

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

МИНСК. БЕЛОРУССКАЯ НАУКА. 2018. ТОМ 62. № 1

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. Клиин

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. Волотовский – 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. 2018. Т. 62. № 1

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор Т. П. Петрович
Компьютерная верстка Н. И. Кашиба

Сдано в набор 22.02.2018. Выпуск в свет 27.02.2018. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 164 экз. Заказ 31.

Цена: индивидуальная подписка – 10,47 руб.; ведомственная подписка – 25,45 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, 2018

DOKLADY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

MINSK. BELARUSKAYA NAVUKA. 2018. Vol. 62. No. 1

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. 2018. Vol. 62. No. 1

Printed in Russian, Belarusian and English languages

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

Sent for press 22.02.2018. Output 27.02.2018. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 164 copies. Order 31.
Price: individual subscription – 10,47 BYN, departmental subscription – 25,45 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, 2018

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА

| | |
|--|----|
| Янчевский В. И., Рыжков А. А. Структура ветвящихся дискретно нормированных гензелевых инволютивных алгебр с делением..... | 7 |
| Княжище Л. Б. К исследованию устойчивости градиентных систем вторым методом Ляпунова..... | 13 |
| Кудин А. С. Об оценках величин результатов целочисленных полиномов без общих корней..... | 18 |

ФИЗИКА

| | |
|--|----|
| Пархоменко И. Н., Власукова Л. А., Комаров Ф. Ф., Камышан А. С., Урьев Г. А., Мурзич А. Э., Немкаева Р. Р. Структурные особенности костной ткани при коксартрозе, выявленные методом спектроскопии комбинационного рассеяния света..... | 24 |
| Батраков К. Г., Максименко С. А. Стимулированное излучение черенковского типа в графеновых системах..... | 33 |
| Томильчик Л. М. К вопросу об энергии двухчастичного гравитационного взаимодействия..... | 41 |

ХИМИЯ

| | |
|---|----|
| Свирид А. В., Шапиро М. А., Шагойко П. Г., Походня Ю. Г., Гилеп А. А., Усанов С. А. Лиганд-связывающие и каталитические свойства рекомбинантной тромбосансинтазы человека..... | 51 |
| Панибрат О. В., Шабуня П. С., Фатыхова С. А., Жабинский В. Н., Киселев П. А. Антикацерогенная активность брассиностероидов в опухолевых клетках карциномы печени..... | 66 |

БИОЛОГИЯ

| | |
|---|----|
| Урбан В. А., Дудко А. В., Вересов В. Г. Структурные детерминанты вытеснения белка Вах из комплекса ТОМ/Вах белком tBid при апоптозе..... | 73 |
| Щаюк А. Н., Крупнова Э. В., Шепетько М. Н., Михаленко Е. П., Чеботарёва Н. В., Дедик С. Ю., Кильчевский А. В. Генетический полиморфизм внутриклеточных сигнальных путей у пациентов с немелкоклеточным раком легкого..... | 78 |
| Хейдорова Е. Э., Шпак А. В., Гомель К. В., Сидорович В. Е., Демянчик В. В., Прокопчук В. В., Никифоров М. Е. Молекулярно-генетическая идентификация инвазивного вида – шакала азиатского (<i>Canis aureus</i>) на территории Беларуси..... | 86 |

МЕДИЦИНА

| | |
|--|-----|
| Мартиневич Г. Г., Мартиневич И. В., Вчрашня А. В., Зенков Н. К., Меньщикова Е. Б., Черенкевич С. Н. Регуляция пролиферативной активности и химиорезистентности опухолевых клеток аскорбатом натрия..... | 93 |
| Калиновская Е. И., Арчакова Л. И., Кузнецова Т. Е., Рыжковская Е. Л., Митюкова Т. А., Полулях О. Е., Басалай А. А., Балашевич Т. В. Изменения микроциркуляторного русла кожи и органов, сопутствующего гормонально-биохимического фона у крыс линии Вистар при моделировании сахарного диабета..... | 101 |

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

| | |
|---|-----|
| Баранова Т. А., Жданов В. Л., Иванов Д. А., Смутьский Я. И., Терехов В. И. Численный анализ присоединенного течения за ребром (на англ. яз.)..... | 109 |
| Ильющенко А. Ф., Овчинников В. И. Особенности зарождения электромагнитного поля в условиях ионизации продуктов взрыва..... | 115 |
| Дубровский В. В., Адериха В. Н., Шаповалов В. А., Песецкий С. С. Влияние гибридного наполнения коротким стекловолокном и терморасширенным графитом на структуру и свойства полиэтиленерефталата..... | 120 |

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

CONTENTS

MATHEMATICS

| | |
|---|----|
| Yanchevskii V. I., Ryzhkov A. A. Structure of ramified discretely valued henselian division algebras with involutions..... | 7 |
| Knyazhishche L. B. Investigation of the stability of gradient systems by the second Lyapunov method..... | 13 |
| Kudin A. S. On the estimates of resultant values of integer polynomials without common roots..... | 18 |

PHYSICS

| | |
|--|----|
| Parkhomenko I. N., Vlasukova L. A., Komarov F. F., Kamyshan A. S., Uryev G. A., Murzich A. E., Nemkaeva R. R. Raman spectroscopy study of the bone tissue with coxarthrosis | 24 |
| Batratkov K. G., Maksimenko S. A. Cherenkov-type stimulated emission in graphene-based systems | 33 |
| Tomilchik L. M. On the two-particle gravitational interaction energy problem..... | 41 |

CHEMISTRY

| | |
|--|----|
| Svirid A. V., Shapira M. A., Shahoika P. G., Pakhadnia Yu. G., Gilep A. A., Usanov S. A. Ligand-binding and catalytic properties of recombinant human thromboxane synthase..... | 51 |
| Panibrat O. V., Shabunya P. S., Fatykhava S. A., Zhabinskii V. N., Kiselev P. A. Anticancerogenic activity of brassinosteroids in liver tumor cells | 66 |

BIOLOGY

| | |
|--|----|
| Urban V. A., Dudko A. V., Veresov V. G. Structural determinants of Bax displacement from the TOM/Bax complex by tBid during apoptosis | 73 |
| Shchayuk A. N., Krupnova E. V., Shapetska M. N., Mikhalenka A. P., Chebotareva N. V., Dedik S. Y., Kilchevsky A. V. Genetic polymorphism of intracellular signal pathways in patients with non-small cell lung cancer..... | 78 |
| Kheidorova E. E., Shpak A. V., Homel K. V., Sidorovich V. E., Demianchuk V. V., Prakapchuk V. V., Nikiforov M. E. Molecular genetic identification of the invasive species – asian jackal (<i>Canis aureus</i>) in the territory of Belarus | 86 |

MEDICINE

| | |
|---|-----|
| Martinovich G. G., Martinovich I. V., Vcherashniaya A. V., Zenkov N. K., Menshchikova E. B., Cherenkevich S. N. Regulation of the proliferative activity and chemoresistance in tumor cells by sodium ascorbate..... | 93 |
| Kalinovskaya E. I., Archakova L. I., Kuznetsova T. E., Ryzhkovskaya E. L., Mityukova T. A., Poluliakh O. E., Basalai A. A., Balashevich T. V. Changes of the microcirculatory skin bed and organs associated with the hormonal-biochemical background in Wistar rats when modeling diabetes mellitus | 101 |

TECHNICAL SCIENCES

| | |
|---|-----|
| Baranova T. A., Zhdanov V. L., Ivanov D. A., Smulskii Ya. I., Terekhov V. I. Numerical analysis of a reattached flow behind a rib | 109 |
| Ilyushchenko A. F., Ovchinnikov V. I. Origin of an electromagnetic field under ionization conditions of explosion products..... | 115 |
| Dubrovsky V. V., Aderikha V. N., Shapovalov V. A., Pesetskii S. S. Influence of hybrid filling with short glass fibers and thermally expanded graphite on the structure and properties polyethyleneterephthalate | 120 |

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

МАТЕМАТИКА
MATHEMATICS

УДК 514.142

Поступило в редакцию 25.10.2017
Received 25.10.2017

Академик В. И. Янчевский¹, А. А. Рыжков²

¹*Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

**СТРОЕНИЕ ВЕТВЯЩИХСЯ ДИСКРЕТНО НОРМИРОВАННЫХ ГЕНЗЕЛЕВЫХ
ИНВОЛЮТИВНЫХ АЛГЕБР С ДЕЛЕНИЕМ**

Аннотация. Данное сообщение ставит своей целью описание внутренней структуры слабо разветвлённых ветвящихся алгебр с делением, обладающих унитарными инволюциями, над гензелевыми дискретно нормированными полями в виде прямой суммы их алгебр инерции и специальных образующих, принадлежащих идеалам нормирований.

Ключевые слова: алгебра с делением, унитарные инволюции, слабо разветвлённые алгебры

Для цитирования: Янчевский, В. И. Строение ветвящихся дискретно нормированных гензелевых инволютивных алгебр с делением / В. И. Янчевский, А. А. Рыжков // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 7–12.

Academician Vyacheslav I. Yanchevskii¹, Alexander A. Ryzhkov²

¹*Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

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

**STRUCTURE OF RAMIFIED DISCRETELY VALUED HENSELIAN DIVISION ALGEBRAS
WITH INVOLUTIONS**

Abstract. The aim of the article is to describe the inner structure of ramified division algebras with second-kind involutions over discretely valued henselian fields as the direct sum of their inertial algebras and special generators from valuation ideals.

Keywords: division algebra, unitary involutions, tamely ramified algebras

For citation: Yanchevskii V. I., Ryzhkov A. A. Structure of ramified discretely valued Henselian division algebras with involutions. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 7–12 (in Russian).

Введение. Проблема неразветвлённых подъёмов подалгебр алгебр вычетов алгебр с нормированием восходит ещё к классическому периоду (напр., [1]). С другой стороны, в работах Э. Витта [2], У. Шарлау [3] и других эта проблема изучалась в контексте изучения групп Брауэра полей с нормированием. Наконец, в работах Джейкоба, Уодсворта [4] и Платонова, Янчевского [5] она была полностью решена в случае слабо разветвлённых алгебр над полями с произвольными гензелевыми нормированиями. В теории линейных алгебраических групп важное значение имеет описание групп рациональных точек, которые возникают как специальные унитарные группы одномерных анизотропных эрмитовых форм алгебр с делением, обладающих унитарными инволюциями (т. е. с нетривиальным действием на центре заданной алгебры). Для инволютивных алгебр (т. е. алгебр с такими инволюциями τ) вышеупомянутая проблема является более сложной, так как в этой ситуации требуется не только установление существования неразветвлённых подъёмов, но также и их τ -инвариантность.

Напомним, что со всякой алгеброй, обладающей унитарной инволюцией τ , связан целый класс центринвариантных инволюций (т. е. инволюций, действующих на центре алгебры также как и τ). В [6] установлено (для случая, когда центр алгебры гензелев дискретно нормирован) существование в классе центринвариантных инволюций инволюции μ с μ -инвариантным неразветвлённым подъёмом алгебры вычетов заданной слабо разветвлённой центральной алгебры с унитарной инволюцией. Для гензелевых дискретно нормированных инволютивных алгебр с унитарными инволюциями τ мы устанавливаем справедливость более сильного чем в [6] утверждения о существовании τ -инвариантного подъёма, не требующего перехода к центринвариантной инволюции. Помимо этого, в [6] было доказано, что подходящий переход к центринвариантной инволюции μ обеспечивает не только существование μ -инвариантной алгебры инерции (т. е. μ -инвариантного неразветвлённого подъёма алгебры вычетов), но также и существование μ -инвариантной образующей идеала нормирования заданной алгебры, действующей специальным образом на алгебре инерции.

Отметим, что упомянутые свойства, связанные со строением алгебр с унитарными инволюциями, оказались достаточными для успешного изучения унитарных групп в случае изотропных форм. Однако при изучении групп, связанных с анизотропными формами, переход к центринвариантным инволюциям оказывается обременительным, что привело к необходимости установления существования τ -инвариантных алгебр инерции и τ -инвариантных образующих идеалов нормирования, специальным образом действующих на алгебре инерции заданной алгебры с заданной инволюцией τ . Доказательство существования таких алгебр инерции и таких τ -инвариантных элементов в случае алгебр с дискретным нормированием приводит к полному описанию внутренней структуры таких алгебр, что и составляет основное содержание сообщения. Наконец, заметим, что представленные результаты играют ключевую роль при описании унитарных приведенных групп Уайтхеда алгебр с делением, обладающих унитарными инволюциями, центральных над гензелевыми дискретно нормированными полями.

Для точного изложения результатов сообщения нам потребуются следующие обозначения и определения.

О п р е д е л е н и е 1. Унитарной инволюцией центральной K -алгебры D называется её анти-автоморфизм τ второго порядка с нетривиальным ограничением на K . Для поля k инвариантов τ поля K , K/k – квадратичное расширение Галуа. В этом случае τ называется K/k -инволюцией.

О п р е д е л е н и е 2. Нормирование поля называется дискретным, если его упорядоченная группа значений изоморфна подгруппе аддитивной группы целых чисел (с естественным порядком).

Пусть K – поле с гензелевым дискретным нормированием ($\text{char } K \neq 2$), D – центральная K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией.

Через $Z(D)$ будем обозначать центр алгебры D .

В случае гензелевого поля k его нормирование v_k однозначно продолжается до нормирований v_K поля K и $v_D = v$ алгебры D .

Тогда для нормирования v определены:

кольцо нормирования $V_D = \{d \in D^* \mid v(d) \geq 0\} \cup \{0\}$;

идеал нормирования $M_D = \{d \in D^* \mid v(d) > 0\} \cup \{0\}$ (единственный двусторонний максимальный идеал кольца V_D);

группа v -единиц $U_D = V_D - M_D = V_D^*$ и её подгруппа $1 + M_D = \{1 + m \mid m \in M_D\}$;

алгебра вычетов $\bar{D} = V_D / M_D$ нормирования v и группа значений $\Gamma_D = v(D^*)$.

Более общо, для произвольного подмножества $S \subset V_D$ через \bar{S} будем обозначать совокупность образов элементов из S при каноническом гомоморфизме (гомоморфизме редукции, гомоморфизме перехода к вычетах) из V_D в \bar{D} .

Так как $V_D^\tau = V_D$ и $M_D^\tau = M_D$, то вместе с инволюцией τ определена её редукция $\bar{\tau} : \bar{D} \rightarrow \bar{D}$ для произвольного $d \in V_D : (d + M_D)^\tau = d^\tau + M_D$.

О п р е д е л е н и е 3. Центральная K -алгебра D с делением индекса n называется циклической, если в ней существует максимальное подполе Z , являющееся циклическим расширением

поля K . В этом случае сама алгебра представляется для подходящего элемента $\Pi \in D$ в виде прямой суммы

$$D = Z + Z\Pi + Z\Pi^2 + \dots + Z\Pi^{n-1},$$

причём автоморфизм i_Π при ограничении на Z индуцирует образующую циклической группы Галуа $\text{Gal}(Z/K)$, поэтому $\Pi^n = \pi \in K$. Такая алгебра будет обозначаться через (Z, π) .

Отметим вначале справедливость следующего утверждения.

Предложение. Пусть K – гензелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ . Тогда D не содержит некоммутативных K -подалгебр, вполне разветвлённых над своими центрами.

Нам потребуется также следующее

Определение 4. Расширение полей L/K называется диэдральным степени n , если его группа Галуа некоммутативна и представима в виде полупрямого произведения циклической группы $\langle h \rangle$ порядка n и группы $\langle \tau \rangle$ второго порядка со следующим определяющим соотношением:

$$\tau h \tau = h^{-1}.$$

С помощью предложения 1 доказывается следующая

Теорема 1. Пусть K – гензелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная ветвящаяся K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ , причём расширение K/k слабо разветвлено. Тогда центр $Z(\bar{D})$ алгебры вычетов – нетривиальное диэдральное расширение поля \bar{k} подходящей степени n , делящее индекс D .

Теорема 2. Пусть K – гензелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная ветвящаяся K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ , причём нормирование поля K дискретно и расширение K/k не является слабо разветвлённым. Тогда центр алгебры вычетов $Z(\bar{D})/\bar{k}$ – либо нетривиальное диэдральное расширение подходящей степени n , делящее индекс D , либо абелево расширение экспоненты 2.

Описание центров $Z(\bar{D})$ алгебр вычетов \bar{D} позволяет установить структуру слабо разветвлённых гензелевых дискретно нормированных центральных ветвящихся K -алгебр с делением, обладающих унитарными K/k -инволюциями. Более точно, имеет место следующая основная теорема, берущая начало в [6].

Теорема 3. Пусть K – гензелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная ветвящаяся K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ . Тогда существуют τ -инвариантная алгебра инерции I_D алгебры D и такой τ -инвариантный элемент $\Pi \in D$, что I_D инвариантна относительно внутреннего автоморфизма i_Π и алгебра D представляется в виде прямой суммы

$$D = I_D + I_D\Pi + I_D\Pi^2 + \dots + I_D\Pi^{n-1},$$

причём автоморфизм i_Π при ограничении на центр I_D индуцирует образующую циклической группы Галуа порядка n центра I_D над полем K .

Для специальных полей \bar{k} теорема 3 позволяет получить более полную информацию о таких алгебрах.

Определение 5. Поле L называется квазиконечным, если оно совершенно и обладает изоморфизмом топологических групп

$$\Phi: \hat{Z} \rightarrow \text{Gal}(L_s/L),$$

где L_s – алгебраическое замыкание L .

Определение 5 эквивалентно тому, что поле L обладает единственным (обязательно циклическим) расширением L_n степени n для любого натурального n , причём объединение L_n даёт поле L_s .

Далее исследуем вышеприведённые алгебры для специальных полей \bar{k} . Для квазиконечных полей имеет место следующее утверждение.

Т е о р е м а 4. Пусть K – гезелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная ветвящаяся K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ , причём k – квазиконечное поле. Тогда $D = K$.

Т е о р е м а 5. Пусть K – гезелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная ветвящаяся K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ , причём k – локальное поле. Тогда существуют τ -инвариантная алгебра инерции I_D алгебры D , являющаяся либо коммутативной, либо кватернионной, и такой τ -инвариантный элемент $\pi \in D$, что алгебра I_D инвариантна относительно внутреннего автоморфизма i_π , а алгебра D представляется в виде

$$D = I_D + I_D\pi + I_D\pi^2 + \dots + I_D\pi^{n-1},$$

причём автоморфизм i_π при ограничении на центр I_D индуцирует образующую циклической группы Галуа порядка n центра I_D над полем K .

Докажем теорему 5 используя следующее утверждение, описывающее слабо разветвлённые алгебры с унитарными инволюциями над локальными полями.

Л е м м а 1. Пусть K – гезелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная ветвящаяся K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ , причём k – локальное поле. Тогда индекс алгебры D не превосходит двух.

Д о к а з а т е л ь с т в о. Вначале заметим, что \bar{D}/\bar{k} – циклическое расширение, поскольку является конечным расширением конечного поля \bar{k} . Обозначим через E неразветвлённый τ -инвариантный подъём \bar{D} в алгебре D . Тогда D является циклической алгеброй вида (KE, γ) для подходящего элемента $\gamma \in K$. Для таких алгебр с унитарными K/k -инволюциями необходимо выполнение следующего условия Алберта:

$$\gamma\gamma^\tau = N_{E/k}(x),$$

где $x \in E$. Учтывая, что $x = \prod_k u$, где \prod_k – простой элемент кольца нормирования поля k , $u \in U_E$. Вычислим нормирование обеих частей последнего равенства:

$$2v(\prod_k) = nv(\prod_k), \quad (1)$$

где $n = \text{ind } D$; \prod_k – простой элемент кольца нормирования поля K . Предположим, что $n > 2$. Тогда приходим к противоречию, поскольку $v(\prod_k) \geq v(\prod_k)$. Далее, пусть $n = 2$. Из того, что расширение E/k неразветвлено и квадратично, заключаем, что $\bar{K} = \bar{k}$. Это возможно в следующих двух случаях: расширение K/k вполне разветвлено и расширение K/k непосредственно. Вначале рассмотрим случай вполне разветвлённого расширения K/k . Тогда $v(\prod_k) = v(\prod_k)/2$, и в виду (1) приходим к противоречию с предположением, что $n > 2$. В случае непосредственного расширения K/k равенство (1) выполняется только при условии $n \leq 2$. Таким образом, $\text{ind } D \leq 2$.

Перейдём к доказательству теоремы 5.

Д о к а з а т е л ь с т в о т е о р е м ы 5. Вначале рассмотрим случай $\bar{\tau}|_{\bar{k}} \neq \text{id}$. Тогда \bar{D} – алгебра с унитарной инволюцией над локальным полем. Следовательно, применяя лемму 1, получаем, что $\text{ind } \bar{D} \leq 2$. Далее, используя основную теорему 3, заключаем, что существует τ -инвариантная алгебра инерции $I_{\bar{D}}$ алгебры \bar{D} , являющаяся либо коммутативной, либо кватернионной.

Далее, пусть $\bar{\tau}|_{\bar{k}} = \text{id}$. Тогда \bar{D} – алгебра с инволюцией первого рода. В этом случае экспонента алгебры совпадает с индексом и не может быть больше двух. Следовательно, \bar{D} либо поле, либо алгебра кватернионов. Таким образом, существует τ -инвариантная алгебра инерции $I_{\bar{D}}$ алгебры \bar{D} , являющаяся либо коммутативной, либо кватернионной. Однако если $I_{\bar{D}}$ является алгеброй кватернионов и \bar{D} – алгебра с инволюцией первого рода, то $I_{\bar{D}} = A \otimes_{Z_\tau} Z$, где A – алгебра кватернионов. Поскольку Z/Z_τ – квадратичное расширение, то оно расщепляет алгебру A . Следовательно, $I_{\bar{D}}$ коммутативна.

Для C_1 -полей \bar{k} существование циклических слабо разветвлённых ветвящихся алгебр с унитарными инволюциями установлено в следующем утверждении.

Т е о р е м а 6. Пусть K – гензелево дискретно нормированное поле, D – слабо разветвлённая центральная ветвящаяся K -алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией τ , причём \bar{k} — C_1 -поле. Тогда для подходящих τ -инвариантного подполя Z и τ -инвариантного элемента π алгебра D вида циклической алгебры (Z, π) .

Д о к а з а т е л ь с т в о. Вначале заметим, что алгебра \bar{D} коммутативна, поскольку \bar{k} – C_1 -поле и все C_1 -поля имеют размерность 1 (см. [7; 8]), и потому группа Брауэра $\text{Br}(\bar{k})$ тривиальна. Следовательно ввиду основной теоремы 3 заключаем, что алгебра инерции $I_D = Z$ является коммутативным расширением поля K и существует τ -инвариантный элемент $\pi \in D$, что автоморфизм i_π при ограничении на Z индуцирует образующую циклической группы Галуа порядка n $\text{Gal}(Z/K)$.

Таким образом, получаем, что алгебра $D = (Z, \pi)$ – ветвящаяся слабо разветвлённая алгебра с делением, обладающая унитарной инволюцией с τ -инвариантным подполем Z и τ -инвариантным элементом π .

В заключение опишем пример построения ветвящейся слабо разветвлённой алгебры D с делением, обладающей унитарной K/k -инволюцией.

Т е о р е м а 7. Пусть \tilde{K}/\tilde{k} – квадратичное расширение Галуа, причём \tilde{k} – C_1 -поле и $\tilde{\varepsilon}_n \in \tilde{k}$ – примитивный корень из 1 степени n , где $n = \text{ind } D$. Тогда для подходящих Z и π существует алгебра $D = (Z, \Pi)$, где $\Pi^n = \pi$.

Д о к а з а т е л ь с т в о. Пусть \tilde{Z}/\tilde{K} – циклическое расширение поля \tilde{K} , порождённое корнем степени n из элемента $b \in \tilde{K}/\tilde{k}$. Для поля \tilde{k} и для дискретной линейно упорядоченной группы \mathbb{Z} существует гензелево поле k такое, что $\bar{k} = \tilde{k}$ и $\Gamma_k = \mathbb{Z}$. Обозначим через Z неразветвлённый подъём \tilde{Z} как \tilde{k} -алгебры. Пусть $D = (Z, \Pi)$ для подходящего элемента $\Pi^n = \pi \in k$. Запишем эту алгебру в следующем виде: $(K(\Pi), \gamma)$ для подходящего элемента $\gamma \in K$. Для таких алгебр с инволюцией второго рода необходимо выполнение критерия Алберта:

$$\gamma\gamma^\tau = N_{K(\Pi)/k}(x), \tag{2}$$

где $x \in E$. Учитывая, что $x = \pi^m u$, вычислим нормирование от обеих частей последнего равенства:

$$2v(\Pi_k) = mv(\Pi_k), \tag{3}$$

где Π_k – простой элемент кольца нормирования поля k ; $u \in U_E$. Равенство (3) становится верным при $m = 2$. В равенстве (2) перейдём к вычетам, учитывая, что $N_{K(\Pi)/k}(x) = \pi^2 u^n$:

$$\bar{v} \bar{v}^\tau = \bar{u}^n, \tag{4}$$

где $\gamma = \pi v$, $v \in U_K$. Заметим, что $\bar{v} \bar{v}^\tau = N_{\tilde{K}/\tilde{k}}(\bar{v})$. Так как \tilde{k} – C_1 -поле и \tilde{K}/\tilde{k} – конечное расширение, отображение нормы $N_{\tilde{K}/\tilde{k}}$ – сюръективно, а потому для подходящего $\bar{v} \in \bar{K}$ имеет место равенство $\bar{v} \bar{v}^\tau = \bar{u}^n$. Таким образом из равенства (2) следует, что

$$\pi^2 v v^\tau = \pi^2 u^n (1 + m), \tag{5}$$

где $m \in M_k$. В силу слабой разветвлённости расширения K/k и взаимной простоты 2 и n заключаем, что $(1 + m) = N_{K/k}(1 + p)$ для подходящего $p \in M_k$. Положим $y = \pi^2 u(1 + p)$. Тогда справедливость равенства $\gamma\gamma^\tau = N_{K(\Pi)/k}(y)$ очевидна ввиду вышеизложенного.

Таким образом, получаем, что алгебра $D = \langle Z, \Pi \rangle$ – циклическая ветвящаяся слабо разветвлённая алгебра с делением, обладающая унитарной K/k -инволюцией, что и требовалось.

З а к л ю ч е н и е. Получен окончательный результат о внутренней структуре слабо разветвлённых ветвящихся алгебр с делением, обладающих унитарными инволюциями τ , над гензелевыми дискретно нормированными полями в виде прямой суммы их τ -инвариантных алгебр инерции и специальных τ -инвариантных образующих, принадлежащих идеалам нормирований.

