnett R. *Chemical aspects of photodynamic therapy*. Amsterdam, Gordon and Breach Science Publishers, 2000. 305 p.

Информация об авторах

Люлькович Елизавета Сергеевна – студент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lisa.lulkovich@gmail.com.

Пуховская Светлана Геннадьевна – д-р хим. наук, профессор. Ивановский государственный химико-технологический университет (пр-т Ф. Энгельса, 7, 153000, Иваново, Российская Федерация). E-mail: svetlana.puhovskaya@mail.ru.

Иванова Юлия Борисовна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт химии растворов имени Г. А. Крестова Российской академии наук (ул. Академическая, 1, 153045, Иваново, Российская Федерация). E-mail: jjiv@yandex.ru.

Семейкин Александр Станиславович – д-р хим. наук, гл. науч. сотрудник, профессор. Ивановский государственный химико-технологический университет (пр-т Ф. Энгельса, 7, 153000, Иваново, Российская Федерация). E-mail: semeikin@isuct.ru.

Крук Николай Николаевич – д-р физ.-мат. наук, заведующий кафедрой, доцент. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: krukmikalai@yahoo.com.

Information about the authors

Liulkovich Lizaveta Siargeeuna – student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lisa.lulkovich@gmail.com.

Pukhovskaya Svetlana Gennad'evna – D. Sc. (Chemistry), Professor. Ivanovo State University of Chemistry and Technology (7, F. Engels Ave., 153000, Ivanovo, Russian Federation). E-mail: svetlana.puhovskaya@mail.ru.

Ivanova Yulia Borisovna – Ph. D. (Chemistry), Leading researcher. G. A. Krestov Institute of Solution Chemistry of Russian Academy of Sciences (1, Akademicheskaya Str., 153045, Ivanovo, Russian Federation). E-mail: jjiv@yandex.ru.

Semeikin Alexandr Stanislavovich – D. Sc. (Chemistry), Chief researcher, Professor. Ivanovo State University of Chemistry and Technology (7, F. Engels Ave., 153000, Ivanovo, Russian Federation). E-mail: semeikin@isuct.ru.

Kruk Mikalai Mikalaevich – D. Sc. (Physics and Mathematics), Head of the Department, Assistant professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: krukmikalai@yahoo.com.

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 577.112

Поступило в редакцию 08.09.2017

Received 08.09.2017

В. В. Бритиков, Е. В. Панкратова, член-корреспондент С. А. Усанов

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**РАЗНОСТНАЯ ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ С ПЕРЕНОСОМ НАСЫЩЕНИЯ
В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА P450cam
С 4-ФЕНИЛИМИДАЗОЛОМ: ОБНАРУЖЕНИЕ НОВОГО ПРОМЕЖУТОЧНОГО
СОСТОЯНИЯ КОМПЛЕКСА**

Аннотация. Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия цитохрома P450cam с 4-фенилимидазолом (4-PI) методом спектрофотометрии и ЯМР спектроскопии. Полученные методом разницы переноса насыщения ЯМР (РПН-ЯМР) данные указывают на существование промежуточного короткоживущего состояния 4-фенилимидазола в активном сайте P450cam, где 4-фенилимидазол связан с внутренней областью активного сайта и/или областью канала доступа субстрата без образования координационной связи между атомами азольной группы лиганда и атомом железа гема. В данной работе нами впервые применен метод РПН-ЯМР для исследования взаимодействия цитохрома P450 с лигандом. Равновесная константа диссоциации комплекса P450cam–4-PI, рассчитанная с использованием зависимости фактора амплификации РПН при нулевом времени насыщения, составляет 10,4 мМ и отличается от константы, рассчитанной при постоянном времени насыщения (34,6 мМ), что указывает на зависимость определения K_d при использовании РПН-ЯМР от времени насыщения и концентраций взаимодействующих веществ. Сравнение энергии диссоциации для промежуточного комплекса (11,2 кДж) относительно комплекса с прямой координацией (28,5 кДж) позволяет предположить, что основной вклад во взаимодействие белок–лиганд вносит гидрофобное взаимодействие 4-PI с внутренней поверхностью полости активного сайта P450cam. Обнаруженное промежуточное состояние позволяет объяснить образование гидроксильированных форм ингибиторов азольной природы при взаимодействии с цитохромами P450, когда ингибитор находится в промежуточной форме в качестве субстрата, без образования координационной связи с атомом железа гема.

Ключевые слова: ЯМР спектроскопия, РПН-ЯМР, цитохром P450cam, 4-фенилимидазол, белок-лигандное взаимодействие, резонансный перенос энергии, разностное спектрофотометрическое титрование, диссоциация комплекса, промежуточное короткоживущее состояние лиганда

Для цитирования: Бритиков, В. В. Разностная ЯМР спектроскопия с переносом насыщения в исследовании взаимодействия цитохрома P450cam с 4-фенилимидазолом: обнаружение нового промежуточного состояния комплекса / В. В. Бритиков, Е. В. Панкратова, С. А. Усанов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 66–79.

Vladimir V. Britikov, Elena V. Pankratova, Corresponding Member Sergey A. Usanov

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**SATURATION TRANSFER DIFFERENCE NMR SPECTROSCOPY IN STUDIES OF THE INTERACTION
OF CYTOCHROME P450cam WITH 4-PHENYLIMIDAZOLE: DETECTION OF A NOVEL INTERMEDIATE
STATE OF THE COMPLEX**

Abstract. The present work is devoted to the investigation of the interaction of cytochrome P450cam with 4-phenylimidazole (4-PI) using spectrophotometry and NMR spectroscopy. The data obtained by the STD-NMR method indicate the existence of an intermediate short-lived state of 4-phenylimidazole in the active site of P450cam where 4-phenylimidazole is bound to the inner region of the active site and/or to the substrate access channel without the formation of a coordination bond between the ligandazole group atoms and the heme iron atom. In this article, we first used the STD-NMR method to study the interaction of cytochrome P450 with ligand. The equilibrium dissociation constant of the P450cam-4-PI complex, which was calculated using the dependence of the amplification factor at zero saturation time (10.4 mM), differs from the constant that was calculated at

constant saturation time (34.6 mM). This fact indicates the dependence of the K_d determination using STD-NMR at saturation time and concentrations of interacting substances. Comparison of the dissociation energy for the intermediate complex (11.2 kJ) relative to the direct coordination complex (28.5 kJ) suggests that the main contribution to the protein-ligand interaction is related to the hydrophobic interaction of 4-PI with the inner surface of the cavity of the active site of P450cam. The observed intermediate state makes it possible to explain the formation of hydroxylated forms of azole inhibitors during the interaction with cytochromes P450, when an inhibitor is in an intermediate form as a substrate and is not bound by a coordination bond with a heme iron atom.

Keywords: NMR spectroscopy, STD-NMR, cytochrome P450cam, 4-phenylimidazole, protein-ligand interaction, resonant energy transfer, differential spectrophotometric titration, dissociation of complex, intermediate short-lived ligand state

For citation: Britikov V. V., Pankratova E. V., Usanov S. A. Saturation transfer difference NMR spectroscopy in studies of the interaction of cytochrome P450cam with 4-phenylimidazole: detection of a novel intermediate state of the complex. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 66–79 (in Russian).

Введение. Суперсемейство цитохрома P450 является одной из наиболее распространенных и разнообразных ферментных систем в природе. Цитохромы P450 широко представлены во всех биологических царствах и катализируют различные комплексные окислительные реакции. Наиболее характерной реакцией для P450 является монооксигенирование органического соединения путем внедрения активированного атома кислорода. Активация молекулярного кислорода цитохромом P450, путем последовательного переноса двух электронов на молекулу кислорода, и сопутствующее гидрокселирование неактивного субстрата по C–H связи являются одним из наиболее важных процессов в природе, а цитохромы P450, несомненно, одни из наиболее привлекательных объектов в области биохимии и молекулярной биологии уже на протяжении полувека, в основном, благодаря огромному прикладному потенциалу и мировому развитию фармацевтической химии и персонализированной медицины [1].

Взаимодействие белков с низкомолекулярными лигандами – критическая стадия всех энзимологических и большинства биологических процессов. Тема исследования связывания цитохрома P450 с лигандами особенно сложна, вызвано это огромным количеством субстратов и ко-субстратов, которые связываются с различными формами цитохрома P450. Кроме того, некоторые изоформы P450 демонстрируют отсутствие специфичности и взаимодействуют с огромным числом различных по структуре лигандов. В результате маловероятно обнаружение общих правил, описывающих структурные, термодинамические и кинетические механизмы, которые будут применимы для характеристики всех взаимодействий между цитохромами P450 и их лигандами. Среди возможных типов взаимодействий P450–лиганд, изученных в последние годы, большинство усилий было направлено на небольшие органические молекулы или газообразные диатомные лиганды. Связывание субстратов с цитохромом P450 обычно рассматривается как первый этап в каталитическом цикле. Этот процесс интенсивно изучается с помощью различных биохимических и биофизических подходов [2].

Экспериментальные подходы, используемые для изучения связывания лигандов с P450, можно разделить на две категории: обычные биофизические методы, применимые к негемовым белкам, и экспериментальные методы, которые контролируют изменения в спектральных свойствах гема, отражающие связывание с лигандами и/или вследствие конформационных изменений белка.

В основном, большое количество результатов получено при помощи оптических методов детекции как для определения равновесных констант связывания, так и для кинетических параметров взаимодействия. Данный подход зависит от взаимодействия лигандов с гемовой группой, координированием по атому железа, в случае присутствия в лиганде атомов с неподеленной электронной парой, при этом характер спектральных изменений в области полосы Soret зависит от силы поля лиганда. В отсутствие координирования при достаточно близком расположении групп лиганда к гему образуется пятикоординационное состояние, характеризующееся расщеплением молекулярных электронных орбиталей гема таким образом, что происходит распаривание пяти электронов на внешней оболочке атома железа (высоко-спиновое состояние).

К основным методам, которые способны детектировать связывание лигандов с цитохромом P450 без контроля за изменением спинового состояния железа гема, можно отнести изотермическую титровальную калориметрию, флуоресцентные методы, поверхностный плазмонный резонанс (ППР) и ЯМР методы.

Среди биофизических методов исследования белок-лигандных взаимодействий, ЯМР спектроскопия является самым мощным и универсальным, бурно развивающимся, физико-химическим методом исследования, так как обеспечивает сайт-специфической количественной информацией на атомарном уровне. ЯМР спектроскопия – широко известная техника для анализа белок-лигандных взаимодействий в большом диапазоне аффинности (от нМ до мМ). ЯМР широко используется для определения констант диссоциации, в частности для относительно слабых взаимодействий ($K_d > 10$ мМ), что является проблематичным для других биофизических методов. Методы ЯМР традиционно делят на две группы: эксперименты, где наблюдения проводятся над сигналами ЯМР-спектров белка (белок-наблюдаемые ЯМР эксперименты), и на те, где наблюдаются ЯМР-спектры лиганда (лиганд-наблюдаемые ЯМР эксперименты). Белок-наблюдаемые ЯМР эксперименты, в основном, полагаются на анализ возмущений химических сдвигов, которые возникают в двумерных ЯМР-спектрах C^{13} - или N^{15} -меченых образцов белка при связывании лиганда [3].

Лиганд-наблюдаемые ЯМР эксперименты основаны на изменении размер-чувствительных ЯМР параметров для лиганда в присутствии белкового рецептора. Рассматривая белок-лигандный комплекс со слабой и умеренной аффинностью (обычно K_d лежит в диапазоне от 0,1 мкМ до 1,0 мМ), наблюдаемые ЯМР параметры представляют собой простое популяционно-взвешенное среднее между свободным и связанным состояниями. В отличие от белок-наблюдаемых лиганд-наблюдаемые эксперименты более чувствительны для белков больших размеров и требуют меньшего количества белка без изотопного мечения. Лигандные методы могут быть использованы для идентификации связывающихся веществ и измерения аффинности комплекса белок–лиганд, а также обеспечивают соответствующую структурной информацией [4].

Лиганд-наблюдаемые ЯМР эксперименты можно разделить на несколько групп: эксперименты, которые основываются на межмолекулярном переносе намагниченности за счет ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) (tr-NOESY, INPHARMA, ILOE, STD и WaterLOGSY); эксперименты по измерению скоростей ядерных релаксаций (усиление парамагнитной релаксации, измерение парамагнитных сдвигов) и эксперименты, основанные на разнице времен вращательной корреляции молекул (DOSY).

На данный момент самым используемым методом ЯМР для анализа белок-лигандных взаимодействий является STD (от английского – **saturation transfer difference**, что означает эксперимент по разнице переноса насыщения ЯМР, далее РПН-ЯМР). Впервые эта методика была разработана в 2001 г. Майром и Мэйром [5]. Данный метод апробирован на системе взаимодействия между галактозой и белком агглютинином RCA120. РПН-ЯМР имеет преимущество над таким часто используемым методом, как ППР, так как позволяет определять взаимодействие с лигандами в широком диапазоне аффинности, имеет более высокопропускную способность (хорошо оптимизирован для скрининга библиотек лигандов), не зависит от непредвиденных повреждений измерительной системы, как в случае с чипами ППР. Самым важным преимуществом является возможность получения структурных данных для белок-лигандных комплексов (эпитопное картирование), помимо термодинамических и кинетических параметров взаимодействия. РПН-ЯМР, как и все эксперименты, основанные на переносном ЯЭО, часто проводятся в условиях быстрого обмена лиганда.

РПН эксперимент заключается в следующем: при помощи селективных радиочастотных импульсов осуществляется насыщение определенных ядерных спинов белковой молекулы (наиболее часто используется область алифатических сигналов от 0 до 1 ppm). Затем ядерная намагниченность от белка переносится посредством ЯЭО и спиновой диффузии на ядра молекулы лиганда, если таковой взаимодействует с определенной областью молекулы белка. Эксперимент проводится в 2 этапа. На первом этапе селективный радиочастотный импульс подается на нерезонансной частоте белка (офф-резонанс). Полученный спектр соответствует сигналам от общего пула лиганда. На втором этапе селективный импульс подается на резонансной частоте белка (он-резонанс), в случае если лиганд взаимодействует с белком, то тогда происходит аттенюация сигналов лиганда. Оценка результирующего разностного спектра позволяет определить взаимодействующие лиганды. Эксперимент РПН-ЯМР в основном проводится при условиях, когда концентрация лиганда во много раз превышает концентрацию белка. В условиях быстрого обмена

(для лигандов со слабым и средним аффинитетом от 0,1 мкМ до мМ) связанного с белком лиганда наблюдаемые изменения в РПН соответствуют популяционно-взвешенному среднему значению между связанным и свободным в растворе лигандом [6].

Прогресс в области РПН-ЯМР не остановился с момента его разработки. Были внесены изменения в стратегию проведения эксперимента для нивелирования артефактных погрешностей в измерении равновесной константы диссоциации, а также расширена область применения данного метода. Например, разработан способ детекции взаимодействия лигандов с белками непосредственно в живых клетках с использованием РПН по двойной разнице [7]. РПН-ЯМР был модифицирован и применен для непосредственного измерения взаимодействия белков, иммобилизованных на сефарозной матрице [8]. При совместном использовании данных по молекулярному моделированию и РПН-ЯМР для получения структурных данных о белок-лигандном комплексе, предложена теория полной релаксации и матрицы конформационных изменений (CORCEMA), также разработана вычислительная программа на ее основе [9].

Комплексы цитохрома P450 с лигандами азольной, триазольной (далее азолы) природы характеризуются повышенной устойчивостью (высокоаффинные лиганды) вследствие образования координационной связи между атомом железа гемовой группы и атомом азота с неподеленной электронной парой азола. Данное свойство позволяет использовать эти соединения в качестве высоко аффинных ингибиторов цитохрома P450 (лекарства, фунгициды, инсектициды) [10]. Образование промежуточных короткоживущих комплексов в данном случае теоретически возможно из-за погруженного в ядро белка активного сайта и протяженного канала доступа субстрата. РПН-ЯМР позволяет установить комплексы белок–лиганд, которые находятся в быстром обмене. Это свойство может позволить обнаружить промежуточные комплексы P450 с азолами, в которых не образуется координационная связь. Такие комплексы могут оказывать влияние на общую каталитическую реакцию, осуществляемую цитохромом P450. В данной работе мы впервые применили РПН-ЯМР к исследованию взаимодействия цитохрома P450 с его низкомолекулярным лигандом. В качестве объекта исследования был выбран цитохром P450cam и взаимодействующий с ним 4-фенилимидазол (4-PI).

Цитохром P450cam (CYP101) из почвенной бактерии *Pseudomonas putida* является одним из модельных объектов в исследовании функционирования цитохром P450 зависимой монооксигеназной системы и исследуется уже на протяжении многих десятилетий [11]. P450cam осуществляет регио- и стерео-селективное гидроксирование d-камфары до 5-экзо-гидроксикамфары путем активации молекулы кислорода электронами, поступающими от электрон-транспортной системы, состоящей из NADH-путидаредоксин редуктазы и путидаредоксина [12]. P450cam – первый цитохром P450, для которого определена пространственная структура кристаллического состояния по данным рентгеноструктурного анализа [13]. На сегодняшний день расшифрованы кристаллические структуры комплексов P450cam с различными лигандами его активного сайта [14; 15], но отсутствует информация о состояниях комплексов в растворе на атомарном уровне.

P450cam является гидрофильным белком, нарабатывается в больших количествах при помощи гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*, а также достаточно стабилен при обычных условиях. Преимуществом 4-PI в исследовании методом ЯМР является его растворимость в миллимолярных концентрациях в водных буферных растворах, небольшое количество сигналов химических сдвигов в области слабого поля (область ароматических сигналов) и их хорошее разрешение на современных ЯМР спектрометрах. Кристаллическая структура данного комплекса расшифрована методом рентгеноструктурного анализа (pdb код 1PHF). Известно, что 4-PI располагается в активном сайте P450cam так, что образуется координационная связь между атомом азота (N¹) и атомом железа гема (комплекс с прямой координацией, образование которого легко детектируется оптической спектроскопией по изменению полосы поглощения Core). При этом азольное кольцо 4-PI практически перпендикулярно оси I-спирали P450cam. 4-PI имеет второй свободный атом азота и может находиться в протонированном состоянии, в отличие от 1-фенилимидазола. Этим обуславливается существенная разница в константе диссоциации между ними в комплексе с P450cam, а также их различия в пространственном положении. Эти различия объясняются термодинамическим проигрышем в десольватации N² атома для 4-PI [16].

Материалы и методы исследования. *Гетерологическая экспрессия рекомбинантного P450cam.* Экспрессию P450cam осуществляли с использованием клеток *E. coli* (DH5 α), трансформированных плазмидным вектором pBI25, в который по сайту рестрикции *Hind III* был клонирован ген цитохрома P450cam дикого типа. Первичную ночную культуру пересевали в малые колбы (100 мл среды) с ТВ-средой, микроэлементами, ампициллином (100 мкг/мл) и инкубировали до достижения оптической плотности 2,5–3 (D_{600}) при температуре 37 °С и 180 об/мин (8–9 ч). Из малых колб культуру переносили в большие колбы (500 мл среды) с той же средой и инкубировали один час при температуре 37 °С. После добавляли в среду индуктор экспрессии изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид до концентрации 100 мкг/мл, аминоклевулиновую кислоту (70 мг/л) и инкубировали клетки 48 ч при температуре 26 °С и 130 об/мин. Полученные клетки осаждали центрифугированием 20 мин (20000 g) и ресуспендировали в 50 мМ калий фосфатном буфере (КФБ) (рН 7,4), содержащем 20 % глицерина, 50 мМ NaCl, 0,4 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). Полученную суспензию хранили при –80 °С.

Очистка рекомбинантного P450cam. К размороженным клеткам добавляли ФМСФ до концентрации 1 мМ. Клетки разрушали с использованием аппарата Emulsiflex. Разрушенные клетки осаждали центрифугированием 1 ч при 18000 об/мин и температуре 4 °С. Полученный супернатант, содержащий цитохромом P450cam наносили на хроматографическую колонку с диэтил-аминоэтил-сефарозой 6В (cross-linked), предварительно уравновешенную 50 мМ КФБ (буфер А) (рН 7,4) с 1 мМ дитиотреитолом (ДТТ) и 10 мМ NaCl. После нанесения колонку последовательно промывали десятью объемами буфера А с увеличением концентрации NaCl (10 мМ, 30 мМ, 50 мМ, 100 мМ). Элюцию P450cam осуществляли буфером А с 20 % глицерина и 400 мМ NaCl. Далее белок очищали при помощи гель-фильтрационной хроматографии с использованием матрицы Sephadex G-100 Superfine, уравновешенной 50 мМ КФБ (рН 7,4) с 1 мМ ДТТ. В дальнейшем использовали фракции P450cam с соотношением поглощения A_{417}/A_{280} нм выше 1,4.

Разностное спектрофотометрическое титрование. Сродство 4-PI к P450cam определяли по изменению поглощения в диапазоне длин волн 350–500 нм. Для измерений использовали двулучевую спектрофотометр Cary 5000. Цитохром P450cam разбавляли до концентрации 1 мкМ в 100 мМ КФБ (рН 7,4). Концентрацию стокового раствора P450cam определяли спектрофотометрически по поглощению карбонильного комплекса восстановленной формы при 450 нм ($\epsilon = 91000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и по поглощению при 417 нм для свободной формы ($\epsilon = 117000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). В обоих случаях концентрации совпадали. Не наблюдалось образование 420-й неактивной формы. Титрование производили 4-PI, растворенным в метаноле. Измерения проводили при температуре 22 °С. В кювету сравнения добавляли метанол без 4-PI. Конечная концентрация метанола в буферном растворе белка составила 3 %. Изменение поглощения оценивали по разнице на длине волны при 434 и 400 нм. Для определения равновесной константы диссоциации использовали зависимость разности поглощения от концентрации 4-PI. Экспериментальные точки аппроксимировали кривой Ленгмюра для случая связывания с одним сайтом с использованием программного пакета Origin 2016.

Измерение константы скорости диссоциации 4-PI от P450cam методом остановленной струи. Измерения проводили с использованием спектрофотометра ультрафиолетовой/видимой/ближней инфракрасной области спектра Cary5000, оснащенного установкой для быстрого смешивания методом остановленной струи SX20 производства Applied Photophysics. Диссоциацию 4-PI из комплекса с P450cam определяли непрямой метод: насыщенный раствор P450cam (2 мкМ) с 4-PI (250 мкМ) смешивали с раствором d-камфары (2,5 мМ). Изменение поглощения детектировали при длине волны 434 нм и температуре 22 °С. Измерения проводились в 5 повторах. Полученные кинетически кривые подвергались регрессионному анализу методом наименьших квадратов для вычисления констант скоростей реакции диссоциации в программном пакете Origin 2016.

Подготовка образца для ЯМР спектроскопии. Для ЯМР измерений использовали цитохром P450cam в 100 мМ D₂O-КФБ. Для этого цитохром P450cam в обычном КФБ концентрировали при помощи ультрафильтрации в пробирках Millipore 30000 MWCO и затем разбавляли в D₂O буфере. Данную процедуру повторяли многократно, чтобы концентрация первоначального буфера стала меньше 1 %. Конечную концентрацию белка доводили до 500 мМ. Концентри-

рованный раствор 4-PI получали при растворении в дейтерированном метаноле (d_4 -MetOH). Для измерений использовали 5 мм ЯМР ампулы высокого разрешения. Объем образцов составлял 700 мкл.

Измерение РПН-ЯМР. Измерения РПН-ЯМР для комплекса 4-PI с P450cam осуществляли на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 500 (резонансная частота для протонов 500 МГц). Для измерений использовали импульсную программу stddif из стандартных импульсных последовательностей программы TopSpin 2.1 (Bruker). Сигнал стабилизации поля (сигнал лока) устанавливали по D_2O . Проводили калибровку длительности стандартного мощного 90-градусного импульса. Частоту селективного импульса для возбуждения ядер цитохрома P450cam устанавливали на 0,8 ppm, для нерезонанса – на 30 ppm. Мощность селективного импульса устанавливалась на 46 дБ. Время задержки d1 соответствовало 5-кратному времени для T1 релаксации. Измерения проводили при различном времени насыщения d21.

Результаты и их обсуждение. *Разностное спектрофотометрическое титрование.* Положение полосы поглощения Soret хорошо коррелирует со спиновым состоянием железа гема цитохрома P450cam, что подтверждается методами прямого измерения спинового состояния. Так связывание субстрата приводит к переходу железа из низко- в высоко-спиновое состояние, при этом максимум поглощения полосы Soret сдвигается с 417 на 391 нм [17]. В свою очередь лиганды, содержащие в своем составе атомы азота с неподеленной электронной парой (например, азольные ингибиторы), образуют координационную связь с атомом железа, в результате чего железо гема становится 6-координационным, а полоса поглощения Soret сдвигается в длинноволновую область спектра (417 → 420 → 425 нм).

Для определения равновесной константы диссоциации комплекса P450cam–4-PI мы использовали метод разностного спектрофотометрического титрования. Добавление 4-PI вызывает смещение максимума поглощения P450cam вследствие координирования атома азота по атому железа гема (рис. 1). Найденная равновесная константа диссоциации ($8,99 \pm 0,38$ мкМ) соответствует умеренному сродству для лиганда азольной природы, чего и следовало ожидать, учитывая структуру 4-PI.

Кинетика диссоциации комплекса P450cam–4-PI. Для определения времени жизни комплекса с прямой координацией нами проведен эксперимент по замещению 4-PI камфарой при помощи

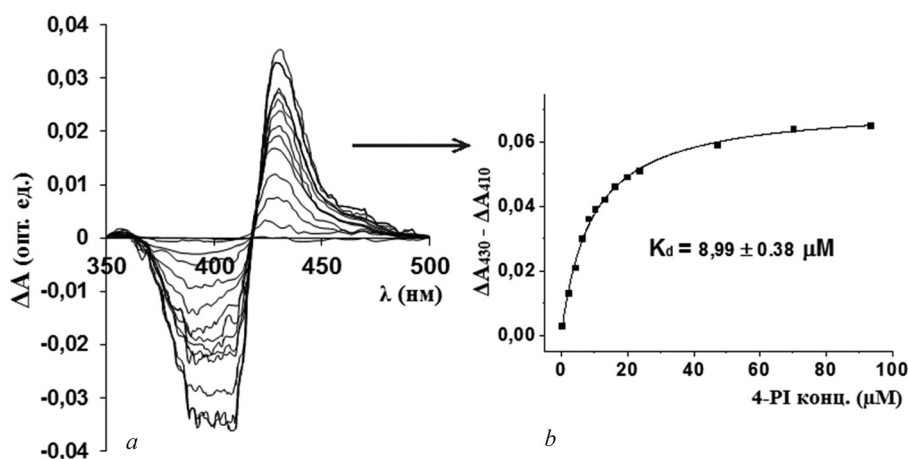


Рис. 1. Определение сродства 4-PI к P450cam методом разностного спектрофотометрического титрования: *a* – разностный спектр при титровании P450cam (1 мМ) с 4-PI (0,3–93 мМ); *b* – экспериментальные точки зависимости разности поглощения при 400–430 нм от концентрации 4-PI с аппроксимирующей кривой. Данная кривая найдена методом наименьших квадратов с использованием зависимости Ленгмюра для случая взаимодействия с одним центром связывания

Fig. 1. Determination of the interaction of 4-PI with P450cam by the method of difference spectrophotometric titrating: *a* – difference spectrum when titrating P450cam (1 mM) with 4-PI (0.3–93 mM); *b* – experimental points of the dependence of the absorption difference at 400–430 nm on 4-PI concentration and the approximating curve. This curve is found by the least square method and the use of the Langmuir dependence for the case of the interaction with one binding site

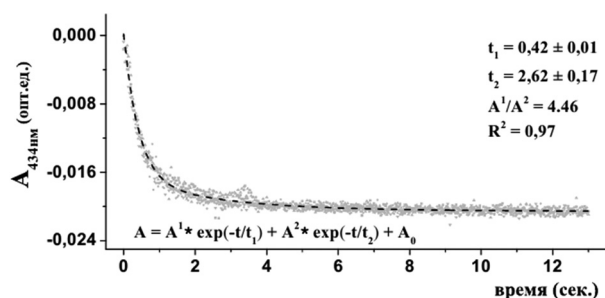


Рис. 2. График кинетики диссоциации комплекса между 4-PI (250 мкМ) и P450cam (2 мкМ) при добавлении избытка d-камфары (2,5 мМ). Экспериментальные данные кинетической кривой соответствуют четырем измерениям при 22 °С методом остановленной струи

Fig. 2. Plot of the dissociation kinetics of the complex between 4-PI (250 μ M) and P450cam (2 μ M) added with an excess of d-camphor (2.5 mM). Experimental data of the kinetic curve correspond to four measurements at 22 °C made by the stop-flow method

в связанном с P450cam состоянии. Данная кривая хорошо аппроксимируется двухэкспоненциальной зависимостью (с временем $t_1 = 1,506$, $t_2 = 0,41$), на основании чего мы предполагаем существование двух различных комплексов P450cam–4-PI с прямой координацией.

Это объясняется тем, что 4-PI может находиться в двух резонансных формах (рис. 3) и координирование возможно при участии обоих атомов азота.

РПН-ЯМР эксперимент. РПН-ЯМР эксперимент проводится в условиях избытка лиганда относительно белка. При таких условиях можно наблюдать влияние связанного с белком лиганда на интенсивность сигналов ЯМР за счет быстрого обмена с общим пулом лиганда в растворителе. Для комплексов с прямой координацией, со временем жизни порядка секунд, влиянием на общий пул лиганда можно пренебречь (это связано с низкой концентрацией белка, временем релаксации протонов), только малая часть связанного лиганда успевает передать намагниченность в раствор за время насыщения радиочастотным импульсом. Поэтому эффекта от комплекса с прямой координацией не должно наблюдаться в РПН-ЯМР эксперименте.

Нами получен РПН-ЯМР спектр при добавлении P450cam к избытку 4-PI (рис. 4). В референсном спектре (частота насыщения 30 ppm, вне резонанса) (рис. 4, b) обнаруживается остаточный сигнал от метильной группы метанола, так как добавляемый 4-PI предварительно растворяли в d4-метаноле. Разностный РПН-ЯМР спектр (рис. 4, a), полученный вычитанием референсного РПН-ЯМР спектра из спектра на резонансной частоте (насыщение селективным импульсом на частоте резонанса алифатических групп белка при 0,8 ppm), отражает взаимодействие 4-PI с P450cam в режиме быстрого обмена. Отсутствие сигнала в разностном РПН-ЯМР спектре для метильной группы метанола указывает на отсутствие его взаимодействия с P450cam. Кроме аттенюации сигнала 4-PI в РПН-ЯМР спектре в области частот, которые подвергаются резонансному насыщению, обнаруживаются сигналы от протонов белковых групп. Полученные результаты соответствуют первоначальным теоретическим предположениям промежуточного взаимодействия 4-PI со специфическим сайтом связывания P450cam до момента координирования по атому железа гема, так как в противном случае также можно было бы ожидать атте-

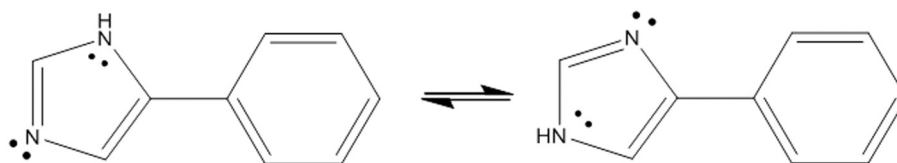


Рис. 3. Две резонансные структуры 4-PI

Fig. 3. Two resonance structures of 4-PI

метода остановленной струи (рис. 2). При добавлении d-камфары (природный субстрат) к комплексу P450cam–4-PI устанавливается новое термодинамическое равновесие в системе, а количество комплекса P450cam с 4-PI уменьшается. При связывании с d-камфарой атом железа гема цитохрома P450cam становится пятикоординационным. Пятикоординационное состояние является высоко-спиновым, в отличие от шестикоординационного низко-спинового для комплекса с 4-PI. При этом максимум поглощения сдвигается в коротковолновую область спектра (393 нм). Таким образом, замещение 4-PI камфарой можно контролировать по уменьшению поглощения при 434 нм (максимум в разностном спектре, рис. 1, a). Временная константа полученной кинетической кривой (рис. 2) соответствует времени жизни 4-PI

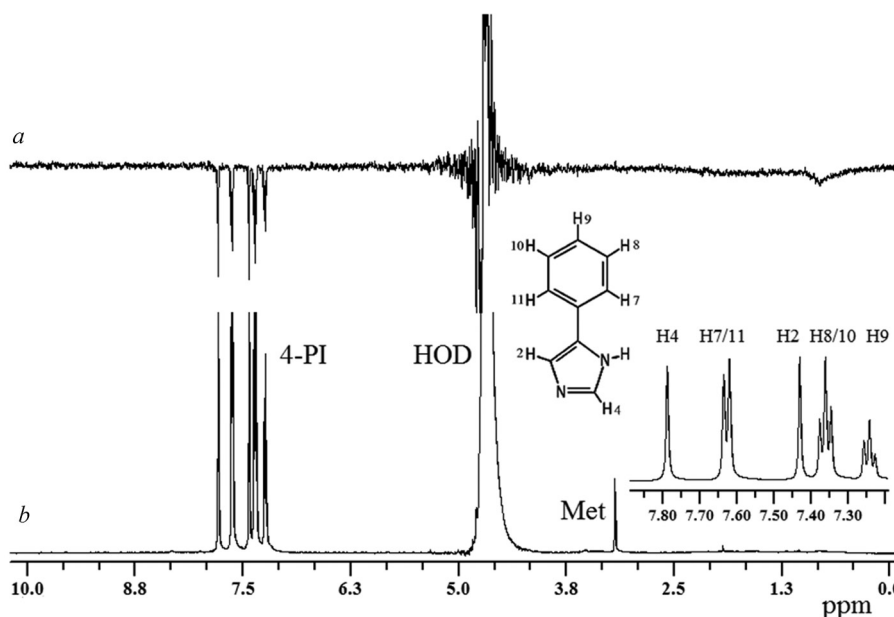


Рис. 4. ^1H -ЯМР спектры раствора 4-PI (11 мМ) в присутствии P450cam (6 мкМ) (D_2O -КФБ 100 мМ, рD 7,5): *a* – разностный РПН-ЯМР спектр (получен при вычитании спектра с радиочастотным насыщением P450cam из спектра без насыщения); *b* – РПН-ЯМР спектр с частотой селективного импульса в области 30 ppm (вне резонанса). На вставке изображена область спектра с сигналами 4-PI, с отнесением их химических сдвигов относительно молекулярной структуры. HOD – остаточный сигнал от протонов воды, Met – сигнал от метильной группы d4-метанола

Fig. 4. ^1H -NMR spectra of the solution of 4-PI (11 mM) in the presence of P450cam (6 μM) (D_2O -KFB 100 mM, pD 7.5): *a* – difference STD-NMR spectrum (obtained by subtracting a spectrum with radiofrequency saturation of P450cam from a spectrum without saturation); *b* – STD-NMR spectrum with a selective pulse frequency within 30 ppm (outside resonance). The insert shows the region of the spectrum with 4-PI signals, with the assignment of their chemical shifts relative to the molecule structure. HOD is the residual signal of water protons and Met is the signal of the methyl group of d4-methanol

нюации сигнала молекулы метанола. В дальнейшем большой интерес представляет количественное определение данного промежуточного взаимодействия, в целях сравнения с комплексом с прямой координацией.