Список использованных источников

1. Nakayama, T. Divisionsalgebren über diskret bewerteten perfekten Körpern / T. Nakayama // *J. Reine Angew. Math.* – 1938. – Bd. 178. – S. 11–13. doi.org/10.1515/crll.1938.178.11
2. Witt, E. Schiefkörper über diskret bewerteten Körpern / E. Witt // *J. Reine Angew. Math.* – 1937. – Vol. 176. – P. 153–156. doi.org/10.1515/crll.1937.176.153
3. Scharlau, W. Über die Brauer-Gruppe eines Hensel-Körpers / W. Scharlau // *Abh. Math. Sem. Univ. Hamburg.* – 1969. – Vol. 33, N 3–4. – P. 243–249. doi.org/10.1007/bf02992939
4. Jacob, B. Division algebras over Henselian fields / B. Jacob, A. Wadsworth // *Journal of Algebra.* – 1990. – Vol. 128, N 1. – P. 126–179. doi.org/10.1016/0021-8693(90)90047-r
5. Платонов, В. П. Гипотеза Дьедонне о строении унитарных групп над телом и эрмитова K -теория / В. П. Платонов, В. И. Янчевский // *Изв. Акад. наук СССР, сер. матем.* – 1984. – Т. 48, № 6. – С. 1266–1294.
6. Янчевский, В. И. Приведенная унитарная K -теория и тела над гензелевыми и дискретно нормированными полями / В. И. Янчевский // *Изв. Акад. наук СССР, сер. матем.* – 1978. – Т. 42, № 4. – С. 879–918.
7. Серр, Ж.-П. Когомологии Галуа / Ж.-П. Серр. – Москва: Мир, 1968. – 208 с.
8. Serre, J.-P. *Local fields* / J.-P. Serre. – New York; Berlin: Springer-Verlag, 1979. – Vol. 67. – 249 p. doi.org/10.1007/978-1-4757-5673-9

References

1. Nakayama T. Divisionsalgebren über diskret bewerteten perfekten Körpern. *Journal für die reine und angewandte Mathematik (Crelles Journal)*, 1938, bd. 178, s. 11–13 (in German). doi.org/10.1515/crll.1938.178.11
2. Witt E. Schiefkörper über diskret bewerteten Körpern. *Journal für die reine und angewandte Mathematik (Crelle's Journal)*, 1937, vol. 176, pp. 153–156 (in German). doi.org/10.1515/crll.1937.176.153
3. Scharlau W. Über die Brauer-Gruppe eines Hensel-Körpers. *Abhandlungen aus dem Mathematischen Seminar der Universität Hamburg*, 1969, vol. 33, no. 3–4, pp. 243–249 (in German). doi.org/10.1007/bf02992939
4. Jacob B., Wadsworth A. Division algebras over Henselian fields. *Journal of Algebra*, 1990, vol. 128, no. 1, pp. 126–179. doi.org/10.1016/0021-8693(90)90047-r
5. Platonov V. P., Yanchevskii V. I. Dieudonné's conjecture on the structure of unitary groups over a division ring, and hermitian-theory. *Mathematics of the USSR – Izvestiya*, 1985, vol. 25, no. 3, pp. 573–599. doi.org/10.1070/IM1985v025n03ABEH001308
6. Jančevskii V. I. Reduced unitary-theory and division rings over discretely valued hensel fields. *Mathematics of the USSR – Izvestiya*, 1979, vol. 13, no. 1, pp. 175–213. doi.org/10.1070/IM1979v013n01ABEH002018
7. Serre J.-P. *Galois cohomology*. Springer, 1964. 208 p. doi.org/10.1007/978-3-642-59141-9
8. Serre J.-P. *Local fields*. New York, Berlin, Springer-Verlag, 1979, vol. 67. 249 p. doi.org/10.1007/978-1-4757-5673-9

Информация об авторах

Янчевский Вячеслав Иванович – академик, д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий отделом. Институт математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yanch@im.bas-net.by.

Рыжков Александр Андреевич – магистрант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexander.ryzhkov.96@gmail.com.

Information about the authors

Yanchevskii Vyacheslav Ivanovich – Academician, D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Head of the Department. Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yanch@im.bas-net.by.

Ryzhkov Alexander Andreevich – Undergraduate. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexander.ryzhkov.96@gmail.com.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)
УДК 517.9

Поступило в редакцию 15.01.2018
Received 15.01.2018

Л. Б. Княжище

Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

К ИССЛЕДОВАНИЮ УСТОЙЧИВОСТИ ГРАДИЕНТНЫХ СИСТЕМ ВТОРЫМ МЕТОДОМ ЛЯПУНОВА

(Представлено академиком И. В. Гайшуном)

Аннотация. В работе приведены новые достаточные условия наличия экстремума для функции многих переменных. На основе этих условий установлены новые признаки устойчивости и асимптотической устойчивости градиентных систем.

Ключевые слова: устойчивость, градиентные системы, экстремум, метод Ляпунова

Для цитирования: Княжище, Л. Б. К исследованию устойчивости градиентных систем вторым методом Ляпунова / Л. Б. Княжище // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 13–17.

Leonid B. Knyazhishche

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

INVESTIGATION OF THE STABILITY OF GRADIENT SYSTEMS BY THE SECOND LYAPUNOV METHOD

(Communicated by Academician Ivan V. Gaishun)

Abstract. In the article, new sufficient conditions of the extremum of the multivariable functions are shown. New sufficient tests of the stability and the asymptotic stability of gradient systems are stated.

Keywords: stability, gradient systems, extremum, Lyapunov method

For citation: Knyazhishche L. B. Investigation of the stability of gradient systems by the second Lyapunov method. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 13–17 (in Russian).

Введение. При исследовании устойчивости положения равновесия ряда дифференциальных систем вторым методом Ляпунова приходится иметь дело со скалярными функциями многих переменных, в том или ином смысле содержащими информацию о поведении решений в окрестности положения равновесия. При этом достаточно часто существенную роль играет наличие или отсутствие экстремума таких функций в особых точках, положениях равновесия. В связи с этим можно упомянуть, например, теорему Лагранжа–Дирихле об устойчивости для уравнения $\ddot{x} = -\nabla f(x)$, теоремы Ляпунова и Четаева об устойчивости и неустойчивости в гамильтоновых системах, исследование поведения решений градиентных систем. Как правило, существенную роль играет вопрос о знакоопределенности или знакопостоянстве той или иной функции. По сути дела, это вопрос о наличии строгого или нестрогого экстремума в точке покоя [1].

Ниже будет приведено несколько утверждений, которые обобщенно можно назвать достаточными признаками экстремума первого порядка, не использующими значений градиента и, тем более, гессиана в точке экстремума. Кроме того, сформулируем несколько утверждений, иллюстрирующих применение таких признаков при изучении асимптотического поведения решений дифференциальных систем.

Условия экстремума функции многих переменных. Введем несколько обозначений. Пусть U – открытое множество в R_n , содержащее точку $x_0 = 0$. Функция $f: U \rightarrow R$ предполагается, если не оговорено иное, непрерывно дифференцируемой по Фреше в U за исключением, возможно, точки $x_0 = 0$.

Нашей первой задачей будет формулирование достаточных признаков наличия минимума и строгого минимума в точке $x_0 = 0$.

В случае, когда для некоторой окрестности $B_\varepsilon = \{x \in R_n \mid \|x\| \leq \varepsilon\}$ точки $x_0 = 0$ верно $f(x_0) \leq f(x) \forall \|x\| \in B_\varepsilon$, будем говорить, что в точке $x_0 = 0$ достигается минимум. Если же выполнено неравенство $f(x_0) < f(x)$, то – строгий минимум. Не ограничивая общности, можно считать, что $f(0) = 0$.

Символом $\nabla f(x)$, как обычно, обозначается градиент функции f в точке x . Если зафиксирован некоторый базис в R_n , то $\nabla f(x)$ – вектор частных производных. Если функция дважды дифференцируема в точке x , то определена матрица вторых производных $\nabla^2 f(x)$ – гессиан функции f в точке x . Если x и y из R_n , то (x, y) – скалярное произведение векторов x и y , в координатной форме равное $\sum_{i=1}^n x_i y_i$. Норму $\|x\|$ вектора $x \in R_n$ полагаем равной $\|x\| = (x, x)^{1/2}$. Обозначим $S_r(x_0)$ и $B_r(x_0)$ – сфера и открытый шар в R_n с центром в точке x_0 и радиусом r . Если $x_0 = 0$, то будем x_0 опускать и использовать обозначения S_r и B_r . Луч в R_n , исходящий из точки x_0 с направлением x , т. е. $\{x \in R_n \mid x = x_0 + \alpha x, \alpha \geq 0\}$, будем обозначать $l_x(x_0)$, если $x_0 = 0$, то просто l_x . Отметим, что $l_x(x_0) = x_0 + l_x$ в смысле суммы Минковского.

Хорошо известно, что если функция f дифференцируема в точке $x_0 = 0$, то условие $\nabla f(0) = 0$ является необходимым условием экстремума. Это же условие является и достаточным условием локального минимума для выпуклой в некоторой окрестности точки $x_0 = 0$ функции.

Если f дважды дифференцируема в точке $x_0 = 0$, то условие $\nabla^2 f(x_0) \geq 0$ является необходимым, а условие $\nabla^2 f(x_0) > 0$ – достаточным условием минимума. Знакопостоянство и знакоопределенность матрицы $\nabla^2 f(x_0)$ здесь понимаются в общепринятом для матриц смысле.

Пусть $M(r) = \min_{x \in S} f(x)$ – минимальное значение функции f на сфере S_r и MS_r – множество тех точек на сфере радиуса r , в которых f принимает минимальное на этой сфере значение, равное $M(r)$.

Л е м м а 1. Пусть f – непрерывно дифференцируема в проколотом шаре B_H и для каждого $0 < r < H$ и любого $x \in MS_r$ верно неравенство

$$(\nabla f(x), x) \geq 0. \quad (1)$$

Тогда $x_0 = 0$ – точка локального минимума функции f_0 . Если же найдется последовательность $\{r_i\}_i^\infty$, такая, что $r_i \leq H \forall i$ и $r_i \rightarrow 0, i \rightarrow \infty$ и для любого $x \in MS_{r_i}$ верно строгое неравенство

$$(\nabla f(x), x) > 0, \quad (2)$$

то $x_0 = 0$ – точка строго локального минимума.

Д о к а з а т е л ь с т в о несложно получить, заметив, что множество MS_r – компактно при каждом r и условие (1), как нетрудно показать, гарантирует неубывание функции $M(r)$ на множестве $r \in (0, H)$, а условие (2) – ее монотонное возрастание в некоторой окрестности каждой точки r_i .

З а м е ч а н и е 1. Условия леммы при изучении точек максимума, очевидно, необходимо изменить следующим образом. Множество MS_r функции $M(r)$ следует строить опираясь на максимальное значение f на сфере S_r , а знаки в неравенствах (1) и (2) заменить на противоположные.

Отметим, что множество MS_r при каждом r , как правило, будет состоять из небольшого числа точек, однако его явное построение, как и вычленение $M(r)$, достаточно затруднительно.

Пусть $M_1 S_r = \{x \in S_r \mid \nabla f(x) = \alpha(x)x, \alpha(x) \in R\}$ – множество таких x , для которых градиент f коллинеарен x . Отметим, что $\nabla f(x) = \alpha(x)x$ – необходимое условие экстремума функции f на сфере S_r в точке x .

Л е м м а 2. Пусть f – непрерывно дифференцируема в проколотом шаре B_H и для каждого $0 < r < H$ и любого $x \in M_1 S_r$

$$\alpha(x) \geq 0, \quad (3)$$

тогда $x_0 = 0$ – точка локального минимума. Если же найдется последовательность $\{r_i\}_i^\infty$, такая, что $r_i \leq H \forall i, r_i \rightarrow 0, i \rightarrow 0$ и для любого $x \in MS_{r_i}$ верно строгое неравенство

$$\alpha(x) > 0 \tag{4}$$

то $x = 0$ – точка строгого локального минимума.

Доказательство очевидно следует из леммы 1, так как M_1S_r содержит множество MS_r , а из (3) следует (1) и из (4) – (2).

Множество M_1S_r может быть существенно больше множества MS_r , так как в него входят, например, точки максимума функции f на сфере S_r .

Если функция f дважды дифференцируема, то для явного построения множества, меньшего чем M_1S_r , но содержащего MS_r , можно использовать необходимое условие минимума f на сфере S_r второго порядка [2].

Положим $M_2S_r = \{x \in S_r \mid \nabla f(x) = \alpha(x)x \text{ и } (h, \nabla^2 f(x)h) \geq \alpha(x), \forall h \in L_x\}$, где $L_x = \{h \in R_n \mid (x, h) = 0 \text{ и } \|h\| = 1\}$.

Л е м м а 3. Пусть f – дважды дифференцируема в проколотом шаре B_H , для каждого $0 < r < H$ и любого $x \in M_2S_r$ выполнено (3). Тогда x_0 – точка локального минимума. Если найдется последовательность $\{r_i\}_i^\infty$, такая что $r_i \leq H \forall i, r_i \rightarrow 0, i \rightarrow 0$ и для любого $x \in M_2S_r$ верно (4), то $x_0 = 0$ – точка строгого локального минимума.

Доказательство очевидно, поскольку M_2S_r содержит MS_r .

Для описания достаточно широкого класса функций, для которых в условиях леммы 1, 2 неравенства (1) и (3) не только достаточны, но и необходимы, введем следующие определения.

Пусть l_x – луч в R_n , проходящий через точку x . Будем говорить, что функция $-f$ радиально выпукла в направлении x , если она выпукла на отрезке луча l_x , лежащем в U . Если функция f радиально выпукла в направлении x , то будем говорить, что f – радиально вогнута. Если f радиально выпукла для всех x из некоторого множества, то такую функцию будем называть радиально выпуклой для направлений из этого множества. Наконец, скажем, что функция f радиально сохраняет тип выпуклости на направлениях из некоторого множества, если для каждого направления из этого множества функция либо выпукла, либо вогнута. Говоря просто «радиально выпуклая функция», будем иметь ввиду, что множество направлений, для которых функция радиально выпукла, совпадает с U . Аналогично, для радиально вогнутой и радиально сохраняющей тип выпуклости. Отметим, что выпуклая в U функция f является и радиально выпуклой, а вогнутая – радиально вогнутой. Обратное, очевидно, неверно. Линейную функцию будем относить к выпуклым.

У т в е р ж д е н и е 1. Пусть f непрерывно дифференцируема в U и достигает в точке $x \in U$ строгого минимума. Если f радиально сохраняет тип выпуклости для всех $x \in MS_r$ и для таких x , в направлении которых f радиально вогнута, верно $f'_\alpha(ax) \neq 0 \forall \alpha > 0$, таких, что $ax \in U$, то при любом $r > 0$ для всякого $x \in MS_r$ верно (2).

Доказательство очевидно, для $x \in MS_r$, таких, что на l_x функция радиально выпукла.

Рассматривая $x \in MS_r$, такие, что f радиально вогнута, отметим, что $f'_\alpha(ax) = \nabla f(ax)x$. Поскольку $f'_\alpha(ax) \neq 0$, то f не достигает максимума на луче l_x , пока он не выходит из U , а значит, $f'_\alpha(ax)$ сохраняет знак на этом луче. Поскольку $f(ax) > f(0)$, то $f'_\alpha(ax) > 0$. Отсюда очевидно, что $\nabla f(x)x > 0$.

З а м е ч а н и е 2. Если в условиях утверждения 1 заменить множество MS_r на множество M_1S_r (или на множество M_2S_r), то при любом $r > 0$ для всякого $x \in M_1S_r$ (или M_2S_r) будет верно (4).

Доказательство повторяет доказательство утверждения (1).

Таким образом, для функций f , радиально сохраняющих тип выпуклости, леммы 1–3 представляют необходимые и достаточные условия строгого максимума.

З а м е ч а н и е 3. Аналогично доказывается и необходимость условия (1) в лемме 1 и условия (3) в леммах 2, 3, если в точке $x_0 = 0$ функция f достигает не строгого локального минимума.

Доказательство для $x \in MS_r$, таких, что $f(ax) > f(0)$, повторяет доказательство утверждения 1 и приводит к более сильному, чем (1) неравенству (2). Если же x таково, что $f(x) = f(0)$, то

поскольку f радиально сохраняет тип выпуклости, легко получаем, что $f(\alpha x) = f(0) \forall \alpha$, такого, что $\alpha x \in U$. Отсюда очевидно, что $\nabla f(x)x = 0$, т. е. выполнено (1) (а в леммах 2, 3 выполнено равенство $\alpha(x) = 0$, т. е. верно (3)).

Условия устойчивости градиентных систем. Рассмотрим градиентную дифференциальную систему

$$\dot{x} = -\nabla f(x), \nabla f(x_0) = 0, x \in U. \quad (5)$$

Используя в качестве функции Ляпунова $V(x) = f(x)$ и применяя основные положения второго метода Ляпунова, легко получить следующие заключения, заметив, что $\dot{V}(x) = -(\nabla f(x), \nabla f(x))$.

1. Если положение равновесия $x = 0$ системы (5) является точкой локального минимума и изолирована, т. е. в U нет таких точек $x \neq 0$, что $\nabla f(x) = 0$, то $x_0 = 0$ асимптотически устойчиво.

2. Если $x_0 = 0$ – точка строгого локального минимума функции $f(x)$, то положение равновесия $x \equiv 0$ устойчиво.

3. Наличие локального минимума функции $f(x)$ в точке $x_0 = 0$, вообще говоря, не влечет устойчивости [3; 4].

Опираясь на предложенные выше формулировки достаточных условий минимума, можно сформулировать следующее утверждение.

У т в е р ж д е н и е 2. Пусть функция f непрерывно дифференцируема в U , за исключением точки $x = 0$, и $\nabla f(x) = 0$ только при $x = 0$. Если для $x \in U$ из равенства $\nabla f(x) = \alpha(x)x$ следует $\alpha(x) > 0$, то положение равновесия $x \equiv 0$ асимптотически устойчиво.

У т в е р ж д е н и е 3. Пусть в системе (5) функция f дважды дифференцируема в U , за исключением точки $x = 0$, и $\nabla f(x) = 0$ только при $x = 0$.

Если для таких $x \in U$, для которых верно

$$\nabla f(x) = \alpha(x)x, \quad (6)$$

$$(h, \nabla^2 f(x)h) \geq \alpha(x), \forall h \text{ таких, что } (x, h) = 0, \|h\| = 1$$

следует $\alpha(x) > 0$, то положение равновесия $x \equiv 0$ асимптотически устойчиво.

Аналогичным образом, используя признаки строгого минимума из леммы 2 и 3, можно сформулировать условия устойчивости для системы (5). При этом не следует предполагать, что точка $x = 0$ – изолированная критическая точка, поскольку условия (2), (4) допускают наличие точек x , в которых $\nabla f(x) = 0$ вне множеств $M_1 S_r$ (или $M_2 S_r$).

Приведем здесь формулировку, опирающуюся на лемму 3.

У т в е р ж д е н и е 4. Пусть функция f дважды дифференцируема. Если найдется последовательность чисел $r_i > 0$, таких, что $r_i \rightarrow 0$ при $i \rightarrow \infty$ и для таких $x \in U$, что $\|x\| = r_i$ и верны соотношения (6) выполнено неравенство $\alpha(x) > 0$, то положение равновесия $x \equiv 0$ системы (5) устойчиво.

Д о к а з а т е л ь с т в о легко следует из того факта, что функция Ляпунова $v(x) = f(x)$ в данном случае оказывается положительно определенной и имеет знакоотрицательную производную в силу системы (5).

В заключение отметим, что представленный в утверждениях 1–3 метод исследования устойчивости допускает обобщения и на ряд других систем, в которых легко удается строить функции со знакопостоянной производной.

Список использованных источников

1. Гайшун, И. В. Условия устойчивости решений автономных вполне интегрируемых уравнений / И. В. Гайшун, Л. Б. Княжище // Дифференц. уравнения. – 1982. – Т. 18, № 8. – С. 1453–1456.
2. Гороховик, В. В. Конечномерные задачи оптимизации / В. В. Гороховик. – Минск: Изд. центр БГУ, 2007. – 239 с.
3. Absil, P. A. On the stable equilibrium points of gradient systems / P. A. Absil, K. Kurdyka // Systems & Control Letters. – 2006. – Vol. 55, N 7. – P. 573–577. doi.org/10.1016/j.sysconle.2006.01.002
4. Румянцев, В. В. О неустойчивости равновесия голономных консервативных систем / В. В. Румянцев, С. П. Сосницкий // Прикл. матем. и мех. – 1993. – Т. 57, № 6. – С. 144–166.

References

1. Gaishun I. V., Knyazhishche L. B. Conditions for the stability of solutions of autonomous completely integrable equations. *Differentsial'nye uravneniya = Differential equations*, 1982, vol. 18, no. 8, pp. 1453–1456 (in Russian).
2. Gorokhovich V. V. *Finite-dimensional optimization tasks*. Minsk, Publishing Center of the Belarusian State University, 2007. 239 p. (in Russian).
3. Absil P. A., Kurdyka K. On the stable equilibrium points of gradient systems. *Systems & Control Letters*, 2006, vol. 55, no. 7, pp. 573–577. doi.org/10.1016/j.sysconle.2006.01.002
4. Rumyantsev V. V., Sosnitskii S. P. The stability of the equilibrium of holonomic conservative systems. *Journal of Applied Mathematics and Mechanics*, 1993. vol. 57, no. 6, pp. 1101–1122. doi.org/10.1016/0021-8928(93)90088-4

Информация об авторе

Княжище Леонид Болеславович – д-р физ.-мат. наук, гл. науч. сотрудник. Институт математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: klb@im.bas-net.by.

Information about the author

Knyazhishche Leonid Boleslavovich – D. Sc. (Physics and Mathematics), Leading researcher. Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Sorganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: klb@im.bas-net.by.

ISSN 1561-8323 (Print)
 ISSN 2524-2431 (Online)
 УДК 511.42

Поступило в редакцию 22.01.2018
 Received 22.01.2018

А. С. Кудин

Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОБ ОЦЕНКАХ ВЕЛИЧИН РЕЗУЛЬТАНТОВ ЦЕЛОЧИСЛЕННЫХ ПОЛИНОМОВ БЕЗ ОБЩИХ КОРНЕЙ

(Представлено академиком И. В. Гайшуном)

Аннотация. В данной работе мы усиливаем и обобщаем известную лемму из монографии А. О. Гельфонда «Трансцендентные и алгебраические числа» об оценке порядка одновременной аппроксимации нуля значениями двух целочисленных полиномов без общих корней. В лемме Гельфонда утверждается, что если два целочисленных полинома P_1 и P_2 степени не более n_1 и n_2 и высоты не более Q^{μ_1} и Q^{μ_2} соответственно, не имеющие общих корней, принимают в некоторой трансцендентной точке $x \in \mathbb{R}$ значения $|P_1(x)| < Q^{-\tau_1}$ и $|P_2(x)| < Q^{-\tau_2}$, то $\min(\tau_1, \tau_2) < n_1\mu_2 + n_2\mu_1 + \delta$. Лемма Гельфонда и ее аналоги имеют важные приложения во многих проблемах метрической теории диофантовых приближений. Одно из них – результат В. И. Берника 1983 года об оценке сверху размерности Хаусдорфа множества действительных чисел с заданной мерой трансцендентности, который вместе с результатом А. Бейкера и В. Шмидта 1970 года об оценке снизу размерности Хаусдорфа позволил найти ее точное значение. В своей работе В. И. Берник усилил лемму Гельфонда, рассматривая значения полиномов степени не более n и высоты не более Q^μ на некотором интервале длины Q^{-n} и получая более сильное неравенство $\tau + \mu + 2 \max(\tau + \mu - \eta, 0) < 2\mu n + \delta$, $\tau = \min(\tau_1, \tau_2)$. Однако область применения результата В. И. Берника была несколько ограничена из-за необходимости рассматривать одинаковые оценки степени и высоты полиномов. В данной работе мы рассматриваем значения полиномов различной степени и высоты на интервале и получаем более сильную оценку, используя производные более высоких порядков, что усиливает и обобщает лемму А. О. Гельфонда и существующие аналогичные результаты. В работе используются методы теории трансцендентных чисел.

Ключевые слова: диофантовы приближения, размерность Хаусдорфа, трансцендентные числа, результат, лемма Гельфонда, гипотеза Вирзинга

Для цитирования: Кудин, А. С. Об оценках величин результантов целочисленных полиномов без общих корней / А. С. Кудин // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 18–23.

Alexey S. Kudin

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

ON THE ESTIMATES OF RESULTANT VALUES OF INTEGER POLYNOMIALS WITHOUT COMMON ROOTS

(Communicated by Academician Ivan V. Gaishun)

Abstract. In the article we present an improvement to the lemma on the order of simultaneous zero approximation by the values of two integer polynomials without common roots from A. O. Gelfond's monograph "Transcendental and algebraic numbers". The lemma says that if two integer polynomials P_1 and P_2 of degree not exceeding n_1 and n_2 and of height not exceeding Q^{μ_1} and Q^{μ_2} respectively having no roots in common take values $|P_1(x)| < Q^{-\tau_1}$ and $|P_2(x)| < Q^{-\tau_2}$ at some transcendental point $x \in \mathbb{R}$, then $\min(\tau_1, \tau_2) < n_1\mu_2 + n_2\mu_1 + \delta$. Gelfond's lemma and similar results have important applications to many problems of the metric theory of Diophantine approximation. One of such applications is the result due to V. Bernik (1983) on the upper bound for the Hausdorff dimension of the set of real numbers with specified order of zero approximation by the values of integer polynomials. This result along with the result of A. Baker and W. Schmidt (1970) on the lower bound of the Hausdorff dimension of the set mentioned above gives the exact formula. In order to prove the upper bound V. Bernik improved and extended Gelfond's lemma by considering the values of polynomials of degree not exceeding n and of height not exceeding Q^μ on some interval of length Q^{-n} and obtaining a stronger inequality $\tau + \mu + 2 \max(\tau + \mu - \eta, 0) < 2\mu n + \delta$, $\tau = \min(\tau_1, \tau_2)$. However, the need to consider the same estimates for the degree and height of the polynomials is still restrictive and limits the range of problems this result could be applied to. In our work we consider the values of polynomials of different degrees and heights on an interval and obtain a stronger estimate by using higher order derivatives, thus improving and extending Gelfond's lemma and existing similar results. The result is obtained using the methods of the theory of transcendental numbers.

Keywords: Diophantine approximation, Hausdorff dimension, transcendental numbers, resultant, Gelfond’s lemma, Wirsing’s hypothesis

For citation: Kudin A. S. On the estimates of resultant values of integer polynomials without common roots. *Doklady Natsional’noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 18–23 (in Russian).

В монографии А. О. Гельфонда [1] приведена одна лемма, которая утверждает, что два целочисленных полинома без общих корней не могут одновременно принимать слишком малые ненулевые значения в одной точке. Гельфонд использовал ее в своем методе доказательства трансцендентности некоторых чисел. В дальнейшем данная лемма и утверждения, ее усиливающие, нашли широкое применение в метрической теории чисел.

Пусть $P(x) = a_n x^n + \dots + a_1 x + a_0 \in \mathbb{Z}[x]$ – целочисленный полином степени $\deg P = n$ и высоты $H(P) = \max_{0 \leq i \leq n} |a_i|$. Обозначим как \mathcal{P}_n множество целочисленных полиномов степени не более n и как $\mathcal{P}_n(Q)$ множество целочисленных полиномов степени не более n и высоты не более Q . Пусть $\mu(A)$ – мера Лебега измеримого множества $A \subset \mathbb{R}$. Запись $f \ll_{v_1, v_2, \dots} g$ будет означать, что существует некоторая величина $C > 0$ такая, что $f < Cg$. При этом величина C может зависеть от величин v_1, v_2, \dots , но не зависит от f и g . Как $\text{res}(P_1, P_2)$ будем обозначать результат полиномов P_1 и P_2 . В дальнейшем будем считать, что полиномы $T_1(x)$ и $T_2(x)$ имеют коэффициенты и корни, соответственно,

$$\begin{aligned} T_1(x) &= a_0 + a_1 x + \dots + a_{n_1} x^{n_1} = a_{n_1} (x - \alpha_1) \cdot \dots \cdot (x - \alpha_{n_1}), \quad a_{n_1} \neq 0, \\ T_2(x) &= b_0 + b_1 x + \dots + b_{n_2} x^{n_2} = b_{n_2} (x - \beta_1) \cdot \dots \cdot (x - \beta_{n_2}), \quad b_{n_2} \neq 0. \end{aligned}$$

Вышеупомянутую лемму Гельфонда можно сформулировать следующим образом.

Л е м м а 1 [1, лемма V, с. 181]. Пусть $\delta > 0$ – некоторое действительное число, n_1, n_2 – натуральные числа, $Q > Q_0(n, \delta)$ – достаточно большое действительное число. Далее пусть $P_1(x) \in \mathcal{P}_{n_1}(Q^{\mu_1})$, $P_2(x) \in \mathcal{P}_{n_2}(Q^{\mu_2})$, $\mu_1, \mu_2 > 0$ – полиномы без общих корней. Тогда, если для некоторого трансцендентного α выполняются неравенства $|P_1(\alpha)| < Q^{-\tau_1}$, $|P_2(\alpha)| < Q^{-\tau_2}$, то

$$\min(\tau_1, \tau_2) < n_1 \mu_2 + n_2 \mu_1 + \delta.$$

В дальнейшем лемма Гельфонда была усилена В. И. Берником [2], что позволило ему доказать гипотезу А. Бейкера и В. Шмидта [3] о точном значении размерности Хаусдорфа множества всех $x \in \mathbb{R}$, для которых существует бесконечное число полиномов $P \in \mathcal{P}_n$, удовлетворяющих неравенству $|P(x)| < H(P)^{-w}$, $w > n$.

Т е о р е м а 1 [2, лемма 12]. Пусть $\delta > 0$ – некоторое действительное число, n – натуральное, $Q > Q_0(n, \delta)$ – достаточно большое действительное число. Далее пусть $P_1(x), P_2(x) \in \mathcal{P}_n(Q^\mu)$, $\mu > 0$ – полиномы без общих корней. Тогда, если для всех x из некоторого интервала $I \subset (-n, n)$, $|I| = Q^{-\eta}$, $\eta > 0$, выполняются неравенства $\max(|P_1(x)|, |P_2(x)|) < Q^{-\tau}$, $\tau > 0$, то

$$\tau + \mu + 2 \max(\tau + \mu - \eta, 0) < 2\mu n + \delta.$$

Также в работе К. И. Тищенко [4] доказывается аналог леммы Гельфонда с использованием производных первого порядка, что позволило автору добиться [4; 5] улучшения результатов Е. Вирзинга [6].

Некоторые ограничения для применения теоремы 1 возникают из-за необходимости рассматривать одинаковые оценки степени и высоты полиномов. В данной работе мы развиваем методы Тищенко [4] и усиливаем теорему 1, используя производные более высоких порядков и рассматривая полиномы с разными оценками степени и высоты.

Т е о р е м а 2. Пусть $\delta > 0$ – некоторое действительное число, $1 \leq n_1 \leq n_2 \leq n$ – натуральные числа, $Q > Q_0(n, \delta)$ – достаточно большое действительное число, $P_1(x) \in \mathcal{P}_{n_1}$, $P_2(x) \in \mathcal{P}_{n_2}$ – полиномы без общих корней, $H(P_1(x)) \ll_n Q^{\mu_1}$, $H(P_2(x)) \ll_n Q^{\mu_2}$, $\mu_1, \mu_2 > 0$. Тогда, если для всех x из некоторого интервала $I \subset (-c_1(n), c_1(n))$, $|I| \approx_n Q^{-\eta}$, $\eta > 0$, выполняются неравенства $|P_1(x)| \ll_n Q^{-\tau_1}$, $|P_2(x)| \ll_n Q^{-\tau_2}$, $\tau_1, \tau_2 \in \mathbb{R}$, то

$$\hat{\tau} + 2 \sum_{j=1}^{n_1-1} \max(\hat{\tau} - j\eta, 0) + (1 + n_2 - n_1) \max(\hat{\tau} - n_1\eta, 0) < n_1\mu_2 + n_2\mu_1 + \delta, \quad (1)$$

где

$$\hat{\tau} = \min(\tau_1 + \mu_1, \tau_2 + \mu_2).$$

В доказательстве теоремы 2 будут использоваться следующие утверждения.

Л е м м а 2. Пусть даны полиномы $T_1(x), T_2(x) \in \mathbb{C}[x]$ степени $1 \leq n_1 \leq n_2$ вместе с оценками величин их коэффициентов

$$\begin{aligned} |a_l| &\leq L_l, \quad l = 0, \dots, n_1, \\ |b_l| &\leq L_l, \quad l = 0, \dots, n_2, \end{aligned}$$

где L_l удовлетворяют условиям

$$\begin{aligned} 0 < L_0 &\leq L_1 \leq \dots \leq L_{n_2}, \\ \frac{L_0}{L_1} &\leq \frac{L_1}{L_2} \leq \dots \leq \frac{L_{n_2-1}}{L_{n_2}}. \end{aligned} \quad (2)$$

Тогда величина результата $\text{res}(T_1, T_2)$ заданных полиномов оценивается как

$$|\text{res}(T_1, T_2)| \leq (n_1 + n_2)! \cdot \bar{R},$$

где

$$\bar{R} = L_0(L_1 \cdot \dots \cdot L_{n_1-1})^2 L_{n_1}^{1+n_2-n_1}.$$

Д о к а з а т е л ь с т в о. Запишем результат $\text{res}(T_1, T_2)$ как определитель матрицы Сильвестра полиномов T_1 и T_2 :

$$M = \begin{pmatrix} \left. \begin{matrix} a_0 & a_1 & \dots & a_{n_1} \\ & \ddots & \ddots & \\ & & a_0 & a_1 & \dots & a_{n_1} \end{matrix} \right\} n_2 \\ \left. \begin{matrix} b_0 & b_1 & \dots & b_{n_2} \\ & \ddots & \ddots & \\ & & b_0 & b_1 & \dots & b_{n_2} \end{matrix} \right\} n_1 \end{pmatrix} = (m_{i,j})_{\substack{i=1,\dots,n_1+n_2 \\ j=1,\dots,n_1+n_2}},$$

$$\text{res}(T_1, T_2) = \det M = \sum_{\sigma \in S_{n_1+n_2}} \text{sgn } \sigma \prod_{i=1}^{n_1+n_2} m_{i,\sigma(i)} = \sum_{\sigma \in S_{n_1+n_2}} \text{sgn } \sigma \prod_{j=1}^{n_1+n_2} m_{\sigma(j),j},$$

где $\text{sgn } \sigma$ – знак перестановки σ .

Дополнительно определим величины L_l при $l = -n_2 + 1, \dots, -1$ и $l = n_2 + 1, \dots, n_1 + n_2 - 1$ так, чтобы выполнялись аналоги условий (2):

$$\begin{aligned} 0 < L_{-n_2+1} &\leq \dots \leq L_0 \leq L_1 \leq \dots \leq L_{n_2} \leq \dots \leq L_{n_1+n_2-1}, \\ \frac{L_{-n_2+1}}{L_{-n_2+2}} &= \dots = \frac{L_{-1}}{L_0} = \frac{L_0}{L_1} \leq \frac{L_1}{L_2} \leq \dots \leq \frac{L_{n_2-1}}{L_{n_2}} = \frac{L_{n_2}}{L_{n_2+1}} = \dots = \frac{L_{n_1+n_2-2}}{L_{n_1+n_2-1}}. \end{aligned} \quad (3)$$

Из свойства (3) непосредственно следует, что для любых индексов $-n_2 + 1 \leq l_1, l_2, l_3, l_4 \leq n_1 + n_2 - 1$, удовлетворяющих условиям $l_1 \leq l_3$ и $l_1 - l_2 = l_3 - l_4 < 0$, справедливо

$$\frac{L_{l_1}}{L_{l_2}} = \frac{L_{l_1}}{L_{l_1+1}} \frac{L_{l_1+1}}{L_{l_1+2}} \cdot \dots \cdot \frac{L_{l_2-1}}{L_{l_2}} \leq \frac{L_{l_3}}{L_{l_3+1}} \frac{L_{l_3+1}}{L_{l_3+2}} \cdot \dots \cdot \frac{L_{l_4-1}}{L_{l_4}} = \frac{L_{l_3}}{L_{l_4}}. \quad (4)$$

Определим матрицу $\bar{M} = (\bar{m}_{i,j})_{\substack{i=1,\dots,n_1+n_2 \\ j=1,\dots,n_1+n_2}}$,

$$\bar{m}_{i,j} = \begin{cases} L_{-i+j}, & i \leq n_2, \\ L_{-i+j+n_2}, & i > n_2, \end{cases}$$

заменяя в матрице Сильвестра M коэффициенты полиномов их оценками L_l , а нулевые элементы заменяя на дополнительно определенные величины L_l .

Из определения M следует, что для любой перестановки $\sigma \in S_{n_1+n_2}$ имеет место

$$\left| \prod_{j=1}^{n_1+n_2} m_{\sigma(j),j} \right| \leq \left| \prod_{j=1}^{n_1+n_2} \bar{m}_{\sigma(j),j} \right|,$$

поэтому для доказательства леммы достаточно доказать справедливость оценки

$$\bar{\Pi}(\sigma) = \left| \prod_{j=1}^{n_1+n_2} \bar{m}_{\sigma(j),j} \right| \leq \bar{R}. \tag{5}$$

Заметим, что если для $\sigma \in S_{n_1+n_2}$ при $1 \leq j_1 < j_2 \leq n_1 + n_2$ выполняется одно из неравенств $n_2 \geq \sigma(j_1) > \sigma(j_2)$ или $\sigma(j_1) > \sigma(j_2) > n_2$, то для перестановки $\sigma' = (\sigma(j_1)\sigma(j_2))\sigma$ справедливо

$$\bar{\Pi}(\sigma) \leq \bar{\Pi}(\sigma'). \tag{5}$$

Рассмотрим, например, случай $n_2 \geq \sigma(j_1) > \sigma(j_2)$. Второй случай рассматривается аналогично. Неравенство (5) сводится к неравенству $L_{-\sigma(j_1)+j_1}L_{-\sigma(j_2)+j_2} \leq L_{-\sigma(j_2)+j_1}L_{-\sigma(j_1)+j_2}$, которое выполняется в силу (4), если взять $l_1 = -\sigma(j_1) + j_1$, $l_2 = -\sigma(j_1) + j_2$, $l_3 = -\sigma(j_2) + j_1$, $l_4 = -\sigma(j_2) + j_2$.

Также заметим, что если для $\sigma \in S_{n_1+n_2}$ при $1 \leq j_1, j_2 \leq n_1 + n_2$ выполняется неравенство $\sigma(j_1) + n_2 = \sigma(j_2)$, то для перестановки $\sigma' = (\sigma(j_1)\sigma(j_2))\sigma$ справедливо

$$\bar{\Pi}(\sigma) = \bar{\Pi}(\sigma'). \tag{6}$$

Пусть $\sigma \in S_{n_1+n_2}$ – некоторая перестановка. Начиная с первого столбца, используя свойства (5) и (6), будем последовательно переходить от перестановки σ к перестановкам σ_j , дающим максимальное значение $\bar{m}_{\sigma_j(j),j}$ в j -м столбце. Таким образом, получим цепочку $\bar{\Pi}(\sigma) \leq \bar{\Pi}(\sigma_1) \leq \dots \leq \bar{\Pi}(\sigma_{n_1+n_2})$, где

$$\sigma_{n_1+n_2}(j) = \begin{cases} \frac{j}{2} + \frac{1}{2}, & j \leq 2n_1 \wedge j \notin 2\mathbb{Z}, \\ \frac{j}{2} + n_2, & j \leq 2n_1 \wedge j \in 2\mathbb{Z}, \\ j - n_1, & j > 2n_1, \end{cases}$$

откуда $\bar{\Pi}(\sigma_{n_1+n_2}(j)) = \bar{R}$. Лемма 2 доказана.

Л е м м а 3 [4, лемма 3.3]. Пусть даны полиномы $T_1(x), T_2(x) \in \mathbb{C}[x]$, а также некоторая точка $\xi \in \mathbb{C}$. Тогда результат полиномов $T_1(x)$ и $T_2(x)$ равен результату полиномов $\bar{T}_1(x) = T_1(x + \xi)$ и $\bar{T}_2(x) = T_2(x + \xi)$.

Д о к а з а т е л ь с т в о. Нетрудно заметить, что

$$\text{res}(T_1(x), T_2(x)) = a_{n_1}^{n_2} b_{n_2}^{n_1} \prod_{\substack{1 \leq i \leq n_1 \\ 1 \leq j \leq n_2}} (\alpha_i - \beta_j) = a_{n_1}^{n_2} b_{n_2}^{n_1} \prod_{\substack{1 \leq i \leq n_1 \\ 1 \leq j \leq n_2}} ((\alpha_i - \xi) - (\beta_j - \xi)) = \text{res}(\bar{T}_1(x), \bar{T}_2(x)).$$

Лемма 3 доказана.

Д о к а з а т е л ь с т в о т е о р е м ы 2. Пусть $\deg P_1(x) = m_1 \leq n_1$, $\deg P_2(x) = m_2 \leq n_2$. Полиномы $P_1(x)$ и $P_2(x)$ в совокупности имеют не более $2n$ корней, поэтому найдутся два различных, отличных от данных корней, целых числа $|r_1|, |r_2| \ll_n 1$. Введем целочисленные полино-

мы $T_k(x) = P_k(x)(x - r_k)^{n_k - m_k}$, $k = 1, 2$. Нетрудно убедиться, что для них справедливы те же оценки высоты и значений на интервале I :

$$\deg T_k(x) = n_k, \quad H(T_k(x)) \ll_n Q^{\mu_k}, \quad \forall x \in I: |T_k(x)| \ll_n Q^{-\tau_k}, \quad k = 1, 2.$$

Так как целочисленные полиномы $T_1(x)$ и $T_2(x)$ не имеют общих корней, $0 \neq \text{res}(T_1(x), T_2(x)) \in \mathbb{Z}$, следовательно,

$$1 \leq |\text{res}(T_1(x), T_2(x))|.$$

Найдется величина $c_2(n) > 0$ и трансцендентная точка $\xi \in I$ такая, что $|\xi - \gamma| \geq c_2(n)\mu I$ для любого корня $\gamma = \alpha_1, \dots, \alpha_{n_1}, \beta_1, \dots, \beta_{n_2}$, в противном случае можно покрыть интервал I интервалами вида $I_\gamma = \{x \in \mathbb{R}: |x - \gamma| < c_2(n)\mu I\}$ для сколь угодно малого $c_2(n) > 0$, что приводит к противоречию. Следовательно, величины производных $|T_k^{(s)}(\xi)|$ можно оценить как

$$|T_k^{(s)}(\xi)| \ll_n Q^{-\tau_k + s\eta}, \quad k = 1, 2, \quad s = 0, \dots, n_k.$$

Например, получим данную оценку для полинома $T_1(x)$:

$$|T_1^{(s)}(\xi)| = \left| a_{n_1} \sum_{1 \leq i_1 < i_2 < \dots < i_{n_1-s} \leq n_1} s! (\xi - \alpha_{i_1}) \dots (\xi - \alpha_{i_{n_1-s}}) \right| \ll_n \frac{|a_{n_1} (\xi - \alpha_1) \dots (\xi - \alpha_{n_1})|}{(\mu I)^s} \ll_n Q^{-\tau_1 + s\eta}.$$

Используем лемму 3 в точке $\xi \in I$. Нетрудно убедиться, используя ряд Тейлора, что полиномы $\bar{T}_k(x)$ имеют коэффициенты $T_k^{(0)}(\xi), \frac{1}{1!}T_k^{(1)}(\xi), \dots, \frac{1}{n_k!}T_k^{(n_k)}(\xi)$. Поделим строки матрицы Сильвестра полиномов $\bar{T}_1(x)$ и $\bar{T}_2(x)$ на Q^{μ_1} и Q^{μ_2} . Тогда

$$\text{res}(T_1(x), T_2(x)) = \text{res}(\bar{T}_1(x), \bar{T}_2(x)) = \det M \cdot Q^{n_1\mu_2 + n_2\mu_1},$$

где

$$M = \begin{pmatrix} T_1(\xi)Q^{-\mu_1} & \dots & \frac{1}{n_1!}T_1^{(n_1)}(\xi)Q^{-\mu_1} & & & \\ & & \ddots & & \ddots & \\ & & & T_1(\xi)Q^{-\mu_1} & \dots & \frac{1}{n_1!}T_1^{(n_1)}(\xi)Q^{-\mu_1} \\ T_2(\xi)Q^{-\mu_2} & \dots & \frac{1}{n_2!}T_2^{(n_2)}(\xi)Q^{-\mu_2} & & & \\ & & \ddots & & \ddots & \\ & & & T_2(\xi)Q^{-\mu_2} & \dots & \frac{1}{n_2!}T_2^{(n_2)}(\xi)Q^{-\mu_2} \end{pmatrix} = (m_{i,j})_{\substack{i=1, \dots, n_1+n_2 \\ j=1, \dots, n_1+n_2}}.$$

Пусть

$$\hat{\tau} = \min(\tau_1 + \mu_1, \tau_2 + \mu_2),$$

$$L_s = c_3(n) \min(1, Q^{-\hat{\tau} + s\eta}), \quad s = 0, \dots, n_2.$$

Тогда при подходящем выборе $c_3(n)$ для величин $T_k^{(s)}(\xi)Q^{-\mu_k}$ справедливы оценки

$$|T_k^{(s)}(\xi)Q^{-\mu_k}| \leq L_s, \quad k = 1, 2, \quad s = 0, \dots, n_k.$$

Также нетрудно убедиться, что для L_s выполняются свойства (2), что позволяет оценить определитель матрицы M с помощью леммы 2. Получим неравенство

$$1 \ll_n L_0 (L_1 \cdot \dots \cdot L_{n_1-1})^2 L_{n_1}^{1+n_2-n_1} Q^{n_1\mu_2+n_2\mu_1},$$

$$\max(1, Q^{\hat{\tau}}) (\max(1, Q^{\hat{\tau}-\eta}) \cdot \dots \cdot \max(1, Q^{\hat{\tau}-(n_1-1)\eta}))^2 \max(1, Q^{\hat{\tau}-n_1\eta})^{1+n_2-n_1} \ll_n Q^{n_1\mu_2+n_2\mu_1}.$$

Оценивая скрытую в символе Виноградова константу как Q^δ и переходя к логарифмам по основанию Q , получим неравенство (1). Теорема 2 доказана.

Список использованных источников

1. Гельфонд, А. О. Трансцендентные и алгебраические числа / А. О. Гельфонд. – Москва: ГИТТЛ, 1952. – 224 с.
2. Берник, В. И. Применение размерности Хаусдорфа в теории диофантовых приближений / В. И. Берник // *Acta Arithmetica*. – 1983. – Vol. 42, N 3. – P. 219–253.
3. Baker, A. Diophantine approximation and Hausdorff dimension / A. Baker, W. M. Schmidt // *Proceedings of the London Mathematical Society* (3). – 1970. – Vol. 21. – P. 1–11. doi.org/10.1112/plms/s3-21.1.1
4. Tishchenko, K. I. On approximation to real numbers by algebraic numbers / K. I. Tishchenko // *Acta Arithmetica*. – 2000. – Vol. 94, N 1. – P. 1–24.
5. Tsishchanka, K. I. On approximation of real numbers by algebraic numbers of bounded degree / K. I. Tishchenko // *Journal of Number Theory*. – 2007. – Vol. 123, N 2. – P. 290–314. doi.org/10.1016/j.jnt.2006.07.012
6. Wirsing, E. Approximation mit algebraischen Zahlen beschränkten Grades / E. Wirsing // *J. Reine Angew. Math.* – 1961. – Vol. 206. – P. 67–77. doi.org/10.1515/crll.1961.206.67

References

1. Gelfond A. O. *Transcendental and algebraic numbers*. Moscow, GITTL Publ., 1952. 224 p. (in Russian).
2. Bernik V. I. Application of Hausdorff Dimension in the theory of Diophantine Approximation. *Acta Arithmetica*, 1983, vol. 42, no. 3, pp. 219–253 (in Russian).
3. Baker A., Schmidt W. M. Diophantine approximation and Hausdorff dimension. *Proceedings of the London Mathematical Society* (3), 1970, vol. 21, pp. 1–11. doi.org/10.1112/plms/s3-21.1.1
4. Tishchenko K. I. On approximation to real numbers by algebraic numbers. *Acta Arithmetica*, 2000, vol. 94, no. 1, pp. 1–24.
5. Tsishchanka K. I. On approximation of real numbers by algebraic numbers of bounded degree. *Journal of Number Theory*, 2007, vol. 123, no. 2, pp. 290–314. doi.org/10.1016/j.jnt.2006.07.012
6. Wirsing E. Approximation mit algebraischen Zahlen beschränkten Grades. *Journal für die reine und angewandte Mathematik (Crelles Journal)*, 1961, vol. 206, pp. 67–77 (in German). doi.org/10.1515/crll.1961.206.67

Информация об авторе

Кудин Алексей Сергеевич – канд. физ.-мат. наук, науч. сотрудник. Институт математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: knxd@yandex.ru.

Information about the author

Kudin Alexey Sergeevich – Ph. D. (Physics and Mathematics), Researcher. Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: knxd@yandex.ru.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

ФИЗИКА
PHYSICS

УДК 535.8; 617.581

Поступило в редакцию 16.10.2017
Received 16.10.2017

**И. Н. Пархоменко¹, Л. А. Власукова¹, член-корреспондент Ф. Ф. Комаров²,
А. С. Камышан², Г. А. Урьев³, А. Э. Мурзич³, Р. Р. Немкаева⁴**

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко

Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

³Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии,
Минск, Республика Беларусь

⁴Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ КОКСАРТРОЗЕ,
ВЫЯВЛЕННЫЕ МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ
КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ СВЕТА**

Аннотация. Методом спектроскопии комбинационного рассеяния света исследована структура срезов костной ткани людей, страдающих деформирующим артрозом тазобедренного сустава (коксартроз). Проведен сравнительный анализ срезов здоровых и больных участков костной ткани по соотношению интенсивностей полос комбинационного рассеяния, характеризующих долю органической и минеральной фазы. Показано, что для разрушенной в результате коксартроза костной ткани характерна более высокая доля органической составляющей и более высокая степень замещения фосфатной группы на карбонатную в решетке гидроксиапатита.

Ключевые слова: тазобедренный сустав, костная ткань, химический состав, коксартроз, комбинационное рассеяние света

Для цитирования: Структурные особенности костной ткани при коксартрозе, выявленные методом спектроскопии комбинационного рассеяния света / И. Н. Пархоменко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 24–32.

**Irina N. Parkhomenko¹, Liudmila A. Vlasukova¹, Corresponding Member Fadey F. Komarov¹,
Alexander S. Kamyshan², Gennadiy A. Uryev³, Alexander E. Murzich³, Renata R. Nemkaeva⁴**

¹Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²A. N. Sevchenko Institute of Applied Physics Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

³Republican Scientific Practical Centre of Traumatology and Orthopedics, Minsk, Republic of Belarus

⁴Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

RAMAN SPECTROSCOPY STUDY OF THE BONE TISSUE WITH COXARTHROSIS

Abstract. The structure of human bone slices taken from patients suffering from deforming arthrosis of the hip joint (coxarthrosis) was studied by Raman spectroscopy. Comparative analysis of healthy and sick bone tissues was made on the basis of the intensity ratio of RS bands associated with organic and mineral components. It was shown that coxarthrosis results in a relative increase of an organic component and in a higher degree of substitution of phosphate groups by carbonate ones in the hydroxyapatite lattice.

Keywords: hip joint, bone tissue, chemical composition, coxarthrosis, Raman spectroscopy

For citation: Parkhomenko I. N., Vlasukova L. A., Komarov F. F., Kamyshan A. S., Uryev G. A., Murzich A. E., Nemkaeva R. R. Raman spectroscopy study of the bone tissue with coxarthrosis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* = *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 24–32 (in Russian).

Введение. Известно, что с возрастом, а также при проявлении различных заболеваний опорно-двигательного аппарата происходят изменения химического состава костной ткани, которые, в свою очередь, приводят к изменениям ее физических свойств. Широко используемые в клинической диагностике методы, такие как рентгенография, компьютерная и магнитно-резонансная томография, двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия основаны на определении плотности кости и не отражают химический состав неорганической и органической фазы костной ткани. Вместе с тем методы, позволяющие определить химический состав кости, могут быть более эффективными при установлении диагноза, при оценке уровня риска перелома, при проверке эффективности лечения. Одним из перспективных методов оценки качества костной ткани и вероятности ее разрушения является метод спектроскопии комбинационного рассеяния света (КРС), основанный на изменении частоты возбуждающего излучения в результате взаимодействия падающей волны с собственными колебаниями химических связей в исследуемом веществе. Это экспрессный, неразрушающий, бесконтактный метод диагностики образцов, позволяющий определять состав и симметрию исследуемого вещества, степень его кристалличности, оценивать наличие механических напряжений и дефектов. В современных спектрометрах КРС реализуется высокое пространственное разрешение (до 0,5–1 мкм). К преимуществам метода можно также отнести простоту пробоподготовки, сниженные требования к образцам (могут быть непрозрачными, гидратированными и др.), высокую чувствительность, отсутствие внешних маркеров, а также отсутствие разрушений после анализа.

В настоящее время спектроскопия КРС широко применяется в биомедицинских целях как *in vitro*, так и *in situ* посредством минимальной инвазии с помощью оптоволоконна или прямо через кожу [1–3]. Применительно к костным тканям в ряде публикаций сообщается о выявленной корреляции между химическим составом, определенным из спектров КРС, и биохимическими свойствами костей. Так, плотность костной ткани, ее модуль Юнга, предел прочности при растяжении, сжатии, изгибе, наноиндентационные измерения твердости и пластичности костей и др. в значительной мере коррелировали с оценкой степени минерализации и кристалличности костной ткани, проведенной на основе данных КРС [4–6]. В данной работе спектроскопия КРС использована для анализа структурных изменений костной ткани человека при проявлении деформирующего артроза тазобедренного сустава (коксартроза). В многочисленных работах, посвященных изучению возможностей метода спектроскопии КРС для диагностики остеоартроза, в основном используется экспериментальное моделирование на животных (мыши, коровы). В то же время публикаций, касающихся костной ткани людей с диагнозом коксартроз, в литературе явно недостаточно [7; 8]. Стоит также отметить, что в ортопедии выделяют идиопатический (первичный) коксартроз, этиология которого до сих пор не выяснена. Полученная на основе данных КРС информация о молекулярных изменениях в костной ткани, происходящих при данной патологии, возможно, будет полезна для более глубокого понимания причин возникновения данного заболевания. Принимая во внимание стремительно развивающуюся технологию микрорамановских спектрометров (карманные спектрометры, эндоскопы, оптоволоконные зонды, игольные зонды для подкожной глубинной диагностики, браслеты), работающих в режиме *in vivo*, полученные в данной работе закономерности могут быть в будущем использованы как для диагностики, так и для оценки хода лечения остеопороза.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись фрагменты костной ткани головок бедренных костей женщин и мужчин в возрасте 58–69 лет, больных деформирующим артрозом тазобедренного сустава (коксартрозом). Фрагменты головки бедра забирались на исследование в момент операции по эндопротезированию тазобедренного сустава. У всех пациентов диагноз был подтвержден данными рентгенологического исследования. В качестве исследуемых образцов использовались срезы костных тканей. Размеры среза составляли порядка 10 × 10 × 3 мм. Фрагменты больной ткани вырезались из головки бедренной кости. В сравнительных целях изучались фрагменты здоровой ткани, вырезанные из шейки бедренной кости.