Для определения равновесной константы диссоциации для такого быстро-обмениваемого состояния при взаимодействии P450cam с 4-PI использовали зависимость РПН_{ФА} при нулевом времени насыщения от концентрации 4-PI.

В результате исследований Ангуло и соавт. [18] показано, что равновесная константа диссоциации (K_d), определенная методом РПН-ЯМР по зависимости фактора амплификации от концентрации лиганда при выбранном времени насыщения, зачастую переоценивается. Показано, что K_d зависит от концентрации белка, интенсивности выбранного сигнала и времени насыщения. В свою очередь, эти зависимости можно отнести к процессу повторного быстрого связывания (ребиндинга), когда уже насыщенный намагниченностью связанный с белком лиганд успевает диссоциировать, а затем повторно связаться за время насыщения, не успевая релаксировать до первоначального состояния. Ангуло разработана схема РПН-ЯМР эксперимента [6], позволяющая обойти нежелательные эффекты и определить истинную термодинамическую равновесную константу диссоциации. Основной принцип заключается в определении K_d по зависимости фактора амплификации от концентрации лиганда при времени насыщения, стремящемся к нулю. Для этого необходимо провести измерения РПН при различном времени насыщения для каждой концентрации лиганда. Затем по зависимости фактора амплификации от времени насыщения определить константу скорости насыщения и максимальный фактор амплификации. Произведение этих двух величин дает фактор амплификации РПН при нулевом времени насыщения. Построив зависимость фактора амплификации в нулевом насыщении от концентрации лиганда можно определить, используя аппроксимацию полученных экспериментальных точек изотермой Ленгмюра (для случая взаимодействия с одним центром связывания), истинную термодинамическую равновесную константу диссоциации.

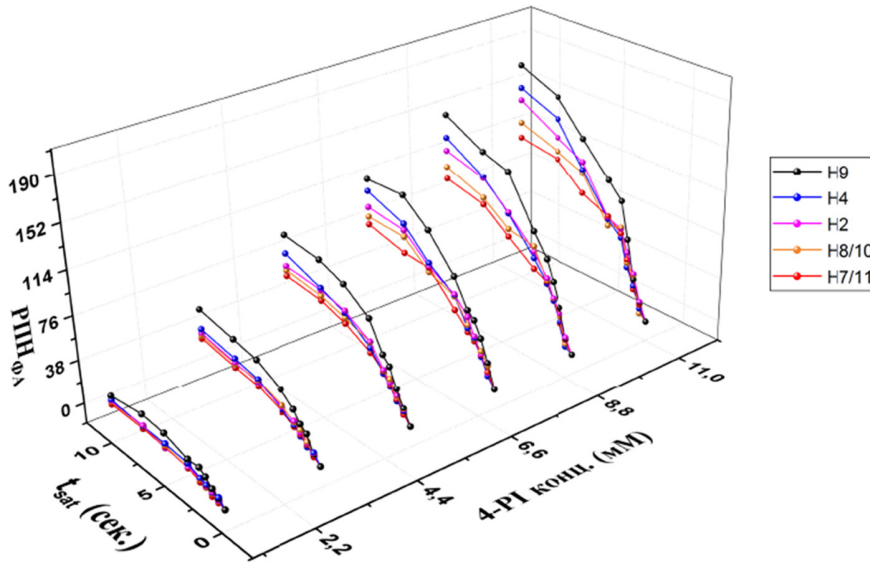


Рис. 5. График зависимости $STD_{\Phi A}$ сигналов протонов 4-PI от концентрации 4-PI и времени насыщения (t_{sat}) в присутствии P450cam (6 мкМ). Цветовая легенда отображает принадлежность кривых к определенным сигналам протонов 4-PI

Fig. 5. $STD_{\Phi A}$ of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration and saturation time (t_{sat}) in the presence of P450cam (6 μ M). Color indicates that the curves stand for the determined signals of 4-PI protons

Майер и Майер предложили преобразовать наблюдаемые экспериментальные интенсивности $(I_0 - I_{sat}) / I_0$ в фактор амплификации $RPN_{\Phi A}$:

$$RPN_{\Phi A} = \frac{\varepsilon(I_0 - I_{sat})}{I_0} = \varepsilon\eta_{RPN}$$

Учитывая это, можно представить вышеизложенную теорию данного эксперимента в виде следующих выражений:

$$RPN_{\Phi A}(t_{sat}) = RPN_{\Phi A}^{max} (1 - \exp(-k_{sat}t_{sat})),$$

где $RPN_{\Phi A}(t_{sat})$ – наблюдаемая интенсивность $RPN_{\Phi A}$; $RPN_{\Phi A}^{max}$ – асимптотический максимум кривой увеличения RPN ; t_{sat} – время насыщения селективным импульсом; k_{sat} – константа скорости, относящаяся к релаксационным свойствам выбранного ядра, которая определяет скорость увеличения $RPN_{\Phi A}$. $RPN_{\Phi A}^{max}$ и k_{sat} вычисляется методом наименьших квадратов, а начальный наклон кривой определяется как

$$dRPN_{\Phi A} / dt(0) = RPN_{\Phi A}^{max} k_{sat},$$

$$\lim_{t_{sat} \rightarrow 0} d / dt(RPN_{\Phi A}) = k_{sat} RPN_{\Phi A} = RPN_{\Phi A0}$$

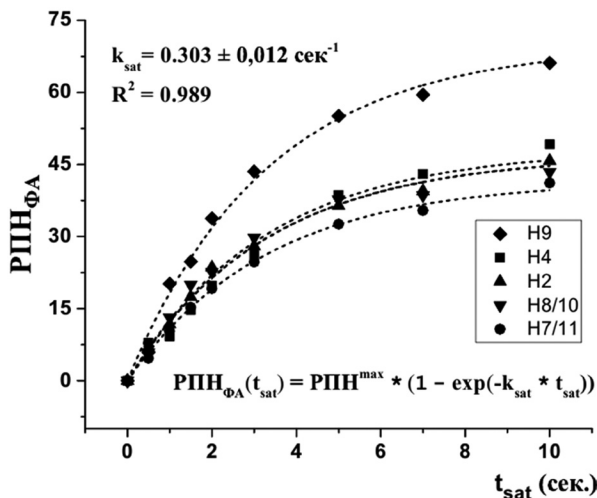


Рис. 6. График зависимости $RPN_{\Phi A}$ сигналов протонов 4-PI от времени насыщения при концентрации 4-PI 3 мМ

Fig. 6. $STD_{\Phi A}$ of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration and saturation equal to 3 mM

Нами получены экспериментальные данные зависимости $RPN_{\Phi A}$ от времени насыщения для определения $RPN_{\Phi A0}$ для пяти сигналов от различных протонов 4-PI (рис. 5). Полученные кривые хорошо аппроксимируются моноэкспоненциальной зависимостью для RPN (рис. 6). Это свидетельствует в пользу того, что полученные экспериментальные кривые соответствуют од-

ному состоянию, где 4-PI взаимодействует с одним сайтом связывания. При увеличении концентрации 4-PI происходит увеличение $RPN_{\Phi A}$, что согласуется с теорией РПН-ЯМР.

Рассчитанные по кривым значения $RPN_{\Phi A_{\max}}$ и k_{sat} (таблица) позволили определить значения для $RPN_{\Phi A0}$. Найденные значения для $RPN_{\Phi A_{\max}}$ дают возможность осуществить «эпитопное картирование», т. е. определить относительную близость расположения протонов лиганда к насыщаемым селективным радиочастотным импульсом белковым группам. Так максимально близко к белку располагается протон H9, в то время как протоны H7 и H11 наиболее отдалены.

Расчитанные по экспериментальным данным (рис. 5) значения максимального фактора амплификации ($RPN_{\Phi A_{\max}}$) и константы скорости насыщения (k_{sat}), а также их произведения

Values of the maximum amplification factor ($STD_{\Phi A \max}$) and saturation rate constants (k_{sat}), as well as their products calculated from the experimental data in Fig. 5

Концентрация (мМ) Concentration (mM)	$RPN_{\Phi A_{\max}}$ $STD_{\Phi A \max}$										k_{sat} (сек ⁻¹)	
	H4		H7/11		H2		H8/10		H9			
1	16,6	(±0,8)	14,8	(±0,7)	16,3	(±0,8)	18,4	(±0,8)	26,9	(±0,9)	0,459	(±0,031)
3	48,2	(±1,2)	41,6	(±1,2)	47,0	(±1,2)	46,9	(±1,2)	69,8	(±1,4)	0,304	(±0,012)
5	83,8	(±2,3)	71,6	(±2,1)	82,5	(±2,3)	78,6	(±2,2)	112,1	(±2,6)	0,295	(±0,013)
7	113,9	(±3,1)	92,6	(±2,9)	108,9	(±3,1)	102,0	(±3,0)	141,4	(±3,5)	0,273	(±0,012)
9	140,7	(±4,7)	113,0	(±4,2)	139,6	(±4,6)	124,8	(±4,4)	176,0	(±5,3)	0,242	(±0,013)
11	164,4	(±7,3)	133,3	(±6,6)	161,4	(±7,2)	144,8	(±6,9)	196,5	(±8,0)	0,245	(±0,018)

Данные зависимости $RPN_{\Phi A0}$ от концентрации 4-PI с использованием соотношения Ленгмюра для взаимодействия с одним сайтом связывания (рис. 7) позволили определить истинную равновесную константу диссоциации комплекса P450cam–4-PI, которая составила 10,4 мМ. Данная константа на три порядка отличается от той, которая была определена нами спектрофотометрическим методом (8,9 мкМ).

Зависимость k_{sat} от концентрации 4-PI (рис. 8) указывает на наличие реассоциации насыщенного намагниченностью 4-PI при его низкой концентрации, в тот момент, когда отношение P450cam/4-PI возрастает. После переноса насыщения с молекулы P450cam диссоциировавшая молекула 4-PI успевает заново связаться до момента полной релаксации намагниченности. Данный факт подтверждает целесообразность определения равновесной константы диссоциации по зависимости $RPN_{\Phi A0}$ от концентрации лиганда вместо определения по зависимости $RPN_{\Phi A}$ при постоянном времени насыщения. Действительно, ранее мы определили равновесную константу диссоциации комплекса P450cam–4-PI по зависимости $RPN_{\Phi A}$ от концентрации 4-PI при постоянном времени насыщения (рис. 9). Найденная таким образом K_d составила 34,6 мМ, что в несколько раз превышает K_d , найденную по $RPN_{\Phi A0}$ (10,4 мМ). Таким образом, мы можем утверждать, что определение при постоянном времени насыщения из-за эффекта реассоциации приводит к завышению определяемой K_d , которая в данном случае зависит от времени насыщения, интенсивности выбранного сигнала, концентрации белка и отличается от истинной термодинамической равновесной константы. При увеличении концентрации 4-PI отношение P450cam/4-PI уменьшается, вследствие чего

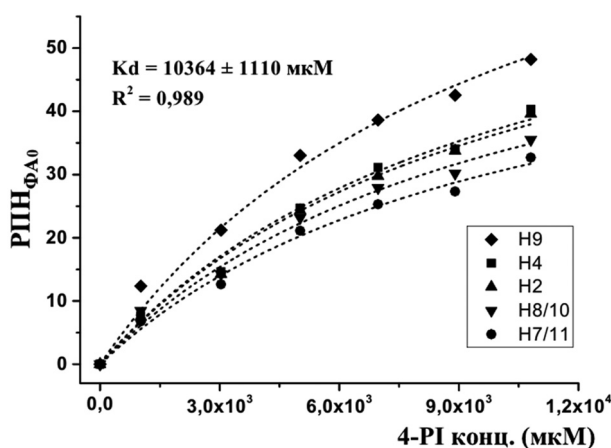


Рис. 7. Кривые зависимости $RPN_{\Phi A0}$ сигналов протонов 4-PI от концентрации 4-PI, найденные методом наименьших квадратов по экспериментальным точкам с использованием зависимости Ленгмюра для случая взаимодействия с одним центром связывания

Fig. 7. $STD_{\Phi A0}$ of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration determined by the least square method and the use of the Langmuir relation for the case of the interaction with one binding site

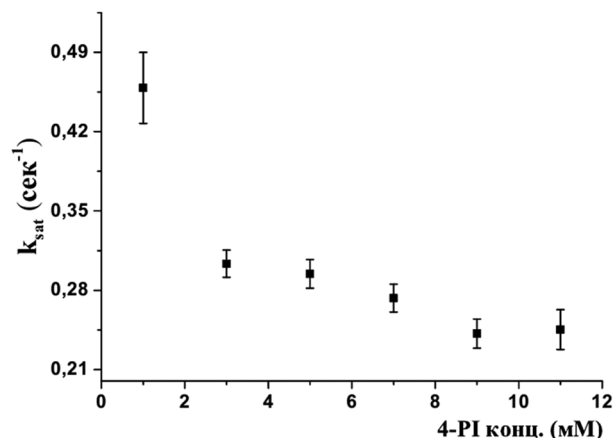


Рис. 8. Зависимость константы скорости насыщения (k_{sat}) от концентрации 4-PI

Fig. 8. Saturation rate constant (k_{sat}) as a function of 4-PI concentration

тательно, активный сайт P450cam обладает большой степенью гидрофобности, поэтому при ассоциации с ним 4-PI выделяется такое количество энергии. Таким образом, мы можем предположить, что после проникновения через канал доступа в погруженный активный сайт P450cam 4-PI некоторое время существует в некоординированном состоянии. Если координирование не происходит из-за конформационных ограничений структуры P450cam, то за счет флуктуации групп полипептидной цепи активного сайта и канала доступа 4-PI может диссоциировать в раствор.

Флуктуации активного сайта P450cam подтверждаются исследованиями время-разрешенного измерения анизотропии флуоресценции d-камфары при взаимодействии с ним, где была показана ее мобильность [19]. Так же подвижность d-камфары обнаруживается при анализе кристаллографических данных термального бета-фактора [20].

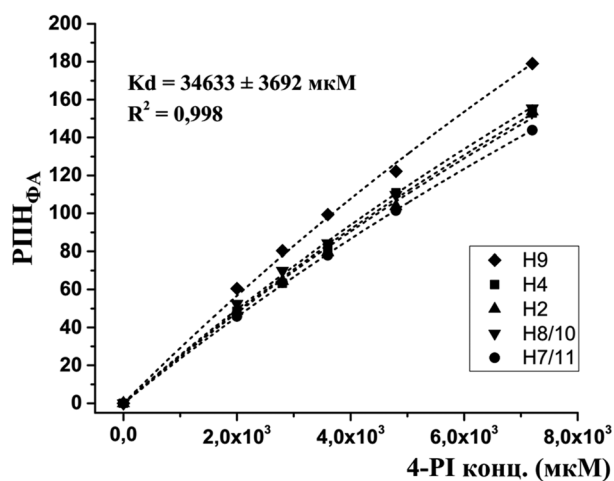


Рис. 9. Кривые зависимости РПН_{ФА} сигналов протонов 4-PI от концентрации 4-PI при времени насыщения 8 с, найденные методом наименьших квадратов по экспериментальным точкам с использованием зависимости Ленгмюра для случая взаимодействия с одним центром связывания

Fig. 9. STD_{ФА} of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration during the 8 sec saturation time found by the least square method and the use of the Langmuir relation for the case of the interaction with one binding site

частота процесса реассоциации насыщенного намагниченностью 4-PI снижается. При малых концентрациях 4-PI вероятность повторной реассоциации выше.

Исходя из полученных нами данных, мы можем утверждать, что РПН-ЯМР эксперимент позволил нам обнаружить новое состояние комплекса между P450cam и 4-PI. В данном состоянии 4-PI не координирован по атому железа гема, энергия взаимодействия (11,2 кДж) намного меньше и обусловлена только взаимодействием интерфейса активного сайта. Время жизни такого комплекса мало, и вследствие этого 4-PI быстро обменивается с объемом растворителя. Свободная энергия связывания (11,2 кДж) приблизительно соответствует величине разницы энергии перехода 4-PI из водного в гидрофобное окружение. Действительно,

активный сайт P450cam обладает большой степенью гидрофобности, поэтому при ассоциации с ним 4-PI выделяется такое количество энергии. Таким образом, мы можем предположить, что после проникновения через канал доступа в погруженный активный сайт P450cam 4-PI некоторое время существует в некоординированном состоянии. Если координирование не происходит из-за конформационных ограничений структуры P450cam, то за счет флуктуации групп полипептидной цепи активного сайта и канала доступа 4-PI может диссоциировать в раствор.

Флуктуации активного сайта P450cam подтверждаются исследованиями время-разрешенного измерения анизотропии флуоресценции d-камфары при взаимодействии с ним, где была показана ее мобильность [19]. Так же подвижность d-камфары обнаруживается при анализе кристаллографических данных термального бета-фактора [20].

Сложность процесса взаимодействия с лигандом неоднократно упоминалась в работах при исследовании других цитохромов P450. В частности, методом ППР показано связывание цитохрома P450 3A4 с итраконазолом и кетоназолом с разными ориентациями в активном сайте. Данные лиганды имеют небольшую скорость диссоциации при взаимодействии по типу ингибитора и каталитически продуктивного состояния при взаимодействии по типу субстрата [21]. При этом изначально было известно, что итраконазол может гидроксироваться в положении, удаленном от триазольных атомов азота на расстоянии в 25 Å. Полученные результаты позволили выяснить причину образования такого продукта реакции. Измеренные равновесные константы диссоциации при помощи ППР для высоко-аффинного состояния соответствуют данным, полученным в результате разностного спектрофотометрического титрования для данных комплексов.

При помощи метода флуоресцентного резонансного переноса энергии (ФРПЭ) и титрования Джобса для цитохрома P450 3A4 установлено [22], что взаимодействие с 1-пиренбу-

танолом соответствует механизму последовательного связывания, где спиновый переход инициируется связыванием 1-пиренбутанола с сайтом с низкой аффинностью, что возможно только при насыщении сайта с высоким сродством. В исследовании взаимодействия P450eryF с флуоресцентным красителем фтор-7GA (фтор-555) [23] по изменению резонансного переноса флуоресценции было предположено существование, по крайней мере, двух сайтов связывания с разным аффинитетом. При помощи времязрешенного ФППЭ показано значительное увеличение аффинности P450eryF к фтор-7GA при повышенных давлениях, что свидетельствует в пользу конформационных превращений, вызванных связыванием с лигандом и связанным с этим значительным увеличением уровня гидратации фермента. Позднее [24] для того же лиганда при взаимодействии с P450 3A4 показано существование двух различных сайтов связывания, расположенных на значительном удалении друг от друга. При взаимодействии с периферическим сайтом связывания происходит существенный сдвиг спинового состояния, что модулирует дальнейшее связывание с активным сайтом. Авторы отмечают, что данные исследования являются первым подтверждением наличия важного сайта связывания на периферии белковой глобулы цитохрома P450 и предполагают, что механизм кооперативности P450 3A4 включает конформационный переход, запускаемый аллостерическим взаимодействием с лигандом.

В [25] предложена модель трехстадийного связывания молекулы ингибитора с цитохромом P450 3A4. С использованием комбинации флуоресцентного стоп-флоу и стоп-флоу поглощения показано возможное существование промежуточного состояния на пути к финальному комплексу с лигандом в активном сайте. В частности, наблюдалось, что тушение лигандом внутренней флуоресценции белка происходит в более быстром временном интервале, чем изменение спинового состояния гема.

Заключение. В настоящей работе мы впервые показали возможность обнаружения быстро-обмениваемого состояния азольного лиганда в активном сайте цитохрома P450cam методом РПН-ЯМР спектроскопии. В условиях, когда концентрация лиганда намного больше концентрации белка, детектирование взаимодействия методом РПН-ЯМР спектроскопии возможно только в случае быстрого обмена лиганда между активным сайтом и объемом растворителя. Нами показано, что комплекс с прямой координацией имеет время жизни в связанном состоянии порядка секунд. Этот факт указывает на невозможность обнаружения данного взаимодействия в РПН-ЯМР эксперименте. В обнаруженном нами короткоживущем комплексе между P450cam и 4-PI последний находится в промежуточном состоянии, которое предшествует координированию по атому железа гема. Можно предположить, что данное состояние 4-PI обладает большой степенью подвижности в активном сайте P450cam. Рассчитанная равновесная константа диссоциации по РПН-ЯМР позволяет утверждать, что энергия взаимодействия 4-PI в промежуточном состоянии относится, в основном, к гидрофобным взаимодействиям с полостью активного сайта цитохрома P450cam.

Таким образом, с учетом нашей работы и уже существующих данных, можно утверждать, что взаимодействие цитохромов P450 с лигандами не является простым бимолекулярным процессом. До момента образования финального комплекса с субстратом или ингибитором, последние могут связываться в промежуточных сайтах цитохрома P450 достаточное время, чтобы быть обнаруженными, например, такими методами, как ЯМР, но не детектироваться оптическими методами. К таким промежуточным сайтам можно отнести область канала доступа субстрата цитохрома P450, поверхность вблизи данного канала или область активного сайта, взаимодействие с которой препятствует дальнейшему сближению с гемовой группой.

Список использованных источников

1. Hrycaj, E. G. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450 / E. G. Hrycaj, S. M. Bandiera // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2015. – Vol. 851. – 368 p. doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2
2. Isin, E. M. Substrate binding to cytochromes P450 / E. M. Isin, F. P. Guengerich // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2008. – Vol. 392, N 6. – P. 1019–1030. doi.org/10.1007/s00216-008-2244-0
3. Aguirre, C. Overview of Probing Protein-Ligand Interactions Using NMR / C. Aguirre, O. Cala, I. Krimm // *Current Protocols in Protein Science*. – 2015. – P. 17.18.1–17.18.24. doi.org/10.1002/0471140864.ps1718s81
4. Cala, O. NMR-based analysis of protein–ligand interactions / O. Cala, F. Guillièrè, I. Krimm // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2014. – Vol. 406, N 4. – P. 943–956. doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0
5. Mayer, M. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor / M. Mayer, B. Meyer // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123, N 25. – P. 6108–6117. doi.org/10.1021/ja0100120

6. Angulo, J. STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules – a quantitative approach / J. Angulo, P. M. Nieto // *European Biophysics Journal*. – 2011. – Vol. 40, N 12. – P. 1357–1369. doi.org/10.1007/s00249-011-0749-5
7. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ in native platelets than in liposomes / B. Claassen [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127, N 3. – P. 916–919. doi.org/10.1021/ja044434w
8. Direct detection of ligand binding to Sepharose-immobilised protein using saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy / T. Haselhorst [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2007. – Vol. 359, N 4. – P. 866–870. doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.204
9. Jayalakshmi, V. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes / V. Jayalakshmi, N. R. Krishna // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2002. – Vol. 155, N 1. – P. 106–118. doi.org/10.1006/jmre.2001.2499
10. Godamudunage, M. P. Comparison of Cytochrome P450 3A4 and 3A7 with Azole Inhibitors / M. P. Godamudunage, J. N. Lampe, E. E. Scott // *FASEB Journal*. – 2017. – Vol. 31, N 1. – P. 669.5.
11. Sevrioukova, I. F. Structural biology of redox partner interactions in P450cam monooxygenase: a fresh look at an old system / I. F. Sevrioukova, T. L. Poulos // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2011. – Vol. 507, N 1. – P. 66–74. doi.org/10.1016/j.abb.2010.08.022
12. Mueller, E. J. Twenty-five years of P450cam research / E. J. Mueller, P. J. Loida, S. G. Sligar // *Cytochrome P450*. – Springer US, 1995. – P. 83–124. doi.org/10.1007/978-1-4757-2391-5_3
13. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450 / T. L. Poulos [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – Vol. 260, N 30. – P. 16122–16130.
14. Conformational states of cytochrome P450cam revealed by trapping of synthetic molecular wires / A. M. A. Hays [et al.] // *Journal of molecular biology*. – 2004. – Vol. 344, N 2. – P. 455–469. doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.046
15. Three clusters of conformational states in p450cam reveal a multistep pathway for closing of the substrate access channel / Y. T. Lee [et al.] // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50, N 5. – P. 693–703. doi.org/10.1021/bi101726d
16. Poulos, T. L. Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450cam / T. L. Poulos, A. J. Howard // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26, N 25. – P. 8165–8174. doi.org/10.1021/bi00399a022
17. Lipscomb, J. D. Structural aspects of the active site of cytochrome P-450cam / J. D. Lipscomb, I. C. Gunsalus // *Drug Metabolism and Disposition*. – 1973. – Vol. 1, N 1. – P. 1–5.
18. Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy Characterization of Dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN / J. Angulo [et al.] // *ChemBioChem*. – 2008. – Vol. 9, N 14. – P. 2225–2227. doi.org/10.1002/cbic.200800361
19. Prasad, S. Binding of camphor to *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam: steady-state and picosecond time-resolved fluorescence studies / S. Prasad, S. Mazumdar, S. Mitra // *FEBS letters*. – 2000. – Vol. 477, N 3. – P. 157–160. doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01745-2
20. Crystal structure of the cytochrome P-450CAM active site mutant Thr252Ala / R. Raag [et al.] // *Biochemistry*. – 1991. – Vol. 30, N 48. – P. 11420–11429. doi.org/10.1021/bi00112a008
21. Surface plasmon resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with kinetic resolution of multiple binding orientations / J. T. Pearson [et al.] // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, N 20. – P. 6341–6353. doi.org/10.1021/bi0600042
22. Fernando, H. Resolution of Multiple Substrate Binding Sites in Cytochrome P450 3A4: The Stoichiometry of the Enzyme-Substrate Complexes Probed by FRET and Job's Titration / H. Fernando, J. R. Halpert, D. R. Davydov // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, N 13. – P. 4199–4209. doi.org/10.1021/bi052491b
23. Davydov, D. R. Allosteric transitions in cytochrome P450eryF explored with pressure-perturbation spectroscopy, lifetime FRET, and a novel fluorescent substrate, Fluorol-7GA / D. R. Davydov, N. Y. Davydova, J. R. Halpert // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47, N 43. – P. 11348–11359. doi.org/10.1021/bi8011803
24. Peripheral ligand-binding site in cytochrome P450 3A4 located with fluorescence resonance energy transfer (FRET) / D. R. Davydov [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, N 9. – P. 6797–6809. doi.org/10.1074/jbc.m111.325654
25. Isin, E. M. Multiple sequential steps involved in the binding of inhibitors to cytochrome P450 3A4 / E. M. Isin, F. P. Guengerich // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, N 9. – P. 6863–6874. doi.org/10.1074/jbc.m610346200

References

1. Hrycay E. G., Bandiera S. M. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, vol. 851. 368 p. doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2
2. Isin E. M., Guengerich F. P. Substrate binding to cytochromes P450. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, vol. 392, no. 6, pp. 1019–1030. doi.org/10.1007/s00216-008-2244-0
3. Aguirre C., Cala O., Krimm I. Overview of Probing Protein-Ligand Interactions Using NMR. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, pp. 17.18.1–17.18.24. doi.org/10.1002/0471140864.ps1718s81
4. Cala O., Guillière F., Krimm I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2014, vol. 406, no. 4, pp. 943–956. doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0
5. Mayer M., Meyer B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, vol. 123, no. 25, pp. 6108–6117. doi.org/10.1021/ja0100120
6. Angulo J., Nieto P. M. STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules – a quantitative approach. *European Biophysics Journal*, 2011, vol. 40, no. 12, pp. 1357–1369. doi.org/10.1007/s00249-011-0749-5

7. Claassen B., Axmann M., Meinecke R., Meyer B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin α IIb β 3 in native platelets than in liposomes. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, vol. 127, no. 3, pp. 916–919. doi.org/10.1021/ja044434w
8. Haselhorst T., Münster-Kühnel A. K., Oschlies M., Tiralongo J., Gerardy-Schahn R., von Itzstein M. Direct detection of ligand binding to Sepharose-immobilised protein using saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, vol. 359, no. 4, pp. 866–870. doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.204
9. Jayalakshmi V., Krishna N. R. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *Journal of Magnetic Resonance*, 2002, vol. 155, no. 1, pp. 106–118. doi.org/10.1006/jmre.2001.2499
10. Godamudunage M. P., Lampe J. N., Scott E. E. Comparison of Cytochrome P450 3A4 and 3A7 with Azole Inhibitors. *FASEB Journal*, 2017, vol. 31, no. 1, pp. 669.5.
11. Sevrioukova I. F., Poulos T. L. Structural biology of redox partner interactions in P450cam monooxygenase: a fresh look at an old system. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2011, vol. 507, no. 1, pp. 66–74. doi.org/10.1016/j.abb.2010.08.022
12. Mueller E. J., Loida P. J., Sligar S. G. Twenty-five years of P450cam research. *Cytochrome P450*. Springer US, 1995, pp. 83–124. doi.org/10.1007/978-1-4757-2391-5_3
13. Poulos T. L., Finzel B. C., Gunsalus I. C., Wagner G. C., Kraut J. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, vol. 260, no. 30, pp. 16122–16130.
14. Hays A. M. A., Dunn A. R., Chiu R., Gray H. B., Stout C. D., Goodin D. B. Conformational states of cytochrome P450cam revealed by trapping of synthetic molecular wires. *Journal of molecular biology*, 2004, vol. 344, no. 2, pp. 455–469. doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.046
15. Lee Y. T., Glazer E. C., Wilson R. F., Stout C. D., Goodin D. B. Three clusters of conformational states in p450cam reveal a multistep pathway for closing of the substrate access channel. *Biochemistry*, 2011, vol. 50, no. 5, pp. 693–703. doi.org/10.1021/bi101726d
16. Poulos T. L., Howard A. J. Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450cam. *Biochemistry*, 1987, vol. 26, no. 25, pp. 8165–8174. doi.org/10.1021/bi00399a022
17. Lipscomb J. D., Gunsalus I. C. Structural aspects of the active site of cytochrome P-450cam. *Drug Metabolism and Disposition*, 1973, vol. 1, no. 1, pp. 1–5.
18. Angulo J., Díaz I., Reina J. J., Tabarani G., Fieschi F., Rojo J., Nieto P. M. Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy Characterization of Dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN. *ChemBioChem*, 2008, vol. 9, no. 14, pp. 2225–2227. doi.org/10.1002/cbic.200800361
19. Prasad S., Mazumdar S., Mitra S. Binding of camphor to *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam: steady-state and picosecond time-resolved fluorescence studies. *FEBS letters*, 2000, vol. 477, no. 3, pp. 157–160. doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01745-2
20. Raag R., Martinis S. A., Sligar S. G., Poulos T. L. Crystal structure of the cytochrome P-450CAM active site mutant Thr252Ala. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, no. 48, pp. 11420–11429. doi.org/10.1021/bi00112a008
21. Pearson J. T., Hill J. J., Swank J., Isoherranen N., Kunze K. L., Atkins W. M. Surface plasmon resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with kinetic resolution of multiple binding orientations. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 20, pp. 6341–6353. doi.org/10.1021/bi0600042
22. Fernando H., Halpert J. R., Davydov D. R. Resolution of Multiple Substrate Binding Sites in Cytochrome P450 3A4: The Stoichiometry of the Enzyme-Substrate Complexes Probed by FRET and Job's Titration. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 13, pp. 4199–4209. doi.org/10.1021/bi052491b
23. Davydov D. R., Davydova N. Y., Halpert J. R. Allosteric transitions in cytochrome P450eryF explored with pressure-perturbation spectroscopy, lifetime FRET, and a novel fluorescent substrate, Fluorol-7GA. *Biochemistry*, 2008, vol. 47, no. 43, pp. 11348–11359. doi.org/10.1021/bi8011803
24. Davydov D. R., Rumpfolt J. A. O., Sineva E. V., Fernando H., Davydova N. Y., Halpert J. R. Peripheral ligand-binding site in cytochrome P450 3A4 located with fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 9, pp. 6797–6809. doi.org/10.1074/jbc.m111.325654
25. Isin E. M., Guengerich F. P. Multiple sequential steps involved in the binding of inhibitors to cytochrome P450 3A4. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, no. 9, pp. 6863–6874. doi.org/10.1074/jbc.m610346200

Информация об авторах

Бритиков Владимир Владимирович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: britikov@iboch.bas-net.by.

Панкратова Елена Вячеславовна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pankratovaelena3@gmail.com.

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

Information about the authors

Britikov Vladimir Vladimirovich – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: britikov@iboch.bas-net.by.

Pankratova Elena Vyacheslavovna – Junior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pankratovaelena3@gmail.com.