Эксперименты по исследованию химического состава образцов костной ткани проводились на двух микрорамановских спектрометрах (Solver Spectrum (NT-MDT) и Ramanor U1000) при ком-

натной температуре в геометрии обратного рассеяния. Спектрометр Solver Spectrum (NT-MDT) приспособлен для измерения мелких образцов со сложным рельефом. Для возбуждения спектров использовался He-Ne лазер ($\lambda = 632$ нм). При регистрации спектров КРС на данной установке использовалась решетка 150 штрих/мм, время накопления сигнала составляло 100 с. При регистрации спектров КРС на спектрометре Ramanor U1000 источником излучения являлся твердотельный Nd-лазер с длиной волны возбуждения $\lambda = 532$ нм. При регистрации использовались дифракционная решетка 1800 штрихов/мм и мультищелочной ФЭУ. Оцифрованные спектры обрабатывались в программе Origin 7.0, вычитание фона осуществлялось в программе CrystalSleuth.

Результаты и их обсуждение. При изучении биологических объектов методом КРС важно подобрать длину волны возбуждения лазера таким образом, чтобы:

регистрируемый сигнал попадал в так называемое диагностическое окно в области (600–1100 нм), в которой поглощение тканей, воды и гемоглобина минимально;

минимизировать фон флюоресценции.

При исследовании костных тканей методом КРС чаще всего используется возбуждение ближнего ИК диапазона, в первую очередь, чтобы уменьшить вероятность флюоресценции ароматических аминокислот, хромофоров, содержащихся в костях, таких как каратиноиды, гем и др. В менее люминесцирующих образцах предпочтительно использовать возбуждение видимого диапазона, что обеспечивает повышение интенсивности линий КРС пропорционально четвертой степени частоты излучения ($I \sim \omega^4$).

Для поиска оптимальных условий регистрации спектров в качестве источников возбуждения были использованы красный (632 нм) и зеленый (532 нм) лазеры. Кроме того, анализ экспериментальных данных, полученных на различных установках для одних и тех же образцов, позволяет делать более достоверные выводы.

На рис. 1 представлены характерные спектры комбинационного рассеяния света фрагментов деградированной и здоровой костной ткани пациентов, больных коксартрозом. Спектры, снятые при возбуждении зеленым и красным лазерами, представлены в верхней и нижней частях рис. 1, *a* соответственно. При двух используемых режимах регистрации на спектрах КРС наблюдается фон флюоресценции. Однако, как и ожидалось, при возбуждении красным лазером фон люминесценции меньше и находится в области более низких частот. Тем не менее, вычитание фона люминесценции производилось для всех спектров с помощью программы CrystalSleuth (рис. 1, *b*). Преимущества и недостатки выбранных режимов регистрации для конкретных спектральных диапазонов будут отмечаться при обсуждении результатов.

Как известно, костная ткань служит не только для обеспечения жесткости и подвижности тела, но и является биоактивной матрицей, внутри которой происходят сложные биохимические

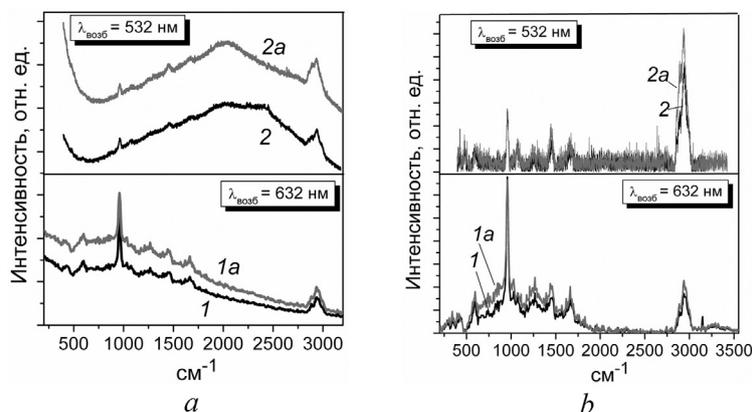


Рис. 1. Исходные (*a*) и обработанные (*b*) спектры КРС фрагментов костной ткани человека, снятые при возбуждении красным (*1*, *1a*) и зеленым (*2*, *2a*) лазерами: *1*, *2* – здоровая, *1a*, *2a* – пораженная коксартрозом ткань

Fig. 1. The initial Raman spectra (*a*) and spectra with a subtracted background (*b*) of the sample of human bones. The spectra excited by red (*1*, *1a*) and green lasers (*2*, *2a*): *1*, *2* – healthy bone, *1a*, *2a* – diseased bone

превращения. Костная ткань – это сложный композит, состоящий из неорганической и органической фазы. Неорганическая фаза, представленная в основном нанокристаллами с размером (2–4 нм) нестехиометрического гидроксиапатита $\text{Ca}_{10-x-y/2}(\text{HPO}_4)_x(\text{CO}_3)_y(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{OH})_{2-x}$, обеспечивает механическую прочность, твердость, жесткость и высокую сопротивляемость к сжимающим нагрузкам. Органическая фаза костной ткани, отвечающая за эластичность кости и динамическую нагрузку, состоит преимущественно из коллагена (около 95 % занимает коллаген типа I, а 5 % приходится на коллагены II, III и IV типов) и небольшого количества гликозаминогликанов, а также белков неколлагеновой природы (гликопротеины, в том числе сиалопротеины, и альбумин) [9]. Благодаря своим особенностям костный коллаген активно участвует в минерализации костной ткани. Преимущество спектроскопии КРС применительно к костным тканям заключается в том, что на спектрах проявляются полосы как от органической, так и от неорганической составляющей костной ткани. Ниже приведем краткий обзор наблюдаемых полос с их интерпретаций на основе литературных данных [7; 10–12].

Наиболее интенсивная полоса в спектрах КРС от минеральной составляющей костной ткани при $\sim 960 \text{ см}^{-1}$ связана с валентными колебаниями фосфатной группы PO_4^{3-} (ν_1). Полосы, связанные с деформационными колебаниями группы PO_4^{3-} , обнаруживаются на спектрах КРС при 430 см^{-1} (ν_2) и 580 см^{-1} (ν_4). Проявлением минеральной составляющей также является полоса при 1070 см^{-1} , связанная с симметричными валентными колебаниями связей C–O в карбонатной группе CO_3^{2-} . В наших экспериментах данная полоса лучше разрешилась на спектрах, снятых при возбуждении зеленым лазером. Наиболее интенсивная полоса от органической составляющей в области частот $2800\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$ связана с валентными колебаниями связей C–H в группах CH_2 и CH_3 . Сложная структура данной полосы также лучше разрешается при возбуждении зеленым лазером. Следует отметить, что эта полоса, несмотря на свою интенсивность, не так часто обсуждается в работах, посвященных спектроскопии костных тканей, в силу ограничения частотного диапазона регистрации до 2000 см^{-1} . Деформационные крутильные (ножничные) колебания группы CH_2 и антисимметричные деформационные колебания группы CH_3 обнаруживаются на спектрах при $\sim 1450 \text{ см}^{-1}$. Также к проявлению на спектрах КРС органической матрицы костной ткани, а именно ее белковой основы, относятся полоса при $\sim 1660 \text{ см}^{-1}$, обусловленная валентными колебаниями связей C=O в амиде I, и полоса при 1250 см^{-1} , обусловленная валентными C–N и деформационными N–H колебаниями связей в амиде III. Также на спектрах заметны слабые полосы при 855 и 875 см^{-1} , связанные с колебаниями связи C–C в бензольных кольцах пролина (Pro) и гидроксипролина (Hyp) соответственно. На спектрах КРС, зарегистрированных при возбуждении красным лазером, проявилась полоса при 3300 см^{-1} , обусловленная наличием связей C–N в коллагене.

Для спектров, снятых на различных участках одного и того же образца, интенсивность отдельных полос может сильно различаться из-за различий в степени шероховатости анализируемой поверхности, в концентрации люминесцирующих веществ и др. Поэтому для анализа химического состава костей, степени кристалличности минерала, для оценки преобладающего вида сшивки в коллагене чаще используют не интегральную интенсивность отдельных полос, а отношение интенсивностей нескольких полос. При этом можно использовать как отношение площадей полос, так и их амплитудных значений. Причем, последнее, как отмечают некоторые авторы, приводит к более достоверным результатам, так как высоты полос менее подвержены ошибкам, возникающим при обработке исходных спектров.

В данной работе для изучения структурных изменений бедренной кости, вызванных развитием коксартроза, будут использоваться отношения интенсивностей отдельных полос, проявившихся на спектрах КРС.

Соотношение минерал/органическая матрица. Данное соотношение очень важно для оценки качества костей, так как от баланса между органической и неорганической составляющими зависят главные функции костей (хрупкость, гибкость). Обычно старение сопровождается уменьшением минеральной составляющей в костях. При исследовании костных тканей методом КРС для характеристики относительного содержания органической матрицы в кости обычно используют сле-

дующие три отношения интенсивностей полос: 1) $\text{PO}_4(960 \text{ см}^{-1}) / \text{амид I}(1660 \text{ см}^{-1})$, 2) $\text{PO}_4(960 \text{ см}^{-1}) / \text{CH}_2$ ($\sim 2935 \text{ см}^{-1}$), 3) $\text{PO}_4(960 \text{ см}^{-1}) / \text{пролин}$ и гидроксипролин ($855\text{--}870 \text{ см}^{-1}$). Стоит отметить, что гидроксипролин является важным компонентом костной ткани, по экскреции которого с мочой судят о костной резорбции. Однако поскольку до 40 % гидроксипролина, выделенного с мочой, может быть не костного происхождения, и взаимосвязь между его экскрецией и метаболизмом костной ткани довольно сложная, данный метод не эффективен при диагностике заболеваний опорно-двигательного аппарата. С другой стороны, анализ спектров КРС позволяет судить о концентрации гидроксипролина, который содержится именно в костном коллагене. Так, в [13] продемонстрирована возможность количественной оценки соотношения «минерал/матрица» по отношению полос от фосфата и гидроксипролина. В данной работе проводилась оценка соотношения минерал/матрица для образцов с заранее известной концентрацией минерала в коллагене по трем, отмеченным выше, отношениям полос КРС. Авторы показали, что отношение интенсивности полосы фосфатной группы к суммарной интенсивности полос пролина и гидроксипролина наиболее достоверно отражает реальное значение отношения «минерал/органическая матрица».

В [13] для оценки изменения соотношения «минерал/органическая матрица» при развитии коксартроза, кроме описанных выше трех полос, дополнительно рассматривался диапазон частот $800\text{--}1750 \text{ см}^{-1}$. Как показано на рис. 2, полосы от минеральной составляющей, а именно от фосфат- и карбонат-ионов, проявляются в узком диапазоне частот $920\text{--}1160 \text{ см}^{-1}$. Вне данного диапазона полосы обусловлены колебаниями органической составляющей. Следовательно, отношение суммарной площади спектральных полос в области $920\text{--}1160 \text{ см}^{-1}$ к суммарной площади спектральных полос в областях $800\text{--}920$ и $1160\text{--}1750 \text{ см}^{-1}$ можно считать параметром, характеризующим отношение «минерал/органическая матрица». По мнению авторов, данная методика отличается простотой и наиболее полно отражает как минеральный состав (рассматривается колебание группы CO_3^{2-} , а не только PO_4^{3-}), так и органическую составляющую (колебания белковых связей амидных группировок, C–H связей).

На рис. 3 схематично изображена динамика предложенного критерия для четырех выбранных образцов. Значение отношения полос для здоровой ткани принималось за единицу. Как видно из рисунка, для всех исследованных образцов при всех используемых методиках наблюдается уменьшение отношения «минерал/органическая матрица» при проявлении коксартроза. Стоит отметить, что результаты, полученные с помощью двух лазеров, близки для всех рассматриваемых вариантов оценки кроме оценки, основанной на отношении «фосфат/пролин + гидроксипролин». Последнее, вероятнее всего, связано с ошибками, вызванными слабой интенсивностью полос пролина и гидроксипролина. Следует отметить, что разные методики могут давать разные результаты. Например, для пациента D отношение интенсивностей полос $\text{PO}_4/\text{C-H}$ уменьшается более, чем в два раза при проявлении заболевания, тогда как отношение, предложенное авторами данной работы, уменьшается незначительно. Это говорит о необходимости проведения дальнейшего набора статистических данных и дополнительного анализа изменения отдельных компонент органической и неорганической составляющей костной ткани при коксартрозе.

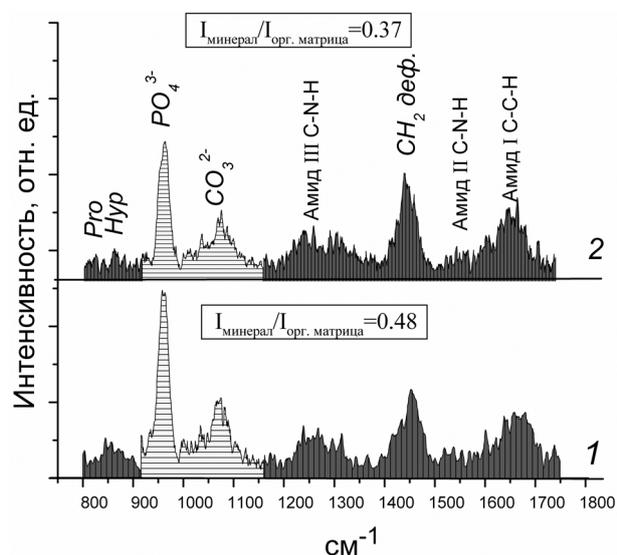


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния света костной ткани ($\lambda_{\text{возб}} = 532 \text{ нм}$): 1 – здоровая, 2 – пораженная коксартрозом. Вертикальной и горизонтальной штриховкой обозначены полосы от органической и минеральной составляющей костной ткани соответственно

Fig. 2. The Raman spectra of the bone tissues ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$): 1 – healthy bone, 2 – diseased bone. The vertical and horizontal hatching show the band attributed to organic and mineral compounds of human bone, correspondingly

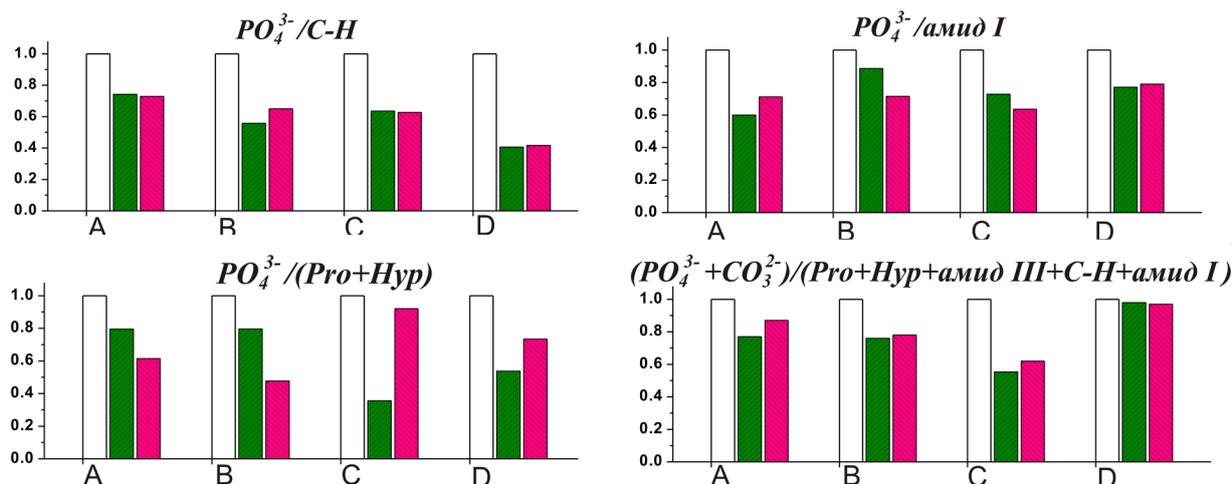


Рис. 3. Изменение отношения полос, отражающих отношение «минерал/органическая матрица» на спектрах КРС, при поражении коксартрозом. Приведены данные для четырех пациентов (А–D) для здоровых тканей (□) (принимались за единицу) и для больных тканей, полученные при возбуждении зеленым (▨) и красным (▩) лазерами

Fig. 3. The change of Raman band intensity relation “mineral/organic matrix” caused by coxarthrosis. The Figures show data of four patients (A–D) for healthy tissues (□) (were taken as unit) and for diseased tissues getting with use of green (▨) and red (▩) lasers

Структурные изменения в минеральной составляющей. Соотношение «карбонат/фосфат».

Известно, что между кристаллической решеткой гидроксиапатита и окружающей его средой (кровь, межклеточная жидкость) происходит ионный обмен, в результате чего накапливаются те или иные ионы, изменяющие или сохраняющие минеральную структуру костной ткани. В состав костного минерала в заметном количестве входят карбонат ионы. Соотношение «карбонат/фосфат» является также показателем кристалличности костной ткани. Замещение фосфат-ионов карбонат-ионами приводит к уменьшению размеров кристаллитов и степени кристалличности гидроксиапатита. В результате увеличивается коэффициент растворимости костной ткани, она становится более аморфной и хрупкой.

Оценить количество замещений карбонатной группой в решетке гидроксиапатита можно с помощью отношения интенсивностей полос при 960 см^{-1} (PO_4^{3-}) и 1070 см^{-1} (CO_3^{2-}) на спектрах КРС. Так, с помощью метода спектроскопии КРС было показано, что старение сопровождается увеличением уровня замещений фосфатной группы в костном минерале ионами карбоната [11]. В нашей работе для большинства исследованных фрагментов костной ткани, пораженной коксартрозом, также зафиксировано увеличение (в 1,3–1,6 раза) соотношения полос CO_3^{2-}/PO_4^{3-} относительно соответствующих значений для здоровых фрагментов костей. Таким образом, костный минерал, разрушенный в результате развития коксартроза, характеризуется увеличением относительной доли ионов карбоната.

Структурные изменения в органической составляющей. Известно, что некоторые серьезные заболевания, такие как цинга, синдром Элерса–Данло, атеросклероз, могут быть связаны с нарушением синтеза коллагена. В частности, аномалии в структуре коллагена влияют на состояние суставов у человека. Например, при остеоартрите в хрящах вместо коллагена обычного типа (d1(II)) содержится коллаген, имеющий в своем составе $\alpha 2$ -цепи с пониженной степенью гликозилирования. С другой стороны, в хрупких костях людей, страдающих одним из видов наследственного заболевания, проявляемого в нарушениях процесса остеогенеза, наряду с содержащимся обычно в костях коллагеном типа I содержится также коллаген типа III [14].

На рис. 4 представлены характерные спектры КРС в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ здорового и больного фрагментов костной ткани. Как отмечалось, при развитии коксартроза увеличивается относительное содержание органической составляющей. Однако кроме интегрального увеличения интенсивности широкой полосы в области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$, обусловленной колебаниями водо-

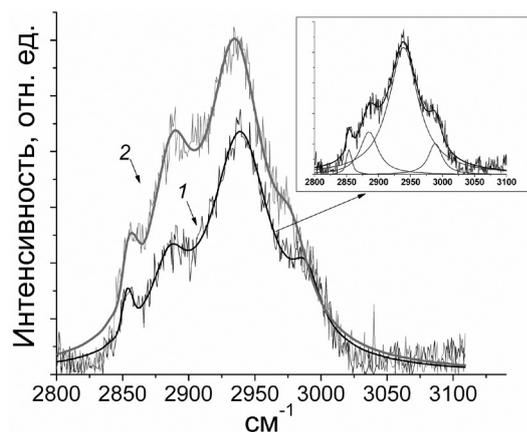


Рис. 4. Спектры комбинационного рассеяния света ($\lambda_{\text{возб}} = 532 \text{ нм}$): 1 – здоровая ткань, 2 – ткань, пораженная коксартрозом. На вставке представлено разложение спектра лоренцианами

Fig. 4. The Raman spectra of the sample A ($\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$): 1 – healthy tissue, 2 – diseased tissue. The inset shows the decomposition of the spectra by Lorentz function

рода в связях С–Н, наблюдается перераспределение интенсивности между компонентами этой полосы. На вкладке на рис. 4 представлено разложение спектра на составляющие с помощью лоренцианов. Как видно из рисунка, в данную область вносят вклад четыре полосы с максимумами при $\sim 2835, 2885, 2935$ и 2988 см^{-1} . На основе литературных данных [15], можно предположить, что первые две полосы относятся к симметричным и асимметричным колебаниям С–Н связей в группе CH_2 соответственно, тогда как две последние – к симметричным и асимметричным валентным колебаниям CH_3 группы. Для всех исследуемых образцов при проявлении заболевания наблюдается более сильное увеличение полос для группы CH_2 (приблизительно в два раза), тогда как интенсивность полос, обусловленных колебаниями CH_3 , увеличивается в меньшей степени (в 1,2–1,5 раза). Таким образом, можно говорить о некой структурной перестройке и в органической составляющей костной ткани при поражении коксартрозом.

Закключение. В работе представлены особенности химического состава костной ткани при проявлении деформирующего артроза тазобедренного сустава (коксартроза), выявленные с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния света. Показано, что доля органической фазы относительно минеральной значительно выше в разрушенной вследствие коксартроза костной ткани по сравнению со здоровой тканью. Предложена методика оценки соотношения «минерал/органическая матрица» в костной ткани, учитывающая полосы от различных компонент минеральной и органической составляющей. Установлено, что при коксартрозе в костной ткани увеличивается замещение ионов PO_4^{3-} ионами CO_3^{2-} . Выявлены изменения спектров КРС в области валентных колебаний связей С–Н от групп CH_2 и CH_3 органической составляющей костной ткани при проявлении заболевания. В дальнейшем, основываясь на представленных в данной работе результатах, авторы планируют провести исследования химического состава ногтей страдающих коксартрозом пациентов методом КРС. Выявленная корреляция химического состава костной ткани и ногтевой пластины позволила бы разработать метод ранней диагностики коксартроза.

Благодарности. Работа выполнена в рамках задания 3.06.6 ГПНИ «Конвергенция» (№ 20161860).

Acknowledgements. The work is supported by the SPSP “Convergence” (The task 3.06.6, № 20161860).

Список использованных источников

1. Griffiths, J. Raman spectroscopy for medical diagnosis / J. Griffiths // *Anal. Chem. ACS*. – 2007. – Vol. 79, N 11. – P. 3975–3978. doi.org/10.1021/ac071917k
2. Novel assessment of bone using time-resolved transcutaneous Raman spectroscopy / E. R. Draper [et al.] // *J. Bone Miner Res.* – 2005. – Vol. 20, N 11. – P. 1968–1972. doi.org/10.1359/jbmr.050710
3. Raman spectroscopy for medical diagnosis – From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection / K. Kong [et al.] // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 2015. – Vol. 89. – P. 121–134. doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.009
4. Akkus, O. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone / O. Akkus, F. Adar, M. B. Schaffler // *Bone*. – 2004. – Vol. 34, N 3. – P. 443–453. doi.org/10.1016/j.bone.2003.11.003
5. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue-levels in a genetic mouse model / X. Bi [et al.] // *Journal of Biomechanics*. – 2011. – Vol. 44, N 2. – P. 297–303. doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.10.009
6. Age-specific profiles of tissue-level composition and mechanical properties in murine cortical bone / M. Raghavan [et al.] // *Bone*. – 2012. – Vol. 50, N 4. – P. 942–953. doi.org/10.1016/j.bone.2011.12.026
7. Киселева, Д. В. Применение рамановской микроспектроскопии для исследования структурных особенностей биогенного апатита / Д. В. Киселева // Ежегодник-2009: Труды института геологии и геохимии им. акад. А. Н. Зава-

рицкого. – Екатеринбург: Институт геологии и геохимии им. А. Н. Заварицкого Уральского отделения РАН, 2010. – Вып. 157. – С. 332–335.

8. Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture / B. R. McCreadie [et al.] // *Bone*. – 2006. – Vol. 39, N 6. – P. 1190–1195. doi.org/10.1016/j.bone.2006.06.008

9. Ковешников, В. Г. Скелетные ткани: хрящевая ткань, костная ткань / В. Г. Ковешников, М. Х. Абакаров, В. И. Лузин. – Луганск: Изд-во Луган. гос. мед. ун-та, 2000. – 50 с.

10. Fourier-transform Raman spectroscopy study of the ovariectomised rat model of osteoporosis / R. A. de Souza [et al.] // *The Open Bone Journal*. – 2010. – Vol. 2. – P. 24–31. doi.org/10.2174/1876525401002010024

11. Mandair, G. S. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength / G. S. Mandair, M. D. Morris // *BoneKey Rep.* – 2015. – Vol. 4. – P. 620 (8 pages). doi.org/10.1038/bonekey.2014.115

12. FT-Raman spectroscopy as a method for screening collagen diagenesis in bone / C. A. M. France [et al.] // *Journal of Archaeological Science*. – 2014. – Vol. 42. – P. 346–355. doi.org/10.1016/j.jas.2013.11.020

13. Karampas, I. A. A quantitative bioapatite/collagen calibration method using Raman spectroscopy of bone / I. A. Karampas, M. G. Orkoula, C. G. Kontoyannis // *J. of Biophotonics*. – 2012. – Vol. 6, N 8. – P. 573–586. doi.org/10.1002/jbio.201200053

14. Мецлер, Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке / Д. Мецлер. – М.: Мир, 1980. – Т. 2. – 501 с.

15. Raman spectroscopy of lipids: a review / K. Czamara [et al.] // *J. Raman Spectrosc.* – 2015. – Vol. 46, N 1. – P. 4–20. doi.org/10.1002/jrs.4607

References

1. Griffiths J. Raman spectroscopy for medical diagnosis. *Analytical Chemistry*, 2007, vol. 79, no. 11, pp. 3975–3978. doi.org/10.1021/ac071917k

2. Draper E. R., Morris M. D., Camacho N. P., Matousek P., Towrie M., Parker A. W., Goodship A. E. Novel assessment of bone using time-resolved transcutaneous Raman spectroscopy. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2005, vol. 20, no. 11, pp. 1968–1972. doi.org/10.1359/jbmr.050710

3. Kong K., Kendall C., Stone N., Notingher I. Raman spectroscopy for medical diagnosis – From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, vol. 89, pp. 121–134. doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.009

4. Akkus O., Adar F., Schaffler M. B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*, 2004, vol. 34, no. 3, pp. 443–453. doi.org/10.1016/j.bone.2003.11.003

5. Bi X., Patil C. A., Lynch C. C., Pharr G. M., Mahadevan-Jansen A., Nyman J. S. Raman and mechanical properties correlate at whole bone- and tissue-levels in a genetic mouse model. *Journal of Biomechanics*, 2011, vol. 44, no. 2, pp. 297–303. doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.10.009

6. Raghavan M., Sahar N. D., Kohn D. H., Morris M. D. Age-specific profiles of tissue-level composition and mechanical properties in murine cortical bone. *Bone*, 2012, vol. 50, no. 4, pp. 942–953. doi.org/10.1016/j.bone.2011.12.026

7. Kisileva D. V. Raman microspectrometry application for investigation of structural peculiarities of biogenic apatite. *Ezhegodnik-2009: Trudy instituta geologii i geokhimii im. akad. A. N. Zavaritskogo* [Year-book-2009: Proceedings of the Institute of Geology and Geochemistry named after Academician A. N. Zavaritsky]. Ekaterinburg, Zavaritsky Institute of Geology and Geochemistry of the Ural Branch (UB) of the Russian Academy of Sciences, 2010, no. 157, pp. 332–335 (in Russian).

8. McCreadie B. R., Morris M. D., Tso-ching Chen, Rao D. S., Finney W. F., Widjaja E., Goldstein S. A. Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. *Bone*, 2006, vol. 39, no. 6, pp. 1190–1195. doi.org/10.1016/j.bone.2006.06.008

9. Koveshnikov V. G., Abakarov M. H., Luzin V. I. *The skeletal tissues: cartilagenous tissue, bone tissues*. Lugansk, Lugansk State Medical University Publ., 2000. 50 p. (in Russian).