Usanov Sergey Aleksandrovich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 635.21:575.222.73

Поступило в редакцию 22.06.2017
Received 22.06.2017

**А. П. Ермишин¹, А. В. Левый¹, Е. В. Воронкова¹, Ю. В. Полюхович¹,
В. И. Лукша¹, А. С. Агеева²**

¹*Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*
²*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

**ДИПЛОИДНЫЕ ГИБРИДЫ МЕЖДУ ДИКИМ АЛЛОТЕТРАПЛОИДНЫМ ВИДОМ
КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM STOLONIFERUM* SCHLDTL. & BOUCHET
И ДИПЛОИДНЫМИ КЛОНАМИ КУЛЬТУРНОГО КАРТОФЕЛЯ *S. TUBEROSUM* L.,
ИМЕЮЩИЕ ГЕНОМ В ДИКОГО ВИДА**

(Представлено академиком Л. В. Хотылевой)

Аннотация. Среди гибридов между дикими тетраплоидными видами картофеля и диплоидными клонами *S. tuberosum* наряду с ожидаемыми триплоидными гибридами встречаются диплоидные гибриды. Ранее нами было показано, что у них сохраняется только один из геномов дикого вида (геном А). В сообщении впервые представлены результаты выявления диплоидных межвидовых гибридов, несущих геном В дикого вида. Среди 235 семян гибридов от скрещивания ценных для селекции образцов *S. stoloniferum* и фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* отобраны четыре гибрида, формирующих жизнеспособную пыльцу. Анализ мейоза в материнских клетках пыльцы показал наличие у них 24 хромосом. У всех диплоидных гибридов, как и у родительских клонов *S. stoloniferum* и триплоидных гибридов выявлен ДНК маркер генома В SolB. Все диплоидные гибриды наследовали характерные для дикого вида маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля RYSC 3 и Yes3-3A, а также маркеры генов устойчивости к фитофторозу R1 и R3b. Два гибрида без потерь наследовали маркеры гена устойчивости к фитофторозу Rpi-sto1, представленные у родительских клонов дикого вида. У одного диплоидного гибрида не детектировался маркер 517/1519, а у одного гибрида произошла утрата обоих маркеров (517/1519 и 1521/518). Получение гибридов с геномом В делает приоритетной версию о возможном механизме их формирования за счет избирательной элиминации одного из геномов дикого вида в процессе развития изначально триплоидных межвидовых гибридов.

Ключевые слова: картофель, *Solanum stoloniferum*, межвидовая гибридизация, ДНК-маркеры, гены устойчивости, PVY, фитофтороз

Для цитирования: Диплоидные гибриды между диким аллотетраплоидным видом картофеля *Solanum stoloniferum* Schldtl. & Bouchet и диплоидными клонами культурного картофеля *S. tuberosum* L., имеющие геном В дикого вида / А. П. Ермишин [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 80–89.

**Alexander P. Yermishin¹, Alexander V. Levy¹, Elena V. Voronkova¹, Yulia V. Polyukhovich¹,
Victoria I. Luksha¹, Anastasiya S. Ageeva²**

¹*Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*
²*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

**DIPLOID HYBRIDS BETWEEN THE WILD ALLOTETRAPLOID POTATO SPECIES *SOLANUM
STOLONIFERUM* SCHLDTL & BOUCHET AND DIPLOID CLONES OF CULTIVATED POTATO
S. TUBEROSUM L. HAVING GENOME B OF WILD SPECIES**

(Communicated by Academician Lubov V. Khotyleva)

Abstract. We were the first who demonstrated the possibility to produce diploid hybrids (along with triploid ones) while pollinating some wild allotetraploid potato species with the pollen of *S. tuberosum* diploid clones. It was determined that these hybrids only retained one of the genomes of wild species (genome A). Here, we present the results of revealing diploid inter-specific hybrids having genome B of wild species. There were selected four hybrids producing the viable pollen among 235 hybrids between valuable for breeding accessions of *S. stoloniferum* and fertile diploid clone of *S. tuberosum*. The analysis of meiosis in pollen mother cells showed that they had 24 chromosomes. The DNA marker SolB of genome B of wild spe-

cies was detected in diploid hybrids, as well as in parental clones of *S. stoloniferum* and triploid interspecific hybrids. The diploid hybrids inherited the typical for wild species markers RYSC 3 and Yes3-3A of Y-virus resistance genes, as well as the markers of late blight resistance genes *R1* and *R3b*. Two of the diploid hybrids inherited markers of late blight resistance gene *Rpi-sto1* presented in parental clones of the wild species lossless. The marker 517/1519 of this gene was not detected in one diploid hybrid and both markers (517/1519 and 1521/518) – in another one. Production of the hybrids with genome B makes the version on a possible mechanism of their formation through the selective elimination of one of the genomes of wild species in ontogenesis of initially triploid interspecific hybrids to be priority.

Keywords: potato, *Solanum stoloniferum*, interspecific hybridization, DNA markers, resistance genes, PVY, late blight

For citation: Yermishin A. P., Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukhovich Yu. V., Luksha V. I., Ageeva A. S. Diploid hybrids between the wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum* Schldtl & Bouchet and diploid clones of cultivated potato *S. tuberosum* L. having genome B of wild species. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 80–89 (in Russian).

Введение. Получение гибридов между отдельными видами может сопровождаться элиминацией хромосом (части или всего генома) одного из родителей. С одной стороны, это может существенно осложнить использование некоторых ценных диких видов в селекции. С другой стороны, это свойство некоторых видов может использоваться в селекции, например, для получения гаплоидов [1].

Нами [2] впервые было установлено, что в результате гибридизации между дикими тетраплоидными видами картофеля *S. acaule*, *S. stoloniferum* (в качестве материнских форм) и диплоидными клонами *S. tuberosum* наряду с ожидаемыми триплоидными гибридами с определенной частотой встречаются диплоидные гибриды. Сравнительный RAPD-анализ показал, что представленность видоспецифических локусов диких видов у диплоидных гибридов оказалась приблизительно в два раза ниже, чем у соответствующих триплоидных межвидовых гибридов, что означает, что при получении диплоидных гибридов происходила утрата половины генетического материала дикого вида [3].

Несмотря на утрату одного из геномов аллотетраплоидного родителя описанные гибриды представляют значительный интерес для селекции. Среди диплоидных гибридов на основе *S. acaule* и *S. stoloniferum* выделены генотипы с высокой устойчивостью к вирусам картофеля PVX и PVY, к фитофторозу [4]. Характерной особенностью диплоидных гибридов является высокая регулярность мейоза и достаточно высокая фертильность. Это позволяет успешно их беккроссировать диплоидами культурного картофеля, применяя как в качестве материнских форм, так и опылителей. Использование диплоидных гибридов эффективнее традиционных схем вовлечения в селекцию полиплоидных диких видов картофеля, которые предполагают получение полиплоидных форм дикого вида и/или межвидовых гибридов с их участием [5]. Получение и беккроссирование диплоидных межвидовых гибридов дает возможность проводить отбор по признакам, которые предполагают перенести в селекционный материал от дикого вида, осуществлять картирование и ДНК-маркирование интрогрессированных генов на диплоидном уровне, что позволяет существенно сократить время и трудовые затраты на эти операции.

Поскольку для диплоидных межвидовых гибридов характерна высокая регулярность мейоза и, как следствие, высокая фертильность, можно заключить, что они помимо генома А *S. tuberosum* несут гомологичный ему геном А дикого аллотетраплоидного вида. Остается неясным, возможно ли получение диплоидных гибридов, несущих геном В (А' для *S. acaule*) и, соответственно, возможна ли интрогрессия в селекционный материал всего многообразия ценных генов, имеющих у диких аллотетраплоидных видов, или только его части.

В сообщении впервые представлены результаты выявления и первичной генетической характеристики диплоидных межвидовых гибридов, несущих геном В дикого вида, в гибридной популяции, полученной в результате скрещивания ценных для селекции образцов аллотетраплоидного дикого вида картофеля *Solanum stoloniferum* и фертильного диплоидного клона *S. tuberosum*.

Материал и методы исследования. В качестве материала использовали межвидовые гибриды между образцами *S. stoloniferum* PI 205522 и PI 473534 (материнские формы) и диплоидным клоном *S. tuberosum* IGC 10/1.21, созданным в нашей лаборатории в результате специальной селекции на высокую функциональную фертильность пыльцы. Семена образцов *S. stoloniferum* по-

лучены из генбанка по картофелю США (United States Potato Genebank NRSP 6). У названных образцов дикого вида нами ранее были выявлены ДНК-маркеры генов устойчивости к Y-вирусу картофеля (PVY), а также гена *Rpi-stol* высокой долговременной устойчивости к фитофторозу [6]. Генетический тип цитоплазмы у образцов *S. stoloniferum* определяли по методике [7]. Было установлено, что образец *S. stoloniferum* PI 205522 имел цитоплазму типа W/γ, а PI 473534 – W/α.

С целью выделения диплоидных гибридов у межвидовых гибридов проводили оценку жизнеспособности пыльцы (с помощью окраски ацетокармином) и функциональной фертильности пыльцы (ФФП) путем определения частоты прорастания пыльцевых зерен за 4 ч при 25 °С на питательной среде, предложенной [8]. Для подтверждения плоидности отобранных гибридов использовали подсчет хромосом в материнских клетках пыльцы (применяли окраску хромосом по Сноу).

Использовали модифицированный для зеленых тканей картофеля протокол выделения ДНК с помощью **DNA purification Kit (Thermo Scientific, EC)**. **Оценку межвидовых гибридов и родительских форм** на наличие ДНК-маркеров генов устойчивости, а также определение типа цитоплазмы осуществляли с применением соответствующих праймеров (синтезированы ОДО «Праймтех», Минск, Беларусь), по протоколам, предложенным разработчиками праймеров (табл. 1). У всех гибридов произведена детекция маркера SolB₄₆₉, который применяется в филогенетических исследованиях для детекции генома В аллотетраплоидных диких видов картофеля секции *Longipedicillata* [9]. С его помощью можно судить, какой из геномов дикого вида перенесен в диплоидные гибриды, а какой элиминирован и, соответственно, какие гены устойчивости дикого вида могут быть перенесены в диплоидные гибриды в зависимости от их геномной локализации.

Т а б л и ц а 1. **Использованные в работе ДНК-маркеры генома В и генов устойчивости к фитофторозу и Y-вирусу картофеля (PVY)**

Table 1. **Used DNA markers of genome B and late blight resistance genes and potato Y-virus (PVY) resistance genes**

Ген Gene	Признак Character	Маркер Marker	Праймер (5'-3') Primer (5'-3')	Температура отжига праймеров, °С Primer annealing temperature, °С	Источник Source
	Маркер генома В	SolB ₄₆₉	F – АТААСТСТСАААТАСГАААСААА R – СТСТГТААСТГТСТТАГАТТСТГТГТ	60	[9]
<i>Ry_{adg}</i>	Устойчивость к PVY	RYSC3 ₃₂₁	F – АТАСАСТСАТСТАААТТТГАТГГ R – АГГАТАТАСГГСАТСАТТТТССГА	56	[10]
<i>Ry_{sto}</i>	Устойчивость к PVY	Yes3-3A ₃₄₁	F – ТААСТСААГСГГААТААССС R – ААТТСАСТГТТТАСАТГСТТСТТГТГ	60	[11]
<i>Rpi-stol</i>	Устойчивость к фитофторозу	517/1519 ₇₅₀	F – САТТССААСТАГСССАТСТТГГ R – ТАТТСАГАТСГАААГТАС	58	[12]
<i>Rpi-stol</i>	Устойчивость к фитофторозу	1521/518 ₇₀₄	F – ГАААГТСТАГАТТАСАСТГГ R – СААТСАААТГГСАГГААСС	58	[12]
<i>R1</i>	Устойчивость к фитофторозу	R1 ₁₄₀₀	F – САСТСГТГАСАТАТССТСАСТА R – СААСССТГГСАТГСССАСГ	55	[9]
<i>R3b</i>	Устойчивость к фитофторозу	R3b ₃₇₈	F – ГТСГАТГААТГСТАТГТТТСТСГАГА R – АССАГТТТСТТГСААТТССАГАТТГ	64	[9]

Производили детекцию названных маркеров у родительских форм: фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* IGC 10/1.21, образцов *S. stoloniferum* (отдельно у клонов, которые были использованы при получении диплоидных гибридов), диплоидных и соответствующих триплоидных гибридов (в анализ было взято 7 триплоидных гибридов от клона PI 205522.2, 8 гибридов от клона PI 205522.3 и 6 гибридов от клона PI 473534.2).

Результаты и их обсуждение. *Выделение диплоидных гибридов 4x S. stoloniferum × 2x S. tuberosum.* В 2015 г. в результате опыления 136 цветков *S. stoloniferum* PI 205522 получено 94 ягоды, из которых выделили 5000 семян. Эффективность гибридизации: 53 семени/ягоду, 37 семян/опыление. Семена в основном были мелкие, невыполненные, имели низкую всхожесть – 9,3 %. Получено 467 сеянцев, часть из которых (407 растений) была высажена в 2016 г. в поле. У 219 сеянцев гибридов *S. stoloniferum* PI 205522 × *S. tuberosum* IGC 10/1.21 были взяты пробы пыльцы, анализ которых показал, что у 216 сеянцев пыльца стерильная, что говорит о том, что они, оче-

видно, являются триплоидами. Три сеянца образовывали выполненную жизнеспособную пыльцу, однако функционально фертильной (ФФП = 15 %) она была только у одного. Подсчет хромосом в мейозе материнских клеток пыльцы удалось провести у 2 сеянцев. Гибрид, который образовывал функционально фертильную пыльцу, оказался пентаплоидом (число хромосом около 60), другой гибрид – диплоидом (24 хромосомы).

Принимая во внимание, что на цитоплазме *W/γ S. stoloniferum* PI 205522 диплоидные гибриды могли быть мужски стерильными, а также тот факт, что полученные нами ранее диплоидные гибриды предположительно имели геном А аллотетраплоидных видов, для отбора диплоидов мы детектировали маркер SolB₄₆₉ генома В у 82 гибридных сеянцев. Маркер был выявлен у 81 гибрида, что с высокой степенью вероятности указывает на их триплоидную природу (геномная формула ААВ). У одного гибрида маркер отсутствовал (геномная формула АА). Подсчет хромосом у этого гибрида показал, что он является диплоидом.

В результате опыления 33 цветков *S. stoloniferum* PI 473534 получено 16 ягод, из которых выделили 783 семени. Эффективность гибридизации: 49 семян/ягоду, 24 семени/опыление. Всхожесть семян составила 6,9 %: было получено 28 гибридных сеянцев. Анализ 16 сеянцев выявил 2 гибрида, формирующих жизнеспособную, но функционально неактивную пыльцу. Цитологический анализ подтвердил их диплоидную природу.

Таким образом, нам удалось выделить в общей сложности 4 диплоидных межвидовых гибрида (два с PI 205522 и два с PI 473534), формирующих жизнеспособную пыльцу и один мужски стерильный диплоидный гибрид (с PI 205522). Один гибрид с участием PI 205522 оказался пентаплоидом, способным образовывать функционально фертильную пыльцу.

Диплоидные межвидовые гибриды заметно отличались от соответствующих триплоидных гибридов по морфологии растений. У них сильнее были выражены признаки культурного родительского вида: более широкие семядоли листьев, более короткие столоны, они имели более крупные цветки по сравнению с диким родительским видом. Пентаплоидный гибрид по внешнему виду был близок *S. stoloniferum*. Как триплоидные, так и все выделенные диплоидные гибриды и пентаплоидный гибрид не поражались в поле фитофторозом (устойчивость 9 баллов).

Попытки вовлечь в гибридизацию отобранные диплоидные гибриды с фертильными диплоидными клонами *S. tuberosum* оказались неудачными. Также не удалось вовлечь в гибридизацию с культурным картофелем пентаплоидный гибрид ни в качестве материнской формы, ни в качестве опылителя (результаты не приводятся).

Анализ мейоза в материнских клетках пыльцы диплоидных гибридов 4x S. stoloniferum × 2x S. tuberosum. Для большинства проанализированных клеток межвидовых гибридов, образующих жизнеспособную пыльцу, характерна относительно высокая регулярность мейоза. В метафазе I у них обнаружено 12 бивалентов, что предполагает наличие 24 хромосом в ядрах соматических клеток (рисунок, а). У одного из гибридов насчитали 30 бивалентов, что говорит о том, что он является пентаплоидом. В отдельных мейоцитах диплоидных межвидовых гибридов наблюдали следующие нарушения: в метафазе I – анафазе I **преждевременное расхождение хромосом (до четырех пар)** (рисунок, б) и отстающие хромосомы (2–3) (рисунок, в), в анафазе II униваленты (1–2) (рисунок, д), тетрады с микроклетками. У пентаплоидного гибрида мейоз проходил с многочисленными нарушениями (напоминал картину, наблюдаемую у триплоидных гибридов). В результате вместо тетрад микроспор образовывались конгломераты, содержащие до 11 микроспор и микроклеток.

Наследование ДНК маркеров генома В и генов устойчивости к PVY и фитофторозу диплоидными и триплоидными гибридами 4x S. stoloniferum × 2x S. tuberosum

У опылителя – фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* IGC 10/1.21 ДНК-маркер генома В SolB₄₆₉, а также маркеры генов устойчивости к PVY и фитофторозу отсутствовали. Маркер генома В был выявлен у всех использованных в работе клонов *S. stoloniferum*, у всех проанализированных триплоидных гибридов и пентаплоидного гибрида. Также он был обнаружен у четырех выделенных межвидовых диплоидных гибридов, формирующих жизнеспособную пыльцу. ДНК мужски стерильного диплоидного гибрида оказалась низкого качества, в связи с чем ее адекватный анализ оказался невозможным. В табл. 2 представлены результаты анализа представленности маркеров генов устойчивости к PVY и фитофторозу у диплоидных межвидовых гибридов, несущих маркер генома В *S. stoloniferum*.

Т а б л и ц а 2. Интрогрессия ДНК-маркеров генома В и генов устойчивости к фитофторозу и PVY от *S. stoloniferum* к межвидовым гибридам на их основе (1 означает наличие маркера, 0 – его отсутствие)

Table 2. Introgression of DNA markers of genome B and genes of resistance to late blight and PVY from *S. stoloniferum* to interspecific hybrids on their base (1 – the presence of a marker, 0 – the absence)

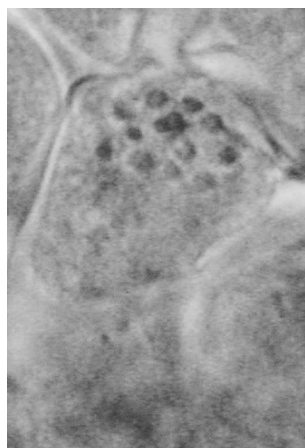
Гибриды, родительские формы Hybrids, parental forms	Маркер генома В Genome B marker SolB	Маркер гена Gene marker <i>Ryadg</i> RYSC3	Маркер гена Gene marker <i>Rysto</i> Yes 3-3A	Маркер гена Gene marker <i>Rpi-stol</i> 517/1519	Маркер гена Gene marker <i>Rpi-stol</i> 1521/518	Маркер гена Gene marker <i>Rl</i> R1	Маркер гена Gene marker <i>R3b</i> R3b
<i>S. tuberosum</i> IGC 10/1.21	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. stoloniferum</i> PI 205522.1	1	1	1	1	1	0	1
F1 2x/1	1	1	1	0	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI 205522.2	1	1	1	1	1	0	1
F1 2x/2	1	1	1	1	1	0	1
F1 3x – контроль	1	1	1	1	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI 205522.3	1	1	1	1	1	0	1
F1 5x	1	1	1	1	1	0	1
F1 3x – контроль	1	1	1	1	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI473534.1	1	1	1	0	1	0	1
F1 2x/3	1	1	1	0	1	0	1
<i>S. stoloniferum</i> PI473534.2	1	1	1	1	1	1	1
F1 2x/4	1	1	1	0	0	1	1
F1 3x – контроль	1	1	1	1	1	1	1

Маркеры генов устойчивости к PVY дикого вида наследовали все проанализированные диплоидные и триплоидные гибриды (расщепления по этим маркерам не наблюдалось). Также названные маркеры были представлены и у пентаплоидного гибрида.

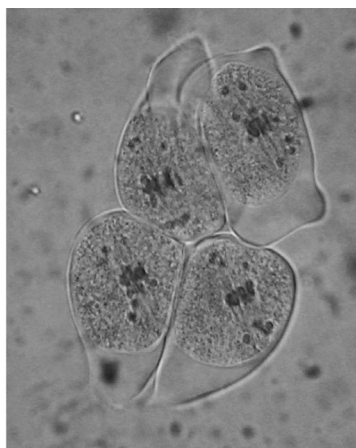
Маркеры гена *Rpi-stol* 517/1519 (в тех случаях, когда он имелся у родительского клона *S. stoloniferum*) и 1521/518 были представлены у всех триплоидных гибридов, т. е. расщепления по ним не наблюдалось. Оба эти маркера присутствовали и у пентаплоидного гибрида. У диплоидного межвидового гибрида 2x/1 (PI 205522.1 × IGC 10/1.21) не детектировался маркер 517/1519, но присутствовал маркер 1521/518, а у гибрида 2x/4 (PI473534.2 × IGC 10/1.21) произошла утрата обоих маркеров. Напротив, гибрид 2x/2 (PI 205522.2 × IGC 10/1.21) унаследовал от дикого вида оба маркера гена *Rpi-stol*, а гибрид 2x/3 (PI473534.1 × IGC 10/1.21) – маркер 1521/518 (второй маркер этого гена 517/1519 у родительского клона дикого вида не представлен).

Маркер гена *R3b* был выявлен у всех диплоидных и триплоидных гибридов, а также пентаплоидного гибрида. Маркер гена *Rl*, имеющийся у клона PI473534.2, присутствовал у всех происходящих от него триплоидных гибридов, а также у единственного диплоидного гибрида, происходящего от этого родительского клона.

Представленные результаты выделения диплоидных межвидовых гибридов среди гибридов от скрещивания ценных для селекции образцов дикого аллотетраплоидного вида *S. stoloniferum* и фертильного диплоидного клона *S. tuberosum* показали, что частота таких гибридов в потомстве этих образцов очень низкая. Так, в результате анализа жизнеспособности пыльцы 219 межвидовых гибридов образца *S. stoloniferum* PI 205522 выявлено только 2 диплоидных гибрида (0,9 %) (причем для одного из них необходимо проведение дополнительных исследований для подсчета числа хромосом). Несколько выше этот показатель был у PI473534: 2 диплоидных гибрида было выделено в результате анализа 28 гибридных семян (7,1 %). Судя по опубликованным данным [2; 4], *S. stoloniferum* и другие тетраплоидные виды при использовании их в скрещиваниях с диплоидными клонами *S. tuberosum* в качестве материнских форм могут образовывать диплоидные гибриды со значительно более высокой частотой (12–33 %). С одной стороны, в генетическом пуле *S. stoloniferum* могут быть образцы, которые редко образуют диплоидные гибриды: PI205522, а также, в некоторой степени, PI473534, можно рассматривать в качестве примеров таких образцов. С другой стороны, хорошо зарекомендовавший себя ранее подход, основанный на отборе фертильных семян (диплоидные гибриды, в отличие от триплоидных, способны формировать жизнеспособную пыльцу), применительно к некоторым образцам диких видов может оказаться неэффективным из-за мужской стерильности, обусловленной генетическим типом цитоплазмы. В частности, с цитоплазмой *S. stoloniferum* W/γ связывают мужскую сте-



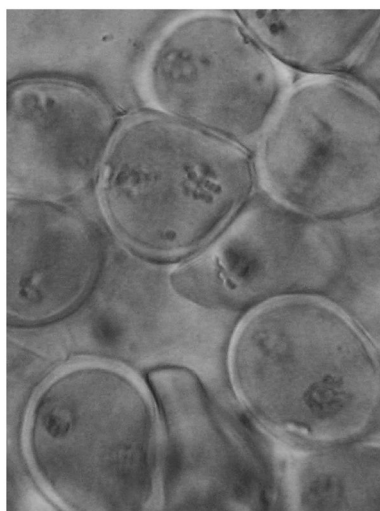
a



b



c



d

Мейоциты диплоидных гибридов, несущих В генотип дикого вида *S. stoloniferum*: *a* – наличие 12 хромосом в мейоците на стадии AI; *b* – преждевременное расхождение части хромосом в AI; *c* – отставание части хромосом при их расхождении в AI (две клетки слева) и расхождение хромосом без нарушений в AI (две клетки справа); *d* – нормальное расхождение хроматид в MII, в одной из клеток (в центре) наблюдается потеря одной из хромосом

Meiosis of diploid hybrids having gene B of wild species *S. stoloniferum*: *a* – 12 chromosomes in meiosis in stage AI; *b* – premature discrepancy of some of chromosomes in AI; *c* – lag of some of the chromosomes in AI (two cells to the left) and discrepancy of chromosomes without disorders in AI (two cells to the right); *d* – normal discrepancy of chromatids in MII, in one of the cells (in the center) it is observed that one of the chromosomes is lost

рильность сортов картофеля, происходящих от этого вида [11]. Примененный в настоящем исследовании альтернативный прием выделения диплоидных гибридов, основанный на детекции маркера генома В дикого вида, достаточно трудоемкий и позволяет выделять диплоидные гибриды, сохранившие лишь один из геномов дикого вида (геном А). Поэтому необходим поиск новых простых и информативных подходов выделения диплоидных семян в больших популяциях межвидовых гибридов с участием диких аллотетраплоидных видов картофеля.

Полученные нами ранее [2] диплоидные межвидовые гибриды на основе аллотетраплоидных диких видов картофеля имели геном А дикого вида (у них отсутствовал маркер генома В; данные не приводятся), что проявлялось в относительно высокой регулярности мейоза, мужской фертильности и хорошей скрещиваемости с диплоидными клонами *S. tuberosum*. В настоящем исследовании впервые удалось выделить диплоидные межвидовые гибриды, несущие геном В *S. stoloniferum*. Вероятность того, что отобранные генотипы являются гаплоидами дикого вида, образовавшимися в результате псевдогамии, очень низкая. Они заметно отличались от дикого родительского вида и триплоидных гибридов, имея более выраженные признаки культурного родительского вида. Для них было характерно относительно регулярное спаривание хромосом в мейозе материнских клеток пыльцы и, как результат, способность формировать жизнеспособную пыльцу (у четырех из пяти диплоидных гибридов), что сложно ожидать от гаплоидов. Аллотетраплоидный вид *S. stoloniferum* имеет дисомный тип наследования признаков: в мейозе образуются биваленты между гомологичными хромосомами соответствующих геномов. По мнению J. Dvorak [13], гомеологичная конъюгация хромосом супрессируется особыми генами, которые есть у аллотетраплоидных видов и отсутствуют у диплоидных видов. Выделенные нами диплоидные межвидовые гибриды имеют геном А, полученный от диплоидного клона культурного картофеля, у которого такой ген, очевидно, отсутствует. Это позволяет объяснить высокую частоту образования у них бивалентов между гомеологичными хромосомами геномов А и В. Факт наличия относительно регулярного мейоза у диплоидных гибридов с гомеологичными геномами (геномная формула АВ) позволяет рассчитывать на успешную интрогрессию в селекционный материал многообразия ценных генов дикого вида, локализованных на геноме В. Следует, однако иметь в виду, что при беккроссировании этих гибридов культурным картофелем возможно потребуются применение специальных приемов, повышающих эффективность гибридизации, так как их балансовое число эндосперма меньше двух. Первые попытки их гибридизации с фертильными диплоидными клонами *S. tuberosum* были неудачными.

Гибридное происхождение выделенных диплоидных семян подтверждает также факт отсутствия у некоторых из них отдельных маркеров гена *Rpi-stol*, которые были представлены у соответствующих триплоидных гибридов (табл. 2). Это могло произойти только в случае утраты одного из геномов дикого вида (генома А).

Предварительные результаты изучения особенностей интрогрессии маркеров генов устойчивости к РВУ и фитофторозу от дикого вида в диплоидные межвидовые гибриды позволили получить неожиданные результаты. Гены *Ryadg*, *R1*, *R3b* интрогрессированы в сорта картофеля от имеющих А-геном видов картофеля *S. andigenum* и *S. demissum*, а *Rysto* – от *S. stoloniferum* с помощью методов, предполагающих с большей вероятностью перенос генов, локализованных на геноме А. В настоящем исследовании маркеры названных генов передавались в диплоидные гибриды с геномом В дикого вида. Очевидно, получение межвидовых гибридов позволяет расширить возможности рекомбинации генов между гомеологичными хромосомами. Данные об относительно регулярном характере мейоза в материнских клетках пыльцы диплоидных межвидовых гибридов также свидетельствуют в пользу этого предположения.

Факт, что маркеры гена устойчивости к фитофторозу *Rpi-stol* (один или оба) не выявлены у диплоидных межвидовых гибридов, имеющих маркер генома В, говорит о том, что оба генома родительского клона дикого вида имели аллельные варианты этого гена. Следовательно, ценный для селекции ген высокой долговременной устойчивости к фитофторозу *Rpi-stol* может передаваться диплоидным межвидовым гибридам как с геномом А, так и геномом В дикого вида.

В качестве возможных механизмов образования диплоидных гибридов между аллотетраплоидными дикими видами картофеля и диплоидными клонами *S. tuberosum* рассматриваются: (1) образование диким видом дважды редуцированных гамет ($n = x = 12$), несущих предположи-

тельно один из геномов; (2) избирательная элиминация одного из геномов дикого вида у первоначально триплоидных межвидовых гибридов на ранних этапах эмбриогенеза [2]. Цитологический механизм образования моноплоидных яйцеклеток у тетраплоидных видов не известен. Тем не менее, именно этот механизм рассматривался нами как наиболее вероятный, так как все полученные ранее диплоидные межвидовые гибриды имели геном А дикого вида и хорошо скрещивались с диплоидными клонами *S. tuberosum* (2x, 2 EBN). **Вероятность образования диплоидных гибридов, несущих геном В дикого вида, с помощью этого механизма очень низкая из-за несбалансированности эндосперма гибридных семян при таком сочетании гамет.**

Согласно теории балансового числа эндосперма [14], каждому виду картофеля предписан специфический показатель (его EBN, эффективная ploидность), значение которого определяет поведение вида при межвидовой гибридизации. Соотношение EBN женского и мужского партнера по скрещиваниям должно быть в эндосперме 2 : 1, чтобы эндосперм, а следовательно, и семя развивалось нормально. Виды картофеля объединены по группам скрещивания: 2x (1 EBN), 2x (2 EBN), 4x (2 EBN), 4x (4 EBN) и 6x (4 EBN). Аллотетраплоидные (4x, 2 EBN) дикие виды картофеля не способны образовывать семена в скрещиваниях с сортами культурного картофеля *S. tuberosum* (4x, 4 EBN) **из-за различий в их эффективной ploидности. Однако их можно скрестить с диплоидами *S. tuberosum* (2x, 2 EBN) и многими диплоидными (2 EBN) видами картофеля с образованием триплоидных гибридов.**

В соответствии с этой теорией гипотетические моноплоидные яйцеклетки, несущие геном А дикого аллотетраплоидного вида, соответствуют по EBN мужским гаметам диплоидных клонов *S. tuberosum*. Поэтому возможно получение с их участием диплоидных межвидовых гибридов, имеющих 2 EBN, которые скрещиваются с диплоидными клонами *S. tuberosum*. Напротив, семязачки с яйцеклетками, несущими геном В дикого вида, не способны давать начало жизнеспособным семенам из-за несбалансированного развития эндосперма. Тот факт, что нам удалось получить диплоидные гибриды, несущие геном В дикого вида, с одной стороны, ставит под сомнение механизм образования диплоидных межвидовых гибридов за счет формирования моноплоидных яйцеклеток дикого вида. С другой стороны, можно предположить, что диплоидные гибриды могут быть получены вопреки правилу EBN. В пользу этого говорит низкая частота образования диплоидных гибридов с геномом В дикого вида в настоящем исследовании, а также получение нами пентаплоидного гибрида. Появление этого гибрида очевидно связано с оплодотворением нередуцированной яйцеклетки *S. stoloniferum* (4x) нормальной пылью диплоидного клона *S. tuberosum*. Соотношение EBN родителей при формировании такого гибридного семени 4 : 1, что должно было бы привести к остановке развития эндосперма. Тем не менее, получен не описанный ранее межвидовой гибрид, имеющий нередуцированный геном дикого вида (AABV) и один геном А культурного картофеля, который представляет интерес для селекции. Для вовлечения этого гибрида в селекцию необходимо решить проблему его беккроссирования культурным картофелем, так как он существенно отличается от обычных пентаплоидных гибридов, которые получают в результате беккроссирования культурным картофелем полиплоидных форм дикого вида или гибридов на его основе.

Принимая во внимание приведенные рассуждения, заслуживает серьезного рассмотрения второй возможный механизм образования диплоидных межвидовых гибридов – за счет избирательной элиминации одного из геномов дикого вида в процессе развития зародыша изначально триплоидных межвидовых гибридов. В литературе представлены примеры элиминации генома одного из родительских видов в процессе развития межвидовых гибридов [1]. Это явление используется в селекции для получения гаплоидов. В частности, дигаплоиды сортов картофеля получают путем их опыления специально созданными гаплопродюсерами *S. phureja*. Хотя считается, что дигаплоиды образуются преимущественно в результате псевдогамии, приведены доказательства, что они могут также формироваться благодаря элиминации генома гаплопродюсера в процессе развития гибридных зародышей [15]. Следует, однако, иметь в виду, что образование диплоидных межвидовых гибридов при опылении аллотетраплоидных видов картофеля пылью диплоидных клонов *S. tuberosum* – особый случай. В отличие от получения гаплоидов при их формировании происходит избирательная элиминация лишь одного из геномов (а не полного генома) одного из родительских видов (дикого аллотетраплоидного вида).

Заклучение. Таким образом, нами впервые выявлены диплоидные гибриды между аллотетраплоидным диким видом картофеля *S. stoloniferum* и фертильным диплоидным клоном *S. tuberosum*, которые сохранили геном В дикого вида. Несмотря на наличие у таких гибридов гомеологичных геномов (геномная формула АВ) они имели относительно регулярный мейоз в материнских клетках пыльцы. Это позволяет рассчитывать на успешную интрогрессию в селекционный материал многообразия ценных генов дикого вида, локализованных на геноме В. Из-за пониженного балансового числа эндосперма диплоидных межвидовых гибридов с геномом В, возможно, потребуется применение специальных приемов, повышающих эффективность гибридизации при их беккроссировании культурным картофелем. Получение гибридов с геномом В делает приоритетной версию о возможном механизме их формирования за счет избирательной элиминации одного из геномов дикого вида в процессе развития изначально триплоидных межвидовых гибридов.