10. de Souza R. A., Jerônimo D. P., Gouvêa H. A., Xavier M., de Souza M. T., Miranda H., Tosato M. G., Martin A. A., Ribeiro W. Fourier-transform Raman spectroscopy study of the ovariectomised rat model of osteoporosis. *The Open Bone Journal*, 2010, vol. 2, pp. 24–31. doi.org/10.2174/1876525401002010024

11. Mandair G. S., Morris M. D. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *BoneKey Reports*, 2015, vol. 4, pp. 620 (8 pages). doi.org/10.1038/bonekey.2014.115

12. France C. A. M., Thomas D. B., Doney C. R., Madden O. FT-Raman spectroscopy as a method for screening collagen diagenesis in bone. *Journal of Archaeological Science*, 2014, vol. 42, pp. 346–355. doi.org/10.1016/j.jas.2013.11.020

13. Karampas I. A., Orkoula M. G., Kontoyannis C. G. A quantitative bioapatite/collagen calibration method using Raman spectroscopy of bone. *Journal of Biophotonics*, 2012, vol. 6, no. 8, pp. 573–586. doi.org/10.1002/jbio.201200053

14. Metzler D. *Biochemistry: The chemical reaction of living cells*. New York, Academic Press, 1977. 1129 p.

15. Czamara K., Majzner K., Pacia M. Z., Kochan K., Kaczor A., Baranska M. Raman spectroscopy of lipids: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 4–20. doi.org/10.1002/jrs.4607

Информация об авторах

Пархоменко Ирина Николаевна – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 5, 220108, Минск, Республика Беларусь). E-mail: parhomir@yandex.by.

Власукова Людмила Александровна – канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 5, 220108, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vlasukova@bsu.by.

Комаров Фадей Фадеевич – член-корреспондент, д-р физ.-мат. наук, заведующий лабораторией. Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 7, 220108, Минск, Республика Беларусь). E-mail: komarovf@bsu.by.

Камышан Александр Степанович – канд. физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник. Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко Белорусского государственного университета (ул. Курчатова, 7, 220108, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kamyshana@mail.ru.

Урьев Геннадий Абрамович – канд. мед. наук, заведующий отделением. Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (ул. Кижеватова, 60/4, 220024, Минск, Республика Беларусь). E-mail: uryev11@tut.by.

Мурзич Александр Эдуардович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии (ул. Кижеватова 60/4, 220024, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mae77@list.ru.

Немкаева Рената Руслановна – магистр. Казахский национальный университет им. аль-Фараби (пр. аль-Фараби, 71, 050040, Алматы, Казахстан). E-mail: quasisensus@mail.ru.

Information about the authors

Parkhomenko Irina Nikolaevna – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior researcher. Belarusian State University (5, Kurchatov Str., 220108, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: parhomir@yandex.by.

Vlasukova Liudmila Alexandrovna – Ph. D. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. Belarusian State University (5, Kurchatov Str., 220108, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vlasukova@bsu.by.

Komarov Fadey 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., 220108, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: komarovf@bsu.by.

Kamyshan Alexander Stepanovich – Ph. D. (Physics and Mathematics), Leading researcher. A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of Belarusian State University (7, Kurchatov Str., 220108, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kamyshana@mail.ru.

Uryev Gennadiy Abramovich – Ph. D. (Medicine), Head of the Department. Republic Scientific Practical Centre of Traumatology and Orthopadics (60/4, Kizhevato Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: uryev11@tut.by.

Murzich Alexander Eduardovich – Ph. D. (Medicine), Head of the Department. Republic Scientific Practical Centre of Traumatology and Orthopadics (60/4, Kizhevato Str., 220024, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mae77@list.ru.

Nemkaeva Renata Ruslanovna – Magister. Al-Farabi Kazakh National University (71, Al-Farabi Ave., 050040, Almaty, Kazakhstan). E-mail: quasisensus@mail.ru.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)
УДК 537.86:621.373

Поступило в редакцию 27.11.2017
Received 27.11.2017

К. Г. Батраков, С. А. Максименко

Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

СТИМУЛИРОВАННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ЧЕРЕНКОВСКОГО ТИПА В ГРАФЕНОВЫХ СИСТЕМАХ

(Представлено членом-корреспондентом Ф. Ф. Комаровым)

Аннотация. Теоретически рассматривается механизм стимулированной эмиссии электромагнитного излучения электронным пучком, взаимодействующим с графеном и металлическими углеродными нанотрубками. Базовые физические свойства таких углеродных наноструктур: сильное замедление поверхностных электромагнитных волн, anomalously большая длина свободного пробега и экстремально большая достижимая плотность тока электронов, позволяют предложить их в качестве кандидатов для разработки наноразмерных излучателей черенковского типа, подобных лампе бегущей волны и лазеру на свободных электронах. При использовании внешнего электронного пучка в графен/полимерных слоистых структурах возможна макроскопическая генерация, причем частота генерации может перестраиваться путем допирования графена или изменением числа слоев в структуре и расстояния между слоями.

Ключевые слова: графен, углеродные нанотрубки, черенковское излучение, стимулированное излучение, терагерцовый диапазон частот

Для цитирования: Батраков, К. Г. Стимулированное излучение черенковского типа в графеновых системах / К. Г. Батраков, С. А. Максименко // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 33–40.

Konstantin G. Batrakov, Sergey A. Maksimenko

Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

CHERENKOV-TYPE STIMULATED EMISSION IN GRAPHENE-BASED SYSTEMS

(Communicated by Corresponding Member Fadey F. Komarov)

Abstract. A mechanism of stimulated emission of electromagnetic radiation by an electron beam in metal carbon nanotubes and graphene is theoretically considered. Three basic properties of graphene and carbon nanotubes: strong slowing down of surface electromagnetic waves, anomalously large electron free path length, and extremely high electron current density to be reached in the structures considered allow us to propose them as candidates for the development of Cherenkov-type nanoscale emitters analogous to a traveling-wave tube and a free electron-based laser. In graphene/polymer multi-layered structures exposed to an external electron beam, the generation is possible on a macroscopic scale, and the generation frequency tuning is proposed by varying the graphene doping, the number of graphene sheets, a distance between sheets, etc.

Keywords: graphene, carbon nanotubes, Cherenkov radiation, stimulated emission, terahertz frequency range

For citation: Batrakov K. G., Maksimenko S. A. Cherenkov-type stimulated emission in graphene-based systems. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 33–40 (in Russian).

Введение. Современный этап развития электромагнетизма связан с постановкой и прогрессом в решении следующих научно-технологических задач:

миниатюризация элементов электрических цепей и межэлементных расстояний в интегральных схемах (ИС) до величин 5–10 нм, позволяющая достичь плотности упаковки в десятки миллиардов элементов на ИС;

активное освоение терагерцового диапазона частот (300 ГГц – 3 ТГц) в целях повышения пропускной способности и скорости беспроводной связи, создания систем безопасности для аэропортов и других мест массового посещения, развития спектроскопических методов исследования сложных биологических молекул.

В силу уникальных физических свойств наноразмерные формы углерода (графен, углеродные нанотрубки (УНТ) и др.) с момента их открытия рассматриваются в качестве базовых для реше-

ния обеих поставленных задач, т. е. и как основа для создания элементной базы нанoeлектроники (наноразмерные диоды, транзисторы, фильтры, антенны, усилители и генераторы электромагнитных сигналов и т. д.) и как основа для разработки макроскопических устройств и функциональных материалов контроля электромагнитных полей верхнего терагерцового и терагерцового диапазонов частот.

В частности, в качестве среды для генерации терагерцового излучения на наноуровне предлагаются углеродные нанотрубки и графен, возбуждение которых осуществляется путем оптической накачки [1]. Принцип работы системы стандартен: оптические фотоны переводят электроны из валентной зоны в зону проводимости, затем возбуждение снимается путем перехода возбужденных электронов на более низкие уровни зоны проводимости с излучением терагерцовых фотонов. Впервые генерация терагерцовых плазмонов таким способом наблюдалась экспериментально в графене [2]. Выбранный подход, однако, представляется не слишком удачным для использования в наноразмерных электрических цепях, так как минимальная площадь засветки существенно превосходит размеры элемента и, таким образом, в зону облучения попадает множество других элементов. Нами предложены альтернативные варианты создания генератора (усилителя) на основе углеродных нанотрубок и графена, которые обсуждаются в данной работе.

Возможность создания источника света на основе углеродной нанотрубки. В макроскопической электронике известны генераторы электромагнитного излучения, работающие на основе излучательной неустойчивости направленных электронных потоков, такие как лампа бегущей волны (ЛБВ), лампа обратной волны (ЛОВ), лазер на свободных электронах (ЛСЭ). Для функционирования указанных приборов необходимо поддержание высокого вакуума для проводки электронных пучков. В противном случае рассеяние электронов нарушает когерентность излучения и приводит к деградации элементов системы. Для создания электронного пучка в таких приборах используются, например, вакуумные диоды. Плотность тока диодов ограничена влиянием пространственного заряда и относительно невысока ($<10\text{--}100\text{ А/см}^2$). Поэтому для генерации стимулированного излучения требуется довольно протяженная область взаимодействия (от 10 см до нескольких метров, в зависимости от параметров электронного пучка и генерируемой частоты). Одним из фундаментальных свойств УНТ является установленная экспериментально [3] баллистическая электронная проводимость со свободным пробегом, составляющим несколько десятков микрон, что на порядки превышает величину пробега $\sim 10\text{ нм}$ в обычных твердых телах. Аномально большой пробег является следствием того, что квазичастица (электрон) в графене описывается эффективным безмассовым уравнением Дирака и вытекающим из этого «парадоксом» Клейна – прохождением электроном без потерь потенциального барьера [4].

Еще одним базовым принципом работы приборов типа ЛОВ и ЛБВ является синхронизация электронного пучка и электромагнитной волны для эффективной передачи кинетической энергии пучка волне. Обычно это достигается путем замедления волны в гофрированной электродинамической структуре. Существенное, в 50–100 раз, уменьшение фазовой скорости поверхностной волны в УНТ по сравнению со скоростью света [5; 6] позволяет добиться условия черенковского синхронизма движения нерелятивистского пучка π -электронов и индуцированной электромагнитной волны. Таким образом, баллистичность движения электронов в УНТ и сильные замедляющие свойства нанотрубок, наряду с высокой достижимой плотностью тока, вплоть до 10^{10} А/см^2 [7], позволяют реализовать источник стимулированного излучения, основанный на модуляции электронного потока в поле генерируемой им волны. Генерация при таких плотностях тока может развиваться при длинах в несколько десятков микрон. Детальная теория генерации электромагнитного излучения терагерцового диапазона построена нами в [8–10]. В качестве электронного пучка в этом случае выступает собственный ток π -электронов. Направленный поток электронов может быть получен путем приложения напряжения к определенной части одностенной или к разным стенкам двустенной УНТ. Не останавливаясь на деталях, на рис. 1 приводим результаты теоретических расчетов для инкремента неустойчивости УНТ для трех различных значений тока.

Таким образом, три фундаментальных свойства УНТ (сильное замедление поверхностной волны, баллистичность движения носителей заряда и экстремально высокая достижимая плот-

ность тока) позволяют нам предложить УНТ в качестве возможной реализации наноразмерного источника (усилителя) электромагнитного излучения терагерцового и оптического диапазонов частот. Такое устройство является перспективным для использования в качестве активного элемента наноразмерных интегральных схем нового поколения. Как следует из приведенного графика, граничные условия реализации усиления (положительные значения временного инкремента) достижимы на современном технологическом уровне. Дальнейшее развитие данного подхода может быть связано с использованием многостенных нанотрубок, в которых возможно существование электромагнитных мод с фазовой скоростью, существенно меньшей, чем в одностенных УНТ. Этот вопрос подробно обсуждается в следующем разделе, посвященном генерации в графен/полимерных многослойных структурах.

Поверхностные волны в многослойных структурах графена. В данном и следующем разделах работы мы исследуем применение макроскопических графеновых структур с внешним пучком электронов для создания источников (усилителей) электромагнитного излучения с электрически перестраиваемой частотой генерации. Такая возможность обусловлена хорошо разработанными методами перестройки электродинамических параметров графена и нанотрубок, например, плавного изменения проводимости путем электростатического допирования [11]. Изменение проводимости, в свою очередь, приводит к изменению условий синхронизма «электромагнитная волна + электрон» и, значит, к плавному изменению частоты генерации. Важно также отметить, что современные технологии допускают создание графеновых листов с линейными размерами в несколько сантиметров и формирование с их помощью графеновых структур с изменяемыми свойствами, идеально подходящими для различных применений, требующих плавной перестройки. В частности, одним из таких применений является создание перестраиваемых по частоте усилителей и генераторов терагерцового диапазона на основе слоистых структур, состоящих из чередующихся слоев графена и полиметилметакрилата (ПММА) [12] (рис. 2).

Для эффективного обмена энергией в системе электрон–электромагнитная волна при черенковском механизме необходимо существование продольной (вдоль направления движения электрона оси Ox) компоненты электрического поля. Поэтому нас будет интересовать волна ТМ поляризации, поддерживаемая такой структурой. Выбирая направление оси Oy вдоль направления магнитного поля, можно представить его в следующем кусочно-непрерывном виде:

$$H_y^{(i)} = e^{iqx} (c_1^{(i)} \exp[ik_z^{(i)} z] + c_2^{(i)} \exp[-ik_z^{(i)} z]),$$

где индекс « i » нумерует соответствующую область между графеновыми слоями; q – компонента волнового вектора вдоль направления распространения поверхностной волны; $k_z = \sqrt{\omega^2 - q^2 c^2}$, $c_1^{(i)}$ – коэффициенты, которые

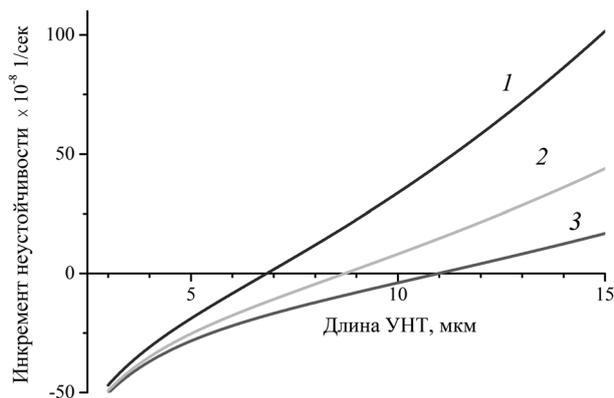


Рис. 1. Зависимость временного инкремента неустойчивости УНТ от ее длины при трех различных значениях плотности тока возбуждения; $j = 10 \cdot 10^9 \text{ A/cm}^2$ (1); $j = 7 \cdot 10^9 \text{ A/cm}^2$ (2); $j = 5 \cdot 10^9 \text{ A/cm}^2$ (3)

Fig. 1. Time increment instability of a carbon nanotube as a function of its length at three values of excitation current density; $j = 10 \cdot 10^9 \text{ A/cm}^2$ (1); $j = 7 \cdot 10^9 \text{ A/cm}^2$ (2); $j = 5 \cdot 10^9 \text{ A/cm}^2$ (3)

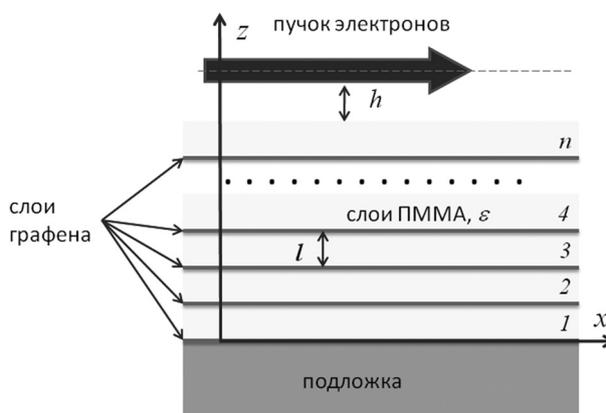


Рис. 2. Принципиальная схема генератора квази-черенковского излучения на основе слоистой структуры графен/ПММА

Fig. 2. Block diagram of the quasi-Cherenkov radiation generator based on a laminated graphene/polymethylmetacrylate structure

определяются из условий шивки на границах; ω – частота волны. В нашем случае необходимо задать граничные условия на всех графеновых слоях. Этими условиями являются равенство тангенциальных компонент электрических полей с обеих сторон от графенового слоя и скачок тангенциальной компоненты магнитного поля при переходе через такой слой. Этот скачок пропорционален возбуждаемому в слое поверхностному току:

$$E_t(z_i + 0) = E_t(z_i - 0),$$

$$H(z_i + 0) - H(z_i - 0) = \frac{4\pi}{c} [j_t(z_i) \times \mathbf{n}].$$

Здесь \mathbf{n} – единичный вектор нормали к слою, а поверхностный ток задается законом Ома $j_t = \sigma E_t$, в котором поверхностная проводимость графена σ определяется внутризонными и межзонными переходами. В терагерцовом и более длинноволновом диапазонах при типичных значениях химического потенциала графена $\mu \sim 0,1$ эВ определяющий вклад в проводимость вносят внутризонные переходы, и таким образом сама проводимость описывается законом Друде:

$$\sigma = 4T \frac{\alpha}{\pi \hbar} \ln \left[2 \cosh \left(\frac{\mu}{2T} \right) \right] \frac{ic}{\omega + i\Gamma},$$

где T – температура в энергетических единицах; c – скорость света; α – постоянная тонкой структуры; Γ – ширина линии, определяемая процессами столкновения электронов в графене. В случае системы из одного графенового слоя граничные условия приобретают вид

$$c_1 + c_2 = 0, \quad c_2(1 + \xi) - c_1 = 0,$$

где $\xi = (4\pi k_z / \omega) \sigma$. Равенство нулю детерминанту этой линейной системы приводит к дисперсионному уравнению, описывающему связь частоты с волновым вектором,

$$\frac{4\alpha\mu}{\hbar\omega} T \ln \left[2 \cosh \left(\frac{\mu}{2T} \right) \right] \frac{\sqrt{q^2 c^2 - \omega^2}}{\omega + i\Gamma} = 1.$$

Рис. 3 демонстрирует зависимость черенковской частоты генерации для электронного пучка с энергией 4, 10 и 60 кэВ. В каждом из случаев кривые приведены для абсолютного нуля темпе-

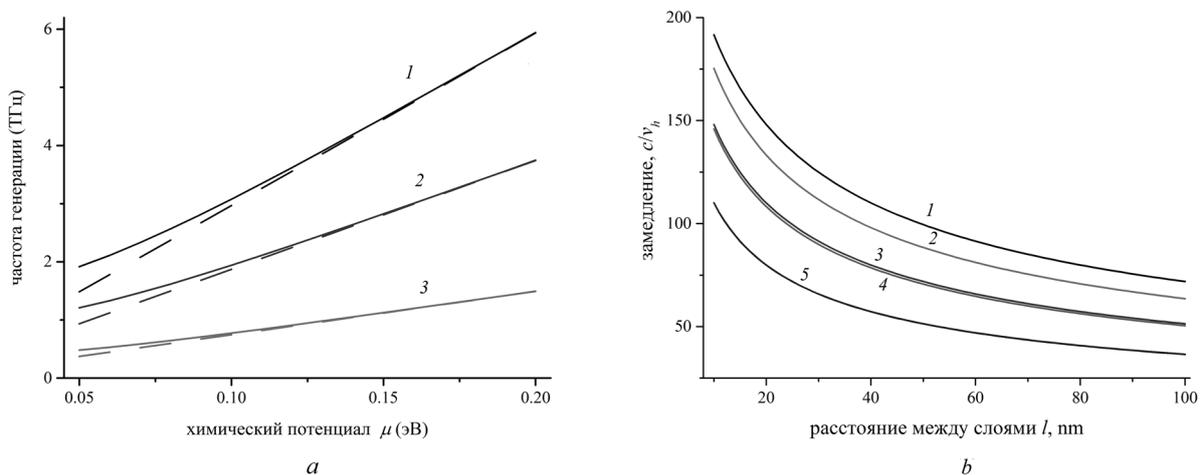


Рис. 3. *a* – Зависимость частоты генерации от химического потенциала графена при различных значениях энергии пучка: 4 кэВ (1), 10 кэВ (2) и 60 кэВ (3) и температуры. Сплошные линии соответствуют температуре 400 К, а штриховые получены для значений $T = 0$; *b* – Зависимость замедления волны от расстояния между слоями графена: $\mu = 0,05$ эВ (1, 2), $\mu = 0,1$ эВ (3, 4) и $\mu = 0,2$ эВ (5); Линии 1 и 3 получены при $T = 0$, а линии 2 и 4 при $T = 400$ К. В случае 5 кривые для разных температур совпадают

Fig. 3. *a* – Generation frequency as a function of chemical graphene potential at different values of beam energy: 4 keV (1), 10 keV (2) and 60 keV (3) and temperature. Solid lines correspond to a temperature of 400 K and the dotted lines stand for the values of $T = 0$; *b* – wave slowing down as a function of distance between graphene layers: $\mu = 0.05$ eV (1, 2), $\mu = 0.1$ eV (3, 4) and $\mu = 0.2$ eV (5); Lines 1 and 3 are obtained at $T = 0$ and lines 2 and 4 – at $T = 400$ K. In case 5, the curves for different temperatures coincide

ратуры и для $T = 400$ К. Более высокие температуры нежелательны, так как возможно расплавление ПММА. Как следует из рис. 3, высокая температура заметно влияет только при достаточно низком значении химического потенциала (0,05 эВ). При $\mu \geq 0,1$ эВ, что является типичным, если не принимать дополнительных мер, для CVD графена, влияние температуры мало. В настоящее время существуют хорошо разработанные методы плавного изменения химического потенциала, например, путем электростатического допирования графена электродом [13]. Таким образом, по-прежнему является одна из возможностей плавной перестройки частоты излучения.

При черенковской генерации на нерелятивистских пучках и особенно на собственных π -электронах графена необходимо сильное замедление волны, соответствующее скорости нерелятивистского электрона. Слоистая графеновая структура представляет прекрасную возможность для сильного замедления. Продемонстрируем этот эффект на примере двух слоев графена, расположенных друг от друга на расстоянии достаточно малом по сравнению с длиной волны, но большем радиуса туннелирования электронов, так что электронные уровни в отдельных слоях графена формируются независимо друг от друга. Поле ТМ волны в этом случае запишется в виде выражения

$$H_y = e^{iqx} \begin{cases} a \exp(-ik_z z), & z < 0, \\ c_1 \exp(ik_z z) + c_2 \exp(-ik_z z), & 0 < z < l, \\ d \exp[ik_z(z-l)], & z > l, \end{cases} \quad (1)$$

где l – расстояние между слоями. Из системы граничных условий, которая в данном случае состоит из четырех уравнений, легко получается дисперсионное уравнение, определяющее собственные поверхностные волны, поддерживаемые двухслойной структурой:

$$2 + \xi \left(1 \pm \exp \left[-l \sqrt{q^2 - (\omega/c)^2} \right] \right) = 0. \quad (2)$$

Знаку «+» в этом выражении отвечает симметричная мода. В условиях, когда область локализации поверхностной волны значительно превышает расстояние между слоями графена, колебания электронов, индуцированные этой волной в слоях графена, происходят синфазно. Для такой волны оба слоя графена «воспринимаются» как один, эффективный поверхностный ток всей системы равен сумме поверхностных токов, возбуждаемых в каждом слое. Как результат, воздействие такой системы на параметры волны происходит таким образом, что можно ввести эффективный химический потенциал, который в случае $\mu \sim T$ равен сумме химических потенциалов слоев. Свойства волны в этом случае будут описываться так же, как для одного слоя графена с эффективным химическим потенциалом. Таким образом, поскольку частота генерации зависит от химического потенциала (рис. 3, *a*), ее перестройка возможна как изменением химического потенциала путем электростатического или химического допирования, так и числа слоев в структуре графен/полимер. Существование симметричных мод в графеновых слоистых структурах подтверждено в экспериментальных работах, исследующих прохождение и поглощение падающего микроволнового и терагерцового излучения в графене [12; 14].

Другой тип волны отвечает знаку «-» в (2). В этом случае возбуждаемые в разных слоях плазмонные колебания электронной системы происходят в противофазе. Этой асимметричной моде отвечает высокая степень локализации поверхностной волны, чему сопутствует ее большее замедление. Причем параметры этой моды весьма чувствительны к расстоянию между графеновыми слоями. Зависимости замедления волны от расстояния l при двух значениях температур приведены на рис. 3, *b*. Из графиков следует, что черенковский синхронизм на этой моде может быть реализован для нерелятивистских электронов, даже на собственных электронах графена. Для подтверждения существования асимметричных мод в экспериментах на прохождение/поглощение падающей волны необходимо использовать, например, дифракционную решетку, переводящую часть падающей объемной волны в поверхностную локализованную волну в месте расположения графена.

Генерация в графене на внешнем электронном пучке. Рассмотрим электронный пучок, распространяющийся над слоем графена или над графеновой многослойной системой. По аналогии с (1) выпишем магнитную компоненту ТМ волны в рассматриваемой системе:

$$H_y = e^{iqx} \begin{cases} a_1 \exp(-ik_z z), & z < 0, \\ c_1 \exp(ik_z z) + c_2 \exp(-ik_z z), & 0 < z < l, \\ d_1 \exp[ik_z(z-l)] + d_2 \exp[-ik_z(z-l)], & l < z < h, \\ f_1 \exp(ik_{bz} z) + f_2 \exp(-ik_{bz} z), & h < z < h + \delta, \\ a_2 \exp(ik_z z), & z > h + \delta. \end{cases} \quad (3)$$

По сравнению с рассмотренными случаями в кусочно-непрерывную область добавляется область, заполненная электронным пучком: $h < z < h + \delta$. Дисперсия волны в этой области описывается уравнением [15]

$$k_{bz}^2 c^2 - \omega^2 = \frac{\omega_L^2}{\Delta^2 \gamma^2} (q^2 c^2 - \omega^2),$$

в котором $\Delta = \omega - qu$ – отстройка от черенковского синхронизма; γ – лоренц-фактор (для нерелятивистского пучка он практически равен единице). В результате требования удовлетворения граничных условий для полей на всех границах, указанных в (3), получается следующее дисперсионное уравнение, описывающее систему «электронный пучок + графен»:

$$I_b = - \frac{(2 + \xi)^2 - \xi^2 \exp\{-2l\sqrt{q^2 - (\omega/c)^2}\}}{\xi \left[2 + \xi + (2 - \xi) \exp\{2l\sqrt{q^2 - (\omega/c)^2}\} \right]}.$$

В этом уравнении

$$I_b = \exp(2ik_z h) \frac{(k_{bz}^2 - k_z^2)^2 \{\exp(ik_{bz} \delta) - \exp(-ik_{bz} \delta)\}}{(k_{bz} - k_z)^2 \exp(ik_{bz} \delta) - (k_{bz} + k_z)^2 \exp(-ik_{bz} \delta)}.$$

На рис. 4 приведены результаты численных расчетов пространственных инкрементов излучательной неустойчивости для некоторых вариантов с разным количеством слоев и химического потенциала для разных энергий пучка. Главный вывод, следующий из кривых, приведенных на этом рисунке, заключается в том,

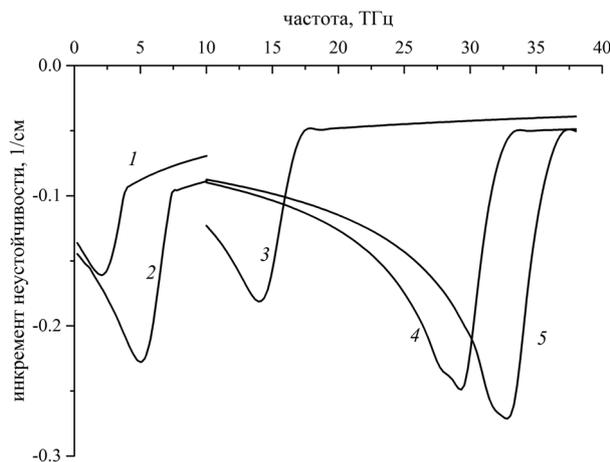


Рис. 4. Частотная зависимость пространственного инкремента неустойчивости $\text{Im}(q)$ для одного (кривые 1, 2), четырех (3), восьми (4) и девяти (5) слоев графена. Энергия пучка $E = 4$ КэВ и химический потенциал $\mu = 0,1$ эВ для кривых 1, 2; $E = 10$ КэВ и $\mu = 0,2$ эВ для кривых 3–5. Для всех случаев ширина линии $\Gamma = 10$ ТГц

Fig. 4. Frequency dependence of the space increment of instability $\text{Im}(q)$ for one (curves 1, 2), four (3), eight (4) and nine (5) layers of graphene. The beam energy $E = 4$ keV and chemical potential $\mu = 0.1$ eV for curves 1, 2; $E = 10$ keV and $\mu = 0.2$ eV for curves 3–5. For all the cases, the line width $\Gamma = 10$ THz

что неустойчивость будет развиваться при длине взаимодействия «волна–электронный пучок» порядка и больше нескольких сантиметров ($\max |\text{Im } k_z| \sim 0,3$ 1/см), что технологически является вполне достижимым. Более того, для этих целей не требуется монокристаллический графен, достаточно использовать планарную мозаичную структуру, состоящую из разориентированных монокристаллических областей графена меньшего размера.

Заключение. Представленные в настоящей работе результаты формируют физический базис создания наноразмерных источников терагерцового излучения на основе углеродных нанотрубок и графена. Источником электронов являются собственные π -электроны наноструктуры, обладающие аномально большой длиной свободного пробега, достаточной для развития генерации при условии сильного замедления поверхностной электромагнитной волны. Эти же свойства могут быть использованы для создания макроскопического источника (усилителя) терагерцового излучения с внешним пуч-

ком электронов. Аномально сильное, в сотни раз, замедление асимметричной моды поверхностной волны в наноразмерных формах углерода позволяет достичь в многослойных углерод/полимерных структурах длины генерации в несколько сантиметров, что вполне соответствует сегодняшнему уровню технологии синтеза графена. Отметим возможность плавной и дискретной перестройки частоты генерации путем электростатического допирования графена, изменения количества слоев и/или расстояния между слоями, а также регулированием температуры. Рассмотренная возможность генерации на графене, а также плавной и дискретной перестройки частоты генерации делает многослойные графен/полимерные структуры перспективными с точки зрения реализации терагерцового источника.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке проектов БРФФИ (Ф17Арм-025) и U.S. Air Force through CRDF Global Agreement grant (AF20-15-61804-1).

Acknowledgments. The work was sponsored by the Projects of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Ф17Арм-025) and the U.S. Air Force through CRDF Global Agreement grant (AF20-15-61804-1).

Список использованных источников

1. Terahertz lasers based on optically pumped multiple graphene structures with slot-line and dielectric waveguides / V. Ryzhii [et al.] // *J. Appl. Phys.* – 2010. – Vol. 107, N 5. – P. 054505 (1–6). doi.org/10.1063/1.3327212
2. The gain enhancement effect of surface plasmon polaritons on terahertz stimulated emission in optically pumped monolayer graphene / T. Watanabe [et al.] // *New J. Physics.* – 2013. – Vol. 15, N 7. – P. 075003 (1–11). doi.org/10.1088/1367-2630/15/7/075003
3. Multiwalled carbon nanotubes are ballistic conductors at room temperature / C. Berger [et al.] // *Appl. Phys. A.* – 2002. – Vol. 74, N 3. – P. 363–365. doi.org/10.1007/s003390201279
4. Katsnelson, M. I. Chiral tunnelling and the Klein paradox in graphene / M. I. Katsnelson, K. S. Novoselov, A. K. Geim // *Nature Phys.* – 2006. – Vol. 2, N 9. – P. 620–625. doi.org/10.1038/nphys384
5. Electrodynamics of carbon nanotubes: Dynamic conductivity, impedance boundary conditions and surface wave propagation / G. Y. Slepyan [et al.] // *Phys. Rev. B.* – 1999. – Vol. 60, N 24. – P. 17136–17149. doi.org/10.1103/physrevb.60.17136
6. Experimental evidence of localized plasmon resonance in composite materials containing single-wall carbon nanotubes / M. V. Shuba [et al.] // *Phys. Rev. B.* – 2012. – Vol. 85, N 16. – P. 165435 (1–6). doi.org/10.1103/physrevb.85.165435
7. Yao, Z. High-Field Electrical Transport in Single-Wall Carbon Nanotubes / Z. Yao, C. L. Kane, C. Dekker // *Phys. Rev. Lett.* – 2000. – Vol. 84, N 13. – P. 2941–2944. doi.org/10.1103/physrevlett.84.2941
8. Batrakov, K. G. Toward the nano-FEL: Undulator and Cherenkov mechanisms of light emission in carbon nanotubes / K. G. Batrakov, P. P. Kuzhir, S. A. Maksimenko // *Physica E.* – 2008. – Vol. 40, N 5. – P. 1065–1068. doi.org/10.1016/j.physe.2007.08.003
9. Carbon nanotube as a Cherenkov-type light emitter and free electron laser / K. G. Batrakov [et al.] // *Phys. Rev. B.* – 2009. – Vol. 79, N 12. – P. 125408 (1–12). doi.org/10.1103/physrevb.79.125408
10. Batrakov, K. G. Cherenkov synchronism: non-relativistic electron beam in multi-walled nanotube and multi-layer graphene / K. G. Batrakov, P. P. Kuzhir, S. A. Maksimenko // *Physica B.* – 2010. – Vol. 405, N 14. – P. 3050–3053. doi.org/10.1016/j.physb.2010.01.047
11. Electric field effect in atomically thin carbon films / K. Novoselov [et al.] // *Science.* – 2004. – Vol. 306, N 5696. – P. 666–669. doi.org/10.1126/science.1102896
12. Flexible transparent graphene/polymer multilayers for efficient electromagnetic field absorption / K. Batrakov [et al.] // *Scientific Reports.* – 2014. – Vol. 4, N 1. – P. 7191 (1–5). doi.org/10.1038/srep07191
13. Graphene Doping: A Review / B. Guo [et al.] // *Insciences J.* – 2011. – Vol. 1, N 2. – P. 80–89. doi.org/10.5640/insc.010280
14. Enhanced microwave-to-terahertz absorption in graphene / K. Batrakov [et al.] // *Appl. Phys. Lett.* – 2016. – Vol. 108, N 12. – P. 123101 (1–4). doi.org/10.1063/1.4944531
15. Кузелев, М. В. Вынужденное излучение сильноточных релятивистских электронных пучков / М. В. Кузелев, А. А. Рухадзе // *УФН.* – 1987. – Т. 152. – С. 285–316.

References

1. Ryzhii V., Dubinov A., Otsuji T., Mitin V., Shur M. S. Terahertz lasers based on optically pumped multiple graphene structures with slot-line and dielectric waveguides. *Journal of Applied Physics*, 2010, vol. 107, no. 5, art. 054505 (1–6). doi.org/10.1063/1.3327212
2. Watanabe T., Fukushima T., Yabe Y., Tombet S. A. B., Satou A., Dubinov A. A., Aleshkin V. Ya., Mitin V., Ryzhii V., Otsuji T. The gain enhancement effect of surface plasmon polaritons on terahertz stimulated emission in optically pumped monolayer graphene. *New Journal of Physics*, 2013, vol. 15, no. 7, art. 075003 (1–11). doi: 10.1088/1367-2630/15/7/075003
3. Berger C., Yi Y., Wang Z. L., de Heer W. A., Multiwalled carbon nanotubes are ballistic conductors at room temperature. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 2002, vol. 74, no. 3, pp. 363–365. doi.org/10.1007/s003390201279

4. Katsnelson M. I., Novoselov K. S., Geim A. K. Chiral tunnelling and the Klein paradox in graphene. *Nature Physics*, 2006, vol. 2, no. 9, pp. 620–625. doi.org/10.1038/nphys384
5. Slepyan G. Y., Maksimenko S. A., Lakhtakia A., Yevtushenko O., Gusakov A. V. Electrodynamics of carbon nanotubes: Dynamic conductivity, impedance boundary conditions and surface wave propagation. *Physical Review B*, 1999, vol. 60, no. 24, pp. 17136–17149. doi.org/10.1103/physrevb.60.17136
6. Shuba M. V., Paddubskaya A. G., Plyushch A. O., Kuzhir P. P., Slepyan G. Ya., Maksimenko S. A., Ksenevich V. K., Buka P., Seliuta D., Kasalynas I., Macutkevicius J., Valusis G., Thomsen C., Lakhtakia A. Experimental evidence of localized plasmon resonance in composite materials containing single-wall carbon nanotubes. *Physical Review B*, 2012, vol. 85, no. 16, art. 165435 (1–6). doi.org/10.1103/physrevb.85.165435
7. Yao Z., Kane C. L., Dekker C. High-field electrical transport in single-wall carbon nanotubes. *Physical Review Letters*, 2000, vol. 84, no. 13, pp. 2941–2944. doi.org/10.1103/physrevlett.84.2941
8. Batrakov K., Kuzhir P., Maksimenko S. Toward the nano-FEL: Undulator and Cherenkov mechanisms of light emission in carbon nanotubes. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 2008, vol. 40, no. 5, pp. 1065–1068. doi.org/10.1016/j.physe.2007.08.003
9. Batrakov K. G., Maksimenko S. A., Kuzhir P. P., Thomsen C. Carbon nanotube as a Cherenkov-type light emitter and free electron laser. *Physical Review B*, 2009, vol. 79, no. 12, pp. 125408 (1–12). doi.org/10.1103/physrevb.79.125408
10. Batrakov K., Kuzhir P., Maksimenko S., Cherenkov synchronism: non-relativistic electron beam in multi-walled nanotube and multi-layer graphene. *Physica B: Condensed Matter*, 2010, vol. 405, no. 14, pp. 3050–3053. doi.org/10.1016/j.physb.2010.01.047
11. Novoselov K., Geim A., Morozov S., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S., Grigorieva I., Firsov A. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 2004, vol. 306, no. 5696, pp. 666–669. doi.org/10.1126/science.1102896
12. Batrakov K., Kuzhir P., Maksimenko S., Paddubskaya A., Voronovich S., Lambin Ph., Kaplas T., Svirko Yu. Flexible transparent graphene/polymer multilayers for efficient electromagnetic field absorption. *Scientific Reports*, 2014, vol. 4, no. 1, art. 7191 (1–5). doi.org/10.1038/srep07191
13. Guo B., Fang L., Zhang B., Gong J. R. Graphene Doping: A Review. *Insciences Journal*, 2011, vol. 1, no. 2, pp. 80–89. doi.org/10.5640/insc.010280
14. Batrakov K., Kuzhir P., Maksimenko S., Volynets N., Voronovich S., Paddubskaya A., Valusis G., Kaplas T., Svirko Yu., Lambin Ph. Enhanced microwave-to-terahertz absorption in graphene. *Applied Physics Letters*, 2016, vol. 108, no. 12, art. 123101 (1–4). doi.org/10.1063/1.4944531
15. Kuzelev M. V., Rukhadze A. A. Stimulated radiation from high-current relativistic electron beams. *Soviet Physics Uspekhi*, 1987, vol. 30, no. 6, pp. 507–524. doi.org/10.1070/pu1987v030n06abeh002853

Информация об авторах

Батраков Константин Германович – канд. физ.-мат. наук, доцент. Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета (ул. Бобруйская, 11, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kgbatrakov@gmail.com.

Максименко Сергей Афанасьевич – д-р физ.-мат. наук, профессор, директор. Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета (ул. Бобруйская, 11, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sergey.maksimenko@gmail.com.

Information about the authors

Batrakov Konstantin Germanovich – Ph. D. (Physics and Mathematics), Assistant Professor. Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University (11, Bobruiskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kgbatrakov@gmail.com.

Maksimenko Sergey Afanasievich – D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Director. Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University (11, Bobruiskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sergey.maksimenko@gmail.com.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)
УДК 524.6;531

Поступило в редакцию 28.12.2017
Received 28.12.2017

Член-корреспондент Л. М. Томильчик

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

К ВОПРОСУ ОБ ЭНЕРГИИ ДВУХЧАСТИЧНОГО ГРАВИТАЦИОННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Аннотация. На основе использования известного условия равновесия двух невращающихся шварцшильдовых черных дыр получено феноменологическое релятивистски мотивированное аналитическое выражение для энергии двухчастичного гравитационного взаимодействия пространственно локализованных масс. Показано, что наличие максимальной силы Гиббонса устраняет координатную сингулярность, существующую в исходном общерелятивистском соотношении, в силу чего найденное выражение для энергии вообще свободно от сингулярностей и имеет конечный минимум. Установлено наличие явной зависимости предельной силы двухчастичного взаимодействия от отношения масс конститuentов.

Ключевые слова: невращающиеся черные дыры, максимальная сила, отсутствие сингулярностей, минимум энергии двухчастичного взаимодействия

Для цитирования: Томильчик, Л. М. К вопросу об энергии двухчастичного гравитационного взаимодействия / Л. М. Томильчик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 41–50.

Corresponding Member Lev M. Tomilchik

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

ON THE TWO-PARTICLE GRAVITATIONAL INTERACTION ENERGY PROBLEM

Abstract. The generally relativistic motivated explicit analytic expression describing the interacting energy of the pair of nonpoint-like non-spinning masses is found. It is shown that Gibbons' maximum tension principle allows us to remove the co-ordinate singularities so that the energy of the gravitational two-particle interaction possesses a numerically bounded minimum. It is shown that Gibbons' maximum force treated in a purely mechanical context possesses the explicit parametric dependence on the interacting mass ratio.

Keywords: Schwarzschild black wholes, Maximum force, singularities abolition, bounded energy interaction minimum

For citation: Tomilchik L. M. On the two-particle gravitational interaction energy problem. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 41–50 (in Russian).

Введение. Как известно, в традиционной общерелятивистской теории гравитации (General Relativity – GR) существует проблема с определением трансформационных свойств тензора энергии-импульса гравитационного поля. С другой стороны, понятия силы (Закон Всемирного Тяготения – ЗВТ) и энергии взаимодействия двух точечных масс, хорошо определенные в ньютоновой теории, не допускают непротиворечивого релятивистского обобщения. Кроме того, в исходном двухчастичном варианте и ЗВТ Ньютона и соответствующее выражение для потенциальной энергии взаимодействия сингулярны в нуле, в силу чего устойчивое статическое состояние в такого рода системе оказывается невозможным.

В то же время наличие в ней ненулевого межчастичного расстояния между конститuentами и, соответственно, конечного энергетического минимума очевидным образом следует из принципа максимального натяжения (Maximum Tension Principle – MTP), предложенного Гиббонсом [1] (см. также [2; 3]), в соответствии с которым допустимая численная величина силы двухчастичного гравитационного притяжения ограничена сверху значением обратной гравитационной константы Эйнштейна (максимальная сила – Maximum Force – MF).

Проблема, однако, заключается в отыскании конкретной формы подобного ограничения. Так, минимальное расстояние, равное среднему квадратичному гравитационных радиусов тяготеющих масс, возникает немедленно, если приравнять, как это сделано в [4], ньютоново выражение для ЗВТ максимальной силе Гиббонса.

Однако такого рода прием не может считаться удовлетворительным, поскольку сам по себе носит характер типичной гипотезы *ad hoc*, оставляющей к тому же открытым вопрос о явной аналитической структуре искомого обобщения ЗВТ Ньютона. Более перспективным в этом плане выглядит ориентация на известное общерелятивистское выражение (см., напр., [5; 6]) для силы гравитационного взаимодействия двух находящихся в состоянии равновесия невращающихся шварцшильдовых черных дыр, которое асимптотически переходит в традиционную формулу для ЗВТ Ньютона.

В настоящей работе рассмотрены чисто механические аспекты МТР Гиббонса, и на этой основе получено явное аналитическое выражение для энергии гравитационного взаимодействия двух пространственно локализованных невращающихся масс. Найденное выражение не содержит сингулярностей, что соответствует наличию конечного минимума энергии в такой системе.

Теоретическая часть. Будем исходить из выражения, определяющего силу $f_N^{(GR)}$, уравнивающую взаимное притяжение двух невращающихся шварцшильдовых черных дыр [5; 6]

$$f_N^{(GR)} = f_N^{(GR)}(R; a, b) = F_0 \frac{b}{R^2 - a^2}, \quad (1)$$

где R – радиальная координата Шварцшильда; $F_0 = \frac{c^4}{G_N}$ (c – скорость света; G_N – гравитационная постоянная Ньютона); $a = R_1 + R_2$, $b = R_1 R_2$;

$$R_\alpha = \frac{m_\alpha G_N}{c^2}, \quad \alpha = 1, 2; \quad (2)$$

m_1, m_2 – массы покоя; размерность параметров R_α – [длина]. Комбинация $F_0 = \frac{c^4}{G_N}$ фундаментальных констант c и G_N имеет размерность силы. В [5] и [6] область изменения радиальной переменной полагается открытой полубесконечной ($R > a$). Выражение (1) асимптотически (при $R \gg a$) переходит в формулу, соответствующую ЗВТ Ньютона, и стремится к ∞ при $R \rightarrow R_0 = a$. Во избежание возможных недоразумений подчеркнем, что в исходном контексте ОТО формула (1) определяет силу, которая уравнивает притяжение двух черных дыр, т. е. имеет положительный знак.

Мы примем выражение (1) в качестве некоторого феноменологического, релятивистски мотивированного двухпараметрического обобщения ЗВТ Ньютона и будем рассматривать его в чисто механическом контексте, т. е. когда параметры m_1 и m_2 обозначают (невращающиеся!) массы покоя, параметры R_1 и R_2 , однозначно определяемые на основе соотношений (2), – их размеры (радиусы соответствующих сфер), а переменная R определяет (координатное) расстояние между их центрами. Будем также предполагать, что аналитическое выражение для функции $U_{gr}^{(GR)}(R)$, определяющее энергию гравитационного взаимодействия двух таких сфер, задается следующим интегралом:

$$U_{gr}^{(GR)}(R) \stackrel{\text{def}}{=} \int f_N dR. \quad (3)$$

Очевидно, что учет собственного вращения масс потребует ориентации не на формулу (1), а на соответствующее общерелятивистское («двухчастичное») выражение для *вращающихся* черных дыр (решение Керра).

В целях дальнейшего исследования удобно ввести обозначение для массы – символ M . Тогда

$$m_1 = M_{\text{major}} = M \quad (\text{большая масса}), \quad (4a)$$

$$m_2 = M_{\text{minor}} = m \text{ (мѐншая масса)}.$$

Введем также безразмерный параметр – отношение масс

$$\delta = \frac{m}{M} \tag{4b}$$

с областью определения

$$\delta_0 \leq \delta \leq 1,$$

где минимальное (ненулевое!) значение параметра $\delta_0 = \delta_{\text{min}}$

$$\delta_0 = \frac{m_{\text{min}} \neq 0}{M_{\text{max}} \neq \infty} \ll 1$$

определено как отношение предельно малой массы покоя к предельно большой (существование которых является специальным предположением, его необходимость и следствия из него будут обсуждены ниже).

Выпишем явно также выражения для параметров a, b и их отношения в новой параметризации:

$$a = \frac{G_N}{c^2}(M + m) = \frac{G_N}{c^2}M_+ = \frac{MG_N}{c^2}(1 + \delta), \tag{4c}$$

где $M_+ = M + m = M(1 + \delta)$ – суммарная масса;

$$b = \left(\frac{G_N}{c^2}\right)^2 Mm = \left(\frac{MG_N}{c^2}\right)^2 \delta; \tag{4d}$$

$$\frac{b}{a} = \frac{G_N}{c^2} \frac{Mm}{M + m} = \frac{\mu G_N}{c^2} = \frac{MG_N}{c^2} \frac{\delta}{1 + \delta}, \tag{4e}$$

$$\varkappa = \frac{b}{a^2} = \frac{R_1 R_2}{(R_1 + R_2)^2} = \frac{\mu}{M_+} = \frac{\delta}{(1 + \delta)^2}, \tag{4f}$$

где $\mu = \frac{mM}{M + m} = \frac{M\delta}{1 + \delta}$ – приведенная масса.

Заметим, что в силу известного алгебраического соотношения $\frac{1}{2}(p + q) \geq (pq)^{\frac{1}{2}}$, справедливого для любой пары конечных положительных чисел p и q , параметр \varkappa может принимать конечные численные значения в области

$$\frac{\delta_0}{(1 - \delta_0)^2} \leq \varkappa \leq \frac{1}{4}.$$

Обратимся к выражению (1). В формально-математическом плане функция $f_N^{(GR)}$ хорошо определена во всей несвязной области изменения переменной

$$0 \leq R < \infty,$$

исключая особую точку $R_{\text{sing}} = a = R_1 + R_2$, которая разделяет эту область на две односвязные компоненты. Условимся кратко называть их *внешней* ($R > a$, вариант *A*) и *внутренней* ($R < a$ вариант *B*). Очевидно, что вариант *A* соответствует обобщению ньютоновой картины на тот случай, когда области локализации каждой из масс M и m не пересекаются и не имеют точек соприкосновения. С другой стороны, как хорошо известно, в ньютоновой гравитинамике взаимодействие тяготеющих масс в той ситуации, когда пробная масса m находится внутри массивного шара,

масса которого M распределена равномерно, на массу m действует эффективная сила квазиупругого типа, порождающая ее гармонические колебания.

Поэтому вариант B будем в дальнейшем интерпретировать как искомое обобщение именно данной ньютоновой ситуации.

Учтем теперь наличие МТР Гиббонса. Рассмотрим вначале вариант A . Условие существования максимальной силы, записанное в виде

$$f_N^{(GR)}(R; a, b) \Big|_{\max} \equiv f_N^{(GR)}(R_{\min}^{(+)}; a, b) = F_0,$$

немедленно приводит к соотношению

$$R_{\min}^{2(+)} - a^2 = b.$$

Из него с учетом обозначений (4a)–(4f) следует выражение

$$R_{\min}^{(+)} = a \{1 + \alpha\}^{\frac{1}{2}} = M \frac{G_N}{c^2} (1 + \delta) \left\{ 1 + \frac{\delta}{(1 + \delta)^2} \right\}^{\frac{1}{2}}, \quad (5)$$

определяющее то предельное значение радиальной переменной $R = R_{\min}$ («расстояние», до которого могут сблизиться центры двух тяготеющих масс). Поскольку допустимые значения параметра α ограничены снизу величиной $\alpha_{\min} = \frac{\delta_0}{(1 + \delta_0)^2} \neq 0$, то, как следует из (5), $R_{\min}^{(+)}$ всегда превосходит $R_{\text{sing}} = R_1 + R_2$. Это означает, что предельные значения радиальной переменной, зависящие от параметра $\delta = \frac{m}{M}$, всегда лежат выше сингулярности, причем величина $\Delta R_{\max}^{(+)}$ наибольшего удаления от нее возникает в случае равных масс ($m = M = \bar{m}$) и составляет

$$\Delta R_{\max}^{(+)} = \left(\sqrt{\frac{5}{4}} - 1 \right) \frac{2\bar{m}G_N}{c^2} \cong 0,118R_g(\bar{m}),$$

где $R_g(\bar{m})$ – радиус Шварцшильда.

Как нетрудно видеть, максимальное значение ньютоновой силы взаимного притяжения $f_N^{(\text{lim})} = -\frac{G_N m M}{R^2}$ в точке $R = R_{\text{lim}}^{(+)}$, определяемой (5), задается следующим соотношением:

$$f_N^{\text{lim}}(\alpha) = -\frac{\alpha}{1 + \alpha} \frac{c^4}{G_N}, \quad (6)$$

где параметр α определяется формулой (4f).

Полученное соотношение показывает, что выражение для силы ньютонова притяжения двух масс, релятивистски модифицированное с учетом предела Гиббонса, фактически содержит явную зависимость от безразмерного параметра $\delta = m/M$, т. е. от отношения масс конstituентов «бинарного» взаимодействия. Это весьма существенная деталь, поскольку из формулы (6) следуют экспериментально проверяемые выводы. Прежде всего, соотношения

$$W_m \stackrel{\text{def}}{=} \frac{1}{m} |f_N^{\text{lim}}| = \frac{c^4}{MG_N} \gamma(\delta),$$

$$W_M \stackrel{\text{def}}{=} \frac{\delta}{M} |f_N^{\text{lim}}| = \frac{\delta c^4}{MG_N} \gamma(\delta),$$

где $\gamma(\delta) = (1 + 3\delta + \delta^2)^{-1}$; $W_m / W_M = M / m$.

Здесь W_m и W_M – предельные значения того ускорения, которое может быть достигнуто каждым из конституентов пары в результате силового воздействия со стороны партнера. В современной литературе применительно к подобной ситуации используется термин *максимальное ускорение, зависящее от массы* (Mass Dependent Maximum Acceleration – MDMA).

Помимо этого ситуация в целом выглядит так, как если бы допустимое верхнее значение скорости движения v_{lim} (инертной) массы $\mu = \frac{mM}{M+m}$ под воздействием силы притяжения со стороны (тяготеющей), суммарной массы $M_+ = M+m$, равной $f_N^{(\text{lim})}(\mathfrak{x}) = -c^4/G_N$, определялось величиной

$$v_{\text{lim}} = \left(\frac{dr}{dt} \right)_{\text{lim}} = \alpha(\mathfrak{x})c,$$

где $\alpha(\mathfrak{x}) = \left(\frac{\mathfrak{x}}{1+\mathfrak{x}} \right)^{\frac{1}{4}}$ – множитель, меньший 1, численное значение которого задается отношением масс $\left(\delta = \frac{m}{M} \right)$. Для случая равных масс $\left(\delta = 1, \mathfrak{x} = \frac{1}{4} \right)$ $\alpha(\mathfrak{x}) = \frac{1}{\sqrt[4]{5}}$.

Наиболее интересна ситуация, когда $\delta \ll 1$, $\mathfrak{x} \approx \delta$. В этом случае

$$\alpha(\mathfrak{x}) \cong \delta^{\frac{1}{4}} = \left(\frac{m}{M} \right)^{\frac{1}{4}},$$

что соответствует известному эмпирическому закону Талли–Фишера, которому подчиняются, в частности, периферийные скорости вращения типичных спиральных галактик.

Разумеется, приведенные соображения (равно как и принципиальный вопрос о корректном переходе к ньютонову пределу) требуют теоретического обоснования в рамках самосогласованной гравидинамической модели, в которой наличие ограничений одновременно на скорость $\left(\frac{dr}{dt} \right)$ и скорость изменения импульса $\left(\frac{dp}{dt} \right)$ имели бы чисто кинематическое происхождение.

Переходя к рассмотрению варианта B , заметим прежде всего, что выражение (1) несингулярно в нуле, поскольку численное значение величины

$$f_N^{(GR)}(R=0; R_1, R_2) = -\mathfrak{x}F_0 = -\frac{\mu}{M_+} \frac{c^4}{G_N}$$

всегда конечно. Это выражение в структурно-содержательном плане аналогично (6). В то же время здесь речь идет о двух концентрических сферах.