При гибридизации *S. stoloniferum* с диплоидным клоном *S. tuberosum* получен не описанный ранее пентаплоидный межвидовой гибрид. Возможный механизм его образования – оплодотворение нередуцированной яйцеклетки дикого вида (4x) спермием нормальной ploidyности (x) *S. tuberosum*. Геномная формула гибрида ААВВА (сесквиплоид). Гибрид представляет интерес для селекции, так как он существенно отличается от обычных пентаплоидных гибридов, которые получают в результате беккроссирования культурным картофелем полиплоидных форм дикого вида или гибридов на его основе.

Благодарности. Работа выполнена благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б16Р-103).

Aknowledgements. This research has been supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grant Б16Р-103).

Список использованных источников

1. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding / K. Tonosaki [et al.] // *Breed. Sci.* – 2016. – Vol. 66, N 3. – P. 333–349. doi.org/10.1270/jsbbs.15114
2. Воронкова, Е. В. Диплоидные гибриды между аллотетраплоидными дикими видами картофеля *Solanum acaule* Bitt., *Solanum stoloniferum* Schltldl. и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / Е. В. Воронкова, В. М. Лисовская, А. П. Ермишин // *Генетика.* – 2007. – Т. 43, № 8. – С. 882–890.
3. Ермишин, А. П. Представленность специфических RAPD-локусов родительских видов у триплоидных и диплоидных гибридов между аллотетраплоидными видами картофеля и дигаплоидами *Solanum tuberosum* L. / А. П. Ермишин, Е. В. Воронкова // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2014. – Т. 58, № 2. – С. 97–103.
4. Ермишин, А. П. Генетические особенности аллотетраплоидных диких видов картофеля (*Solanum*) как объекта селекции / А. П. Ермишин // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2014. – № 1. – С. 23–31.
5. Гавриленко, Т. А. Межвидовая гибридизация картофеля: теоретические и прикладные аспекты / Т. А. Гавриленко, А. П. Ермишин // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2017. – Т. 21, № 1. – С. 16–29. doi 10.18699/VJ17.220
6. Представленность ДНК-маркеров генов устойчивости к фитофторозу и к PVY у образцов дикого аллотетраплоидного вида картофеля *Solanum stoloniferum* / В. А. Левый [и др.] // *Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2017. – № 2. – С. 46–54.
7. Hosaka, K. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections / K. Hosaka, R. Sanetomo // *Theor. Appl. Genet.* – 2012. – Vol. 125, N 6. – P. 1237–1251. doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4
8. Pallais, N. Research on the physiology of potato sexual seed production / N. Pallais, N. Fong, D. Berrios // *Innovative methods for propagating potatoes: CIP Rep. 28th Planning Conf., CIP, Lima, 1984.* – Lima, 1984. – P. 149–168.
9. Соколова, Е. А. Молекулярные маркеры генов устойчивости и геномов-доноров устойчивости картофеля к фитофторозу: методические указания / Е. А. Соколова, О. А. Фаина, Э. Е. Хавкин. – Москва, 2013. – 25 с.
10. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry^{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes / K. Kasai [et al.] // *Genome.* – 2000. – Vol. 43, N 1. – P. 1–8. doi.org/10.1139/gen-43-1-1
11. Song, Y.-S. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Rysto*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars / Y.-S. Song, A. Schwarzfischer // *Amer. J. Potato Res.* – 2008. – Vol. 85, N 2. – P. 159–170. doi.org/10.1007/s12230-008-9012-8
12. Wang, M. Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species: PhD-thesis / M. Wang. – Wageningen, Netherlands: Wageningen Universiteit, 2007. – P. 43–58.
13. Dvorak, J. Evidence for genetic suppression of heterogenetic chromosome pairing in polyploid species of *Solanum*, sect. *Petota* / J. Dvorak // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1983. – Vol. 25, N 5. – P. 530–539. doi.org/10.1139/g83-080
14. Hanneman, R. E. Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding / R. E. Hanneman Jr. // *Potato Res.* – 1999. – Vol. 42, N 2. – P. 283–312. doi.org/10.1007/bf02357859
15. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*-induced dihaploid potatoes / S. A. Clulow [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 1991. – Vol. 82, N 5. – P. 545–551. doi: 10.1007/BF00226789

References

1. Tonosaki K., Osabe K., Kawanabe T., Fujimoto R. The importance of reproductive barriers and the effect of allopolyploidization on crop breeding. *Breeding Science*, 2016, vol. 66, no. 3, pp. 333–349. doi.org/10.1270/jsbbs.15114
2. Voronkova E. V., Lisovskaja V. M., Yermishin A. P. Diploid hybrids between allotetraploid wild potato species *Solanum acaule* Bitt., *S. stoloniferum* Schltld. and dihaploids of *S. tuberosum* L. *Russian Journal of Genetics*, 2007, vol. 43, no. 8, pp. 882–889. doi.org/10.1134/s102279540708008x
3. Yermishin A. P., Voronkova E. V. Representability of the RAPD-loci specific for the parental species of triploid and diploid hybrids between allotetraploid potato species and dihaploids of *Solanum tuberosum* L. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2014, vol. 58, no. 2, pp. 97–103 (in Russian).
4. Yermishin A. P. Genetic peculiarities of wild allotetraploid potato (*Solanum*) species the as object of breeding. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2014, no. 1, pp. 23–31 (in Russian).
5. Gavrilenko T. A., Yermishin A. P. Interspecific hybridization of potatoes: theoretical and applied aspects. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2017, vol. 21, no. 1, pp. 16–29. doi.org/10.18699/vj17.220 (in Russian).
6. Levy A. V., Voronkova E. V., Polyukhovich Yu. V., Yermishin A. P. Representativeness of DNA-markers of late blight and PVY-resistance genes in accessions of wild allotetraploid potato species *Solanum stoloniferum*. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 2, pp. 46–54 (in Russian).
7. Hosaka K., Sanetomo R. Development of a rapid identification method for potato cytoplasm and its use for evaluating Japanese collections. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, vol. 125, no. 6, pp. 1237–1251. doi.org/10.1007/s00122-012-1909-4
8. Pallais N., Fong N., Berrios D. Research on the physiology of potato sexual seed production. *Innovative methods for propagating potatoes. CIP Rep. 28th Planning Conf. CIP, Lima, 1984*. Lima, 1984, pp. 149–168.
9. Sokolova E. A., Fadina O. A., Khavkin E. E. *Molecular markers of resistance genes and genomes that are donors of resistance of potatoes to late blight*. Moscow, 2013. 25 p. (in Russian).
10. Kasai K., Morikawa Y., Sorri V. A., Valkonen J. P. T., Gebhardt C., Watanabe K. N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry^{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 2000, vol. 43, no. 1, pp. 1–8. doi.org/10.1139/gen-43-1-1
11. Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (Rysto) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*, 2008, vol. 85, no. 2, pp. 159–170. doi.org/10.1007/s12230-008-9012-8
12. Wang M. *Diversity and evolution of resistance genes in tuber-bearing Solanum species*. PhD-thesis. Wageningen, Netherlands: Wageningen Universiteit, 2007, pp. 43–58.
13. Dvorak J. Evidence for genetic suppression of heterogenetic chromosome pairing in polyploid species of *Solanum*, sect. *Petota*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1983, vol. 25, no. 5, pp. 530–539. doi.org/10.1139/g83-080
14. Hanneman R. E. Jr. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. *Potato Research*, 1999, vol. 42, no. 2, pp. 283–312. doi.org/10.1007/bf02357859
15. Clulow S. A., Wilkinson M. J., Waugh R., Baird E., De Maine M. J., Powell W. Cytological and molecular observations on *Solanum phureja*-induced dihaploid potatoes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, vol. 82, no. 5, pp. 545–551. doi.org/10.1007/bf00226789

Информация об авторах

Ермишин Александр Петрович – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Ermishin@igc.by.

Левый Александр Васильевич – аспирант. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: A30413@mail.ru.

Воронкова Елена Васильевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Полюхович Юлия Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Лушка Виктория Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Luksha@igc.by.

Агеева Анастасия Сергеевна – студент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nastya_ageeva95@mail.ru.

Information about the authors

Yermishin Alexander Petrovich – D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Ermishin@igc.by.

Levy Alexander Vasilievich – Postgraduate student. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A30413@mail.ru.

Voronkova Elena Vasilievna – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Voronkova@igc.by.

Polyukhovich Yulia Vladimirovna – Ph. D. (Biology), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yuliy1612@yandex.ru.

Luksha Victoria Ivanovna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Luksha@igc.by.

Ageeva Anastasiya Sergeevna – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nastya_ageeva95@mail.ru.

Член-корреспондент Ж. А. Рупасова¹, Н. Б. Павловский¹, Т. И. Василевская¹,
Н. Б. Криницкая¹, А. Г. Павловская¹, Ю. М. Пинчукова², академик И. И. Лиштван³

¹Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный экономический университет, Минск, Республика Беларусь

³Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ ПОГОДНЫХ УСЛОВИЙ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ ХАРАКТЕРИСТИК БИОХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПЛОДОВ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ *OXYCOCCUS MACROCARPUS* (AIT.) PERS. В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Аннотация. Приведены результаты сравнительного исследования изменчивости биохимического состава плодов 6 новых интродуцированных в Беларуси сортов: *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. – Stevens, Bain Favorit, Hiliston, Holistar Red, Stankovich и WSU 108 в контрастные по режиму увлажнения сезоны. Установлено, что наименее выраженными межсезонными различиями характеризовались параметры накопления в плодах сухих веществ, аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, а также общее количество антоциановых пигментов и биофлавоноидов в целом, тогда как наиболее значительными – показатель сахарокислотного индекса и содержание в них растворимых сахаров, пектиновых веществ, лейкоантоцианов и флавонолов. Показано, что в таксономическом ряду клюквы крупноплодной наибольшей устойчивостью биохимического состава плодов к погодным факторам характеризовался сорт Stankovich, тогда как наименьшей – сорта Bain Favorit и особенно Hiliston.

Ключевые слова: клюква крупноплодная, сорт, плоды, биохимический состав, органические кислоты, углеводы, биофлавоноиды, коэффициент вариации

Для цитирования: Влияние погодных условий на изменчивость характеристик биохимического состава плодов интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 90–96.

Corresponding Member Zhanna A. Rupasova¹, Nikolay B. Pavlovski¹, Tamara I. Vasilevskaya¹,
Natalia B. Krinitskaya¹, Alla G. Pavlovskaya¹, Yulia M. Pinchukova², Academician Ivan I. Lishtvan³

¹Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Economical University, Minsk, Republic of Belarus

³Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

INFLUENCE OF WEATHER CONDITIONS ON THE VARIABILITY OF CHARACTERISTICS OF THE BIOCHEMICAL COMPOSITION OF FRUITS OF INTRODUCED VARIETIES *OXYCOCCUS MACROCARPUS* (AIT.) PERS. IN THE CONDITIONS OF BELARUS

Abstract. The article presents the results of a comparative study of the variability of the biochemical composition of the fruits of six cultivars introduced in Belarus: *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. – Stevens, Bain Favorit, Hiliston, Holistar Red, Stankovic and WSU 108 during contrast moistening seasons. It has been established that the least pronounced inter-sectional differences are characterized by the parameters of accumulation in the fruits of dry substances, ascorbic and hydroxycinnamic acids, as well as the total amount of antoniated pigments and bioflavonoids in general, while of most significance are the sugar-dependent concentration and the content of soluble sugars, pectins, leucoanthocyanins and flavonols. It is shown that in the taxonomic series of large-fruited cranberries the Stankovich cultivar was characterized by the greatest resistance of the biochemical composition of the fruits to weather factors, while the lowest cultivar was Bain Favorit and especially Hiliston.

Keywords: large-cranberry, cultivar, fruits, biochemical composition, organic acids, carbohydrates, bioflavonoids, coefficient of variation

For citation: Rupasova Zh. A., Pavlovski N. B., Vasilevskaya T. I., Krinitskaya N. B., Pavlovskaya A. G., Pinchukova Yu. M., Lishtvan I. I. Influence of weather conditions on the variability of characteristics of the biochemical composition of fruits of introduced varieties *Oxycoccus macrocarpus* (Ait.) Pers. in the conditions of Belarus. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* = *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 90–96 (in Russian).

Введение. Важнейшим аспектом интродукционных исследований, связанных с сортоизучением малораспространенных культур плодовоговодства, является сравнительная оценка биохимического состава плодов в многолетнем цикле наблюдений, дающая представление не только о его

генотипических особенностях, но и о степени зависимости содержания действующих веществ от гидротермического режима сезона, в значительной мере определяющей их органолептические свойства. Рассмотрение данного аспекта ответной реакции новых, ранее не изучавшихся интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus* из коллекционного фонда Центрального ботанического сада НАН Беларуси, на комплексное воздействие метеорологических факторов представляется нам весьма актуальным, поскольку крайне неустойчивый характер погодных условий в период вегетации растений и созревания их плодов, свойственный Белорусскому региону, может заметно повлиять на темпы накопления тех или иных соединений и тем самым оказать корректирующее действие на питательную и витаминную ценность ягодной продукции. Изучение же данного вопроса позволит выявить сорта клюквы крупноплодной, наиболее перспективные не только по вкусовым свойствам плодов, обусловленным особенностями их биохимического состава, но и по степени устойчивости его отдельных компонентов к комплексному воздействию метеорологических факторов в районе интродукции.

Цель работы – определить степень зависимости содержания действующих веществ в плодах новых интродуцированных сортов клюквы крупноплодной от погодных условий вегетационного периода.

Материалы и методы исследований. Исследования выполнены в контрастные по режиму увлажнения сезоны 2015 и 2016 гг. на экспериментальном участке лаборатории интродукции и технологии ягодных растений ЦБС НАН Беларуси (Ганцевичский р-н Брестской обл.), находящемся на территории центральной агроклиматической зоны Беларуси в районе распространения легких песчаных дерново-подзолистых почв и осушенных верховых торфяников. Вегетационный период первого года наблюдений в целом характеризовался умеренным температурным фоном при существенном недостатке влаги, тогда как второй сезон отличался более жаркой погодой при достаточном и временами избыточном выпадении атмосферных осадков. Это указывает на то, что созревание плодов клюквы во втором сезоне протекало в более комфортных, чем годом ранее, погодных условиях.

В качестве объектов исследований были использованы плоды 6 сортов *Oxycoccus macrocarpus* – *Stevens*, *Bain Favorit*, *Hiliston*, *Holistar Red*, *Stankovich*, *WSU 108*.

Сравнительную оценку их биохимического состава осуществляли по широкому спектру показателей, относящихся к разным классам действующих веществ. В свежих усредненных пробах зрелых плодов определяли содержание: сухих веществ – по ГОСТ 8756.2–82 [1]; аскорбиновой кислоты (витамина С) – стандартным индофенольным методом [2]; титруемых кислот (общей кислотности) – объемным методом [2]. В высушенных при температуре 60 °С пробах растительного материала определяли содержание: гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую) – спектрофотометрическим методом [3]; растворимых сахаров – ускоренным полумикрометодом [4]; пектиновых веществ – кальциево-пектатным методом [2]; суммы антоциановых пигментов – по методу T. Swain, W. E. Hillis [5] (с построением градуировочной кривой по кристаллическому цианидину, полученному из плодов аронии черноплодной и очищенному по методике Ю. Г. Скориковой и Э. А. Шафтан [6]); собственно антоцианов и суммы катехинов (с использованием ванилинового реактива) – фотоэлектроколориметрическим методом [2; 7]; суммы флавонолов (в пересчете на рутин) – спектрофотометрическим методом [2]; дубильных веществ – титрометрическим методом Левенталя [8]. Все аналитические определения выполнены в 3-кратной биологической повторности. Данные статистически обработаны с использованием программы Excel.

Результаты и их обсуждение. Различия погодных условий периода созревания и формирования биохимического состава плодов исследуемых сортов *Oxycoccus macrocarpus* заметно отразились на темпах накопления в них отдельных соединений, что наглядно иллюстрируют усредненные в сортовом ряду, а следовательно, интегрирующие в себе генотипическую составляющую, количественные характеристики биохимического состава плодов в годы наблюдений, приведенные в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Усредненные в таксономическом ряду новых интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus* параметры накопления действующих веществ в сухой массе плодов в годы наблюденийT a b l e 1. Averaged in the taxonomic series of new introduced varieties *Oxycoccus macrocarpus* parameters of accumulation of active substances in the dry weight of fruits in the years of observation

Показатель Index	2015 г.	2016 г.	Межсезонные различия, % Off-season differences, % (2016/2015)
Сухие вещества, %	13,5	13,0	–
Свободные органические кислоты, %	22,8	24,6	+7,9
Аскорбиновая кислота, мг%	438,6	488,7	+11,4
Гидроксикоричные кислоты, мг%	621,9	683,7	+9,9
Растворимые сахара, %	28,7	37,4	+30,3
Сахарокислотный индекс	1,3	1,5	+15,4
Пектиновые вещества, %	7,9	5,3	–32,9
Собственно антоцианы, мг%	2013,5	2520,0	+25,2
Лейкоантоцианы, мг%	5190,7	4069,9	–21,6
Сумма антоциановых пигментов, мг%	7204,2	6589,9	–8,5
Катехины, мг%	1473,7	1740,4	+18,1
Флавонолы, мг%	927,2	1501,6	+62,0
Сумма биофлавоноидов, мг%	9605,1	9831,9	–
Дубильные вещества, %	3,04	2,56	–15,8

П р и м е ч а н и е: прочерк означает отсутствие статистически значимых по *t*-критерию Стьюдента различий при $p < 0,05$.

N o t e: the dash shows that the Student differences statistically important in the *t*-criterion at $p < 0.05$ are absent.

Нетрудно убедиться в заметных межсезонных различиях приведенных показателей, обусловленных влиянием гидротермического режима вегетационного периода на содержание в плодах отдельных соединений. Так, более благоприятное сочетание погодных условий во втором сезоне способствовало активизации накопления в них, по сравнению с предыдущим засушливым сезоном, на 8–62 % свободных органических, аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, растворимых сахаров, собственно антоцианов, катехинов и флавонолов и увеличению на 15 % показателя сахарокислотного индекса, свидетельствующего об улучшении их органолептических свойств. При этом позитивные изменения в биохимическом составе плодов клюквы сопровождалось снижением на 9–33 % содержания в них сухих, пектиновых и дубильных веществ, а также лейкоантоцианов. Вместе с тем отмеченные сдвиги в составе Р-витаминного комплекса во второй год наблюдений не оказали достоверного влияния на общее количество биофлавоноидов в плодах клюквы.

С целью выявления степени зависимости анализируемых показателей от погодных условий вегетационного периода было проведено сравнение в таксономическом ряду уровней их изменчивости в двухлетнем цикле наблюдений. При этом мы ориентировались на значения коэффициентов вариации (V , %) рассматриваемых признаков, указывающие на уровень их зависимости от метеорологических факторов, т. е. чем выше коэффициент вариации, тем сильнее эта зависимость и наоборот. В данных исследованиях мы ориентировались на шкалу Г. Н. Зайцева [9], предусматривающую распределение признаков на 5 групп: с очень низким уровнем изменчивости ($V < 7$ %), низким ($V = 8–12$ %), средним ($V = 13–20$ %), повышенным ($V = 21–40$ %) и очень высоким ($V > 41$ %).

Сравнительный анализ данных табл. 2 выявил весьма широкие диапазоны изменений в двухлетнем цикле наблюдений коэффициентов вариации количественных характеристик биохимического состава плодов клюквы крупноплодной. Это свидетельствовало о разном уровне их зависимости от гидротермического режима сезона и позволяло обозначить исследуемые признаки, а также сорта интродуцента, обладающие наибольшей и соответственно наименьшей степенью данной зависимости.

Т а б л и ц а 2. Средние в двухлетнем цикле наблюдений значения коэффициентов вариации V , % количественных показателей биохимического состава плодов новых интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus*

Table 2. Average values of coefficients of variation V , % of quantitative indicators of the biochemical composition of fruits of the new introduced varieties *Oxycoccus macrocarpus* in the biennial cycle of observations

Показатель Index	Сорт Variety					
	<i>Stevens</i>	<i>Bain Favorit</i>	<i>Hiliston</i>	<i>Holistar Red</i>	<i>Stankovich</i>	<i>WSU 108</i>
Сухие вещества	1,5	1,1	5,2	2,2	8,8	1,1
Свободные органические кислоты	13,9	3,4	27,8	3,4	10,9	4,9
Аскорбиновая кислота	20,8	2,7	30,2	7,4	14,7	4,1
Гидроксикоричные кислоты	9,9	3,8	11,4	10,4	11,7	10,9
Растворимые сахара	29,2	23,4	11,0	13,1	9,4	25,4
Сахарокислотный индекс	15,7	17,0	13,7	10,1	18,9	30,3
Пектиновые вещества	32,1	30,1	56,1	36,2	10,1	20,2
Собственно антоцианы	19,8	33,6	24,7	4,1	1,3	13,8
Лейкоантоцианы	15,8	6,3	33,1	24,0	22,3	10,4
Сумма антоциановых пигментов	3,9	16,0	14,6	14,4	16,2	2,3
Катехины	8,9	37,0	5,7	6,0	8,5	31,0
Флавонолы	21,0	43,7	21,7	48,3	32,8	33,8
Биофлавоноиды	1,4	23,1	8,4	5,9	6,2	7,9
Дубильные вещества	5,9	4,7	17,5	17,3	18,2	8,4
Среднее	14,3	17,6	20,1	14,5	13,6	14,6

Как следует из данных табл. 3, изменчивость большинства показателей биохимического состава плодов *Oxycoccus macrocarpus* в двухлетнем цикле наблюдений в значительной мере определялась генотипом растений. Так, на долю наиболее устойчивых признаков с очень низким уровнем изменчивости приходилось от 14 % у сортов *Hiliston* и *Stankovich* до 43 % у сортов *Bain Favorit* и *Holistar Red*. Для низкого уровня изменчивости было показано полное отсутствие признаков у сорта *Bain Favorit*, тогда как у сорта *Stankovich* их доля возрастала до 43 %. Менее контрастная картина сортовых различий наблюдалась для характеристик биохимического состава плодов со средним уровнем изменчивости – от 14 % у сортов *Bain Favorit* и *WSU 108* до 29 % у сортов *Stevens* и *Stankovich*. Доля показателей с повышенным уровнем изменчивости варьировалась в сортовом ряду от 14 % у сортов *Holistar Red* и *Stankovich* до 36 % у сортов *Bain Favorit* и *Hiliston*. Что касается показателей с очень высоким уровнем изменчивости, то их незначительная доля (не более 7 %) отмечена лишь у трех сортов – *Bain Favorit*, *Hiliston* и *Holistar Red*, тогда как в остальных случаях их не выявлено вовсе.

Т а б л и ц а 3. Относительная доля показателей биохимического состава плодов новых интродуцированных сортов *Oxycoccus macrocarpus* с разным уровнем изменчивости в двухлетнем цикле наблюдений, %

Table 3. Relative share of biochemical composition of fruits of new introduced varieties *Oxycoccus macrocarpus* with different levels of variability in a two-year observation cycle, %

Уровень изменчивости (V , %) Variability level (V , %)	Сорт Variety					
	<i>Stevens</i>	<i>Bain Favorit</i>	<i>Hiliston</i>	<i>Holistar Red</i>	<i>Stankovich</i>	<i>WSU 108</i>
Очень низкий (<7)	29	43	14	43	14	28
Низкий (8–12)	14	0	21	14	43	29
Средний (13–20)	29	14	22	22	29	14
Повышенный (21–40)	28	36	36	14	14	29
Очень высокий (>41)	0	7	7	7	0	0

Вместе с тем, как следует из данных табл. 2, интегральный уровень изменчивости биохимического состава плодов в двухлетнем цикле наблюдений, оцениваемый по средневзвешенным

значениям варибельности совокупности анализируемых признаков, в таксономическом ряду *Oxycoccus macrocarpus* оказался наиболее высоким у сортов *Bain Favorit* и особенно *Hiliston*, наиболее низким – у сорта *Stankovich*. Это указывало на то, что наибольшей устойчивостью биохимического состава плодов к погодным факторам характеризовался сорт *Stankovich*, тогда как наименьшей – сорта *Bain Favorit* и особенно *Hiliston*.

Заметим, что в годы наблюдений у исследуемых сортов клюквы уровень варибельности конкретного признака, как правило, не сохранял соответствие той или иной области принятой градации, что однозначно указывало на его выраженную зависимость от гидротермического режима сезона. В связи с этим для выявления степени данной зависимости представлялось целесообразным ориентироваться на усредненные в таксономическом ряду и двухлетнем цикле наблюдений значения коэффициентов вариации исследуемых характеристик биохимического состава плодов, приведенные в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Средние для таксономического ряда *Oxycoccus macrocarpus* в двухлетнем цикле наблюдений значения коэффициентов вариации показателей биохимического состава плодов и их позиции в ряду усиления степени зависимости от абиотических факторов

Table 4. Mean for the taxonomic series *Oxycoccus macrocarpus* in a biennial cycle of observations, the values of the coefficients of variation in the indicators of the biochemical composition of fruits and their position in the series of intensification of the degree of dependence on abiotic factors

Показатель Index	Уровень изменчивости (V, %) Variability level (V, %)	Позиция показателя в ряду усиления степени зависимости от абиотических факторов Dependence of sugar concentration and the content of soluble sugars on abiotic factors
Сухие вещества	3,3	1
Свободные органические кислоты	10,7	4
Аскорбиновая кислота	13,3	7
Гидроксикоричные кислоты	9,7	3
Растворимые сахара	18,6	11
Сахарокислотный индекс	17,6	10
Пектиновые вещества	30,8	13
Собственно антоцианы	16,2	8
Лейкоантоцианы	18,7	12
Сумма антоциановых пигментов	11,2	5
Катехины	16,3	9
Флавонолы	33,6	14
Биофлавоноиды	8,8	2
Дубильные вещества	12,0	6

Анализ этих данных показал, что наименее выразительными (в пределах очень низкого уровня изменчивости) межсезонные различия оказались лишь в единичном случае – для содержания в плодах сухих веществ. Низким уровнем изменчивости по годам характеризовались параметры накопления в них свободных органических и гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, а также суммарные показатели накопления антоциановых пигментов и биофлавоноидов. При этом для содержания в плодах аскорбиновой кислоты, растворимых сахаров, собственно антоцианов, лейкоантоцианов, катехинов, а также показателя сахарокислотного индекса был показан средний уровень изменчивости в двухлетнем цикле наблюдений, и лишь в двух случаях – для содержания пектиновых веществ и флавонолов – повышенный. Довольно близкая этой картина изменчивости во временном ряду характеристик биохимического состава плодов клюквы крупноплодной была получена нами в более ранних исследованиях в данном регионе с другим набором сортов [10], что, очевидно, является видовой особенностью ответной реакции растений на изменение погодных условий вегетационного периода.

Для выявления последовательности анализируемых признаков в порядке возрастания уровня данной изменчивости, указывающего на усиление их зависимости от гидротермического режима сезона, были определены позиции каждого из них в соответствии с увеличением значений

коэффициентов вариации, представленные в табл. 4. Если исходить из посыла, что первые 5 позиций в приведенном ряду занимают признаки, обладающие наименьшим, а последние 5 позиций занимают признаки с наибольшим уровнем зависимости от абиотических факторов, то из данных табл. 4 следует, что наименее выраженные межсезонные различия у клюквы крупноплодной установлены для содержания в плодах сухих веществ, аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, а также общего количества антоциановых пигментов и биофлавоноидов в целом, тогда как наиболее значительные – для содержания в них растворимых сахаров, пектиновых веществ, лейкоантоцианов и флавонолов, а также показателя сахарокислотного индекса.

Заключение. Сравнительное исследование биохимического состава плодов 6 новых интродуцированных в Беларуси сортов *Oxycoccus macrocarpus* – *Stevens*, *Bain Favorit*, *Hiliston*, *Holistar Red*, *Stankovich*, *WSU 108*) по 14 параметрам в контрастные по режиму увлажнения сезоны 2015 и 2016 гг. показало, что благоприятное сочетание погодных условий во втором сезоне способствовало активизации накопления в них, по сравнению с предыдущим засушливым сезоном, на 8–62 % свободных органических, аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, растворимых сахаров, собственно антоцианов, катехинов и флавонолов и увеличению на 15 % показателя сахарокислотного индекса, свидетельствующего об улучшении их органолептических свойств. При этом позитивные изменения в биохимическом составе плодов клюквы сопровождалось снижением на 9–33 % содержания в них сухих, пектиновых и дубильных веществ, а также лейкоантоцианов.

В результате сравнительного исследования уровней варибельности показателей биохимического состава плодов клюквы в двухлетнем цикле наблюдений установлено, что наименее выраженными межсезонными различиями характеризовались параметры накопления в плодах сухих веществ, аскорбиновой и гидроксикоричных кислот, а также общее количество антоциановых пигментов и биофлавоноидов в целом, тогда как наиболее значительными – показатель сахарокислотного индекса и содержание в них растворимых сахаров, пектиновых веществ, лейкоантоцианов и флавонолов.

В таксономическом ряду клюквы крупноплодной наибольшая устойчивость биохимического состава плодов к погодным факторам установлена у сорта *Stankovich*, тогда как наименьшая – у сортов *Bain Favorit* и особенно *Hiliston*.

Список использованных источников

1. Методы определения сухих веществ: ГОСТ 8756.2–82. – Введ. 01.01.1983. – Москва: Изд-во стандартов, 1982. – 5 с.
2. Методы биохимического исследования растений / под ред. А. И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Ленинград, 1987. – 430 с.
3. Марсов, Н. Г. Фитохимическое изучение и биологическая активность брусники, клюквы и черники: дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.02 / Н. Г. Марсов. – Пермь, 2006. – 200 с.
4. Плешков, Б. П. Практикум по биохимии растений / Б. П. Плешков. – Москва: Колос, 1985. – С. 110–112.
5. Swain, T. The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents / T. Swain, W. Hillis // *J. Sci. Food Agric.* – 1959. – Vol. 10, N 1. – P. 63–68. doi.org/10.1002/jsfa.2740100110
6. Скорикова, Ю. Г. Методика определения антоцианов в плодах и ягодах / Ю. Г. Скорикова, Э. А. Шафтан // Тр. 3-го Всесоюз. семинара по биологически активным (лечебным) веществам плодов и ягод. – Свердловск, 1968. – С. 451–461.
7. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной / В. Ю. Андреев [и др.] // *Фармация*. – 2013. – № 3. – С. 19–21.
8. Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье // Государственная фармакопея СССР. – Москва: Медицина, 1987. – Вып. 1: Общие методы анализа. – С. 286–287.
9. Зайцев, Г. Н. Методика биометрических расчетов: Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г. Н. Зайцев. – Москва: Наука, 1973. – 256 с.
10. Формирование биохимического состава плодов видов семейства Ericaceae (Вересковые) при интродукции в условиях Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]; под ред. акад. В. И. Парфенова. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 307 с.

References

1. State Standard 8756.2-82. *Methods for determination of dry substances*. Moscow, 1982. 5 p. (in Russian).
2. Yermakov A. I. (ed.). *Methods of biochemical research of plants*. 3d ed. Leningrad, Agropromizdat Publ., 1987. 430 p. (in Russian).

3. Marsov N. G. *Phytochemical study and biological activity of cranberries, cranberries and blueberries*: PhD in Pharmaceutical sciences. Perm, 2006. 200 p. (in Russian).
4. Pleshkov B. P. *Practical work on plant biochemistry*. Moscow, Kolos Publ., 1985, pp. 110–112 (in Russian).
5. Swain T., Hillis W. The phenolic constituents of *Prunus Domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1959, vol. 10, no. 1, pp. 63–68. doi.org/10.1002/jsfa.2740100110
6. Skorikova Yu. G., Shaftan E. A. Method for the determination of anthocyanins in fruits and berries. *Trudy 3-go Vsesoyuznogo seminaru po biologicheski aktivnym (lechebnym) veshchestvam plodov i yagod* [Proceedings of the 3rd All-Union Seminar on Biologically Active (Medicinal) Substances of Fruits and Berries], Sverdlovsk, 1968, pp. 451–461 (in Russian).
7. Andreyev V. Yu., Kalinkina G. I., Kolomiyets N. E., Isaykina N. V. Method for the determination of anthocyanins in the fruit of chokeberry aronia. *Farmaciya = Pharmacy*, 2013, no. 3, pp. 19–21 (in Russian).
8. Determination of the content of tannins in medicinal plant raw materials. *State Pharmacopoeia of the USSR. Vol. 1: General methods of analysis*. Moscow, Medicine Publ., 1987, pp. 286–287 (in Russian).
9. Zaytsev G. N. *The method of biometric calculations. Mathematical statistics in experimental botany*. Moscow, Nauka Publ., 1973. 256 p. (in Russian).
10. Rupasova Zh. A., Reshetnikov V. N., Vasilevskaya T. I., Yakovlev A. P., Pavlovski N. B., Parfenov V. I., ed. *Formation of the biochemical composition of the fruits of the Ericaceae family (Heathers) when introduced in Belarus*. Minsk, Belarusskaya navuka Publ., 2011. 307 p. (in Russian).

Информация об авторах

Рупасова Жанна Александровна – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by.

Павловский Николай Болеславович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavlovskiy@tut.by.

Василевская Тамара Ивановна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: T.Vasileuskaya@cbg.org.by.

Криницкая Наталья Болеславовна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: T.Vasileuskaya@cbg.org.by.

Павловская Алла Генриховна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2В, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pavlovskiy@tut.by.

Пинчукова Юлия Михайловна – канд. техн. наук, доцент. Белорусский государственный экономический университет (ул. Свердлова, 7, 220000, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pinchukova@gmail.com.

Литшван Иван Иванович – академик, д-р техн. наук, профессор, главный научный сотрудник. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Скорины, 10, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gntpecology@mail.ru.