Кроме того, знак силы в этом варианте оказывается противоположным тому, который он имеет в предыдущем варианте. Заметим также, что сингулярность теперь отсутствует и при $\delta = \delta_{\text{max}} = \frac{1}{4} \left(M = m, \mathfrak{x}_{\text{max}} = \frac{1}{4} \right)$, когда абсолютное значение силы становится в точности равным пределу Гиббонса $\left(F_{\text{max}} = F_G = \frac{c^4}{4G_N} \right)$. Этот случай соответствует такой предельной ситуации, когда толщина шарового слоя, разделяющего две концентрические сферы, стремится к нулю. Это означает, что варианту B соответствует, строго говоря, нетривиальная топологическая ситуация (сферическая трехмерная пространственная область с «выколотой» центральной точкой), анализ которой, не предполагающий выхода за пределы строгой общерелятивистской концепции, требует отдельного обсуждения.

В рамках принятого нами феноменологического подхода будем рассматривать вариант B в предположении, что область изменения переменной R находится в пределах интервала $\Delta R = R_1 - R_2$.

Определение экстремального значения $R = R_{\text{lim}}^{(-)}$ (в этом варианте – максимального) находится из условия

$$f_{gr}^{(GR)}(R_{\text{lim}}^{(-)}; a, b) = -F_0,$$

из которого следует соотношение

$$R_{\text{max}}^{(-)} = a\{1 - \delta\}^{\frac{1}{2}} = \frac{MG_N}{c^2}(1 + \delta) \left\{1 - \frac{\delta}{(1 + \delta)^2}\right\}^{\frac{1}{2}}. \quad (7)$$

Видно, что наибольшее удаление $\Delta R_{\text{max}}^{(+)}$ от R_{sing} теперь составляет

$$\Delta R_{\text{max}}^{(-)} = \left(1 - \sqrt{\frac{3}{4}}\right) \frac{2\bar{m}G_N}{c^2} \cong 0,234Rg(\bar{m}).$$

Рассмотрим теперь выражение (3), определяющее энергию взаимодействия $U_{gr}^{(GR)}$ для случая, когда сила $f_N^{(GR)}$ задана формулой (1). Возникает интеграл следующего вида:

$$U_{gr}^{(GR)} \stackrel{\text{def}}{=} F_0 b \int \frac{dR}{R^2 - a^2} = F_0 \frac{b}{a} \int \frac{d\left(\frac{R}{a}\right)}{\left(\frac{R}{a}\right)^2 - 1},$$

где $a = R_1 + R_2$, $b = R_1 R_2$.

Интеграл вида $I = \int \frac{d\eta}{\eta^2 - 1}$ относится к числу табличных и выражается (для внешней и внутренней областей соответственно) через элементарные функции следующим образом:

$$(A): \quad I_A = \int \frac{dx}{x^2 - 1} = -\text{Arcth } x + \text{const} = -\frac{1}{2} \ln \left(\frac{x+1}{x-1} \right) + \text{const} \quad (8)$$

$$\left(x = \frac{R}{a} > 1 \right);$$

$$(B): \quad I_B = \int \frac{d\xi}{\xi^2 - 1} = -\text{Arth } \xi + \text{const} = -\frac{1}{2} \ln \left(\frac{1+\xi}{1-\xi} \right) + \text{const} \quad (9)$$

$$\left(\xi = \frac{R}{a} < 1 \right).$$

Подчеркнем, что в рассматриваемой нами ситуации, когда $(x_{\text{lim}} > 1)$ и $(\xi_{\text{lim}} < 1)$ функции (8) и (9) не имеют сингулярности в точке $\eta = 1$ в силу несвязности области изменения переменной R .

Здесь конкретные значения констант могут быть фиксированы выбором граничных условий.

Очевидно, что функция $U_{gr}^{(GR)}(R; a, b)$ принимает конечные значения в предельных точках $R_{\text{lim}} = R_{\text{min}}^{(+)}$ (формула (5), вариант (A)) и $R_{\text{lim}} = R_{\text{max}}^{(-)}$ (формула (7), вариант (B)).

Асимптотическое поведение этой функции при $\frac{R}{a} \gg 1$ в первом варианте и при $\frac{R}{a} \ll 1$ во втором очевидно.

Поскольку

$$\ln \left(\frac{\frac{R}{a} + 1}{\frac{R}{a} - 1} \right) \Bigg|_{\frac{R}{a} \gg 1} = \ln \left(\frac{1 + \frac{a}{R}}{1 - \frac{a}{R}} \right) \Bigg|_{\frac{a}{R} \ll 1} \cong \ln \left(1 + \frac{2a}{R} \right) \Bigg|_{\frac{a}{R} \ll 1} \cong 2a / R,$$

$$\ln \left(\frac{1 + \frac{R}{a}}{1 - \frac{R}{a}} \right) \Bigg|_{\frac{R}{a} \ll 1} \cong \ln \left(1 + \frac{2R}{a} \right) \Bigg|_{\frac{R}{a} \ll 1} \cong 2R/a,$$

то получаем

$$(A): U_{gr}^{(GR)}(R; a, b) \Bigg|_{\frac{R}{a} \gg 1} = -bF_0 \frac{1}{R} = -R_1 R_2 \frac{C^4}{G_N} \frac{1}{R} = -\frac{G_N m M}{R} = U_{gr}^N(R),$$

где $U_{gr}^{(N)} = -\frac{G_N m M}{R}$ – ньютоново выражение для энергии двухчастичного гравитационного взаимодействия.

Соответственно

$$f_{gr}^{(RG)}(R) \Bigg|_{\frac{R}{a} \gg 1} \stackrel{\text{def}}{=} -\frac{\partial U_{gr}^{(N)}}{\partial R} = -\frac{G_N m M}{R^2} = f_{gr}^{(N)} \text{ – ньютонова сила (ЗВТ).}$$

$$(B): U_{gr}^{(GR)}(R; a, b) \Bigg|_{\frac{R}{a} \ll 1} = -\frac{b}{a^2} F_0 R = -\frac{\mu}{M_+} \frac{C^4}{G_N} R = -\frac{\delta}{(1+\delta)^2} \frac{C^4}{G_N} R = -\mathfrak{a} \frac{c^4}{G_N} R.$$

Соответственно, оставаясь в рамках традиционного определения связи между силой и потенциальной энергией, получаем в этом приближении

$$f_{gr}^{(RG)}(R) \Bigg|_{\frac{R}{a} \ll 1} \stackrel{\text{def}}{=} -\frac{\partial U_{gr}^{(N)}}{\partial R} \Bigg|_{\frac{R}{a} \ll 1} = \frac{\mu}{M_+} F_0 = \mathfrak{a} \frac{G_N}{c^4} = f_{gr}^{(RG)}(\mathfrak{a}), \tag{10}$$

т. е. возникает постоянная (не зависящая от радиальной переменной) сила $f_g^{(RG)}(\mathfrak{a}) = \mathfrak{a} \frac{c^4}{G_N}$, имеющая характер силы гравитационного отталкивания. Эта сила параметрически зависит от отношения масс (в приближении $\delta \ll 1$ – линейно). Заметим, что с чисто формальной стороны соотношение (10) сохраняет смысл и для случая $\delta = 1$, что находится в полном соответствии с отмеченным выше фактом отсутствия сингулярности у исходного выражения в точке $R = 0$.

Как нетрудно видеть, в обоих случаях мы имеем дело с компактной трехмерной «потенциальной ямой», которая имеет следующую конфигурацию. Параметр

$$\bar{a} = \frac{1}{2}(R_1 + R_2) = \frac{a}{2}$$

определяет ее полуширину, тогда как величина

$$\bar{b} = (R_1 R_2)^{\frac{1}{2}} = b^{\frac{1}{2}}$$

ее глубину, так что в общем случае «яма» имеет форму сплюснутого эллипсоида вращения с эксцентриситетом ε , равным

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\bar{b}^2}{\bar{a}^2} \right)^{\frac{1}{2}} = \left(1 - \frac{4R_1 R_2}{(R_1 + R_2)^2} \right)^{\frac{1}{2}} = (1 - 4\mathfrak{a})^{\frac{1}{2}} = \left\{ 1 - \frac{4\delta}{(1+\delta)^2} \right\}^{\frac{1}{2}}.$$

Сферическому случаю ($\varepsilon = 0$) соответствует равенство масс ($M = m = \bar{m}$), что не вызывает дополнительных вопросов в случае варианта (A), но требует отдельного обсуждения при рассмо-

трении варианта (B). В то же время в рамках принятых нами допущений (наличие M_{\max} и m_{\min}) предельное значение $\varepsilon_{\text{lim}} = 1$ исключается в обоих вариантах.

Минимальное значение энергии взаимодействия, которое соответствует предельным значениям (5) и (7), составляет соответственно

$$(A): U_{gr}^{(GR)} \Big|_{\min} = -\frac{1}{4} \bar{m} c^2 \ln \left(\frac{\sqrt{5} + 2}{\sqrt{5} - 2} \right) \approx -\frac{2,8875}{4} \bar{m} c^2 \cong -0,72 \bar{m} c^2,$$

$$(B): U_{gr}^{(GR)} \Big|_{\min} = -\frac{1}{4} \bar{m} c^2 \ln \left(\frac{2 + \sqrt{3}}{2 - \sqrt{3}} \right) \approx -\frac{2,6377}{4} \bar{m} c^2 \cong -0,66 \bar{m} c^2.$$

Здесь $\bar{m} = m = M$ ($\delta = 1$, ситуация, когда обе массы совпадают по величине).

В этих предельных случаях гравитационная потенциальная яма имеет характер сферы с радиусом, определяемым (5), (7) соответственно.

Если рассматривать обсуждаемую двухчастичную систему как изолированную, где отрицательная энергия взаимодействия является энергией связи, то в ее полную энергию следует включать суммарную положительную энергию, соответствующую массе покоя конститuentов.

Предложенная двухпараметрическая модель принадлежит к категории феноменологических. Вопрос о ее возможных физических приложениях требует, помимо фиксации численного значения ее параметров, также выбора той динамической версии, в рамках которой можно производить конкретные теоретические расчеты наблюдаемых эффектов.

Наиболее естественным выглядит отождествление параметра M_{\max} с массой Вселенной ($M_{\max} = M_u \sim 10^{55}$ г). Если же ориентироваться на чисто классическую версию динамики, то безоговорочным нижним пределом следует полагать планковское значение массы, определяемое, как известно, условием численного совпадения гравитационного радиуса $R_g(m) = \frac{2mG_N}{c^2}$

с комптоновской длиной $\Lambda_c = \hbar / mc$, т. е. $m_{\min} = \left(\frac{\hbar c}{2G_N} \right)^{\frac{1}{2}}$. В действительности (на квазиклассическом уровне) этот предел следует определить, как минимум, на порядок выше. Ориентировочно можно считать, что $M_{\max} = M_u$, $\delta_0 = \frac{m_{\min}}{M_{\max}} \sim 10^{-60} - 10^{-59}$.

В этом случае во всем диапазоне допустимых значений параметров M и δ всегда можно выделить достаточно широкий интервал ($M \ll M_u$, $10^{-60} \ll \delta \ll 1$), моделирующий наблюдаемую физическую ситуацию.

Заметим, в частности, что в ситуации, когда $M \gg m$, MDMA «маленькой» пробной массы практически не зависит от параметра $\delta = \frac{m}{M}$, а «гравитационное поле» большой массы M в качестве приобретаемого ею ускорения будет с высокой степенью точности равно величине

$$W_M^{(\text{backgrown})} = \frac{c^4}{MG_N} \sim M^{-1} \cdot 10^{-49} \text{ см} / \text{с}^2$$

и носить фоновый характер (не зависеть от величины m). Если $M = M_u \sim 10^{55}$ г, то $W_{M_u} \sim 10^{-8}$ см/с², что совпадает по порядку величины с экспериментально зарегистрированным аномальным ускорением космических кораблей Пионер 10/11 (Pioneer Anomaly).

В целом очевидным объектом рассмотрения в рамках предлагаемого подхода (вариант (A)) могут стать такие реальные крупномасштабные астрофизические объекты «бинарного» типа, как спиральные галактики, двойные звезды, две близкие отдельные галактики, пары массивных черных дыр.

Что касается варианта (B), то он может быть использован в целях поиска возможной физической интерпретации внутреннего решения Шварцшильда.

Выводы. Основные результаты проведенного исследования могут быть резюмированы следующим образом.

1. Если рассматривать МТР Гиббонса в чисто классическом механическом контексте, то оказывается, что предельная величина силы двухчастичного гравитационного взаимодействия параметрически зависит от отношения масс $\left(\delta = \frac{m}{M}\right)$ конstituентов (допустимые численные значения масс конечны!). Она достигает экстремального значения соответственно – наибольшего (в случае: $\delta = 1$) и наименьшего (в случае: $\delta = \delta_0 = \frac{m_{\min}}{M_{\max}}$). Прямым следствием этого факта является а) существование предельного значения ускорения для обеих масс, составляющих пару (максимальное, зависящее от массы, ускорение (Mass Dependent Maximum Acceleration – MDMA)), причем отношение этих ускорений обратно пропорционально отношению масс; а также б) наличие фактора, равного $\delta^{\frac{1}{4}}$ (при $\delta \ll 1$), который снижает обычный спецрелятивистский верхний предел скорости движения (v_{\max}) меньшей из масс, входящих в пару, относительно большей до величины $v_{\max} = \left(\frac{m}{M}\right)^{\frac{1}{4}} c$, что находится в соответствии с данными астрофизических наблюдений (известный эмпирический закон Талли–Фишера, эффект «скрытой» массы – «холодная темная материя»).

2. Найденные явные аналитические выражения для энергии двухчастичного гравитационного взаимодействия имеют минимум конечной величины, что, в принципе, обеспечивает устойчивость рассматриваемой системы. Они имеют перспективы использования в целях описания поведения наблюдаемых крупномасштабных астрофизических объектов.

3. Корректная математическая экстраполяция исходного выражения для силы на конечную (внутреннюю) область изменения радиальной переменной приводит к ситуации, соответствующей эффекту гравитационного отталкивания.

Благодарности. Выражаю благодарность В. В. Кудряшову, Е. А. Толкачеву и А. Э. Шалыт-Марголину за помощь в работе и полезные обсуждения.

Acknowledgements. I am grateful to V. V. Kudryashov, E. A. Tolkachev and A. E. Shalyt-Margolin for assistance in the study and useful discussions.

Список использованных источников

1. Gibbons, G. W. The Maximum Tension Principle in General Relativity / G. W. Gibbons // *Found. Phys.* – 2002. – Vol. 32, N 12. – P. 1891–1901. doi.org/10.1023/a:1022370717626
2. Schiller, C. General relativity and cosmology derived from principle of maximum power or force / C. Schiller // *Int. J. Theor. Phys.* – 2005. – Vol. 44, N 9. – P. 1629–1647. doi.org/10.1007/s10773-005-4835-2
3. Tomilchik, L. M. Conformally-Flat Metric, Position-Dependent Mass and Cold Dark Matter / L. M. Tomilchik, V. V. Kudryashov // *Actual Problems of MicroWorld Physics. Proc. Int. School-Seminar, Gomel, Belarus, July 28–August 8, 2003* / ed. P. Starovoitov. – Dubna, 2004. – Vol. 1. – P. 24–42.
4. Томильчик, Л. М. Модель пульсирующего массивного шара как точное решение уравнений самовзаимной гамилтоновой динамики / Л. М. Томильчик // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2017. – Т. 61, № 1. – С. 36–46.
5. Weinstein, G. On Rotating Black Holes in Equilibrium in General Relativity / G. Weinstein // *Communications on Pure and Applied Mathematics.* – 1990. – Vol. 43, N 7. – P. 903–948. doi.org/10.1002/cpa.3160430705
6. Manko, V. S. Double-Reissner-Nordstrom Solution and the interaction force between two spherical masses in general relativity / V. S. Manko // *Phys. Rev. D.* – 2007. – Vol. 76, N 12. – P. 124032 (1–6). doi.org/10.1103/physrevd.76.124032

References

1. Gibbons G. W. The Maximum Tension Principle in General Relativity. *Foundations of Physics*, 2002, vol. 32, no. 12, pp. 1891–1901. doi.org/10.1023/a:1022370717626
2. Schiller C. General relativity and cosmology derived from principle of maximum power or force. *International Journal of Theoretical Physics*, 2005, vol. 44, no. 9, pp. 1629–1647. doi.org/10.1007/s10773-005-4835-2

3. Tomilchik L. M., Kudryashov V. V. Conformally-Flat Metric, Position-Dependent Mass and Cold Dark Matter. Starovoitov P. (ed.) *Actual Problems of MicroWorld Physics. Proceedings International School-Seminar, Gomel, Belarus, July 28–August 8, 2003*. Dubna, 2004, vol. 1, pp. 24–42.

4. Tomilchik L. M. Model of massive pulsating sphere as an exact solution of the Hamiltonian self reciprocal dynamics equations. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 1, pp. 36–46 (in Russian).

5. Weinstein G. On Rotating Black Holes in Equilibrium in General Relativity. *Communications on Pure and Applied Mathematics*, 1990, vol. 43, no. 7, pp. 903–948. doi.org/10.1002/cpa.3160430705

6. Manko V. S. Double-Reissner-Nordstrom Solution and the interaction force between two spherical masses in general relativity. *Physical Review D*, 2007, vol. 76, no. 12, pp. 124032 (1–6). doi.org/10.1103/physrevd.76.124032

Информация об авторе

Томильчик Лев Митрофанович – член-корреспондент, 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: lmt@dragon.bas-net.by.

Information about the author

Tomilchik Lev Mitrofanovich – Corresponding Member, 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: lmt@dragon.bas-net.by.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 577.322.23

Поступило в редакцию 25.10.2017

Received 25.10.2017

**А. В. Свирид¹, М. А. Шапиро¹, П. Г. Шагойко², Ю. Г. Походня², А. А. Гилеп¹,
член-корреспондент С. А. Усанов¹**

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Национальная антидопинговая лаборатория, Минск, Республика Беларусь

**ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
РЕКОМБИНАНТНОЙ ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

Аннотация. С целью выявления модуляторов активности тромбоксансинтазы человека осуществлен анализ взаимодействия рекомбинантного гемопротейда с различными низкомолекулярными лигандами. Показано, что тромбоксансинтаза взаимодействует с рядом жирных кислот и их производных (потенциальные субстраты или конкурентные ингибиторы), а также является мишенью для ингибирования производными имидазола и триазола, применяющимися в медицинской практике и сельском хозяйстве, что позволило установить механизм, по которому могут реализовывать свое токсическое действие соединения, нарушающие работу эндокринной системы человека (endocrine-disrupting chemicals, EDC).

Впервые показано восстановление атома железа гема тромбоксансинтазы NADPH-цитохром P450 редуктазой, что оказывает частичное ингибирующее действие на фермент и подавляет образование побочных продуктов реакции – 12-гидроксигептадекатриеновой кислоты (12-ННТ) и малонового диальдегида (МДА). Предполагается, что данный механизм может участвовать в регуляции активности фермента *in vivo*.

Ключевые слова: тромбоксансинтаза человека (TXAS), разностное спектрофотометрическое титрование, NADPH-цитохром P450 редуктаза (CPR), азолы, жирные кислоты, endocrine-disrupting chemicals (EDC)

Для цитирования: Лиганд-связывающие и каталитические свойства рекомбинантной тромбоксансинтазы человека / А. В. Свирид [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 51–65.

**Andrey V. Svirid¹, Michail A. Shapira¹, Pavel G. Shahoika², Yury G. Pakhadnia², Andrei A. Gilep¹,
Corresponding Member Sergei A. Usanov¹**

¹Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²National Antidoping Laboratory, Minsk, Republic of Belarus

**LIGAND-BINDING AND CATALYTIC PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN
THROMBOXANE SYNTHASE**

Abstract. To study the spectrum of modulators of the human thromboxane synthase activity, the interaction of recombinant protein with various low-molecular weight ligands was analyzed. It was shown that thromboxane synthase interacts with a number of fatty acids and their derivatives (potential substrates or concurrent inhibitors), being a target for nonselective inhibition by imidazole and triazole derivatives used in medical practice and agriculture. Thus, another mechanism of action of endocrine-disrupting chemicals (EDC) was established.

For the first time, the reduction of heme iron of thromboxane synthase by cytochrome P450 reductase was shown. This interaction accompanied by a partial inhibitory effect on the enzyme suppresses the formation of reaction by-products 12-hydroxyheptadecatenic acid (12-HHT) and malonic dialdehyde (MDA). It is likely that this mechanism can participate in the regulation of the enzyme activity *in vivo*.

Keywords: human thromboxane synthase (TXAS), differential spectrophotometric titration, cytochrome P450 reductase (CPR), azoles, fatty acids, endocrine-disrupting chemicals (EDC)

For citation: Svirid A. V., Shapira M. A., Shahoika P. G., Pakhadnia Yu. G., Gilep A. A., Usanov S. A. Ligand-binding and catalytic properties of human recombinant thromboxane synthase. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 51–65 (in Russian).

Введение. Цитохромы P450 (CYP) – ферменты, играющие важнейшую роль в метаболизме множества эндогенных и экзогенных соединений. Цитохромы P450 участвуют в биосинтезе ряда биологически активных соединений из группы эйкозаноидов. Среди них следует отметить тромбоксаны и простаглицлины, последовательный синтез которых осуществляется циклооксигеназой (ЦОГ) и тромбоксан- и простаглицлин-синтазами (TXAS и PGIS, КФ 5.3.99.5 и КФ 5.3.99.4 соответственно), принадлежащими к суперсемейству цитохромов P450 [1].

Изомеризация простаглицдина H_2 (PGH₂) в тромбоксан A_2 (TXA₂), катализируемая тромбоксансинтазой, является ключевым этапом сложного многофакторного механизма агрегации тромбоцитов и сокращения стенок кровеносных сосудов, который способствует процессу тромбообразования.

Первоначально тромбоксансинтаза была выделена из тромбоцитов человека. Фермент преимущественно синтезируется в протромбоцитах и стволовых гематопозитических клетках-предшественниках моноцитов, лейкоцитов и макрофагов, где TXA₂ участвует в регуляции их дифференцировки [2]. Среди других типов клеток синтез TXAS обнаружен в клетках легких, почек, желудка, кишечника, селезенки, тимуса, поджелудочной железы и печени [3]. Однако об особенностях функционирования указанного фермента как в тромбоцитах и их предшественниках, так и в других типах клеток, где он экспрессируется, известно сравнительно мало: не известна пространственная структура белка, недостаточно информации о модуляторах активности фермента как низко-, так и высокомолекулярных. В связи с этим роль тромбоксансинтазы в клетках других тканей, кроме крови, и точный механизм развития и патогенеза болезней кроветворной системы до сих пор остаются невыясненными.

В отсутствие данных о трехмерной структуре ферментов, наиболее часто используемым методом для характеристики активного центра является анализ данных о лигандах, взаимодействующих с ним. Для понимания структурной организации цитохромов P450 используют скрининг потенциальных субстратов и ингибиторов. Анализ литературных данных свидетельствует о практически полном отсутствии сведений о влиянии известных ингибиторов цитохромов P450 на тромбоксансинтазу.

Для скрининга ингибиторов наиболее логичным является выбор тех соединений, которые взаимодействуют с различными цитохромами P450, при этом оптимальной стратегией будет использование соединений, встречающихся в повседневной жизни человека и, как следствие, способных оказывать влияние на тромбоксансинтазу. Наиболее известными соединениями такого рода являются азолы. Азольные соединения – ингибиторы цитохромов P450 грибов и ряда других патогенных организмов, действие которых направлено на нарушение синтеза эргостерина за счет ингибирования функции ланостерин 14 α -деметилазы (CYP51). К таким соединениям также относятся ингибитор стероид-17- α -гидроксилазы (CYP17A1) абиратерон и ингибиторы ароматазы (CYP19A1) анастрозол и летрозол. Кроме того, соединения этого ряда используют в качестве пестицидов (фунгицидов) в сельском хозяйстве и промышленности.

Взаимодействие азолов с цитохромами P450 реализуется за счет комплексного эффекта гидрофобных взаимодействий боковых групп азотсодержащих соединений и консервативных остатков активного сайта цитохрома P450, а также образования координационной связи азота азольной или триазольной группы и железа гема. Таким образом, параметры взаимодействия тромбоксансинтазы с азольными соединениями, широко встречающимися в промышленности и медицине, сами по себе являются важным фармакологическим показателем, что может пролить свет на механизм действия веществ, нарушающих работу эндокринной системы (endocrine-disrupting chemicals (EDC)).

На данный момент отсутствуют данные о каких-либо аллостерических эффекторах активности тромбоксансинтазы, а также о ее возможных белковых партнерах, ответственных как за регуляцию активности фермента, так и за перенос метастабильных продуктов реакции к мишеням действия данных соединений, относящихся к группе аутокринных и паракринных регуляторов (тромбоксана A_2 (TXA₂), 12-гидроксигептадекатриеновой кислоты (12-ННТ), рис. 1). Поиск таких белковых партнеров и их функциональных связей является актуальной задачей – модуляторы активности ферментов, равно как и транспортеры метастабильных по своей химической природе соединений представляют интерес для лекарственной терапии целого ряда заболеваний.

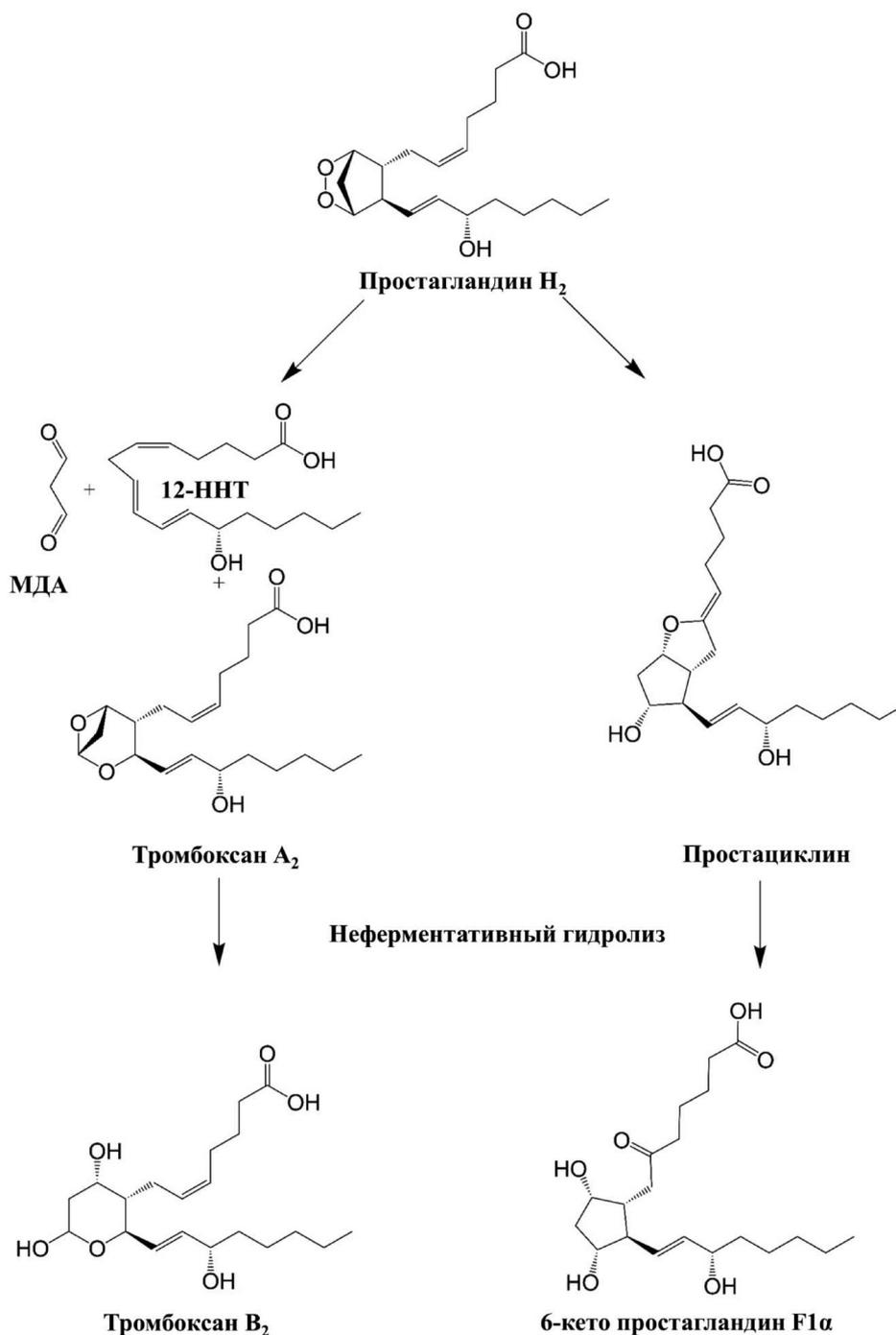


Рис. 1. Изомеризация простагландина H₂ в тромбоксан A₂ и простациклин
 Fig. 1. Isomerization of prostaglandin H₂ to thromboxane A₂ and prostacyclin

Материалы и методы исследования. В работе использовались следующие реактивы: Tris основной, этилен-диамино-тетраацетат натрия (Na-ЭДТА) жирные кислоты и их производные, производные имидазола и триазола, NADPH, D-глюкоза (Sigma, США), C₁₈-картриджи для твердофазной экстракции Sep-Pak (Waters, США), простагландины и их производные (Cayman Chemical, Santa Cruz Biotechnology, США), ацетонитрил, метанол, муравьиная кислота (Fisher Chemical, США), 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновая кислота (HEPES), холат натрия (Serva, Германия), каталаза (Merck, Германия), глюкозооксидаза, изоцитратдегидрогеназа (Boehringer Ingelheim, Германия).