Information about the authors

Rupasova Zhanna Aleksandrovna – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: J.Rupasova@cbg.org.by.

Pavlovski Nikolay Boleslavovich – Ph. D. (Biology), Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavlovskiy@tut.by.

Vasilevskaya Tamara Ivanovna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: T.Vasileuskaya@cbg.org.by.

Krinitckaya Natalia Boleslavovna – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: T.Vasileuskaya@cbg.org.by.

Pavlovskaya Alla Genrihovna – Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavlovskiy@tut.by.

Pinchukova Yulia Mihailovna – Ph. D. (Engineering), Assistant Professor. Belarusian State Economical University (7, Sverdlov Str., 220000, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pinchukova@gmail.com.

Lishtvan Ivan Ivanovich – Academician, D. Sc. (Engineering), Chief researcher. Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, F. Skoryna Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gntpecology@mail.ru.

ISSN 1561-8323 (print)

УДК 577.21:631.524.86:632.4:633.111

Поступило в редакцию 04.09.2017

Received 04.09.2017

Т. В. Долматович¹, А. А. Булойчик¹, академик С. И. Гриб²¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь²Научно-практический центр Национальной академии наук по земледелию, Жодино, Республика Беларусь**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ, СТЕБЛЕВОЙ
И ЖЕЛТОЙ РЖАВЧИНЕ В СОРТАХ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ
(*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Аннотация. С помощью подобранной коллекции молекулярно-генетических маркеров к генам устойчивости к бурой, стеблевой и желтой ржавчине: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31/Yr9*, *Lr34/Yr18/Pm38*, *Lr35/Sr39*, *Lr37/Sr38/Yr17*, *Sr2/Yr30*, *Sr22*, *Sr26*, *Sr1RS^{Amigo}*, *Sr36*, *Sr45*, *Yr10*, *Yr26* осуществлен поиск доноров устойчивости среди 23 сортов яровой мягкой пшеницы, внесенных в Государственный реестр Республики Беларусь в 2016 г. и 46 сортов и линий из коллекционного питомника НПЦ НАН Беларуси по земледелию. В результате в сортообразцах яровой пшеницы идентифицированы гены устойчивости: *Lr1*, *Lr10*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57*, *Lr37/Sr38/Yr17*, *Sr1RS^{Amigo}* и *Yr10*. Выделены сортообразцы яровой пшеницы с комплексной устойчивостью к ржавчинным заболеваниям.

Ключевые слова: яровая пшеница, гены устойчивости, ржавчинные болезни

Для цитирования: Долматович, Т. В. Идентификация генов устойчивости к бурой, стеблевой и желтой ржавчине в сортах яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) / Т. В. Долматович, А. А. Булойчик, С. И. Гриб // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 97–102.

Tatiana V. Dolmatovich¹, Andrei A. Buloichik¹, Academician Stanislav I. Grib²¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus²Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming, Zhodino, Republic of Belarus**IDENTIFICATION OF GENES OF RESISTANCE TO BROWN, STEM AND YELLOW RUST IN SPRING SOFT
WHEAT VARIETIES (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Abstract. With the help of a selected collection of molecular genetic markers for resistance to brown, stem and yellow rust genes: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31/Yr9*, *Lr34/Yr18/Pm38*, *Lr35/Sr39*, *Lr37/Sr38/Yr17*, *Sr2/Yr30*, *Sr22*, *Sr26*, *Sr1RS^{Amigo}*, *Sr36*, *Sr45*, *Yr10*, *Yr26*, a search was made for resistance donors among 23 varieties of spring soft wheat introduced into the State Register of the Republic of Belarus in 2016 and 46 varieties and lines from the collection nursery “Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming”. As a result, resistance genes were identified in spring wheat varieties: *Lr1*, *Lr10*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57*, *Lr37/Sr38/Yr17*, *Sr1RS^{Amigo}* and *Yr10*. Selected varieties of spring wheat with complex resistance to rusty diseases are identified.

Keywords: spring wheat, resistance genes, rust diseases

For citation: Dolmatovich T. V., Buloichik A. A., Grib S. I. Identification of genes of resistance to brown, stem and yellow rust in spring soft wheat varieties (*Triticum aestivum* L.). *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 97–102 (in Russian).

Введение. Пшеница подвержена воздействию большого комплекса фитопатогенов, среди которых возбудители бурой (*Puccinia triticina* Erikss.), стеблевой (*P. graminis* f. *tritici* Erikss. and Henning) и желтой (*P. striiformis* f. *tritici* Erikss.) ржавчины, занимающие особое место. По данным ряда исследований, потери урожая от этих заболеваний в годы сильных эпифитотий могут достигать 50–70 %, при этом ухудшается качество зерна [1]. В связи с этим создание сортов пшеницы с комплексной устойчивостью к ржавчинным заболеваниям остается актуальной задачей для практической селекции. Для защиты сортов активно привлекаются как эффективные пшеничные гены устойчивости, так и интрогрессивные, локализованные в чужеродных транслокациях. Их аккумуляция в одном генотипе на основе высокопродуктивных сортов позволит предотвратить эпифитотийные вспышки заболеваний.

Применение молекулярных маркеров при пирамидировании необходимых генов устойчивости позволяет идентифицировать генотипы, содержащие комбинации генов на более ранних стадиях, что ускоряет и повышает эффективность селекционного процесса. Идентификация генотипов с помощью молекулярно-генетических маркеров особенно значима при выявлении высокоэффективных генов, вирулентность к которым в природных популяциях патогена практически отсутствует, и генов «возрастной» устойчивости, эффективность которых проявляется на более поздних этапах онтогенеза пшеницы.

Цель работы – скрининг сортов, районированных на территории Республики Беларусь, а также сортов и линий из коллекционного питомника РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» на наличие генов устойчивости к ржавчинным заболеваниям и выделение среди них источников комплексной устойчивости.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования служили 23 сорта яровой мягкой пшеницы, внесенные в Государственный реестр Республики Беларусь в 2016 г., 46 сортов и линий из коллекционного питомника РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию». ДНК выделяли из 10 индивидуальных растений 5–7-дневных проростков пшеницы для каждого сорта или линии согласно методике, описанной Plaschke [2]. Маркеры к генам устойчивости отбирали на основании литературных данных [3; 4]. Реакцию амплификации проводили согласно методическим рекомендациям [5]. Положительным контролем служили изогенные линии пшеницы и сорта, в которых гены устойчивости идентифицированы, в качестве отрицательного контроля – сорта, в которых гены устойчивости не выявлены. Анализ полученных фрагментов амплификации проводили в 1,5 %-ном агарозном геле в трис-боратном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания бромидом этидия. В качестве маркера молекулярного веса использовали GeneRulertm 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

Результаты и их обсуждение. Скрининг сортов пшеницы проводили с помощью подобранной коллекции маркеров к генам устойчивости к бурой ржавчине: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr27*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*; стеблевой: *Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr36*, *Sr38*, *Sr39*, *Sr45*, *Sr57*, *Sr1RS^{Amigo}* и желтой ржавчине: *Yr9*, *Yr10*, *Yr17*, *Yr18*, *Yr26*, *Yr30*.

В результате проведенных исследований в сортах яровой пшеницы идентифицированы одиночные гены устойчивости: *Lr1*, *Lr10*, *Sr1RS^{Amigo}*, *Yr10*, а также сцепленные блоки генов устойчивости к нескольким заболеваниям: *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57*, *Lr37/Sr38/Yr17* (таблица).

Наиболее часто встречаемыми в сортах яровой пшеницы были гены устойчивости к бурой ржавчине *Lr1* и *Lr10*. Носителями гена *Lr1* являлись сорта из Германии (Sorbas, Munk, Fasan, Margin); России (Ульяновская 101, Каменка, Эстер); Польши (Koksa, Verbena, Navra); Великобритании (KWS Torridon, линия CE BC 122); Беларуси (Ласка, Восточка); Чехии (Septima); Сербии (Venera); Италии (Vittorio); Греции (Elissavet) и США (Ruble).

Ген устойчивости *Lr10* идентифицирован у сортов из России (Агата, Ульяновская 101, Ульяновская 106, Воронежская 18, Тулайковская надежда); Германии (линии ShTRU1122,30.2); Великобритании (KWS Torridon); Польши (Serenada); Украины (Подарунок, Улюблена); Сербии (Venera) и Греции (Elissavet). Ген *Lr1* получил широкое распространение в сортах пшеницы во всем мире, но к настоящему времени утратил свою эффективность в большинстве стран мира, в том числе и в Беларуси [6]. Ген *Lr10* выявлен у многих сортов и линий пшеницы, ведущих свое происхождение от селекционных программ CIMMYT, а также распространен в старых австралийских и северо-американских сортах. В настоящее время *Lr10* также относится к неэффективным к белорусской популяции бурой ржавчины [6], поэтому рекомендуется использование генов *Lr1* и *Lr10* в сочетании с другими *Lr*-генами.

Сцепленные гены устойчивости *Lr19/Sr25* и *Lr24/Sr24* в составе транслокаций T7DS.7DL-7Ae#1L; T7AL-7Ae#1 и T3DL.3DL-3Ae#1; T1BL.1BS-3Ae#1L, соответственно, переданы в мягкую пшеницу от *Thinopyrum elongatum*. Гены устойчивости *Lr19/Sr25* идентифицированы у российских сортов Ульяновская 106 и Тулайковская надежда. Гены *Lr24/Sr24* выявлены у сортов немецкой селекции KWS Akvilon и Kvintus, линии KWS B-274 из Великобритании, сорта польской селекции Serenada и сорта украинской селекции Етюд (таблица).

Сорта яровой пшеницы с идентифицированными генами устойчивости к бурой, стеблевой и желтой ржавчине

Spring wheat varieties with identified genes of resistance to brown, stem and yellow rust

Название сорта Variety name	Происхождение Origin	Гены устойчивости Resistance genes
Агата	Россия	<i>Lr10</i>
Ульяновская 101	Россия	<i>Lr1, Lr10</i>
Ульяновская 106	Россия	<i>Lr10, Lr19/Sr25</i>
Воронежская 18	Россия	<i>Lr10</i>
ShTRU 1122, 30.2	Германия	<i>Lr10</i>
KWS B-274	Великобритания	<i>Lr24/Sr24</i>
CE BC 122	Великобритания	<i>Lr1</i>
Каменка	Россия	<i>Lr1</i>
KWS Akvilon	Германия	<i>Lr24/Sr24</i>
Sorbas	Германия	<i>Lr1, Lr34/Yr18/Pm38</i>
KWS Torridon	Великобритания	<i>Lr1, Lr10</i>
Serenada	Польша	<i>Lr10, Lr24/Sr24</i>
Подарунок	Украина	<i>Lr10</i>
Улюблена	Украина	<i>Lr10</i>
Этюд	Украина	<i>Lr24/Sr24, Sr1RS^{Amigo}</i>
Тулайковская надежда	Россия	<i>Lr10, Lr19/Sr25, Lr26/Sr31/Yr9/Pm8</i>
Koksa	Польша	<i>Lr1</i>
Venega	Сербия	<i>Lr1, Lr10</i>
Ласка	Беларусь	<i>Lr1</i>
Verbena	Польша	<i>Lr1</i>
Septima	Чехия	<i>Lr1, Lr37/Sr38</i>
Kvintus	Германия	<i>Lr24/Sr24</i>
Весточка	Беларусь	<i>Lr1</i>
Munk	Германия	<i>Lr1</i>
Fasan	Германия	<i>Lr1</i>
Nawra	Польша	<i>Lr1</i>
Elissavet	Греция	<i>Lr1, Lr10</i>
Vittorio	Италия	<i>Lr1</i>
Marin	Германия	<i>Lr1</i>
Ruble	США	<i>Lr1</i>
Эстер	Россия	<i>Lr1</i>
Kar'jaso	–	<i>Lr1, Lr10, Yr10</i>

Высокая эффективность гена *Lr19* выявлена в Болгарии, Германии, Испании, Италии, Польше, Румынии [7–9], Украине [10] и Беларуси [6]. К настоящему времени ген устойчивости *Lr19* преодолен некоторыми расами патогена в Мексике, России, Чехии [7]. В то же время ген устойчивости *Sr25*, присутствующий в этой же транслокации, придает сортам высокую эффективность против широко распространенной угандинской расы (Ug99) стеблевой ржавчины. Ген *Lr24* широко представлен в сортах, выращиваемых в Южной и Северной Америке, Австралии и Южной Африке, что привело к потере его эффективности в этих странах [7]. Он сохраняет эффективность в Германии и России [8]. В белорусской популяции бурой ржавчины встречается до 50 % клонов, вирулентных к этому гену [6]. Ген устойчивости *Sr24* эффективен к высоко агрессивной расе Ug99 стеблевой ржавчины, но преодолен новой разновидностью расы Ug99+*Sr24* (ТТКСТ).

Источником генов устойчивости *Sr31/Lr26/Yr9/Pm8*, *Sr50* и *Sr1RS^{Amigo}* является рожь *Secale cereale* L. В результате серии скрещиваний, данные гены в составе транслокации 1BL.1RS (Petkus), 1AL.1RS (Insave), 1BL.1RS и 1DL.1RS (Imperial) переданы в сорта и линии пшеницы *Triticum aestivum* [7]. Вместе с тем у ряда сортов мягкой пшеницы, несущих транслокацию 1BL.1RS, экспрессия гена *Pm8* подавлена. Транслокация 1BL.1RS с генами устойчивости

Sr31/Lr26/Yr9/Pm8 идентифицирована у российского сорта Тулайковская надежда, а транслокация 1AL.1RS с геном устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr1RS^{Amigo}* у сорта украинской селекции Етюд. К настоящему времени транслокация 1BL.1RS идентифицирована во многих сортах, возделываемых в Австралии, странах Европы, Северной и Южной Америки, а также в Азии и распространена более чем в 650 сортах мягкой пшеницы. Из сортов пшеницы, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1BL/1RS, наиболее известны озимые сорта Кавказ и Аврора, которые использовались в качестве родительских форм при создании сортов с данной транслокацией. С 1999 г. сорта с транслокацией 1BL.1RS, длительное время защищенные от стеблевой ржавчины геном устойчивости *Sr31*, стали поражаться новой расой Ug99 [7]. В то же время сорта, защищенные генами устойчивости *Sr50* и *Sr1RS^{Amigo}*, остаются устойчивыми к агрессивной расе Ug99. По результатам анализа популяции патогена 2009 года ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr26* оказался эффективным к белорусской популяции патогена, в то же время было обнаружено 11 % изолятов, вирулентных к нему, что свидетельствует о возможности их накопления в случае возделывания сортов, содержащих данный ген [6]. В то же время вирулентные к *Lr26* клоны гриба *Puccinia triticina* выявлены во всех регионах России, где ген *Lr26* относится к группе генов устойчивости, утративших свою эффективность в связи с широким возделыванием сортов Аврора и Кавказ.

У сорта немецкой селекции Sorbas показано присутствие кластера с генами неспецифической устойчивости сразу к нескольким заболеваниям: *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57*, а у сорта чешской селекции Septima – наличие транслокации от *Ae. ventricosa* с генами устойчивости *Lr37/Sr38/Yr17*. Ген возрастной устойчивости *Lr34* слабо эффективен в России, но относится к высоко эффективным к белорусской популяции бурой ржавчины [6]. Ген возрастной устойчивости *Lr37* также относится к высоко эффективным генам устойчивости в Беларуси [6]. В Западной Европе и европейской части России ген устойчивости *Lr37* утратил свою эффективность в связи с массовым использованием в селекции на устойчивость. В работе Сибикеева и др. [11] показано, что сочетание чужеродных транслокаций *Lr19/Sr25* и *Lr37/Sr38/Yr17* с преодоленными генами устойчивости к бурой ржавчине у почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы Л653 и Л654 обусловило их высокую устойчивость к бурой ржавчине и расе Ug99+Sr24 стеблевой ржавчины.

Сорт Kar'jaso является носителем генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr1*, *Lr10* и желтой ржавчине *Yr10*. Ген *Yr10* относится к эффективным против *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* Erics. (*Pst*) в Китае, Великобритании, Казахстане [12].

В результате проведенного анализа у сортов белорусской селекции (Ростань, Дарья, Тома, Рассвет, Сударыня, Василиса, Виза, Любава, Сабина, Славянка); российской (Злата); польской (Korynta, Bombona, Mandaryna); немецкой (Melissos, Triso, Quattro, Ethos и линии KWS 655-3-10); французской (Likamero, Briscard, Canuck); чешской (Zuzana, Tercie, Siracl); шведской (Canon, Lavett); голландской (Tybalt) и американской (Marble) генов устойчивости к бурой, стеблевой и желтой ржавчине не идентифицировано.

Заключение. В результате проведенных исследований нами идентифицированы сорта с генами устойчивости к нескольким ржавчинным заболеваниям. Наибольшее количество генов устойчивости идентифицировано у сорта Тулайковская надежда: транслокация 1BL.1RS от *Secale cereale* с генами устойчивости *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, транслокация от *Thinopyrum elongatum* с генами *Lr19/Sr25* и собственно пшеничный ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr10*. Сорт Ульяновская 106 содержит сцепленные гены устойчивости *Lr19/Sr25* и *Lr10*. У сорта Serenada присутствует транслокация от *Th. elongatum* с генами устойчивости *Lr24/Sr24* и ген *Lr10*, а у сорта Етюд одновременно со сцепленными генами *Lr24/Sr24* присутствует транслокация 1AL.1RS от *Secale cereale* с эффективным геном устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr1RS^{Amigo}*. У сорта Sorbas присутствуют сцепленные гены неспецифической устойчивости *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57* и ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr1*. Сорт Septima является носителем комплекса генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr1* и *Lr37*, стеблевой ржавчине *Sr38* и желтой ржавчине *Yr17*, а сорт Kar'jaso – носителем генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr1* и *Lr10* и желтой – *Yr10*. Данные сорта пшеницы рекомендуются в качестве доноров устойчивости к возбудителям бурой, стеблевой и желтой ржавчины в селекционных программах на иммунитет в регионах, где эти гены эффективны.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Санин, С. С. Контроль болезней сельскохозяйственных растений – важнейший фактор интенсификации растениеводства / С. С. Санин // Вестник защиты растений. – 2010. – № 1. – С. 3–14.
2. RFLP-mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye / J. Plaschke [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1993. – Vol. 85, N 8. – P. 1049–1054. doi.org/10.1007/bf00215046
3. Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance / G. Vida [et al.] // Euphytica. – 2009. – Vol. 170, N 1–2. – P. 67–76. doi.org/10.1007/s10681-009-9945-0
4. Идентификация генов Sr у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров / О. А. Баранова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 3. – С. 316–322. doi.org/10.18699/VJ15.041
5. Долматович, Т. В. ДНК-технология идентификации генов устойчивости тритикале к возбудителям бурой, стеблевой и желтой ржавчины пшеницы: метод. рекомендации / Т. В. Долматович, А. А. Булойчик. – Минск, 2015. – 32 с.
6. Булойчик, А. А. Частота встречаемости генов вирулентности в белорусских популяциях *Puccinia triticina* / А. А. Булойчик, В. С. Борзяк, Е. А. Волуевич // Микология и фитопатология. – 2011. – Т. 45, № 5. – С. 436–442.
7. Catalogue of gene symbols for wheat [Electronic resource] / R. A. McIntosh [et al.]. – Mode of access: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>. – Date of access: 11.05.2017.
8. Hanzalova, A. Physiologic specialization of wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in the Czech Republic in 2001–2004 / A. Hanzalova, P. Bartos // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2006. – Vol. 42, N 4. – P. 126–131.
9. Lind, V. Virulence frequencies of *Puccinia triticina* in Germany and the European regions of the Russian Federation / V. Lind, E. Gulyaeva // J. Phytopathology. – 2007. – Vol. 155, N 1. – P. 13–21. doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01182.x
10. Genetic protection of wheat from rusts and development of resistant varieties in Russia and Ukraine / A. Morgunov [et al.] // Euphytica. – 2011. – Vol. 179, N 2. – P. 297–311. doi.org/10.1007/s10681-010-0326-5
11. Сибикеев, С. Н. Пребридинговые исследования почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы с комбинацией транслокаций от *Agropyron elongatum* (Host.) P. B. и *Aegilops ventricosa* Tausch. / С. Н. Сибикеев, А. Е. Дружин // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19, № 3. – С. 310–315. doi.org/10.18699/VJ15.040
12. Идентификация носителей генов устойчивости к желтой *Yr5*, *Yr10*, *Yr15* и бурой ржавчине *Lr26*, *Lr34* на основе молекулярного скрининга образцов пшеницы / А. М. Кохметова [и др.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2014. – № 1. – С. 71–78. doi.org/10.11134/btp.1.2014.10

References

1. Sanin S. S. Agricultural plants diseases control – the main factor of the crop production intensification. *Vestnik zashchity rastenij = Plant protection news*, 2010, no. 1, pp. 3–14 (in Russian).
2. Plaschke J., Börner A., Xie D. X., Koebner R. M. D., Schlegel R. Gale M. D. RFLP-mapping of genes affecting plant height and growth habit in rye. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, vol. 85, no. 8, pp. 1049–1054. doi.org/10.1007/bf00215046
3. Vida G., Gal M., Uhrin A., Veisz O., Syed N. H., Flavell A. J., Wang Z., Bedó Z. Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica*, 2009, vol. 170, no. 1–2, pp. 67–76. doi.org/10.1007/s10681-009-9945-0
4. Baranova O. A., Lapochkina I. F., Anisimova A. V., Gajnullin N. R., Iordanskaya I. V., Makarova I. Yu. Identification of Sr genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 316–322. doi.org/10.18699/VJ15.041 (in Russian).
5. Dolmatovich T. V., Bulojchik A. A. *DNA technology for identification of triticale resistance genes against causative agents of brown, stem and yellow rust of wheat*. Minsk, 2015. 32 p. (in Russian).
6. Bulojchik A. A., Borzyak V. S., Voluevich E. A. Frequency of occurrence of virulence genes in Belarusian *Puccinia triticina* populations. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*, 2011, vol. 45, no. 5, pp. 436–442 (in Russian).
7. McIntosh R. A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D. J., Appels R., Devos K. M. Catalogue of gene symbols for wheat. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp> (accessed 11.05.2017).
8. Hanzalova A., Bartos P. Physiologic specialization of wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in the Czech Republic in 2001–2004. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2006, vol. 42, no. 4, pp. 126–131.
9. Lind V., Gulyaeva E. Virulence frequencies of *Puccinia triticina* in Germany and the European regions of the Russian Federation. *Journal of Phytopathology*, 2007, vol. 155, no. 1, pp. 13–21. doi.org/10.1111/j.1439-0434.2006.01182.x
10. Morgunov A., Ablova I., Babayants O., Babayants L., Bespalova L., Khudokormav Zh., Litvinenko N., Shamanin V., Syukov V. Genetic protection of wheat from rusts and development of resistant varieties in Russia and Ukraine *Euphytica*. *Euphytica*, 2011, vol. 179, no. 2, pp. 297–311. doi.org/10.1007/s10681-010-0326-5
11. Sibikeev S. N., Druzhin A. E. Prebreeding studies of almost isogenic lines of spring soft wheat with a combination of translocations from *Agropyron elongatum* (Host.) P. B. and *Aegilops ventricosa* Tausch. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 2015, vol. 19, no. 3, pp. 310–315 (in Russian). doi.org/10.18699/VJ15.040
12. Kohmetova A. M., Sapahova Z. B., Madenova A. K., Esenbekova G. T. Identification of carriers of resistance genes to yellow *Yr5*, *Yr10*, *Yr15* and brown rust *Lr26*, *Lr34* on the basis of molecular screening of wheat samples. *Biotehnologiya. Teoriya i praktika = Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2014, no. 1, pp. 71–78. doi.org/10.11134/btp.1.2014.10

Информация об авторах

Долматович Татьяна Владимировна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: T.Dolmatovich@igc.bas-net.by.

Бuloичик Андрей Александрович – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: A.Buloichik@igc.bas-net.by.

Гриб Станислав Иванович – академик, д-р сельскохозяйственных наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: triticale@tut.by.

Informations about the authors

Dolmatovich Tatiana Vladimirovna – Ph. D. (Biology), Senior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: T.Dolmatovich@igc.bas-net.by.

Buloichik Andrei Aleksandrovich – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A.Buloichik@igc.bas-net.by.

Grib Stanislav Ivanovich – Academician, D. Sc. (Agricultural), Chief researcher. Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: triticale@tut.by.

ISSN 1561-8323 (print)

МЕДИЦИНА
MEDICINE

УДК 612.111:616-006

Поступило в редакцию 08.08.2017

Received 08.08.2017

**Член-корреспондент И. В. Залуцкий¹, В. С. Лукашевич¹, Н. Ю. Лукьянова²,
С. Б. Кондрашова¹, Ю. А. Рудниченко¹, А. А. Басалай¹, В. Ф. Чехун²**¹*Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*²*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого
Национальной академии наук Украины, Киев, Украина***ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ЛАКТОФЕРРИНА НА РАЗВИТИЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Аннотация. Системное введение лактоферрина *per os* вызывало подавление развития карциномы Эрлиха на 39,4 %. При этом наблюдались положительные воздействия на состояние антиоксидантной и иммунной систем: снижение процесса пероксидации белков и усиление антиоксидантной активности; восстановление уровня IL-1 β и TGF β 1 при статистически достоверном увеличении в сыворотке крови TNF- α , который, как известно, подавляет рост опухолевых клеток и регулирует ряд обменных процессов, а также активность иммунного ответа. Вместе с тем показано снижение в сыворотке крови содержания тестостерона и эстрадиола. Выявленный эффект подавления лактоферрином развития опухоли связан, по-видимому, со значительным (в 5,28 раза) увеличением в сыворотке крови концентрации железа, которое играет важную роль в обеспечении систем регуляции жизнедеятельности опухолевых клеток.

Ключевые слова: рак молочной железы, карцинома Эрлиха, лактоферрин, тестостерон, эстрадиол, цитокины, перекисное окисление

Для цитирования: Влияние экзогенного лактоферрина на развитие экспериментальной модели карциномы молочной железы / И. В. Залуцкий [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 103–108.

**Corresponding Member Joseph V. Zalutsky¹, Vladimir S. Lukashevich¹, Natalia Y. Lukianova²,
Svetlana B. Kondrashova¹, Yulia A. Rudnichenko¹, Anastasia A. Basalay¹, Vasili F. Chekhun²**¹*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*²*R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine***INFLUENCE OF EXOGENOUS LACTOFERRIN ON THE DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL MODEL
OF MAMMARY GLAND CARCINOMA**

Abstract. A systemic administration of lactoferrin *per os* suppressed the development of Ehrlich's carcinoma by 39.4 %. In this case, positive actions upon the state of antioxidant and immune systems were observed: decrease in the peroxidation of proteins and increase in the antioxidant activity; the restoration of IL-1 β and TGF β 1 levels with a statistically reliable increase in the blood serum TNF- α , which, as known, suppresses the growth of tumor cells and regulates a number of metabolic processes, and also the activity of immune response. At the same time, a decrease in the blood serum of the content of testosterone and estradiol is shown. The revealed effect of lactoferrin suppression of the development of tumor is apparently associated with a significant (by a factor of 5.28) increase in the blood serum of the iron concentration, which plays an important role in providing regulation systems of the vital activity of tumor cells.

Keywords: cancer of mammary gland, the carcinoma of Ehrlich, lactoferrin, testosterone, estradiol, cytokins, the peroxide oxidation

For citation: Zalutsky J. V., Lukashevich V. S., Lukianova N. Y., Kondrashova S. B., Rudnichenko Yu. A., Basalay A. A., Chekhun V. F. Influence of exogenous lactoferrin on the development of an experimental model of mammary gland carcinoma. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 103–108 (in Russian).

Введение. В настоящее время раком молочной железы (РМЖ) страдает практически каждая десятая женщина в мире. Среди мужского населения эта патология встречается в 100 раз реже. В последние годы отмечена тенденция к развитию заболевания у женщин в возрасте менее 50 лет.

В структуре онкологической заболеваемости женщин Республики Беларусь РМЖ занимает первое место и составляет 18,4 % [1]. **Основная категория больных этой формой рака – пациентки** возрастного периода 60–64 года, т. е. в состоянии менопаузы. Приблизительно у 70 % женщин опухоли гормоночувствительны: это означает, что в ядрах клеток содержатся рецепторы к стероидным гормонам – эстрадиолу, прогестерону. Эти гормоны являются основными факторами роста опухоли. Немаловажную роль в организме женщины играют и андрогены: они участвуют в регуляции секреции гонадотропинов, синтезе липидов, регрессии фолликулов в яичниках, выработке β -эндорфинов, факторов роста [2].

В соответствии с международными рекомендациями все злокачественные опухоли молочной железы делятся на 3 категории: гормоночувствительные – при содержании рецепторов в ядрах >10 % позитивных клеток; относительно гормоночувствительные – от 1 до 10 % клеток; не чувствительные к эндокринным воздействиям – менее 1 % клеток [3].

Установлено, что развитие опухоли приводит к существенному изменению содержания свободного железа (под «свободным», или «лабильным» железом принято понимать большой пул слабосвязанного, легко диализуемого двухвалентного железа). Для опухолевых клеток характерно повышенное его содержание, причем активные формы кислорода (АФК) инактивируют железосвязывающие белки [4].

В этом свете как претендент на возможное профилактическое или лечебное средство обращает на себя внимание лактоферрин (ЛФ) – железосвязывающий гликопротеин из семейства трансферринов. Впервые ЛФ был выделен в 1939 г. из коровьего молока, в 1960 г. – из молока человека, в дальнейшем он был обнаружен в желчи, секрете кишечно-желудочного тракта, синовиальной жидкости, слезной жидкости, сперме, а также в крови. Он синтезируется также в созревающих нейтрофилах на миелоцитарной стадии развития этих клеток и накапливается во вторичных гранулах нейтрофилов. Синтез ЛФ контролируется гормонами или тканеспецифическими транскрипционными факторами. Неполный список свойств ЛФ включает в себя антибактериальные, противовирусные и противоопухолевые активности, регуляцию роста и дифференциацию клеток, противовоспалительные, иммуномодулирующие характеристики и др. [5].

В конце 2010 г. в Беларуси совместно с российскими учеными впервые было получено молоко трансгенных по человеческому ЛФ коз с высоким содержанием ЛФ (до 6 г/л). В начале 2011 г. была разработана технология лабораторного получения и выделен высокоочищенный отечественный препарат рекомбинантного человеческого ЛФ из молока трансгенных коз [6]. В ближайшие годы предполагается масштабирование его производства и проведение полных клинических испытаний.

Недавно авторами была показана гормонотерапевтическая активность ЛФ, в частности его способность при системном употреблении повышать сывороточный уровень тестостерона [7]. Учитывая, что андрогенотерапия является одним из способов коррекции онкопатологии молочной железы, а также свойство ЛФ к высокоаффинному связыванию железа (что может существенным образом влиять на пролиферативную активность феррумчувствительных опухолевых клеток) этот полифункциональный белок может оказаться эффективным действующим началом для разработки профилактических или лечебных препаратов при раке молочной железы.

Цель исследования – изучение механизмов опухолередуцирующего действия рекомбинантного ЛФ человека на рост солидной опухоли карциномы Эрлиха, как модели РМЖ.

Материалы и методы исследований. В экспериментах использовали самок мышей линии Af (характеризующейся высокой частотой возникновения спонтанных опухолей) массой 19–27 г. Были сформированы три экспериментальные группы: контрольная, группа с привитой карциномой Эрлиха и группа, получавшая лактоферрин *per os* в дозе 100 мг/кг массы превентивно в течение 1,5 мес. и далее (2 недели) сочетанно с прививкой карциномы Эрлиха. Животных размещали в отдельных клетках (по 20 особей в каждой) при свободном доступе к воде и пище. По окончании хронического эксперимента мыши были взяты в острый опыт.

Содержание общего тестостерона и эстрадиола в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов фирмы «Хема» (Lot 5022

кат. № K209; Lot 502 кат. № K208 соответственно; Россия), а уровень железа с помощью набора (НТПК «Анализ X», Беларусь). Отношение тестостерон/эстрадиол в сыворотке крови мышей устанавливали расчетным путем.

Измерение уровней трансформирующего ростового фактора (TGF- β 1), интерлейкина (IL1 β) и фактора некроза опухоли (TNF- α) в сыворотке крови мышей проводили с использованием иммуноферментного набора фирмы R&D Systems (mouse TGF- β 1 ELISA DuOSet, Lot 1336940, Cat. № DY 1679, mouse IL1 β ELISA DuOSet, Lot 1351927, Cat. № DY 401 и mouse TNF- α ELISA DuOSet, Lot 332127, Cat. № DY 410-05) согласно инструкции. Исследования проводили на ИФ-анализаторе Biotek ELx-808 (США).

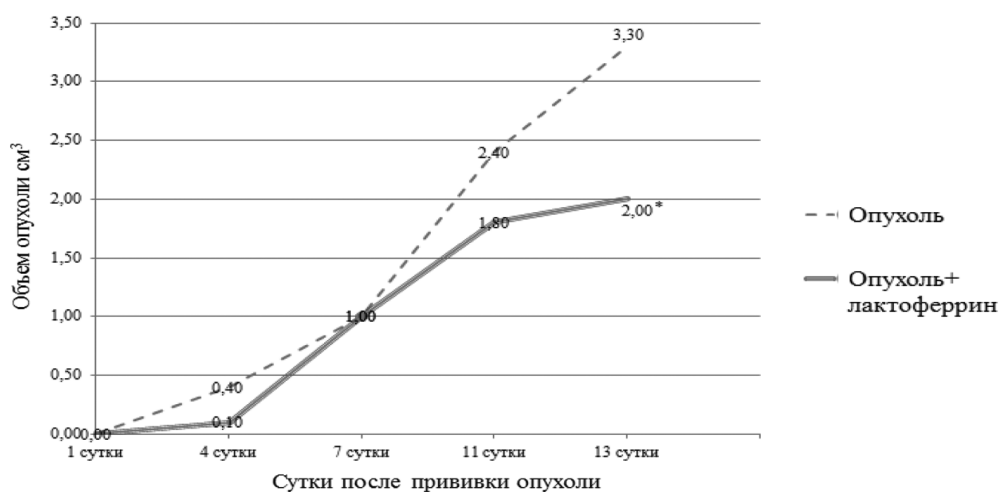
Материалом для исследований показателей перекисного окисления белков (ПОБ) была сыворотка крови. Степень ПОБ оценивали по реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием общих динитрофенилгидразонов (ОДГ), имеющих максимум поглощения при 490 нм, альдегидфенилгидразонов (АДГ), имеющих максимум поглощения при 405 нм, и кетонфенилгидразонов (КДГ), имеющих максимум поглощения при 630 нм [8].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) – ключевого фермента антиоксидантной защиты (АОЗ) определяли по степени торможения реакции окисления кверцетина [9].

Каталазная активность (предотвращение накопления перекиси водорода, образующейся при дисмутации супероксидного аниона) в сыворотке крови оценивалась с помощью спектрофотометрического метода, основанного на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [10].

Экспериментальные данные обработаны с помощью MS Excel, Origin 6.1 и представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка. Статистическая значимость полученных результатов была оценена по *U*-критерию Манна–Уитни для непараметрических выборок, в случае нормального распределения данных в вариационных рядах применяли *t*-критерий Стьюдента с использованием пакета программ Statistica 6.0. Достоверным считали уровень значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. На рисунке представлена диаграмма развития привитой опухоли карциномы Эрлиха при сочетанном введении лактоферрина. На 7-е сутки опухоль в группе мышей-опухоленосителей и опухоль в группе с сочетанием лактоферрина одинаковы по объему. Далее, начиная с 8-х суток и на всем остальном периоде наблюдения объем опухоли под воздействием ЛФ снижался, причем к 13-м суткам эта разница статистически достоверна и составляла 39,4 %.



Динамика развития карциномы Эрлиха под воздействием лактоферрина. * – достоверные отличия от группы мышей-опухоленосителей ($p < 0,05$)

Dynamics of Ehrlich's carcinoma due to lactoferrin administration. * – reliable differences from the group of mouse-tumor carriers ($p < 0.05$)

Изменения содержания показателей ПОБ и активности ферментов АОЗ во всех экспериментальных группах представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Изменение показателей перекисного окисления белков и активности ферментов антиоксидантной защиты в крови мышей в норме, при экспериментальной опухоли и введении лактоферрина

T a b l e 1. Change in the index of peroxidation and the ferment activity of antioxidant protection in the blood of mice in health, with experimental tumor and lactoferrin administration

Показатель Index	Группа Group		
	Контроль Control	Опухоль Tumor	Опухоль + лактоферрин Tumor + lactoferrin
Общие дифенилгидразоны (ОДГ) (ед. опт. пл/мл сыворотки)	0,06±0,01	0,23±0,05*	0,05±0,004*
Спонтанно окисленные альдегидгидразоны (АДГ) (ед. опт. пл/мл сыворотки)	0,10±0,01	0,19 ±0,05*	0,06±0,01*
Кетондинитрофенилгидразоны (КДГ) (ед. опт. пл/мл сыворотки)	0,26±0,02	0,35±0,05*	0,18±0,03*
СОД (У/мл)	4,58±0,25	8,57±1,21*	6,09±1,14*
Каталаза (мкат/л)	15,04±0,66	20,39±0,99*	12,09±1,50*

П р и м е ч а н и е: * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$).

N o t e: * – reliable differences from the control group ($p < 0.05$).

Установлено падение уровня ОДГ на 22,23 %, количества АДГ на 35,42 % и содержания КДГ на 31,25% соответственно в крови мышей с привитой опухолью и введении на ее фоне ЛФ (по сравнению со значениями у интактных животных). У этой же группы крыс также показано достоверное увеличение активности СОД на 33,07 % и снижение активности каталазы (по принципу обратной связи) по сравнению с контролем. При межгрупповом сравнении результатов (группа «опухоль + лактоферрин» с группой «опухоль») установлено достоверное снижение количества продуктов перекисного окисления белков, активности СОД и каталазы и рост концентрации железа.

Полученные данные указывают на факт подавления процесса пероксидации белков и усиления антиоксидантной активности ферментов в организме животных с экспериментально вызванным раком молочной железы, которым вводили ЛФ на фоне данной патологии.

В группе мышей-опухоленосителей уровень общего тестостерона и эстрадиола незначительно снижался на 36,1 и 16,5 % соответственно по сравнению с контрольной группой (табл. 2). В свою очередь, недостоверно уменьшалось содержание железа в сыворотке крови исследуемой группы (на 2,1 %).

Т а б л и ц а 2. Некоторые биохимические и иммунологические показатели в сыворотке крови экспериментальных животных

T a b l e 2. Some biochemical and immunological indices in the serum blood of experimental animals

Показатель Index	Группа Group		
	Контроль Control	Опухоль Tumor	Опухоль + лактоферрин Tumor + lactoferrin
Общий тестостерон (нмоль/л)	2,69 ± 0,54	1,72 ± 0,24	1,26 ± 0,12
Эстрадиол (нмоль/л)	1,21 ± 0,12	1,01 ± 0,08	0,59 ± 0,04 [#]
Индекс тестостерон/эстрадиол	2,45 ± 0,59	3,00 ± 1,34	2,29 ± 0,34
Железо (мкмоль/л)	23,56 ± 1,73	23,07 ± 1,94	121,77 ± 28,62 ^{#*}
IL 1β (пг/мл)	19,59 ± 2,08	10,09 ± 1,66*	16,8 ± 3,07
TGF-β1 (нг/мл)	71,44 ± 5,21	100,58 ± 5,04*	48,48 ± 0,89 [#]
TNF-α (пг/мл)	27,17 ± 1,97	27,53 ± 2,6	41,26 ± 8,21 [#]

П р и м е ч а н и е: * – достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$); [#] – достоверные отличия от группы мышей-опухоленосителей ($p < 0,05$).

N o t e: * – reliable differences from the control group ($p < 0.05$); [#] – reliable differences from the group of mouse-tumor carriers ($p < 0.05$).

Уровень IL-1 β у мышей с привитой опухолью статистически значимо снижался на 48,5 % по отношению к контролю. Напротив, содержание TGF- β 1 достоверно возрастало на 40,8 %. Источником данного противовоспалительного цитокина могут быть как сами опухолевые клетки, так и клетки-эффекторы, круг которых расширяется по мере роста опухоли, так как организм все в большей степени использует воспалительный тип ответа на новообразование.

После перорального введения ЛФ на протяжении двух месяцев экспериментальным животным с привитой опухолью содержание эстрадиола в сыворотке крови статистически значимо снижалось на 41,6 % по отношению к группе мышей-опухоленосителей что, возможно, связано со способностью ЛФ снижать активность или синтез ароматазы, которая участвует в конвертации тестостерона в эстрадиол. В свою очередь, достоверно увеличивалось содержание железа в сыворотке крови исследуемой группы (в 5,28 раза).

Уровень TGF- β 1 значительно ($p < 0,05$) снижался на 51,8 % по отношению к группе мышей с привитой опухолью. Напротив, содержание TNF- α достоверно увеличивалось на 49,9 %.

Заключение. Системное введение лактоферрина *per os* вызывало подавление развития карциномы Эрлиха на 39,4 %. При этом наблюдались положительные воздействия на состояние антиоксидантной и иммунной систем:

снижение процесса пероксидации белков и усиление антиоксидантной активности;

восстановление уровня IL-1 β и TGF β 1 при статистически достоверном увеличении в сыворотке крови TNF- α , который, как известно, подавляет рост опухолевых клеток и регулирует ряд обменных процессов, а также активность иммунного ответа.

Вместе с тем показано снижение в сыворотке крови содержания тестостерона и эстрадиола.

Выявленный эффект подавления лактоферрином развития опухоли карциномы Эрлиха связан, по-видимому, со значительным (в 5,28 раза) увеличением в сыворотке крови концентрации железа, которое играет важную роль в обеспечении систем регуляции жизнедеятельности опухолевых клеток [11]. Связывание железа с лактоферрином характеризуется исключительно высоким сродством (10^{-20} М) и его дефицит в очаге злокачественной трансформации приводит к подавлению пролиферативной активности и жизнеспособности опухолевых клеток.

Благодарности. Исследования выполнены при финансовой поддержке БРФФИ (грант M15УК/A-040).

Acknowledgements. The investigations are sponsored by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grant M15УК/A-040).

Список использованных источников

1. Антоненкова, Н. Н. Проспективное рандомизированное исследование эффективности экземестана в адъювантной гормонотерапии больных раком молочной железы / Н. Н. Антоненкова // Медицинские новости. – 2006. – № 10. – С. 127–138.
2. Стенина, М. Б. Гормонотерапия диссеминированного рака молочной железы / М. Б. Стенина // Практическая онкология. – 2000. – Т. 1, № 2. – С. 12–18.
3. Goldhirsh, A. Endocrine therapies in breast cancer / A. Goldhirsh, R. D. Gelber // Seminars in Oncology. – 1996. – Vol. 23, N 4. – P. 494–505.
4. Белкин, А. В. Флуоресцентный спектральный анализ крови женщин, больных раком молочной железы, и его интеграция в реологические характеристики крови / А. В. Белкин // Вестн. Тюменского гос. ун-та. Медико-биолог. науки. – 2014. – № 6. – С. 108–113.
5. Brock, J. H. Lactoferrin – 50 years on / J. H. Brock // Biochem. Cell Biol. – 2012. – Vol. 90, N 3. – P. 245–251. doi: org/10.1139/o2012-018
6. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-производителей и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – № 1. – С. 72–81.
7. Рудниченко, Ю. А. Экспериментальное исследование влияния рекомбинантного человеческого лактоферрина на уровни андрогенов и основные показатели липидного обмена / Ю. А. Рудниченко, В. С. Лукашевич, И. В. Залуцкий // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, № 5. – С. 566–571.
8. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R. L. Levine [et al.] // Meth. Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 464–478.
9. Костюк, В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. – Рига, 1990. – С. 45–54.
10. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
11. Иванов, С. Д. Железо и рак. Роль ионов железа в процессе канцерогенеза и при лучевой терапии опухоленосителей / С. Д. Иванов // Успехи современной биологии. – 2013. – Т. 133, № 5. – С. 481–494.

References

1. Antonenkova N. N. A prospective, randomized study of the efficacy of exemestane in adjuvant hormone therapy in breast cancer patients. *Meditsinskie novosti* [Medical News], 2006, no. 10, pp. 127–138 (in Russian).
2. Stenina M. B. Hormone therapy of disseminated breast cancer. *Prakticheskaya onkologiya = Practical oncology*, 2000, vol. 1, no. 2, pp. 12–18 (in Russian).
3. Goldhirsh A., Gelber R. D. Endocrine therapies in breast cancer. *Seminars in Oncology*, 1996, vol. 23, no. 4, pp. 494–505.
4. Belkin A. V. Fluorescent spectral blood analysis of women with breast cancer and its integration into the rheological properties of blood. *Vestnik Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta. Mediko-biologicheskie nauki = Bulletin of Tyumen State University. Medico-Biological Sciences*, 2014, no. 6, pp. 108–113 (in Russian).
5. Brock J. H. Lactoferrin – 50 years on. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, vol. 90, no. 3, pp. 245–251. doi.org/10.1139/o2012-018
6. Lukashevich V. S., Budevich A. I., Semak I. V., Kuznetsova V. N., Malyushkova E. V., Pyzh A. E., Novakovskaya S. A., Rudnichenko Yu. A., Popkov N. A., Ivashkevich O. A., Zalutsky I. V. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat-producers and its physiological effects. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72–81 (in Russian).
7. Rudnichenko Yu. A., Lukashevich V. S., Zalutsky I. V. Experimental study of the influence of recombinant human lactoferrin on the levels of androgens and basic parameters of lipid and protein metabolism. *Biomeditsinskaya khimiya*, 2016, vol. 62, no. 5, pp. 566–571. doi.org/10.18097/pbmc20166205566 (in Russian).
8. Levine R. L., Garland D., Oliver C. N., Amici A., Climent I., Lenz A.-G., Ahn B.-W., Shaltiel S., Stadtman E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymology*, 1990, vol. 186, pp. 464–478. doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-h
9. Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Kovaleva Zh. V. A simple, sensitive assay for determination of superoxide dismutase activity based on reaction of quercetin oxidation. *Kislородnye radikaly v khimii, biologii i meditsine* [Oxygen Radicals in Chemistry, Biology and Medicine]. Riga, 1990, pp. 45–54 (in Russian).
10. Korolyuk M. A., Ivanova L. I., Mayorova I. G., Tokarev V. E. Method for the determination of catalase activity. *Laboratornoe delo* [Laboratory Science], 1988, no. 1, pp. 16–18 (in Russian).
11. Ivanov S. D. Iron and cancer. The role of iron ions in carcinogenesis and radiation therapy of tumors bearings. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2013, vol. 133, no. 5, pp. 481–494 (in Russian).

Информация об авторах

Залуцкий Иосиф Викторович – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: IZalutsky@gmail.com.

Лукашевич Владимир Сергеевич – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lukashvs@rambler.ru.

Лукьянова Наталья Юрьевна – заведующий лабораторией. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины (ул. Васильковская, 45, 03022, Киев, Украина). E-mail: nataluk10@gmail.com.

Кондрашова Светлана Болеславовна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svetlana.condraschova2011@yandex.ru.

Рудниченко Юлия Анатольевна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: link060619@list.ru.

Басалай Анастасия Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com.

Чехун Василий Федорович – академик, д-р мед. наук, профессор, директор. Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины (ул. Васильковская, 45, 03022, Киев, Украина). E-mail: chekhun@onconet.kiev.ua.

Information about the authors

Zalutsky Joseph Viktorovich – Corresponding Member, D. Sc. (Medicine), Professor, Director. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: IZalutsky@gmail.com.

Lukashevich Vladimir Sergeevich – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lukashvs@rambler.ru.

Lukianova Natalia Yurievna – Head of the Laboratory. R. E. Kavetsky Institute of Experimental Patology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine (45, Vasilkovskaya Str., 03022, Kiev, Ukraine). E-mail: nataluk10@gmail.com.

Kondrashova Svetlana Boleslavovna – Senior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svetlana.condraschova2011@yandex.ru.

Rudnichenko Julia Anatolievna – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: link060619@list.ru.

Basalay Anastasia Alexandrovna – Junior researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com.

Chekhun Vasili Fiodorovich – Academician, D. Sc. (Medicine), Director. R. E. Kavetsky Institute of Experimental Patology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine (45, Vasilkovskaya Str., 03022, Kiev, Ukraine). E-mail: chekhun@onconet.kiev.ua.

ISSN 1561-8323 (print)

УДК 616. 65-006.6:616.65-089.87]:615.849(476)

Поступило в редакцию 23.08.2017

Received 23.08.2017

**Член-корреспондент С. А. Красный, П. Д. Демешко, С. Л. Поляков,
Е. А. Степанович, А. А. Минич**

*Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии
им. Н. Н. Александрова, Минск, Республика Беларусь*

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАДИКАЛЬНОЙ ПРОСТАТЭКТОМИИ И АДЬЮВАНТНОЙ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ МЕСТНО-РАСПРОСТРАНЕННЫМ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Аннотация. Работа посвящена результатам сравнительного исследования по изучению влияния адьювантной лучевой терапии на выживаемость до биохимического рецидива (БхР) у пациентов, перенесших радикальную простатэктомию (РПЭ) по поводу рака предстательной железы (РПЖ), в зависимости от пред- и послеоперационных факторов прогноза. Проведение адьювантной лучевой терапии после РПЭ в суммарной очаговой дозе 60 Гр у пациентов с местно-распространенным РПЖ (pT3a-b) или локализованным процессом после нерадикально хирургического вмешательства (rT2R1) и высокодифференцированной аденокарциномой (сумма Глисона 6 и менее) по данным послеоперационного морфологического исследования позволяет статистически значимо на 25,7 % повысить 5-летний показатель выживаемости до БхР ($p = 0,047$) по сравнению с наблюдением.

Ключевые слова: рак предстательной железы, радикальная простатэктомия, биохимический рецидив, лучевая терапия

Для цитирования: Отдаленные результаты радикальной простатэктомии и адьювантной лучевой терапии у пациентов, страдающих местно-распространенным раком предстательной железы / С. А. Красный [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 109–114.

**Corresponding Member Sergey A. Krasny, Pavel D. Demeshko, Sergey L. Polyakov,
Elena A. Stepanovich, Alexander A. Minich**

N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

LONG-TERM RESULTS OF RADICAL PROSTATECTOMY AND ADJUVANT RADIOTHERAPY IN PATIENTS WITH LOCALLY ADVANCED PROSTATE CANCER

Abstract. The article presents the results of a comparative study of the effect of adjuvant radiotherapy on the survival to biochemical recurrence (BCR) in patients undergoing radical prostatectomy (RP) of prostate cancer (PCa) depending on pre- and post-operative prognosis factors. Adjuvant radiation therapy following prostatectomy in a total focal dose of 60 Gy in patients with locally advanced prostate cancer (pT3a-b) or the localized process with positive surgical margins (rT2R1) and highly differentiated adenocarcinoma (Gleason score equal to 6 or less) according to a postoperative morphological examination significantly increases a 5-year survival to BCR by 25.7 % ($p = 0.047$) compared to observation.

Keywords: prostate cancer, radical prostatectomy, biochemical relapse, radiation therapy

For citation: Krasny S. A., Demeshko P. D., Polyakov S. L., Stepanovich E. A., Minich A. A. Long-term results of radical prostatectomy and adjuvant radiotherapy in patients with locally advanced prostate cancer. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 109–114 (in Russian).

Введение. Радикальная простатэктомия (РПЭ) является одним из наиболее эффективных методов лечения как локализованного, так и местно-распространенного резектабельного рака предстательной железы (РПЖ) [1–3]. Однако несмотря на то что данный вид лечения обладает высокой онкологической эффективностью, позволяя достичь долгосрочной выживаемости пациентов [4], у 15–40 % из них в течение 5 лет после хирургического лечения развивается рецидив заболевания [5], обычно проявляющийся бессимптомным повышением уровня простат-специфического антигена (ПСА) – биохимический рецидив (БхР) РПЖ. В связи с этим проведение адьювантного лечения способно улучшить отдаленные результаты и предотвратить развитие клинического прогрессирования болезни. В частности, в случае наличия местно-распространенного процесса с инвазией перипростатической клетчатки или нерадикальным характере операции

проведение адъювантной лучевой терапии (аЛТ) является стандартным подходом. Тем не менее, не у всех пациентов, подвергнутых локальному облучению, наблюдается стойкая ремиссия заболевания [6], в связи с чем актуальным является определение индивидуализированных показаний к применению данного вида лечения.

Цель исследования – изучение влияния адъювантной ЛТ на отдаленные результаты лечения пациентов, перенесших РПЭ, в зависимости от пред- и послеоперационных факторов прогноза.

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования послужили 87 пациентов, которые в РНПЦ ОМР им Н. Н. Александрова получали лечение по поводу РПЖ в период с 2008 по 2013 г. Из указанного числа случаев 44 пациентам выполнена РПЭ с последующей адъювантной ЛТ (основная группа), 43 пациентам проведено только хирургическое лечение (контрольная группа). Медиана возраста составила 66,5 года.

Основанием для проведения аЛТ являлось наличие в 9 случаях (20,5 %) роста опухоли в крае отсечения от уретры (R1), либо инвазия опухоли в перипростатическую клетчатку и/или семенные пузырьки (pT3a-b) с негативными краями отсечения (R0), но высокой вероятностью наличия позитивных хирургических краев по мнению оперирующего хирурга (в таком случае ЛТ назначалась консилиумом с участием радиационного онколога с последующим обсуждением клинической ситуации с пациентом). Средний срок начала ЛТ составил 3,8 месяца с момента выполнения РПЭ (но не позднее 6 месяцев после хирургического лечения).

У всех пациентов из группы контроля имел место местно-распространенный РПЖ (pT3a-b) с негативными краями отсечения.

В исследование не включались пациенты с послеоперационным уровнем ПСА $\geq 0,2$ нг/мл, с метастатическим поражением тазовых лимфатических узлов, а также получавшие адъювантную гормональную терапию.

Общая характеристика пациентов представлена в таблице.

Характеристика пациентов в группах

Characteristics of group patients

Показатель Index	Группа пациентов Patient group		p
	Основная Main	Контрольная Control	
Число пациентов	44	43	–
Медиана уровня ПСА до РПЭ, нг/мл	27,2	30,5	0,7*
Медиана возраста, лет	64,8	66,2	0,3*
Степень дифференцировки опухоли, абс. (%):			0,3**
Сумма Глисона ≤ 6	19 (43,2)	23 (53,2)	
Сумма Глисона =7	15 (34,1)	13 (30,2)	
Сумма Глисона ≥ 8	10 (22,7)	7 (16,6)	

Примечания: * – критерий U Манна–Уитни; ** – χ^2 Пирсона.

Note: * – Mann–Whitney U test; ** – Pearson χ^2 test.

Как следует из представленных данных, группы были полностью сопоставимы по всем основным характеристикам.

Методика проведения радикальной простатэктомии и дистанционной лучевой терапии. РПЭ выполнялась по стандартной методике, предполагающей удаление предстательной железы и семенных пузырьков, формирование шейки мочевого пузыря и везико-уретрального анастомоза и выполнение тазовой лимфодиссекции. Стандартная лимфодиссекция включала удаление наружных подвздошных лимфоузлов и лимфоузлов запирающей ямки от запирающего отверстия до бифуркации общей подвздошной артерии.

При проведении дистанционной лучевой терапии использовались следующие объемы облучения: клинический объем облучения (CTV) – ложе предстательной железы и семенных пузырьков; планируемый объем облучения (PTV) – CTV + 1 см во всех направлениях от контура CTV.

Лучевая терапия проводилась на линейных ускорителях электронов Clinac 2300 C/D, TrilogyX и Unique Performance (Varian Medical Systems, США) в условиях 3D-планирования (89,5 % случаев), а также по методикам IMRT/VMAT (10,5 %).

Облучение проводилось с использованием стандартного режима фракционирования дозы (разовая очаговая доза 2 Гр, 1 раз в день, 5 раз в неделю) непрерывным курсом до суммарной очаговой дозы 60 Гр.

Наблюдение за пациентами, оценка результатов лечения и статистический анализ данных. Наблюдение за пациентами после проведения лечения осуществлялось 1 раз в 3 мес. в течение 2 лет, затем 1 раз в 6 мес. в течение 3-го года и последующих лет. У бессимптомных пациентов выполнялся сбор специфического анамнеза, определение уровня ПСА и пальцевое ректальное исследование.

Конечной точкой исследования являлось развитие биохимического рецидива после окончания лечения – выживаемость до биохимического рецидива (ВБхР), наступление которого констатировали в случае повышения уровня ПСА более 0,2 нг/мл, подтвержденное в двух последовательных анализах (согласно международному консенсусу [7; 8]).

Нормальность распределения количественных признаков проверялась при помощи критерия Шапиро–Уилка. Для всех количественных признаков характер распределения отличался от нормального, в связи с чем сравнение их осуществлялось методом непараметрической статистики (критерий Манна–Уитни). Выживаемость оценивалась по методу Каплана–Мейера, статистическая значимость различий оценивалась с использованием log-rank теста. Для статистического анализа использован программный комплекс Statistica, ver. 7 (StatSoft, Inc., 2002).

Результаты и их обсуждение. Медиана наблюдения в общей когорте пациентов составила 50,1 месяца, в течение которых было зарегистрировано 40 (46,0 %) случаев возврата заболевания, медиана ВБхР в общей когорте пациентов составила 61,6 месяца, 5-летняя выживаемость – $51,5 \pm 6,0$ %

При анализе выживаемости без прогрессирования в зависимости от группы статистически значимые различия не выявлены ($p_{\text{log-rank}} = 0,45$) (рис. 1).

Установлено, что в группе пациентов, которым проводилась послеоперационная лучевая терапия медиана выживаемости составила 48,4 месяца, 5-летняя ВБхР – $47,2 \pm 11,1$ %. В группе стандартного хирургического лечения медиана времени жизни до биохимического прогрессирования составила 42,4 месяца, 5-летняя ВБхР – $48,7 \pm 7,6$ %. Тем не менее, при анализе графиков выживаемости обращает на себя внимание достаточно существенная разница в показателе ВБхР между группами в пользу адъювантной ЛТ, наблюдаемая в течение первых 48 мес. после проведенного лечения.

Принимая во внимание, что предоперационный уровень ПСА и сумма Глисона по данным послеоперационного морфологического исследования у пациентов с местно-распространенным раком являются основными факторами-предикторами развития биохимического и клинического прогрессирования заболевания [9], был проведен подгрупповой анализ выживаемости до БхР в зависимости от вышеуказанных показателей (уровень ПСА $<20,0$ нг/мл против $\geq 20,1$ нг/мл, сумма Глисона ≤ 6 против 7–10).

Было выявлено, что у пациентов с умеренно- и низкодифференцированным раком (сумма Глисона 7 и более)

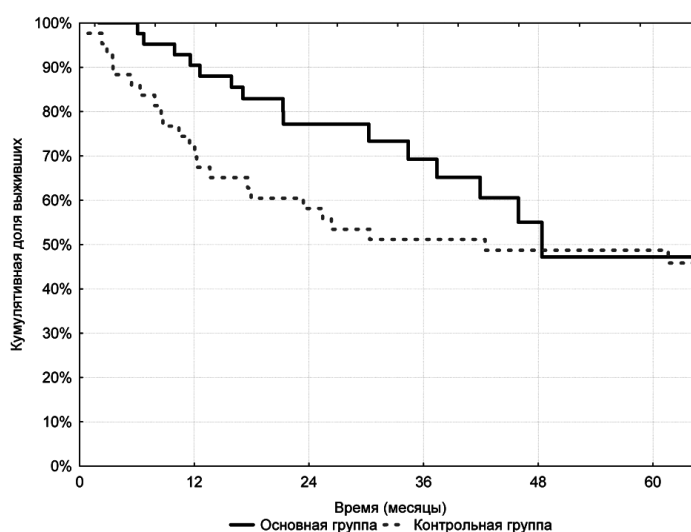


Рис. 1. Выживаемость до биохимического рецидива в зависимости от группы

Fig. 1. Survival to biological recurrence depending on the patient group

показатели ВБхР для основной и контрольной групп статистически значимо не различались, хотя тенденция в пользу адъювантной терапии сохранялась: 5-летняя ВБхР пациентов составила соответственно $31,3 \pm 12,9$ и $20,0 \pm 5,5$ % ($p = 0,2$).

Напротив, у пациентов с высокодифференцированным раком (сумма Глисона 6 и менее) была получена существенная разница в показателе ВБхР в пользу комбинированного метода лечения: 5-летняя ВБхР пациентов данной подгруппы, перенесших РПЭ + ЛТ, составила $78,2 \pm 11,4$ % (медиана выживаемости не достигнута), в то время как после хирургического лечения 5-летняя ВБхР была равна $52,5 \pm 8,1$ % (медиана – 61,6 месяца) ($p = 0,047$) (рис. 2).

При анализе отдаленных результатов лечения пациентов в зависимости от дооперационного уровня ПСА статистически значимых различий получено не было.

В настоящее время РПЭ является одним из основных методов выбора у пациентов с клинически локализованным РПЖ [10]. Тем не менее, более чем у 30 % оперированных пациентов по результатам послеоперационного морфологического исследования выявляются факторы высокого риска прогрессирования заболевания (наличие экстракапсулярной экстензии, инвазии семенных пузырьков, метастатическое поражение регионарных лимфатических узлов, а также сумма баллов Глисона более 6), и одно лишь хирургическое вмешательство может не обеспечить адекватных отдаленных результатов лечения [11], вследствие чего возникает необходимость проведения адъювантной терапии (лучевой и/или гормональной). Адъювантная ЛТ предполагает облучение зоны ложа предстательной железы, семенных пузырьков и, в ряде случаев, регионарных лимфатических узлов, и проводится в течение 1–6 месяцев после РПЭ [12]. Как показали результаты проспективных рандомизированных исследований, ЛТ снижает риск развития БхР и клинического прогрессирования заболевания [13]. Однако до 40 % пациентов, которым аЛТ не проводилась, не продемонстрировали развития БхР заболевания при сроке наблюдения более 10 лет.

Согласно полученным нами данным, проведение аЛТ в общей когорте пациентов существенно улучшало прогноз, однако статистически значимой разницы получено не было.

Степень злокачественности опухоли и предоперационный уровень ПСА являются одними из основных прогностических критериев и наличие умеренно- и низкодифференцированного РПЖ (сумма Глисона 7 и более) ассоциировано с высоким риском системного прогрессирования заболевания. В частности, по данным A. W. Partin, пациенты с патоморфологическим значением суммы Глисона 7, 8–10 и/или поражением семенных пузырьков и/или метастатическим поражением регионарных лимфоузлов таза и/или временем от РПЭ до развития БхР менее двух лет имели выше риск системного прогрессирования, чем местного рецидива ($p < 0,005$) [14]. Согласно результатам настоящего исследования,

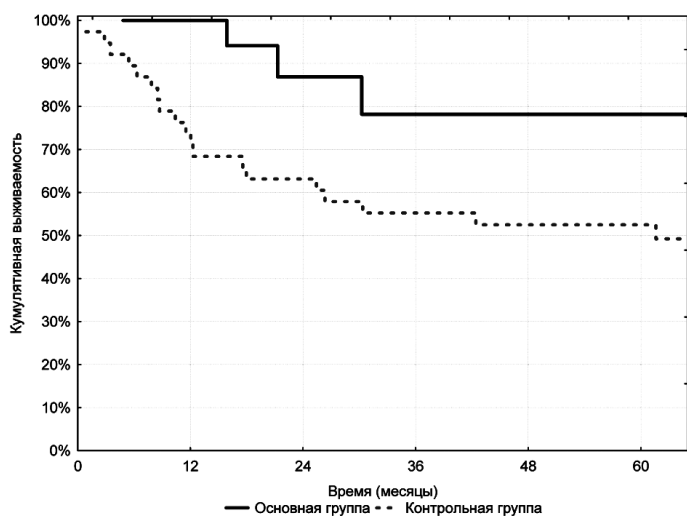


Рис. 2. Выживаемость до биохимического рецидива в зависимости от группы у пациентов с суммой Глисона 6 и менее

Fig. 2. Survival to biochemical recurrence depending on the patient group with the Gleason score equal to 6 or less

применение аЛТ в группе пациентов с суммой Глисона 7 и выше статистически значимо не улучшало показатель ВБхР, что может быть связано с высокой частотой системного прогрессирования заболевания и свидетельствует о недостаточности одной локальной терапии и необходимости дополнительного применения адъювантной гормональной и/или химиотерапии.

В то же время при проведении подгруппового анализа выявлено, что улучшение отдаленных результатов лечения имело место в когорте пациентов с высокодифференцированным раком (сумма Глисона 6 и менее) – проведение аЛТ позволило статистически значимо повысить показатель 5-летней ВБхР более, чем на 25 % по сравнению с группой наблюдения.

Нами не было получено разницы в выживаемости до биохимического рецидива в зависимости от дооперационного уровня ПСА, что возможно связано с достаточно высокими показателями данного маркера в обеих группах (медиана уровня ПСА в основной и контрольной группах составила соответственно 27,2 и 30,5 нг/мл), что также существенно повышает риск системного прогрессирования заболевания.

Заключение. Проведение адъювантной лучевой терапии после РПЭ в суммарной очаговой дозе 60 Гр у пациентов с местно-распространенным РПЖ (pT3a-b) или при локализованном процессе после нерадикального хирургического вмешательства (pT2R1) и высококодифференцированной аденокарциномой (сумма Глисона 6 и менее) по данным послеоперационного морфологического исследования позволяет статистически значимо на 25,7 % повысить 5-летний показатель выживаемости до БХР ($p = 0,047$) по сравнению с наблюдением.

Адъювантное лечение пациентов с местно-распространенным РПЖ и суммой Глисона 7 и более, кроме локальной ЛТ, требует проведения системной терапии.

Список использованных источников

1. Secondary therapy, metastatic progression, and cancer-specific mortality in men with clinically high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy / O. Yossepowitch [et al.] // *Eur. Urol.* – 2008. – Vol. 53, N 5. – P. 950–959. doi.org/10.1016/j.eururo.2007.10.008
2. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin tables) for the new millennium / A. W. Partin [et al.] // *Urology.* – 2001. – Vol. 58, N 6. – P. 843–848. doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01441-8
3. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer / A. Bill-Axelsson [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352, N 19. – P. 1977–1984. doi.org/10.1056/nejmoa043739
4. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer / A. Bill-Axelsson [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364, N 18. – P. 1708–1717. doi.org/10.1056/nejmoa1011967
5. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy / C. R. Pound [et al.] // *J.A.M.A.* – 1999. – Vol. 281, N 17. – P. 1591–1597. doi.org/10.1001/jama.281.17.1591
6. Declining use of radiotherapy for adverse features after radical prostatectomy: results from the National cancer data base / H. M. Sineshaw [et al.] // *Eur. Urol.* – 2015. – Vol. 68, N 5. – P. 768–774. doi.org/10.1016/j.eururo.2015.04.003
7. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus / L. Boccon-Gibod [et al.] // *Int. J. Clin. Pract.* – 2004. – Vol. 58, N 4. – P. 382–390. doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00184.x
8. Moul, J. W. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer / J. W. Moul // *J. Urol.* – 2000. – Vol. 163, N 6. – P. 1632–1642. doi.org/10.1016/s0022-5347(05)67511-8
9. 10-Year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for localized prostate cancer / F. C. Hamdy [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 375, N 15. – P. 1415–1424. doi.org/10.1056/nejmoa1606220
10. The impact of anatomical radical retropubic prostatectomy on cancer control: the 30-year anniversary / J. K. Mullins [et al.] // *J. Urol.* – 2012. – Vol. 188, N 8. – P. 2219–2224. doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.028
11. The role of radiotherapy after radical prostatectomy in patients with prostate cancer / G. Gandaglia [et al.] // *Curr. Oncol. Rep.* – 2015. – Vol. 17, N 12. – P. 53. doi.org/10.1007/s11912-015-0478-5
12. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: long-term results of a randomised controlled trial (EORTC trial 22911) / M. Bolla [et al.] // *Lancet.* – 2012. – Vol. 380, N 9858. – P. 2018–2027. doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61253-7
13. Adjuvant radiotherapy versus wait-and-see after radical prostatectomy: 10-year follow-up of the ARO 96-02/AUO AP 09/95 trial / T. Wiegand [et al.] // *Eur. Urol.* – 2014. – Vol. 66, N 2. – P. 243–250. doi.org/10.1016/j.eururo.2014.03.011
14. Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radical prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases / A. W. Partin [et al.] // *Urology.* – 1994. – Vol. 43, N 5. – P. 649–659. doi.org/10.1016/0090-4295(94)90180-5

References

1. Yossepowitch O., Eggener S. E., Serio A. M., Carver B. S., Bianco F. J., Scardino P. T., Eastham J. A. Secondary therapy, metastatic progression, and cancer-specific mortality in men with clinically high-risk prostate cancer treated with radical prostatectomy. *European Urology*, 2008, vol. 53, no. 5, pp. 950–959. doi.org/10.1016/j.eururo.2007.10.008
2. Partin A. W., Mangold L. A., Lamm D. M., Walsh P. C., Epstein J. I., Pearson J. D. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin tables) for the new millennium. *Urology*, 2001, vol. 58, no. 6, pp. 843–848. doi.org/10.1016/s0090-4295(01)01441-8
3. Bill-Axelsson A., Holmberg L., Ruutu M., Häggman M., Andersson S.-O., Bratell S., Spångberg A., Busch C., Nordling S., Garmo H., Palmgren J., Adami H.-O., Nordin B. J., Johansson J.-E. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 2005, vol. 352, no. 19, pp. 1977–1984. doi.org/10.1056/nejmoa043739
4. Bill-Axelsson A., Holmberg L., Ruutu M., Garmo H., Stark J. R., Busch C., Nordling S., Häggman M., Andersson S.-O., Bratell S., Spångberg A., Palmgren J., Steineck G., Adami H.-O., Johansson J.-E. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 2011, vol. 364, no. 18, pp. 1708–1717. doi.org/10.1056/nejmoa1011967

5. Pound C. R., Partin A. W., Eisenberger M. A., Chan D. W., Pearson J. D., Walsh P. C. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *J.A.M.A.*, 1999, vol. 281, no. 17, pp. 1591–1597. doi.org/10.1001/jama.281.17.1591
6. Sineshaw H. M., Gray P. J., Efstathiou J. A., Jemal A. Declining use of radiotherapy for adverse features after radical prostatectomy: results from the National cancer data base. *European Urology*, 2015, vol. 68, no. 5, pp. 768–774. doi.org/10.1016/j.eururo.2015.04.003
7. Boccon-Gibod L., Djavan B., Hammerer P., Hoeltl W., Kattan M. W., Prayer-Galetti T., Teillac P., Tunn U. W. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. *International Journal of Clinical Practice*, 2004, vol. 58, no. 4, pp. 382–390. doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00184.x
8. Moul J. W. Prostate specific antigen only progression of prostate cancer. *The Journal of Urology*, 2000, vol. 163, no. 6, pp. 1632–1642. doi.org/10.1016/s0022-5347(05)67511-8
9. Hamdy F. C., Donovan J. L., Lane J. A., Mason M., Metcalfe C., Holding P., Davis M., Peters T. J., Turner E. L., Martin R. M., Oxley J., Robinson M., Staffurth J., Walsh E., Bollina P., Catto J., Doble A., Doherty A., Gillatt D., Kockelbergh R., Kynaston H., Paul A., Powell P., Prescott S., Rosario D. J., Rowe E., Neal D. E. 10-Year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for localized prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 2016, vol. 375, no. 15, pp. 1415–1424. doi.org/10.1056/nejmoa1606220
10. Mullins J. K., Feng Z., Trock B. J., Epstein J. I., Walsh P. C., Loeb S. The impact of anatomical radical retropubic prostatectomy on cancer control: the 30-year anniversary. *The Journal of Urology*, 2012, vol. 188, no. 8, pp. 2219–2224. doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.028
11. Gandaglia G., Cozzarini C., Mottrie A., Bossi A., Fossati N., Montorsi F., Briganti A. The role of radiotherapy after radical prostatectomy in patients with prostate cancer. *Current Oncology Reports*, 2015, vol. 17, no. 12, pp. 53. doi.org/10.1007/s11912-015-0478-5
12. Bolla M., van Poppel H., Tombal B., Vekemans K., da Pozzo L., de Reijke T. M., Verbaeys A., Bosset J.-F., van Velthoven R., Colombel M., van de Beek C., Verhagen P., van den Bergh A., Sternberg C., Gasser T., van Tienhoven G., Scalliet P., Haustermans K., Collette L. Postoperative radiotherapy after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer: long-term results of a randomised controlled trial (EORTC trial 22911). *The Lancet*, 2012, vol. 380, no. 9858, pp. 2018–2027. doi.org/10.1016/s0140-6736(12)61253-7
13. Wiegel T., Bartkowiak D., Bottke D., Bronner C., Steiner U., Siegmann A., Golz R., Störkel S., Willich N., Semjonow A., Stöckle M., Rütbe C., Rebmann U., Kälble T., Feldmann H. J., Wirth M., Hofmann R., Engenhardt-Cabillic R., Hinke A., Hinkelbein W., Miller K. Adjuvant radiotherapy versus wait-and-see after radical prostatectomy: 10-year follow-up of the ARO 96-02/AUO AP 09/95 trial. *European Urology*, 2014, vol. 66, no. 2, pp. 243–250. doi.org/10.1016/j.eururo.2014.03.011
14. Partin A. W., Pound C. R., Pearson J. D., Clemens J. Q., Landis P. K., Epstein J. I., Carter H. B., Walsh P. C. Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radical prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases. *Urology*, 1994, vol. 43, no. 5, pp. 649–659. doi.org/10.1016/0090-4295(94)90180-5

Информация об авторах

Красный Сергей Анатольевич – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заместитель директора. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (а/г Лесной, 223040, Минский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: sergeykrasny@tut.by.

Демешко Павел Дмитриевич – д-р мед. наук, заведующий отделом. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (а/г Лесной, 223040, Минский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: pdemeshko@icloud.com.

Поляков Сергей Львович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (а/г Лесной, 223040, Минский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: s.polyakov@yahoo.com.

Степанович Елена Александровна – врач-радиационный онколог. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (а/г Лесной, 223040, Минский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: Lstepanovich@tut.by.

Минич Александр Анатольевич – канд. мед. наук, вед. науч. сотрудник. Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова (а/г Лесной, 223040, Минский р-н, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: alexander.minich@gmail.com.

Information about the authors

Krasny Sergey Anatolievich – Corresponding Member, D. Sc. (Medicine), Professor, Deputy Director. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Lesnoy, 223040, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: sergeykrasny@tut.by.

Demeshko Pavel Dmitrievich – D. Sc. (Medicine), Head of the Department. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Lesnoy, 223040, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: pdemeshko@icloud.com.

Polyakov Sergey Lvovich – Ph. D. (Medicine), Head of the Department. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Lesnoy, 223040, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: s.polyakov@yahoo.com.

Stepanovich Elena Aleksandrovna – Radiation Oncologist. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Lesnoy, 223040, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: Lstepanovich@tut.by.

Minich Alexander Anatolievich – Ph. D. (Medicine), Leading researcher. N. N. Alexandrov National Cancer Centre of Belarus (Lesnoy, 223040, Minsk district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: alexander.minich@gmail.com.

ISSN 1561-8323 (print)

УДК 537.612.2+612.112+591.463

Поступило в редакцию 23.05.2017

Received 23.05.2017

**Г. Г. Верещако¹, И. А. Чешик¹, В. И. Шалатонин², Н. В. Чуешова¹, Г. А. Горох¹,
М. А. Бакшаева¹, А. Е. Козлов¹, Е. В. Цуканова¹**

¹Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь

²Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
Минск, Республика Беларусь

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ И ЭПИДИДИМАЛЬНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ КРЫС К ВОЗДЕЙСТВИЮ МАГНИТНОГО ПОЛЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ ЧАСТОТЫ (50 Гц)

(Представлено членом-корреспондентом В. А. Кульчицким)

Аннотация. В сообщении обсуждаются данные исследований длительного воздействия магнитного поля промышленной частоты (МП ПЧ 50 Гц, 0,4 мТ, 4 ч/день, 5 дней в неделю, суммарное количество 26 дней) на клетки крови и эпидидимальные сперматозоиды крыс Вистар. Установлено, что в различные сроки после воздействия (3-и, 15-е и 30-е сутки) выявляются изменения различных количественных и качественных показателей исследуемых клеток, некоторые из которых сохраняются в отдаленном периоде (30-е сутки после экспозиции).

Ключевые слова: крысы-самцы, лейкоциты, лейкоцитарные элементы крови, эпидидимальные сперматозоиды, жизнеспособность, апоптоз, акрозин, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

Для цитирования: Чувствительность клеток крови и эпидидимальных сперматозоидов крыс к воздействию магнитного поля промышленной частоты (50 Гц) / Г. Г. Верещако [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 115–120.

**Gennady G. Vereschako¹, Igor A. Cheshik¹, Valery I. Shalatonin², Natalya V. Chueshova¹, Gregory A. Gorokh¹,
Margaryta A. Bakshayeva¹, Aliaksandr Ya. Kazlou¹, Elena V. Tsukanova¹**

¹Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

²Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics, Minsk, Republic of Belarus

SENSITIVITY OF RATS BLOOD CELLS AND EPIDIDYMAL SPERMATOZOA TO LOW FREQUENCY MAGNETIC FIELDS (50 Hz)

(Communicated by Corresponding Member Vladimir A. Kulchitsky)

Abstract. The article discusses the data on the long-time effect of low frequency magnetic fields (IF MF 50 Hz, 0.4 mT, 4h/day, 5 days/week, 26 days) on blood cells and spermatozoa of Wistar rats. It was determined that at different times after exposure (3th, 15th and 30th days) the changes in different quantitative and qualitative indicators of test cells were revealed, some of which are kept in 30 days after exposure.

Keywords: male rats, leukocytes, leukocyte blood elements, spermatozoa, viability, apoptosis, acrosyn reaction, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

For citation: Vereschako G. G., Cheshik I. A., Shalatonin V. I., Chueshova N. V., Gorokh G. A., Bakshayeva M. A., Kazlou A. Ya., Tsukanova E. V. Sensibility of rats blood cells and epididymal spermatozoa to low frequency magnetic fields (50 Hz). *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 115–120 (in Russian).

Введение. В настоящее время среди различных антропогенных факторов окружающей среды, оказывающих влияние на организм человека, магнитное поле промышленной частоты (МП ПЧ, 50 Гц) является одним из наиболее значимых, так как многочисленные источники этих полей повсеместно распространены не только на производстве, транспорте, но и в быту. Считается, что действие таких полей низкой частоты сопровождается поглощением электромагнитной энергии тканями и повышением их температуры [1]. Несмотря на то что поглощенная энергия недостаточна для того, чтобы вызвать прямые нарушения в клетках ДНК, в них выявляются генотоксические эффекты, экспрессия генов, индукция апоптоза и другие изменения [2].

Значительное внимание в исследованиях уделяется изучению эффектов облучения МП ПЧ (50 Гц) на репродуктивную систему самцов. В ряде работ показано, что продолжительная (14 дней)

и длительная (85 дней) электромагнитная экспозиция в магнитном поле частота 50 Гц вызывает нарушения ее состояния, в том числе снижение диаметра извитых семенных канальцев, повышение их количества на единицу площади семенников, снижение подвижности сперматозоидов и уровня тестостерона в крови [3], редукцию семенных канальцев, увеличение количества клеток Лейдига и дефектных форм эпидидимальных сперматозоидов [4]. Напротив, другие авторы существенных негативных эффектов при 4- и 8-недельном облучении в течение 4 ч ежедневно на репродуктивную систему взрослых крыс не выявили [5]. В связи с этим объективный анализ действия МП НЧ (50 Гц) на чувствительные клетки крови и эпидидимальные сперматозоиды представляет несомненный интерес.

Цель работы – изучение реакции лейкоцитов и лейкоцитарных элементов крови и эпидидимальных сперматозоидов крыс линии Вистар в различные сроки после воздействия ЭМП ПЧ (50 Гц, 0,4 мТ, 4 ч/день, 5 дней в неделю, суммарная экспозиция 26 дней).

Материалы и методы исследований. Исследования проводили на крысах-самцах линии Вистар (исходный возраст 4,5 мес, масса $344,85 \pm 2,01$ г), находившихся на стандартном пищевом рационе вивария и имевших свободный доступ к питьевой воде. Контролем служили животные аналогичного возраста и пола, содержащиеся в таких же условиях.

Все животные были разделены на две группы: контроль (интактные животные); животные, которые подвергались воздействию МП ПЧ на специальной установке (50 Гц, 0,4 мТ, 4 ч/день) на протяжении 5 дней в неделю, суммарное количество дней экспозиции – 26.

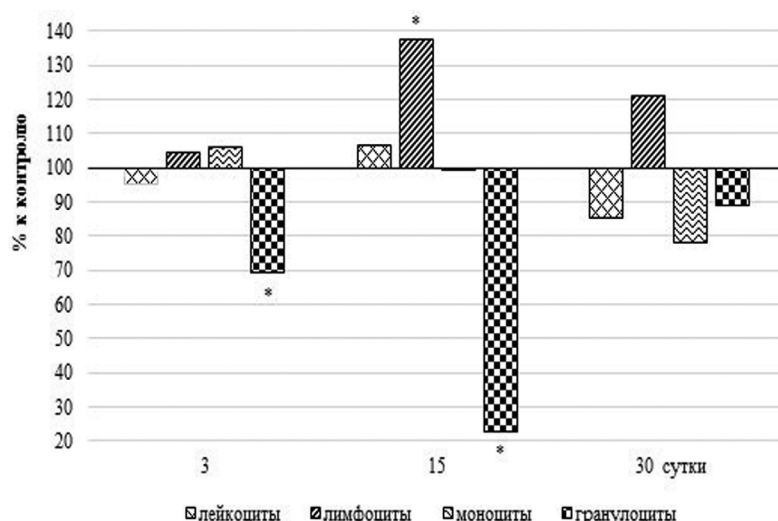
Источником МП являлась установка, состоящая из двух рядом расположенных одинаковых радиальных катушек (катушки Гельмгольца), соединенных таким образом, чтобы обеспечить в них одинаковое направление тока. Расстояние между центрами катушек равнялось их радиусу, что позволило обеспечить наибольшую однородность магнитного поля в рабочей зоне установки. Рабочая зона с магнитным полем, воздействующим на объект исследования, формируется между центрами катушек (примерно $50 \times 50 \times 50$ см).

Опыты проводили на 3-и, 15-е и 30-е сутки после прекращения воздействия. После декапитации животных собирали кровь, в которой определяли количество лейкоцитов и лейкоцитарных элементов крови (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) на гемоанализаторе Celltac MEK-63-18 J/K (Япония), выделяли семенные пузырьки и придатки семенников (эпидидимисы), из которых получали зрелые половые клетки, их количество подсчитывали в камере Горяева [6], определяли жизнеспособность [7], число апоптотических и некротических сперматозоидов [8], активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГФДГ) [9], активность акрозина [10; 11] и содержание фруктозы в семенных пузырьках [12].

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами биологической статистики, используя пакеты программ Excel и GraphPad Prism 5. При сравнении двух независимых групп по количественному признаку использовали критерий Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что магнитное поле промышленной частоты (50 Гц) в различные сроки после воздействия не оказывало существенного влияния на количество лейкоцитов в крови, за исключением их некоторого снижения к 30-м суткам после экспозиции (до 85,2 % по сравнению с контрольной группой). Однако реакция отдельных лейкоцитарных элементов на облучение является значимой. Так, на 15-е и 30-е сутки после воздействия наблюдали повышение количества лимфоцитов, а на 30-е сутки – снижение числа моноцитов (до 78,3 %, $p < 0,05$), в то время как на 3-и и 15-е сутки отмечается выраженное падение числа гранулоцитов (рисунок). По данным [13] после 30-дневного облучения МП ПЧ (50 Гц, 8 ч/день) у беспородных белых мышей выявляется значительный лейкоцитоз за счет существенного повышения количества лейкоцитарных элементов, в том числе лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов.

МП ПЧ (50 Гц) вызывает существенные нарушения количественных и качественных показателей эпидидимальных сперматозоидов. Во все сроки после облучения выявляется статистически значимое падение количества сперматозоидов, которое снижается в большей степени при увеличении срока после прекращения воздействия и составляет на 3-и, 15-е и 30-е сутки соот-



Влияние МП ПЧ (50 Гц, 4 ч/день) на количество лейкоцитов и лейкоцитарные элементы крови крыс-самцов в различные сроки после воздействия

Influence of low frequency magnetic field (50 Hz, 4 h/day) on the number of leucocytes and leucocyte elements of the blood of male rats during different periods after exposure

ветственно 86,7, 75,6 и 59,9 % по отношению к контролю. Одновременно с уменьшением количества зрелых половых клеток происходит падение их жизнеспособности, которое является достоверным для первых двух сроков наблюдения (таблица).

Изменение некоторых показателей эпидидимальных сперматозоидов крыс в различные сроки после продолжительной экспозиции МП ПЧ (50 Гц, 4 ч/день, 5 дней в неделю, 26 дней)

Change in some indicators of epididymal spermatozoa of rats during different periods after exposure to a low frequency magnetic field (50 Hz, 4 h/day, 5 days/week, 26 days)

Показатель Index	Контроль Control	50 Гц 50 Hz	% к контролю % reliable to control
<i>3-е сутки после облучения</i>			
Количество клеток, $\times 10^6 / \text{г}$	$7,38 \pm 0,36$	$6,40 \pm 0,19^*$	87,78
Жизнеспособность, %	$78,17 \pm 3,10$	$69,50 \pm 1,31^*$	88,91
Апоптотические Спз, %	$0,18 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,02^*$	36,36
Некротические Спз, %	$1,78 \pm 0,12$	$3,47 \pm 0,35^*$	194,39
Активность ГАФДс, мЕд/мг белка	$5,99 \pm 1,77$	$9,70 \pm 2,89$	161,94
Активность акрозина, мг /мин	$2,20 \pm 0,72$	$1,28 \pm 0,44$	106,67
<i>15-е сутки после облучения</i>			
Количество клеток, $\times 10^6 / \text{г}$	$7,76 \pm 0,42$	$5,87 \pm 0,48^*$	75,71
Жизнеспособность, %	$79,50 \pm 2,40$	$67,17 \pm 4,42^*$	84,49
Апоптотические Спз, %	$0,80 \pm 0,09$	$1,03 \pm 0,15$	129,17
Некротические Спз, %	$3,10 \pm 0,40$	$3,48 \pm 0,19$	112,37
Активность ГАФДс, мЕд/мг белка	$6,44 \pm 1,61$	$7,56 \pm 1,55$	101,61
Активность акрозина, мг /мин	$1,11 \pm 0,69$	$2,00 \pm 0,65$	180,18
<i>30-е сутки после облучения</i>			
Количество клеток, $\times 10^6 / \text{г}$	$8,45 \pm 0,29$	$5,06 \pm 0,76^*$	59,96
Жизнеспособность, %	$68,83 \pm 1,78$	$60,83 \pm 3,59$	88,38
Апоптотические Спз, %	$0,67 \pm 0,21$	$2,85 \pm 0,63^*$	427,50
Некротические Спз, %	$1,00 \pm 0,15$	$2,75 \pm 0,33^*$	275,00
Активность ГАФДс, мЕд/мг белка	$4,04 \pm 0,66$	$3,12 \pm 0,86$	77,23
Активность акрозина, мг /мин	$1,64 \pm 0,69$	$2,58 \pm 1,11$	157,32

Примечание: * – достоверно к контролю при $p \leq 0,05$.

Note: * – reliable to control at $p \leq 0.05$.

Активность ГФДГ в сперматозоидах, выделенных из эпидидимисов животных, в различные сроки после воздействия МП ПЧ (50 Гц) претерпевает значительные колебания: на 3-и и 15-е сутки выявляется повышение активности этого фермента (соответственно до 161,9 и 117,4 % к контролю), в то время как через месяц его активность снижается до 72,2 %. Отмечается также, что полученные данные отличаются значительной вариабельностью и поэтому статистически не достоверны. Тем не менее, следует учитывать, что активность исследуемого фермента взаимосвязана с подвижностью клеток, т. е. повышение активности фермента указывает на увеличение числа подвижных сперматозоидов. Исходя из этого, можно считать, что действие МП ПЧ (50 Гц) в начальном периоде (3-и сутки) и в меньшей степени на 15-е сутки вызывает определенную стимуляцию подвижности зрелых половых клеток. Такой результат в отношении активности ГФДГ в сперматозоидах облученных животных можно считать не вполне однозначным. В подобном случае повышение активности фермента, вероятно, является следствием увеличения уровня глутатиона в клетках и эффективной работы клеточной системы антиоксидантной защиты, как предполагают некоторые авторы для объяснения реакции ГФДГ при действии некоторых химических факторов [9].

Длительная экспозиция МП ПЧ (50 Гц) вызывает падение акрозиновой реакции до 58,2 % на 3-и сутки после воздействия по сравнению с контрольной группой животных, в последующие сроки интенсивность этой реакции не только восстанавливается, но и значительно превышает контрольные значения до 180,2 и 157,2 % на 15-е и 30-е сутки соответственно. Следовательно, эффективность проникновения сперматозоидов у облученных животных значительно изменяется от низкой в начальном периоде (3-и сутки) до повышенной в последующие сроки наблюдения при последовательно снижающемся количестве половых клеток.

В начальном периоде у крыс-самцов после экспозиции в магнитном поле отмечается выраженное уменьшение числа апоптотических сперматозоидов при существенном нарастании количества погибших половых клеток путем некроза (почти в 2 раза). В отдаленном периоде (30-е сутки) после экспозиции выявляется выраженная гибель зрелых половых клеток как путем апоптоза, так и некроза. При этом число апоптотических и некротических клеток достигает значительных величин, соответственно 427,5 и 275,0 % по сравнению с контролем. Полученные данные находятся в соответствии с результатами исследований, в которых указывается, что длительное воздействие магнитным полем низкой частоты (10 месяцев) при 500 μ T оказывает влияние на активность каспазы 3, являющейся индуктором апоптоза [14].

Изучение содержания фруктозы в семенных пузырьках, которая является основным источником энергообеспечения сперматозоидов, не выявила существенного изменения этого субстрата, за исключением тенденции к ее повышению на 3-и сутки после экспозиции в магнитном поле до $10,82 \pm 2,12$ ммоль/л, в то время как в контроле она составляет $9,38 \pm 0,91$ ммоль/л.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлена повышенная чувствительность лейкоцитарных элементов крови и сперматозоидов, выделенных из эпидидимисов, к длительному действию МП ПЧ (50 Гц). Негативное влияние этого фактора проявляется в значительном падении числа гранулоцитов на 3-и и 15-е сутки, достоверном повышении количества лимфоцитов на 15-е сутки после воздействия и выраженных изменениях количественных и качественных показателей зрелых половых клеток в различные сроки после экспозиции, которые ведут к ухудшению их оплодотворяющей способности у облученных животных.

Заключение. Суммируя вышеизложенное можно отметить, что МП ПЧ (50 Гц, 0,4 мТ, 4 ч/день, на протяжении 5 дней в неделю, суммарное количество дней экспозиции – 26) вызывало значимые изменения количества отдельных лейкоцитарных элементов крови (гранулоциты и лимфоциты) и приводило к выраженным эффектам на изучаемые показатели эпидидимальных сперматозоидов, в том числе к падению их числа и жизнеспособности, нарушению активности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и активности акрозина, значительному повышению числа апоптотических и некротических половых клеток, что, в конечном счете, может негативно отразиться на оплодотворяющей способности эпидидимальных сперматозоидов, определяющих фертильность животных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кудряшов, Ю. Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения / Ю. Б. Кудряшов, Ю. Ф. Перов, А. Б. Рубин. – М.: Физматлит, 2008. – 184 с.
2. Extremely low frequency magnetic fields induce spermatogenic germ cell apoptosis: possible mechanism / S. K. Lee [et al.] // *BioMed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 1–8. doi.org/10.1155/2014/567183
3. Effects of 50 Hz magnetic field on the testes and sperm of adult albino rats / M. Ibrahim [et al.] // *The Open Conference Proceeding J.* – 2014. – Vol. 5, N 1. – P. 8–18. doi.org/10.2174/2210289201405030008
4. Low frequency electromagnetic fields long-term exposure effects on testicular histology, sperm quality and testosterone levels of male rats / A. Bahaodini [et al.] // *Asian Pacific J. Reproduction.* – 2015. – Vol. 4, N 3. – P. 195–200. doi.org/10.1016/j.apjr.2015.06.001
5. Effects of exposure to Extremely Low frequency magnetic fields on Spermatogenesis in adult rats / W. Duan [et al.] // *Bioelectromagnetics.* – 2014. – Vol. 35, N 1. – P. 58–69. doi.org/10.1002/bem.21816
6. Влияние радиационного облучения на витаминный статус и сперматогенез крыс / В. В. Евдокимов [и др.] // *Бюл. эксп. биол. и мед.* – 1997. – Т. 123, № 5. – С. 524–527.
7. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – Geneva, Switzerland: WHO Press, 2010. – 271 p.
8. Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa / R. Z. Mahfouz [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2009. – Vol. 91, N 4. – P. 1110–1118. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.047
9. Низкие концентрации H₂O₂ активируют систему антиоксидантной защиты сперматозоидов человека / В. В. Евдокимов [и др.] // *Биохимия.* – 2015. – Т. 80, № 9. – С. 1431–1439.
10. Химическая природа антиоксидантов и их действие при замораживании семени барана / В. К. Милованов [и др.] // *Животноводство.* – 1981. – № 9. – С. 45–46.
11. Активность акрозина в криоконсервированных спермиях человека / А. В. Дунаевская [и др.] // *Проблемы криобиологии.* – 2003. – № 1. – С. 65–70.
12. Лабораторная диагностика мужского бесплодия / В. В. Долгов [и др.]. – М.; Тверь: «Триада», 2006. – 145 с.
13. Влияние электромагнитного излучения промышленной частоты на гематологические показатели крови грызунов / В. С. Соловьев [и др.] // *Принципы экологии.* – 2016. – № 2. – С. 84–90.
14. Can safe and long-term exposure to extremely low frequency (50 Hz) magnetic fields affect apoptosis, reproduction and oxidative stress / M. Z. Akdag [et al.] // *Int. J. Radiat. Biol.* – 2013. – Vol. 89, N 12. – P. 1053–1060. doi.org/10.3109/09553002.2013.817705

References

1. Kudryashov Yu. B., Perov Yu. F., Rubin A. B. *Radiation biophysics: radio frequency and micro wave electromagnetic radiations.* Moscow, Fizmatlit Publ., 2008. 184 p. (in Russian).
2. Lee S. K., Park S., Gimm Y.-M., Kim Y.-W. Extremely low frequency magnetic fields induce spermatogenic germ cell apoptosis: possible mechanism. *BioMed Research International*, 2014, vol. 2014, pp. 1–8. doi.org/10.1155/2014/567183
3. Ibrahim M., Abdelrahman G., Salem A., Abdelkader G. Effects of 50 Hz magnetic field on the testes and sperm of adult albino rats. *The Open Conference Proceeding Journal*, 2014, vol. 5, no. 1, pp. 8–18. doi.org/10.2174/2210289201405030008
4. Bahaodini A., Owjfar M., Tamadon A., Jafari S. M. Low frequency electromagnetic fields long-term exposure effects on testicular histology, sperm quality and testosterone levels of male rats. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2015, vol. 4, no. 3, pp. 195–200. doi.org/10.1016/j.apjr.2015.06.001
5. Duan W., Liu C., Wu H., Chen C., Zhang T., Gao P., Luo X., Yu Z., Zhou Z. Effects of exposure to Extremely Low frequency magnetic fields on Spermatogenesis in adult rats. *Bioelectromagnetics*, 2014, vol. 35, no. 1, pp. 58–69. doi.org/10.1002/bem.21816
6. Evdokimov V. V., Kodentsova V. M., Vrzhesinskaya O. A., Yakushina L. M., Erasova V. I., Kirpatovsiky V. I., Sakharov I. Y. Influence of radiation on vitamin status and spermatogenesis in rats. *Bulleten experimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1997, vol. 123, no. 5, pp. 524–527 (in Russian).
7. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* 5th ed. WHO Press, Geneva, Switzerland, 2010. 271 p.
8. Mahfouz R. Z., Sharma R. K., Said T. M., Erenpreiss J., Agarwal A. Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 2009, vol. 91, no. 4, pp. 1110–1118. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.047
9. Evdokimov V. V., Barinov K. V., Turovetsky V. B., Muronets V. I., Schmalhausen E. V. Low concentrations of H₂O₂ activate antioxidant defense system of human spermatozoa. *Biohimiya = Biochemistry*, 2015, vol. 80, no. 9, pp. 1431–1439 (in Russian).
10. Milovanov V. K., Koltsov E. A., Shaydullina I. N., Varnavskih V. A. The chemical nature of antioxidants and their behavior when freezing semen of sheep. *Jivotnovodstvo = Animal Breeding*, 1981, no. 9, pp. 45–46 (in Russian).
11. Dunaevskaya A. V., Chub N. N., Kramar M. I., Rodionova V. L. Akrozin activity in cryopreserved human spermatozoa. *Problemye criobiologii = Problems of Cryobiology*, 2003, no. 1, pp. 65–70 (in Russian).
12. Dolgov V. V., Lugovskaya S. A., Fanchenko N. D., Mironov I. I., Nazarov E. K., Rakova N. G., Rakov S. S., Selivanov T. S., Shchelochkov A. M. *Laboratory diagnosis of male infertility.* Moscow; Tver, Triada, 2006. 145 p. (in Russian).

13. Solovyev V. S., Zhevnovskaya A. N., Gashev S. N., Solovyeva S. V. Influence of electromagnetic radiation of industrial frequency on the peripheral blood hematological parameters of the rodents. *Printsipy ekologii = Principles of the Ecology*, 2016, no. 2, pp. 84–90 (in Russian).

14. Akdag M. Z., Dasdag S., Uzunlar A. K., Ulukaya E., Oral A. Y., Çelik N., Akşen F. Can safe and long-term exposure to extremely low frequency (50 Hz) magnetic fields affect apoptosis, reproduction and oxidative stress. *International Journal of Radiation Biology*, 2013, vol. 89, no. 12, pp. 1053–1060. doi.org/10.3109/09553002.2013.817705

Информация об авторах

Верещако Геннадий Григорьевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: vereschako2@tut.by.

Чешик Игорь Анатольевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: igor.cheshik@gmail.com.

Шалатонин Валерий Иванович – канд. техн. наук, доцент. Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники (ул. П. Бровки, 6, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shalatonin@bsuir.by.

Чуешова Наталья Владимировна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: natalya-chueshova@tut.by.

Горох Григорий Андреевич – заведующий лабораторией. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: gyryn@tut.by.

Бакишаева Маргарита Александровна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: m.bakshaeva@yandex.ru.

Козлов Александр Евгеньевич – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: cozlov.aleksander@yandex.ru.

Цуканова Елена Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: elenatsukanova14@gmail.com.

Information about the authors

Vereschako Gennady Grigorievich – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskii Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: vereschako2@tut.by.

Cheshik Igor Anatolievich – Ph. D. (Medicine), Assistant Professor, Director. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskii Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: igor.cheshik@gmail.com.

Shalatonin Valery Ivanovich – Ph. D. (Engineering), Assistant Professor. Belarusian State University of Informatics and Radioelectronics (6, P. Browka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shalatonin@bsuir.by.

Chueshova Natalya Vladimirovna – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskii Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: natalya-chueshova@tut.by.

Gorokh Gregory Andreevich – Head of the Laboratory. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskii Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: gyryn@tut.by.

Bakshayeva Margaryta Alexandrovna – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskii Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: m.bakshaeva@yandex.ru.

Kazlou Aliaksandr Evgenievich – Junior researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskii Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: cozlov.aleksander@yandex.ru.

Tsukanova Elena Vladimirovna – Junior researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninskii Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: elenatsukanova14@gmail.com.

ISSN 1561-8323 (print)

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ
TECHNICAL SCIENCES

УДК 620.22:678.6

Поступило в редакцию 10.05.2017
Received 10.05.2017

Член-корреспондент С. С. Песецкий¹, С. С. Строгонова², В. Н. Коваль¹, В. В. Шевченко¹

¹*Институт механики металлополимерных систем имени В. А. Белого
Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь*

²*ОАО «Могилевхимволокно», Могилев, Республика Беларусь*

**АМОРФИЗАЦИЯ ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА
В СМЕСЯХ С ПЭТ-Г, СОДЕРЖАЩИХ УДЛИНИТЕЛЬ ЦЕПИ**

Аннотация. Исследованы особенности структуры релаксационных, механических и реологических свойств смесей кристаллизующегося ПЭТ и аморфного ПЭТ-Г, содержащих 0,9 мас. % диизоцианатного удлинителя цепи (УЦ). Анализируемые материалы получены смешением в расплаве в двухшнековом реакторе-смесителе с односторонним вращением шнеков. Показано, что при концентрации ПЭТ-Г в смеси ≥ 70 мас. % кристаллизация ПЭТ при добавлении УЦ полностью подавляется. По данным релаксационной спектроскопии ПЭТ и ПЭТ-Г совместимы при их смешении в расплаве.

Ключевые слова: полиэтилентерефталат, смесь полиэфигов, удлинитель цепи

Для цитирования: Аморфизация полиэтилентерефталата в смесях с ПЭТ-Г, содержащих удлинитель цепи / С. С. Песецкий [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 121–128.

Corresponding Member Stepan S. Pesetskii¹, Sniezhana S. Strogonova², Vasily N. Koval¹, Vera V. Shevchenko¹

¹*V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus*

²*Mogilevkhimvolokno Open Joint-stock Company, Mogilev, Republic of Belarus*

**AMORPHIZATION OF POLYETHYLENE TEREPHTHALATE IN BLENDS
WITH PET-G CONTAINING A CHAIN EXTENDER**

Abstract. The present article studies the structural features of relaxation, mechanical and rheological properties of blends of crystallizing PET and amorphous PET-G containing 0.9 wt. % of a diisocyanate chain extender (CE). The analyzed materials were obtained by melt mixing in a twin-screw reactor-mixer with one-sided rotation of screws. It was shown that at a concentration of PET-G in a blend of ≥ 70 wt. % by weight, the crystallization of PET added with CE is completely suppressed. According to relaxation spectrometry, PET and PET-G are compatible when they are mixed in melt.

Keywords: polyethylene terephthalate, polyesters blend, chain extender

For citation: Pesetskii S. S., Strogonova S. S., Koval V. N., Shevchenko V. V. Amorphization of polyethylene terephthalate in blends with PET-G containing a chain extender. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 121–128 (in Russian).

Введение. В последние десятилетия полиэтилентерефталат (ПЭТ) рассматривается как один из важнейших технических полимеров благодаря постоянному и быстрому росту объемов его потребления [1]. Основными областями применения ПЭТ являются волокна, пленки, тонкостенные контейнеры и другая тара для упаковки, разнообразные композиты технического назначения, в том числе получаемые с использованием промышленных полиэфирных отходов [1].

Благодаря низкому водопоглощению, высокой стабильности размеров при переменной влажности, механической прочности и атмосферостойкости ПЭТ потенциально мог бы использоваться для получения светопрозрачных листовых материалов, альтернативных таковым из поликарбоната, акриловых полимеров, ненасыщенных полиэфирных смол и др. Недостатком ПЭТ, ограничивающим его применение в технологии листовых материалов, является способность к кристаллизации, ухудшающая деформационные и особенно светотехнические характеристики листов.

Сравнительно недавно на рынке полимерных материалов появился новый полиэфир –полиэтилентерефталатгликоль (ПЭТ-Г), представляющий собой сополимер терефталевой кислоты и этиленгликоля, в котором часть этиленгликоля заменена на циклогександиметанол-1,4 [2; 3]. В отличие от традиционных модификаций ПЭТ, сополимер типа ПЭТ-Г не обладает регулярностью структуры и относится к числу чрезвычайно трудно кристаллизующихся или вообще не способных к кристаллизации полиэфиров [4]. Вследствие этого данный материал может использоваться для изготовления сравнительно толстостенных листовых или блочных материалов с высокой светопрозрачностью. Его практическое применение сдерживается относительно высокой стоимостью, превышающей стоимость традиционных модификаций ПЭТ.

Учитывая близость химической структуры макромолекул ПЭТ и ПЭТ-Г, можно ожидать, что при их смешении в расплаве могут быть получены смесевые композиты, в которых будет ограничена молекулярная подвижность ПЭТ и затруднена его кристаллизация. Известно также, что сильное ограничение молекулярной подвижности в ПЭТ и замедление кристаллизации достигается при введении в его состав небольших добавок изоцианатных удлинителей цепи (УЦ) [1; 5; 6].

В связи с изложенным, представляло интерес изучить влияние добавок ПЭТ-Г и УЦ на кристаллизруемость ПЭТ и оценить перспективы применения смесевых композитов ПЭТ/ПЭТ-Г для получения конкурентоспособных материалов технического назначения.

Цель работы – изучение влияния добавок ПЭТ-Г и диизоцианатного УЦ на кристаллизруемость ПЭТ, а также комплекс реологических, релаксационных и механических характеристик смесевых материалов.

Материалы и методы исследования. В экспериментах использовали сравнительно медленно кристаллизующийся ПЭТ марки 8200, произведенный ОАО «Могилевхимволокно» (ТУ 6-06-С199–86, характеристическая вязкость в дихлоруксусной кислоте $[\eta] = 0,82$ дл/г, концентрация концевых карбоксильных групп 50,4 ммоль/кг, температура плавления $T_{пл} = 255$ °С, температура кристаллизации $T_{кр} = 187$ °С, температура стеклования $T_c = 82$ °С), а также гранулят аморфного ПЭТ-Г, промышленно выпускаемый фирмой SK Chemicals (Ю. Корея), имеющий плотность 1,27 г/см³, водопоглощение за 24 ч при 23 °С равное 0,13 %, $T_c = 84$ °С.

УЦ служил жидкофазный диизоцианатный продукт марки МГТ-Ж (ТУ ВУ 400084698.265–2014), содержащий в своем составе полиизоцианат, представляющий собой полимерный МДИ – смесь дифенилметан-4,4'-диизоцианата с его изомерами и гомологами; соотношение чистого и полимерного МДИ около 50 % (здесь и далее концентрация выражена в мас. %). Кроме того, в состав МГТ-Ж входил смесевой стабилизатор термоокислительной деструкции насыщенных полиэфиров марки В-561 производства фирмы BASF, ФРГ (смесь термостабилизатора Irgafos 168 и антиоксиданта Irganox 1010 при их массовом соотношении 4 : 1).

Т а б л и ц а 1. Составы исследуемых материалов

Table 1. Test material compositions

Обозначение состава материала Material composition designation	Компоненты, % Components, %			
	ПЭТ PET	ПЭТ-Г PET-G	УЦ CE	В-561
I	99,7	–	–	0,3
II	98,8	–	0,9	0,3
III	–	99,7	–	0,3
IV	–	98,8	0,9	0,3
V	49,7	50	–	0,3
VI	29,7	70	–	0,3
VII	19,7	80	–	0,3
VIII	14,7	85	–	0,3
IX	48,8	50	0,9	0,3
X	28,8	70	0,9	0,3
XI	18,8	80	0,9	0,3
XII	13,8	85	0,9	0,3

Получение материалов и экспериментальных образцов. Технология компаундирования материалов состояла в следующем. Вначале приготавливали механическую смесь предварительно высушенных в вакууме до остаточной влажности не более 0,05 % гранулятов полиэфирных компонентов. Затем, в зависимости от состава (табл. 1), в нее вводили жидкофазный УЦ и тщательно перемешивали компоненты в высокоскоростном двухлопастном смесителе. Далее полученную смесь подвергали компаундированию на экструзионно-грануляционной линии на базе двухшнекового экструдера TSSK-35/40 с односторонним вращением шнеков (производство КНР, диаметр шнеков 35 мм, $L/D = 40$, 10 секций материального цилиндра с независимым нагревом и точным поддержанием температуры в отдельных секциях).

В серии выполненных экспериментов температурные режимы работы материального цилиндра экструдера при компаундировании материалов были идентичными (температура в основных смесительных секциях 4–8 материального цилиндра была постоянной и составляла 270 °С). Частота вращения шнеков составляла 350 об/мин. Длительность пребывания полимерного расплава в материальном цилиндре при этом была равной $\approx 0,5$ мин.

После прохождения материального цилиндра экструдера расплав выдавливался из него через фильеру в виде четырех стренг, которые подвергались водяному охлаждению и гранулированию. Далее полученный гранулят высушивали в вакууме до остаточной влажности $\leq 0,05$ % и использовали для анализа показателя текучести (ПТР), а также вязкости расплава и получения экспериментальных образцов литьем под давлением на термопластавтомате EN-30 (производство Тайвань, объем впрыска 30 см³). Температура литья составляла 265 °С.

Показатели механических свойств определяли при испытаниях методами растяжения и ударного нагружения. Экспериментальные образцы представляли собой лопатки (тип 2 – размер рабочей части 50 × 10 × 4 мм) – для испытаний методом растяжения (ГОСТ 11262–80), а также бруски размером 80 × 10 × 4 мм – для структурных исследований. Испытания при растяжении производили на машине Instron 5657 (Великобритания).

Реологическое поведение расплавов анализируемых материалов оценивали по значениям ПТР (ГОСТ 11645) и вязкости (η), определяемым на приборе 5MPCA фирмы RAY-RAN TEST EQUIPMENT Ltd (Великобритания), главным образом (кроме чистого ПЭТ-Г), при температуре 275 °С и нагрузке 21,6 Н (диаметр капилляра 2,095 мм, длительность выдержки расплава в плавильном цилиндре прибора 4 мин).

Исследования методом релаксационной спектроскопии (РС) проводили с использованием образцов в виде пластин размером 50 × 4 × 1 мм. Их изготавливали на лабораторной литьевой машине поршневого типа с объемом впрыска 5 см³ при температуре расплава 265 °С и температуре формующих элементов формы равной 40 °С. Динамические механические (релаксационные) свойства материалов изучали на основании анализа температурных зависимостей тангенса угла механических потерь ($\text{tg}\delta$) и динамического модуля сдвига (G') образцов. Испытания проводили при использовании обратного крутильного маятника конструкции ИММС НАН Беларуси при частоте 1 Гц; точность измерений температуры составляла $\pm 0,1$ °С, $\text{tg}\delta \pm 3$ %, $G' \pm 1$ % [7].

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) использовали для анализа кристаллической структуры (переходов плавление–кристаллизация). В качестве пробы использовали центральные слои средней части выше упомянутых брусков. Исследования выполняли на приборе Diamond DSC (фирма Perkin Elmer, США) при навеске ≈ 7 мг, скоростях нагрева и охлаждения в токе азота 15 °С/мин.

Результаты и их обсуждение. *Кристаллизруемость материалов по данным ДСК.* Как видно из данных табл. 2 (состав I), ПЭТ подвержен холодной кристаллизации (кристаллизации в твердом состоянии) при нагреве образца в измерительной ячейке калориметра. Значение его $T_{x\text{кр}} = 128$ °С. Кристаллизация из расплава в условиях эксперимента (скорость охлаждения 15 °С/мин) с максимальной скоростью протекает при $T_{\text{кр}} = 194,1$ °С. Степень кристалличности (α) при этом составляет 15,6 %. Введение в ПЭТ добавки диизоцианатного УЦ замедляет кристаллизационные процессы в полиэфире: значения $T_{x\text{кр}}$ повышаются до 131,1 °С, а $T_{\text{кр}}$ снижается до 188,7 °С, почти в два раза уменьшается степень кристалличности ($\alpha = 8,4$ %). Наличие кристаллической фазы в ПЭТ-Г методом ДСК вообще не фиксируется (табл. 2, составы III, IV).

Т а б л и ц а 2. Значения параметров, характеризующих плавление и кристаллизацию полиэфигов по данным ДСК
 T a b l e 2. Values of the parameters of melting and crystallization of polyesters according to differential scanning calorimetry data

Обозначение состава согласно табл. 1 Material composition designation as in Table 1	Холодная кристаллизация Cold crystallization		Плавление Melting		Кристаллизация из расплава Melt crystallization		Степень кристалличности, α , % Crystallinity degree, α , %
	$T_{х\text{кр}}$, °C	$\Delta H_{х\text{кр}}$, Дж/г	$T_{пл}$, °C	$\Delta H_{пл}$, Дж/г	$T_{кр}$, °C	$\Delta H_{кр}$, Дж/г	
I	128,0	21,4	247,2	43,2	194,1	38,9	15,56
II	131,1	21,6	246,6	33,3	183,7	28,1	8,35
III	–	–	–	–	–	–	–
IV	–	–	–	–	–	–	–
V	145,4	18,7	237,4	21,3	–	–	1,86
VI	–	–	223,7	–	–	–	–
VII	–	–	220,6	–	–	–	–
VIII	–	–	222,9	–	–	–	–
IX	–	–	218,2	2,3	–	–	–
X	–	–	–	–	–	–	–
XI	–	–	–	–	–	–	–
XII	–	–	–	–	–	–	–

В смеси ПЭТ/ПЭТ-Г с двойной фазовой непрерывностью (табл. 2, составы V, IX с примерно равными концентрациями ПЭТ и ПЭТ-Г) ПЭТ частично закристаллизован, причем его холодная кристаллизация в составе V без УЦ фиксируется при $T = 145$ °C, что на 17,4 °C превышает такую для исходного полиэфира. При введении УЦ (табл. 2, состав IX) холодная кристаллизация не происходит, а теплота плавления $\Delta H_{пл}$ снижается примерно в 10 раз, что является следствием резкого замедления кристаллизации ПЭТ в смесях с ПЭТ-Г, содержащих УЦ.

Важно также отметить, что в смесях с двойной фазовой непрерывностью наблюдается снижение значений $T_{пл}$ ПЭТ по сравнению с исходным полиэфиром. При этом в смесях, содержащих УЦ (табл. 2, состав IX), это снижение намного существеннее, чем без него (табл. 2, состав V) и составляет 29 °C. Данный факт может быть следствием пластифицирующего влияния аморфного ПЭТ-Г на ПЭТ.

В бинарных смесях ПЭТ/ПЭТ-Г с превалированием фазы ПЭТ-Г (табл. 2, составы VI–VIII) кристаллизация ПЭТ резко замедляется, хотя слабо выраженный пик плавления полиэфира при ≈ 220 – 230 °C проявляется вплоть до [ПЭТ-Г] = 85 % (состав VIII, рис. 1).

Введение добавки УЦ в смеси ПЭТ/ПЭТ-Г приводит к полному подавлению кристаллизации ПЭТ при [ПЭТ-Г] ≥ 70 % (табл. 2). При [ПЭТ-Г] = 70 % в присутствии добавки УЦ ПЭТ в смеси

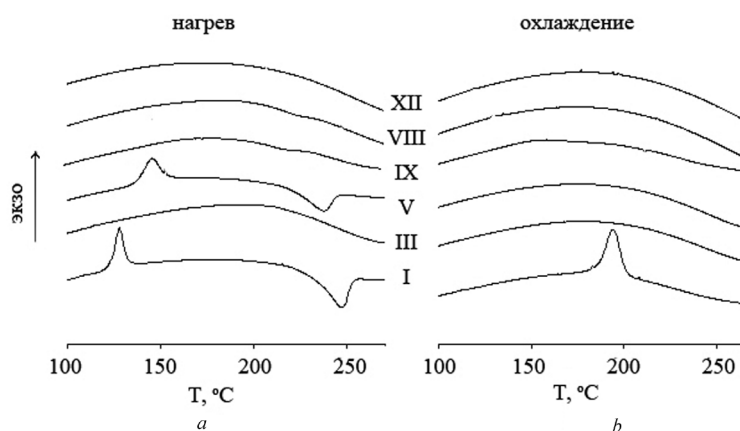


Рис. 1. Кривые ДСК полиэфирных материалов при нагреве (a) и охлаждении (b) образцов; обозначения кривых здесь и на рис. 2 – составы в соответствии с табл. 1

Fig. 1. Curves for differential scanning calorimetry of polyester materials at sample heating (a) and cooling (b); the curves here and in Fig. 2 stand for the compositions as in Table 1

также практически полностью аморфизирован (табл. 2, состав X). Таким образом, при введении добавки УЦ в смеси ПЭТ/ПЭТ-Г при концентрации ПЭТ-Г ≥ 70 % по данным ДСК наблюдается практически полная аморфизация кристаллизующегося ПЭТ.

Анализ материалов методом релаксационной спектроскопии. Значения параметров, характеризующих релаксационные (динамические механические) свойства полиэфирных материалов, приведены в табл. 3, а типичные температурные зависимости тангенса угла механических потерь ($\text{tg} \delta$) и динамического модуля сдвига (G') – на рис. 2.

Т а б л и ц а 3. Релаксационные характеристики полиэфирных материалов

Table 3. Relaxation characteristics of polyester materials

Обозначение состава согласно табл. 1 Material composition designation as in Table 1	T_{β} , °C	T_{α} , °C	$T_{\text{х кр}}$, °C	G'_{-60} , МПа	G'_{20} , МПа	G'_{110} , МПа	G'_{160} , МПа
I	-74,0	82,0	132	1240	955	52	120
II	-73,0	83,6	132	1425	1065	57	125
III	-73,0	84,0	–	1165	850	50	41
IV	-73,5	86,6	–	1125	820	58	55
V	-73,0	83,5	153	1300	970	53	79
VI	-73,4	83,4	–	1223	904	46	55
VII	-73,1	82,3	–	1160	835	44	46
VIII	-72,0	82,7	–	1188	875	49	35
IX	-72,2	82,9	–	1320	975	61	78
X	-73,4	84,6	–	1140	832	49	60
XI	-73,0	82,3	–	1197	859	47	46
XII	-72,5	84,9	–	1157	823	44	51

Как видно из рис. 2 (кривые I), на температурной зависимости $\text{tg} \delta$ ПЭТ имеется три выраженных пика с максимумами при $T_{\beta} = -74$ °C (β -процесс релаксации, характеризующий замораживание подвижности в фениленовых C_6H_4 фрагментах мономерных звеньев макромолекул полиэти-

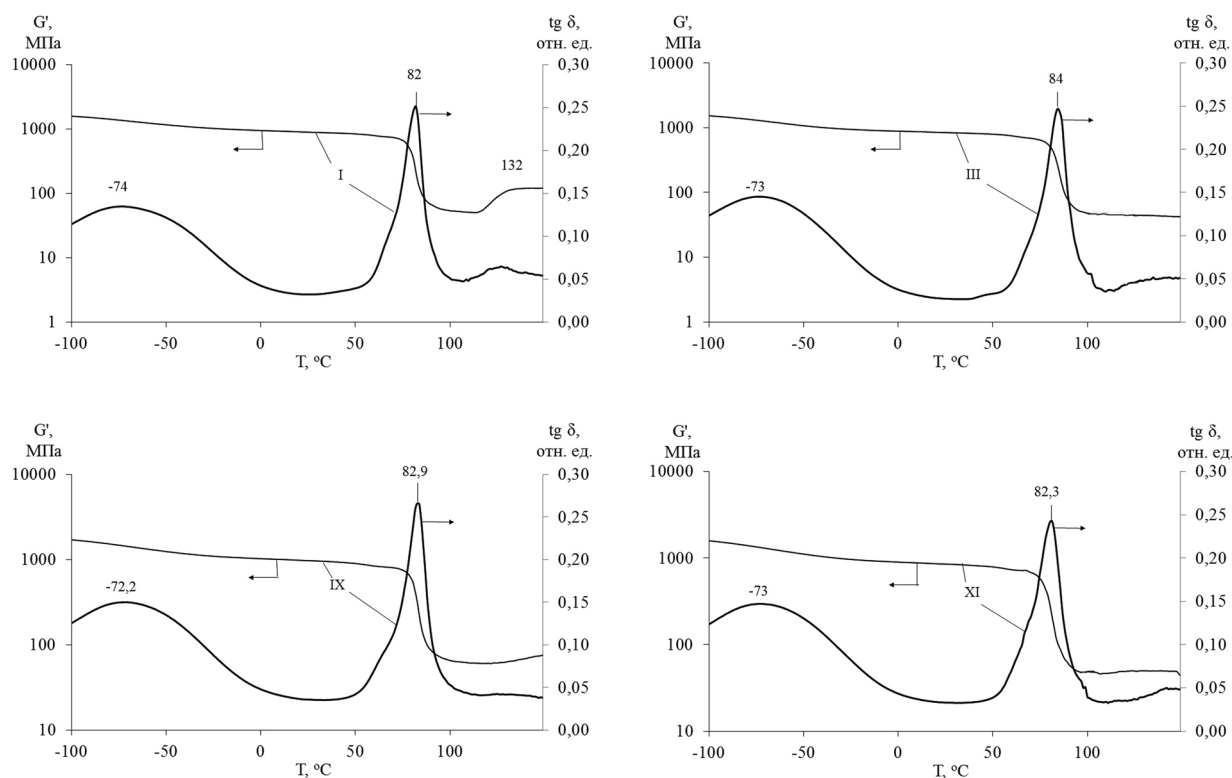


Рис. 2. Температурные зависимости $\text{tg} \delta$ и G' полиэфирных материалов

Fig. 2. Temperature dependences of $\text{tg} \delta$ and G' of polyester materials

лентерефталата) [8]; $T_c = 82$ °С – пик стеклования (замораживание сегментальной подвижности); $T_{x\text{кр}} = 128$ °С, пик, возникающий вследствие протекания процесса холодной кристаллизации в полиэфире [7]. Соответственно на температурной зависимости G' возникают перегибы вследствие снижения данного показателя при размораживании подвижности или его некоторый рост при кристаллизации макромолекул в области $T_{x\text{кр}}$.

Температурные зависимости показателей динамических механических свойств ПЭТ-Г (рис. 2, кривые III) в целом аналогичны таковым для ПЭТ за исключением того, что $T_{c\text{ ПЭТ-Г}} = 84$ °С, что на 2 °С превышает таковую для ПЭТ и отсутствуют признаки холодной кристаллизации материала.

Введение добавки УЦ в полиэфир не изменяет характер релаксационных спектров. Для обоих полиэфиров при этом происходит прирост (на 1,6–2,6 °С) значений T_c (табл. 3, составы II и IV), что может быть следствием ограничения сегментальной подвижности из-за интенсификации межмолекулярных взаимодействий в присутствии диизоцианата. В результате этого, видимо, наблюдается также замедление холодной кристаллизации ПЭТ ($T_{x\text{кр}}$ на 6 °С смещается в область высоких температур).

Смеси ПЭТ/ПЭТ-Г независимо от наличия или отсутствия в их составе УЦ имеют единые T_c и T_β , что свидетельствует о совместимости (возможно термодинамической) компонентов (табл. 3, рис. 2, кривые IX, XI). Значения T_β смесей близки к таковым для индивидуальных компонентов, а T_c находятся в промежутке между температурами стеклования отдельных компонентов, приближаясь к значениям $T_{c\text{ ПЭТ-Г}}$ по мере увеличения [ПЭТ-Г] в смеси.

В отличие от ДСК методом РС холодная кристаллизация ПЭТ в бинарных смесях фиксируется вплоть до концентрации [ПЭТ-Г] = 80 %. Причиной этого является тот факт, что толщина образца, используемого для анализа методом РС, составляет 1 мм, что обеспечивает быстрое охлаждение расплава полиэфира в форме и пониженную кристалличность. В экспериментах с использованием метода ДСК препарирование навесок для анализа осуществлялось из центральной части брусков толщиной 4 мм. Вследствие этого в образцах для ДСК анализа полиэфир был закристаллизован в большей степени.

При введении УЦ в состав смесей ПЭТ/ПЭТ-Г подавление холодной кристаллизации ПЭТ происходит при [ПЭТ-Г] = 70 % (табл. 3).

Таким образом, из данных РС, как и при анализе методом ДСК, следует, что добавки диизоцианатного УЦ способствуют замедлению кристаллизационных процессов в полиэфирных смесях и позволяют получить аморфизированный ПЭТ при [ПЭТ-Г] \geq 70 %.

Определенный интерес представляет анализ влияния добавок УЦ на значения G' при разных температурах, как для индивидуальных полиэфиров, так и для их смесей с различной фазовой структурой. В частности, в табл. 2 приведены значения G' при температурах ниже T_c полиэфиров – $T = -60$ °С (G'_{-60}), 20 °С (G'_{20}) и выше T_c – при $T = 110$ °С (G'_{110} – до протекания процесса холодной кристаллизации ПЭТ), 160 °С (G'_{160} – после протекания холодной кристаллизации в образце). Из табл. 2 видно, что введение УЦ в кристаллизующийся ПЭТ приводит к повышению значений G' независимо от температуры испытаний. Для аморфного ПЭТ-Г эффект упрочнения наблюдается лишь в диапазоне температур выше T_c , когда полимер находится в высокоэластическом состоянии. Следовательно, добавка диизоцианатного УЦ способствует интенсификации межмолекулярного взаимодействия в полиэфирах, в том числе за счет роста молекулярной массы и межмолекулярных реакций, приводящих к частичному сшиванию макромолекул разнородных полиэфиров [9].

В смесях с двойной фазовой непрерывностью (табл. 2, составы V, IX) эффекты упрочнения близки к таковым для чистого ПЭТ, хотя G'_{160} для смесового композита, не содержащего УЦ, несколько ниже, чем для бинарной смеси полиэфиров, что обуславливается более высокой кристалличностью ПЭТ после протекания его холодной кристаллизации. В смесях с преобладанием фазы ПЭТ-Г характер изменений G' при варьировании температуры примерно аналогичен таковому для данного исходного полиэфира как без добавок УЦ, так и при его наличии в полиэфире.

Механические и реологические свойства полиэфирных материалов. Как следует из табл. 4, ухудшение значений показателей важнейших механических свойств при смешении полиэфиров по сравнению с индивидуальными компонентами не происходит.

Т а б л и ц а 4. Показатели механических и реологических свойств полиэфирных материалов

T a b l e 4. Indicators of mechanical and rheological properties of polyester materials

Обозначение состава согласно табл. 1 Material composition designation as in Table 1	σ_{TB} , МПа	σ_{TH} , МПа	ϵ_{TB} , %	ϵ_p , %	σ_{PH} , МПа	ПТР, г/10 мин	η , Па·с
I	55±3,1	23,9	14,4	120	55	35,3	302
II	56±3,0	24,8	14,4	413	167	12,2	872
III	51±2,8	26,9	14,8	82	39	9,5*	1117
IV	50±2,7	27,4	15,1	122	57	3,1*	3440
V	56±3,3	25,4	15,5	63	36	34,2	312
IX	58±3,4	30,6	15,3	90	54	12,1	884
XIII	52±3,0	24,7	15,6	73	41	35,4	301
XIV	60±3,2	29,4	15,0	326	124	12,4	860

Примечание: XIII – ПЭТ-24,7%/ПЭТ-Г-75%/В-561-0,3%; XIV – ПЭТ-22,6%/ПЭТ-Г-75%/УЦ-0,9%/В-561-0,3%; $\sigma_{PH} = \sigma_p(1 + \epsilon_p / 100)$; * – ПТР определен при $T = 250$ °C и $P = 21,6$ Н.

Note: XIII – PET-24.7%/PET-G-75%/B-561-0.3%; XIV – PET-22.6%/PET-G-75%/CE-0.9%/B-561-0.3%; $\sigma_{PH} = \sigma_p(1 + \epsilon_p / 100)$; * – MFI is determined at $T = 250$ °C and $P = 21.6$ Н.

Напротив, по сравнению, по крайней мере с ПЭТ-Г, смеси независимо от их фазовой структуры обладают повышенными значениями верхнего предела текучести (σ_{TB}), определяющего предельные эксплуатационные нагрузки при растяжении. Характерно также, что независимо от типа полиэфирного материала при введении в его состав УЦ существенно повышается деформационная способность, характеризуемая значением ϵ_p , что предопределяет резкое повышение истинной прочности (σ_{PH}) материалов при растяжении. Деформационное поведение исходных полиэфиров и их смесей до момента начала образования шейки примерно одинаково, что подтверждается близкими значениями ϵ_{TB} , характеризующего величину относительной деформации при достижении верхнего предела текучести (табл. 4).

Добавка УЦ, вводимая в полиэфирные материалы в количестве 0,9 %, оказывает сильное влияние на текучесть (вязкость) расплава, снижая значения ПТР примерно в 3 раза. Причинами этого являются повышение молекулярной массы за счет реакций удлинения цепи, а также образование межмолекулярных сшивок при взаимодействии макромолекул, в том числе разнородных полиэфиров с УЦ. Вследствие повышенной вязкости расплава смесей ПЭТ/ПЭТ-Г/УЦ они обладают улучшенной технологичностью при переработке по экструзионным технологиям и, в частности, при производстве листовых материалов.

Таким образом, в смесях ПЭТ/ПЭТ-Г, содержащих изоцианатный удлинитель цепи, может происходить полное подавление кристаллизации ПЭТ. Концентрация ПЭТ-Г при этом должна быть не менее 70 %. Полученные смесевые материалы обладают комплексом улучшенных по сравнению с ПЭТ-Г технико-экономических показателей и повышенной вязкостью расплава, что предопределяет их высокую технологичность при переработке по экструзионным технологиям.

Список использованных источников

1. Pesetskii, S. S. Reactive compatibilization in technology of poly(alkylene terephthalate)-based composites: polyester blends, short fiber-filled materials, and nanocomposites / S. S. Pesetskii, V. V. Shevchenko, V. V. Dubrovsky // Multifunctionality of polymer Composites / ed. K. Friedrich, U. Breuer. Oxford: Elsevier, 2015. – Ch. 9. – P. 302–337. doi.org/10.1016/B978-0-323-26434-1.00009-X
2. Turner, S. R. Amorphous and crystalline polyesters based on 1,4-cyclohexanedimethanol / S. R. Turner, R. W. Seymour, J. R. Dombroski // Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters / ed. J. Scheirsand, T. E. Long. – John Wiley & Sons, Ltd., 2003. – P. 267–292. doi.org/10.1002/0470090685.ch7
3. Schiraldi, D. A. New poly(ethylene terephthalate) copolymers / D. A. Schiraldi // Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters / ed. J. Scheirsand, T. E. Long. – John Wiley & Sons, Ltd., 2003. – P. 245–265. doi.org/10.1002/0470090685.ch6
4. Синтез и свойства аморфного светопрозрачного с-ПЭТ / Н. В. Шевлик [и др.] // Полимерные материалы и технологии. – 2016. – Т. 2, № 3. – С. 35–46.

5. Особенности структуры и свойств полиэтилентерефталата, содержащего добавки углеродных нанонаполнителей и удлинителя цепи / С. С. Песецкий [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 6. – С. 105–110.
6. Agabekov, V. Effect of nanodisperse carbon filler and isocyanate chain extender on structure and properties of poly(ethyleneterephthalate) / V. Agabekov, V. Golubovich, S. Pesetskii // Journal of Nanomaterials. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 870307. – P. 1–7. doi.org/10.1155/2012/870307
7. Песецкий, С. С. Холодная кристаллизация полиэтилентерефталата в смесях с полибутилентерефталатом, армированных стекловолокном / С. С. Песецкий, В. В. Дубровский, В. Н. Коваль // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 4. – С. 106–112.
8. Бартнев, Г. М. Релаксационные свойства полимеров / Г. М. Бартнев, А. Б. Бартенева. – М.: Химия, 1992. – 383 с.
9. Pesetskii, S. S. Effect of isocyanate chain extender on the structure and properties of the blends of poly(butyleneterephthalate) and thermoplastic polyester elastomer / S. S. Pesetskii, V. V. Shevchenko, V. N. Koval // Thermoplastics Composite Materials. – 2016. doi.org/10.1177/0892705716646419

References

1. Pesetskii S. S., Shevchenko V. V., Dubrovsky V. V. Ch. 9. Reactive compatibilization in technology of poly(alkylene terephthalate)-based composites: polyester blends, short fiber-filled materials, and nanomaterials. Friedrich K., Breuer U. (eds). *Multifunctionality of polymer Composites*. Oxford, Elsevier, 2015, pp. 302–337. doi.org/10.1016/B978-0-323-26434-1.00009-X
2. Turner S. R., Seymour R. W., Dombroski J. R. Amorphous and crystalline polyesters based on 1,4-cyclohexanedimethanol. Scheirsand J., Long T. E. (eds). *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters*, John Wiley & Sons, Ltd., 2003, pp. 267–292. doi.org/10.1002/0470090685.ch7
3. Schiraldi D. A. New poly(ethylene terephthalate) copolymers. Scheirsand J., Long T. E. (ed.). *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters*, John Wiley & Sons, Ltd., 2003, pp. 245–265. doi.org/10.1002/0470090685.ch6
4. Shevlik N. V., Stroganova S. S., Tychinskaya L. Yu., Koval V. N., Shcherbina L. A. Synthesis and properties of amorphous translucent c-PET. *Polimernye materialy i tekhnologii = Polymer materials and technologies*, 2016, vol. 2, no. 3, pp. 35–46 (in Russian).
5. Pesetskij S. S., Zhdanok A. S., Krauklis A. V., Bordanovich S. P., Buyakov I. F., Golubovich V. V. Specific features of the structure and properties of polyethyleneterephthalate containing added carbon nanofillers and chain extension. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2010, vol. 57, no. 6, pp. 105–110 (in Russian).
6. Agabekov V., Golubovich V., Pesetskii S. Effect of nanodisperse carbon fillers and isocyanate chain extender on structure and properties of poly(ethyleneterephthalate). *Journal of Nanomaterials*, 2012, vol. 2012, article ID 870307, pp. 1–7. doi.org/10.1155/2012/870307
7. Pesetskii S. S., Dubrovski V. V., Koval V. N. Cold crystallization of polyethyleneterephthalate mixed with polybutyleneterephthalate reinforced with glass fiber. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2011, vol. 55, no. 4, pp. 106–112 (in Russian).
8. Bartenev G. M., Barteneva A. B. *Relaxation properties of polymers*. Moscow, Chemistry Publ., 1992. 383 p. (in Russian).
9. Pesetskii S. S., Shevchenko V. V., Koval V. N. Effect of isocyanate chain extender on the structure and properties of the blends of poly(butyleneterephthalate) and thermoplastic polyester elastomer. *Thermoplastics Composite Materials*, 2016. doi.org/10.1177/0892705716646419

Информация об авторах

Песецкий Степан Степанович – член-корреспондент, д-р техн. наук, профессор, заведующий отделом. Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси (ул. Кирова, 32а, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: otdel5mpri@tut.by.

Строгонова Снежана Святославовна – ОАО «Могилёвхимволокно» (пр. Шмидта, 45, 212035, Могилёв, Республика Беларусь).

Коваль Василий Николаевич – канд. техн. наук, заведующий сектором. Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси (ул. Кирова, 32а, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: Koval_mpri@tut.by.

Шевченко Вера Владимировна – науч. сотрудник. Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси (ул. Кирова, 32а, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: mpri.shevchenko@gmail.com.

Information about the authors

Pesetskii Stepan Stepanovich – Corresponding Member, D. Sc. (Engineering), Professor. Head of the Department. V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (32-a, Kirov Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: otdel5mpri@tut.by.

Stroganova Sniezhana Svyatoslavovna – Mogilevkhimvolokno Open Joint-stock Company (45, Shmidt Ave., 212035, Mogilev, Republic of Belarus).

Koval Vasily Nikolaevich – Ph. D. (Engineering), Head of the Sector. V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (32-a, Kirov Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: Koval_mpri@tut.by.

Shevchenko Vera Vladimirovna – Researcher. V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (32-a, Kirov Str., 246050, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: mpri.shevchenko@gmail.com.