Рекомбинантную тромбосансинтазу человека экспрессировали и выделяли по описанной нами ранее методике [4].

Разностное спектрофотометрическое титрование. Титрование 1 мкМ раствора фермента проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4). Разностный спектр поглощения регистрировали в области 350–500 нм. Для титрования использовали растворы лигандов в этаноле с исходной концентрацией 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} М. Состояние белка в начале и в конце титрования контролировалось записью абсолютного спектра поглощения фермента в том же диапазоне длин волн. Во время эксперимента объемная концентрация этанола в кювете не превышала 1 %. Титрование проводили на двухлучевом спектрофотометре Cary 5000 (Agilent Technologies, США).

Определение константы диссоциации комплекса фермента с лигандом. Константу диссоциации комплекса фермент-лиганд (K_d) определяли, аппроксимируя данные спектрофотометрического титрования нелинейной функцией [5]:

$$A = A_{\max} \frac{L + [E] + K_d - ([L] + E + K_d)^2 - 4[E][L]}{2[E]}$$

где A – амплитуда спектрального ответа при концентрации лиганда $[L]$; A_{\max} – амплитуда спектрального ответа при насыщении фермента лигандом; $[L]$ – текущая концентрация лиганда в растворе; $[E]$ – концентрация фермента.

Определение изомеразной активности фермента. Активность фермента реконструировали в аликвотах (1500 мкл), содержащих смесь фермента в концентрации 7 пкмоль/мл и 60 нмоль/мл субстрата. Реакция проводилась в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4). Кинетический спектр поглощения для регистрации побочных продуктов реакции записывался в области 300–200 нм при 20 °С от 0 до 10 мин. Интервал записи спектра – 0,2 мин. Реакция останавливалась по прошествии 10 мин добавлением метанола до конечной концентрации 50 %. Продукт реакции экстрагировали из реакционной смеси на C_{18} -картриджах для твердофазной экстракции Sep-Pak (Waters, США) по инструкции производителя.

Количество основного продукта реакции анализировали на ВЭЖХ системе, оснащенной колонкой BDS Hypersil C18 ($2,1 \times 150$ мм, размер частиц 3 мкм) (Thermo Fisher Scientific, США), с проточным оптическим и масс-спектрометрическим детектором TSQ Quantum Access (Thermo Fisher Scientific, США). Состав подвижной фазы был следующим: градиент растворителя Б (0,1 %-ная муравьиная кислота в ацетонитриле) в растворителе А (0,2 %-ная муравьиная кислота). Программа разделения заключалась в градиенте растворителя Б (от 5 % растворителя Б в 0 мин до 85 % растворителя Б в 20 мин), затем 5 % растворителя Б с 21 по 28 мин. Скорость потока составляла 0,25 мл/мин, объем вносимого образца – 10 мкл.

Ферментативное восстановление фермента NADPH-цитохром P450 редуктазой (CPR). Ферментативное восстановление осуществляли в аликвотах (1500 мкл) в условиях пониженной концентрации растворенного кислорода. Данный эффект достигался использованием двойной циклической реакции в присутствии глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4), D-глюкозы и каталазы (КФ 1.11.1.6) [6]. Таким образом, каждая аликвота содержала смесь TXAS и NADPH-цитохром P450 редуктазу (CPR) в эквимольных концентрациях (1 мкМ), 1 мкМ пальмитиновой кислоты, 0,5 мМ D-глюкозы, 1 ед/мл глюкозооксидазы, 100 ед/мл каталазы. Аликвота, находящаяся в опытной кювете, барботировалась СО до насыщающей концентрации в течение 60 с. Реакция запускалась добавлением в аликвоты NADPH до концентрации 200 мкМ. Реакция проводилась в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4).

Разностный спектр поглощения для регистрации карбонильного комплекса восстановленного гема записывался в области 500–400 нм при 20 °С от 0 до 130 мин. Интервал записи спектра – 1,5 мин во временном промежутке до 20 мин, а затем 5 мин во временном промежутке до 130 мин.

Реконструкция ферментативной активности в присутствии редокс-партнера. Активность фермента реконструировали в аликвотах (500 мкл), содержащих смесь цитохрома P450 в концентрации 1 мкМ и CPR в концентрации 2 мкМ, субстрат (40 мкМ) и систему для регенерации NADPH – изоцитрат натрия (8 мМ), изоцитрат дегидрогеназу (1 ед/мл). Реакция проводилась в следующем буфере: 25 мМ HEPES (рН 7,4), 10 мМ $MgCl_2$, 0,1 % холат натрия.

Реакцию инициировали внесением NADPH (конечная концентрация 250 мкМ). Через определенные промежутки времени реакцию останавливали добавлением десятикратного объема метилхлорида и перемешиванием на вортексе. Содержимое пробирки центрифугировали 10 мин при 5000 g, отбирали верхний слой, остаток упаривали под аргоном и анализировали на ВЭЖХ системе, оснащенной колонкой ZORBAX Extend C18 (2,1 × 150 мм, размер частиц 1,8 мкм) с проточным оптическим и масс-спектрометрическим детектором Q-TOF 6550 iFunnel (Agilent Technologies, США). Состав подвижной фазы был следующим: градиент растворителя Б (0,2 %-ная муравьиная кислота в ацетонитриле) в растворителе А (0,2 %-ная муравьиная кислота). Программа разделения заключалась в градиенте растворителя Б (от 5 % растворителя Б в 0 мин до 100 % растворителя Б в 28 мин), затем 5 % растворителя Б в 29 мин. Скорость потока составляла 0,3 мл/мин, объем вносимого образца – 15 мкл.

Компьютерное моделирование пространственной структуры фермента. Пространственные модели тромбоксансинтазы строили методом гомологичного моделирования с использованием сервера I-TASSER [7]. Стереохимическое качество моделей оценивали с помощью программы Procheck v.3.5.4 [8]. Молекулярный докинг пептидных молекул проводился с помощью веб-сервиса CABS-dock [9].

Молекулярная динамика комплексов проводилась с использованием пакета программ Amber16 (силовое поле GAFF для низкомолекулярных соединений, ff14SB для аминокислотных остатков и силовое поле для пентакоординированного гема в составе белка), в явном растворителе с применением функций термостата Ланжевана и баростата Берендсена.

Система проходила этапы минимизации энергии, нагрева и уравнивания с ограничениями подвижности аминокислотных остатков, а непосредственно молекулярная динамика проводилась без вышеназванных ограничений. Временной интервал динамики, для которого проводились расчеты, составил 100 нс.

Результаты и их обсуждение. *Скрининг лигандов активного центра тромбоксансинтазы человека среди жирных кислот и их производных.* Для изучения каталитических свойств рекомбинантной TXAS методом спектрофотометрического титрования был проведен скрининг потенциальных лигандов активного центра фермента. Результаты скрининга приведены в табл. 1.

U46619 (9,11-метаноэпокси PGH₂, табл. 1) является стабильным аналогом PGH₂, одновременно конкурентным ингибитором и миметиком PGH₂ по отношению к тромбоксановому рецептору (TXAR). Показано, что K_d комплекса с U46619 составляет $9,06 \pm 1,36$ мкМ, что согласуется с ранее полученными данными для рекомбинантной TXAS в липидных нанодисках [10]. С учетом спектральных параметров и результатов титрования TXAS U46619 можно с уверенностью заключить, что полученный нами препарат рекомбинантной TXAS соответствует природному ферменту в активной форме.

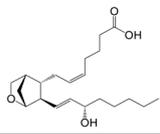
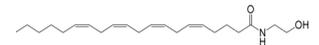
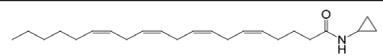
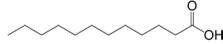
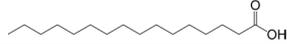
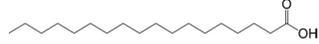
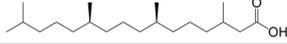
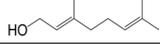
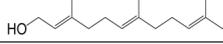
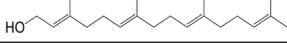
Арахидоновая кислота является природным предшественником PGH₂ и обладает высоким сродством к активному центру TXAS ($1,46 \pm 0,12$ мкМ), тогда как N-арахидониловы проявляют меньшее сродство (анандамид, НАДА и А-CPA), $4,36 \pm 0,51$, $4,09 \pm 0,39$, $10,08 \pm 1,66$ мкМ соответственно (табл. 1). Этот факт может быть объяснен нарушением стабилизации лиганда в активном центре из-за отсутствия взаимодействия карбоксильной группы и Arg413 [11; 12].

Наибольшей аффинностью к активному центру TXAS среди насыщенных жирных кислот обладает стеариновая кислота ($K_d = 0,29 \pm 0,04$ мкМ), меньшей – пальмитиновая ($K_d = 0,65 \pm 0,09$ мкМ) и лауриновая ($K_d = 4,09 \pm 0,54$ мкМ, рис. 2). **Аффинность взаимодействия увеличивается с увеличением длины алифатической цепи, что говорит о том, что немаловажным фактором в стабилизации лиганда является его взаимодействие с гидрофобными аминокислотными остатками активного центра.**

Метил-разветвленные жирные кислоты и их производные (фитановая кислота, гераниол, фарнезол, геранилгераниол) не вызывают спектральных изменений (табл. 1), свидетельствуя о том, что такая модификация исключает связывание лиганда с активным центром. Другим возможным механизмом является затруднение проникновения вещества в активный центр через канал доступа.

Т а б л и ц а 1. Результаты скрининга лигандов активного центра TXAS среди жирных кислот и их производных

T a b l e 1. The results of TXAS active site ligand screening among fatty acids and their derivatives

| Лиганд Ligand | Структура Structure | Тип спектрального ответа Type of spectral response | ΔA_{\max} | K_d , мкМ K_d , μM |
|---|---|---|-------------------|--------------------------------------|
| U46619 |  | I тип | 0,04 | $9,06 \pm 1,36$ |
| Арахидоновая кислота |  | I тип | 0,07 | $1,46 \pm 0,12$ |
| Этаноламид арахидоновой кислоты (анандамид) |  | I тип | 0,03 | $4,36 \pm 0,51$ |
| N-арахидонил-дофамин (НАДА) |  | I тип | 0,07 | $4,09 \pm 0,39$ |
| N-арахидонил-циклопропиламин (А-СРА) |  | I тип | 0,02 | $10,08 \pm 1,66$ |
| Лауриновая кислота |  | I тип | 0,09 | $4,09 \pm 0,54$ |
| Пальмитиновая кислота |  | I тип | 0,07 | $0,65 \pm 0,09$ |
| Стеариновая кислота |  | I тип | 0,03 | $0,29 \pm 0,04$ |
| Фитановая кислота |  | н/о | – | – |
| Гераниол |  | н/о | – | – |
| Фарнезол |  | н/о | – | – |
| Геранилгераниол |  | н/о | – | – |

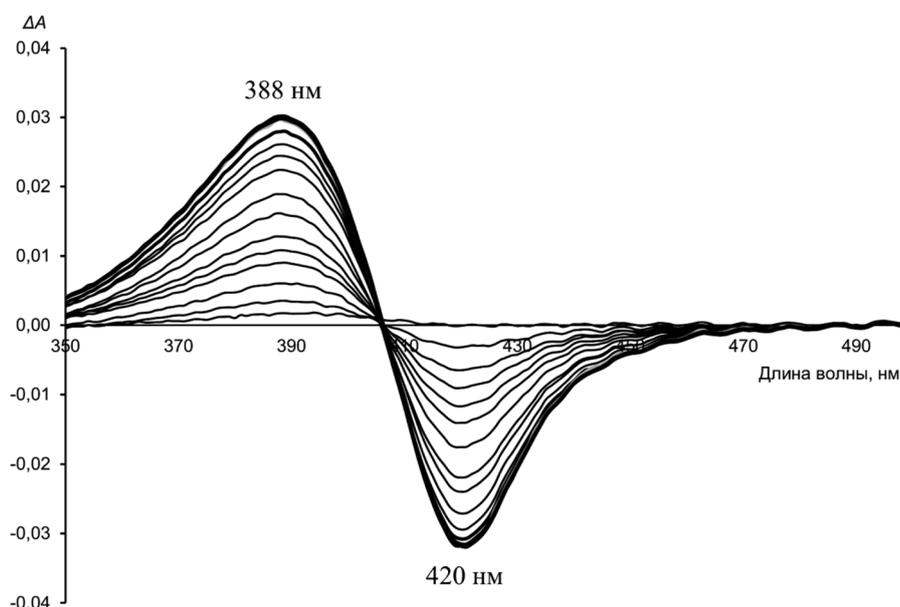


Рис. 2. Дифференциальный спектр, наблюдаемый при титровании TXAS лауриновой кислотой. Титрование проводилось при длине оптического пути 1 см в калий-фосфатном буфере с pH 7,4 концентрациями лауриновой кислоты от 100 нМ до 75 мкМ

Fig. 2. Differential spectrum obtained by titration of TXAS with lauric acid. Titration was carried out at an optical path length of 1 cm in potassium phosphate buffer (pH 7.4) and lauric acid concentrations from 100 nM to 75 μM

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что активный центр TXAS способен связывать различные лиганды, близкие по структуре простагландину H_2 , и могут выступать как в качестве потенциальных субстратов фермента, так и в качестве конкурентных ингибиторов.

Связывание жирных кислот предполагает наличие у TXAS **структурных особенностей**, характерных для семейства СУР4, осуществляющих $\omega(\omega-1)$ -гидроксилирование жирных кислот, которые проводят передачу различных воспалительных, аллергических и ответственных за сосудистый тонус регуляторных сигналов [13]. Возможно, что при определенных условиях в клетке TXAS может осуществлять монооксигеназные реакции, по «классическому» механизму. Гидроксилирование жирных кислот влияет на их биологическую активность, что в данном случае может служить механизмом тонкой регуляции синтеза метастабильного, но крайне высокоактивного тромбоксана A_2 .

Относительно высокая аффинность TXAS по отношению к жирным кислотам позволяет выдвинуть гипотезу о наличии в активном центре ферментов кластера гидрофобных аминокислотных остатков, взаимодействие с которыми вносит дополнительный вклад в стабилизацию субстрата, а также о возможном наличии функциональной нагрузки у такого взаимодействия. Кроме того, при оценке функциональной активности фермента необходимо учитывать возможность наличия в его микроокружении производных жирных кислот, обладающих высоким сродством к активному центру. Наличие таких взаимодействий внутри клетки может выступать дополнительным фактором регуляции TXAS.

Ферментативное восстановление тромбоксансинтазы NADPH-цитохром P450 редуктазой. Тромбоксансинтаза традиционно рассматривается как исключительно «неклассический» представитель семейства цитохромов P450, не требующий для осуществления катализа переноса электронов с восстановительного эквивалента, поэтому на данный момент не существует литературных данных о возможности ее восстановления NADPH в присутствии редокс-партнера. В то же время TXAS обладает спектральными свойствами, подтверждающими ее принадлежность к суперсемейству цитохромов P450. Поэтому мы выдвинули предположение о принципиальной возможности ферментативного восстановления данного фермента и впервые показали,

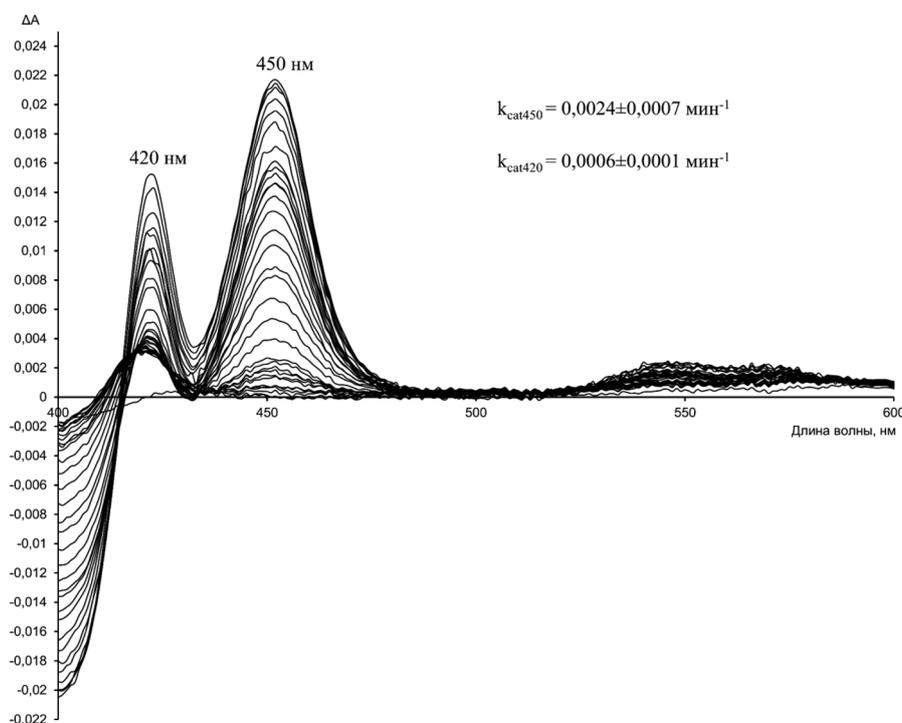


Рис. 3. Разностный кинетический спектр (0–130 мин) карбонильного комплекса TXAS, восстановленной NADPH-цитохром P450 редуктазой

Fig. 3. The difference kinetic spectrum (0–130 min) of the carbonyl complex of TXAS, reduced by NADPH-cytochrome P450 reductase

что, действительно, фермент способен принимать электроны в процессе ферментативного восстановления NADPH-цитохром Р450 редуктазой (CPR).

Процесс восстановления детектировался спектрофотометрически, путем регистрации увеличения поглощения карбонильного комплекса восстановленной формы фермента (450 нм) в реконструированной системе (рис. 3). Скорость данного процесса характеризуется кинетической зависимостью реакции нулевого порядка ($k_{\text{cat}450} = 0,0024 \pm 0,0007 \text{ мин}^{-1}$).

Параллельно с образованием карбонильного комплекса происходит образование неактивной формы цитохрома Р450 – Р420 (максимум поглощения на 420 нм). Скорость образования данной формы подчиняется такой же кинетической зависимости ($k_{\text{cat}420} = 0,0006 \pm 0,0001 \text{ мин}^{-1}$). Следует отметить, что восстановлению подвергается лишь часть фермента, находившегося в растворе – $0,32 \pm 0,12 \text{ мкмоль}$ ($32 \pm 12 \%$).

В результате проведенных исследований нами впервые показана возможность переноса электронов с NADPH при участии NADPH-цитохром Р450 редуктазы (компонент монооксигеназных систем микросомального типа, СYP II класса) на TXAS, что открывает возможность участия данного фермента в реакциях, требующих наличия белковых электрон-донорных систем для активации молекулярного кислорода.

Реконструкция изомеразной активности и влияние на нее различных эффекторов. Для оценки влияния CPR и других эффекторов на активность TXAS нами реконструирована ее специфическая ферментативная активность. Активность фермента оценивалась по стабильному продукту гидролиза основного продукта реакции – тромбоксану В₂ (TXB₂) (рис. 4, а), дополнительно, где это было возможно, проводились кинетические эксперименты для регистрации побочных продуктов реакции – 12-ННТ и малонового диальдегида (МДА) (рис. 4, б).

Активность препарата рекомбинантной TXAS по основному продукту реакции составляет $584,52 \pm 22,76$, $727,97 \pm 291,84 \text{ мин}^{-1}$ по 12-ННТ, $1262,62 \pm 432,33 \text{ мин}^{-1}$ по МДА, что сопоставимо с активностью тромбксансинтазы, полученной из тромбоцитов человека [14].

В качестве эффекторов были использованы CPR, CPR в присутствии насыщающей концентрации NADPH и синтетический высокоаффинный пептид (SGVYKVLVDWQH), взаимодействующий с тромбксансинтазой, последовательность которого нами была получена ранее в эксперименте по поиску пептидомиметиков тромбксансинтазы методом пептидного фагового дисплея

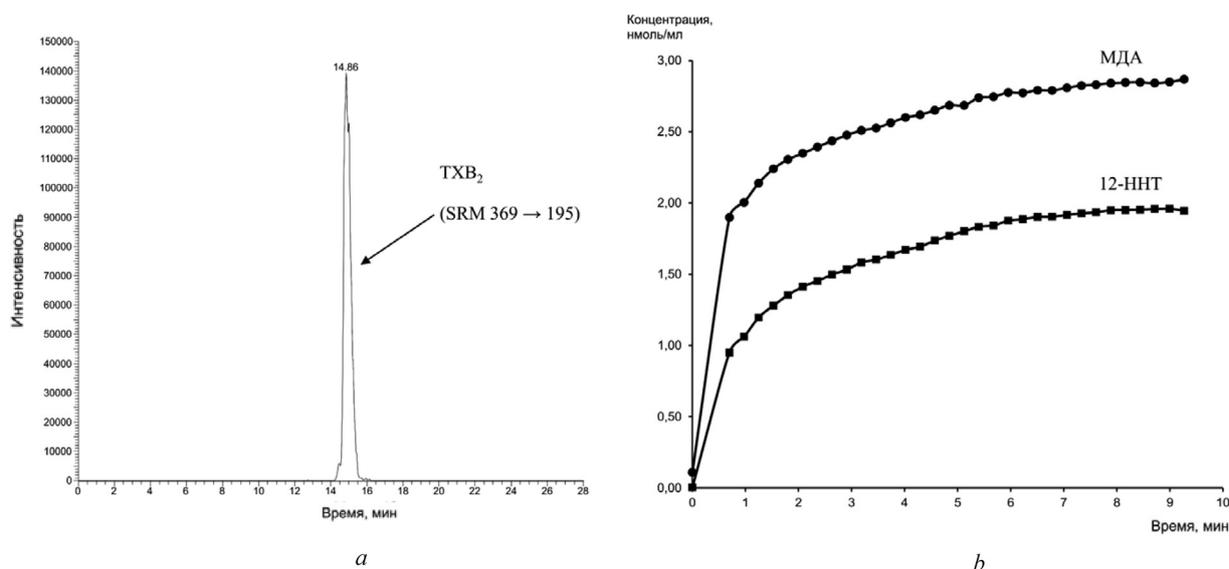


Рис. 4. Регистрация продуктов изомеразной реакции TXAS: а – результаты ВЭЖХ-МС анализа реакционной смеси с селективной детекцией на тройном квадруполе, содержащей конечный продукт изомеризации PGH₂ в TXA₂ (TXB₂); б – график кинетической зависимости реакции относительно побочных продуктов реакции (12-ННТ и МДА) formation

Fig. 4. Registration of products of the TXAS-catalysed isomerase reaction: а – results of an HPLC-MS analysis of a reaction mixture containing the final isomerization product of PGH₂ in TXA₂ (TXB₂) with selective detection on a triple quadrupole; б – kinetic dependence graph of reaction by-products (12-NHT and MDA) formation

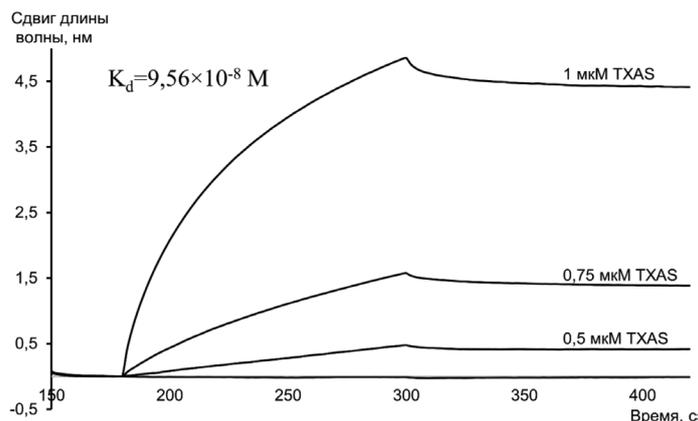


Рис. 5. Кинетические кривые, полученные методом биослойной интерферометрии, характеризующие связывание TXAS с иммобилизованным на матрице пептидом

Fig. 5. Kinetic curves, obtained by biolayer interferometry, characterizing the binding of TXAS to peptide immobilized on the matrix

[4]. Константа диссоциации комплекса пептида с TXAS, рассчитанная исходя из данных биослойной интерферометрии, составила $9,56 \cdot 10^{-8}$ М (рис. 5).

Данные молекулярного моделирования комплекса TXAS с пептидом показали преимущественную его локализацию с проксимальной стороны гема (рис. 6, *a*), области, ответственной за связывание редокс-партнера у микросомальных СУР. Комплекс остается стабильным на протяжении всего временного диапазона молекулярной динамики (100 нс), расчетные центры масс пептида и области связывания находились в пределах 6–10 Å друг от друга (рис. 6, *b*), что характеризует данное взаимодействие как прочное.

Анализ данных активности фермента в реконструированной системе показал (табл. 2), что в присутствии CPR и NADPH наблюдается снижение активности фермента до $47,24 \pm 3,87$ %, но при этом не детектируются побочные продукты реакции. Это может быть связано с конформационными изменениями фермента, индуцируемыми взаимодействием с редокс-партнером. Эти конформационные изменения могут стабилизировать субстрат в активном центре, направляя катализируемую реакцию по механизму, ответственному за образование основного продукта реакции. Фактором, запускающим этот процесс, вероятно, является присутствие восстановительного эквивалента, в пользу чего говорит то, что в случае наличия CPR, но отсутствия NADPH в среде, данный эффект не наблюдается, активность сохраняется.

Взаимодействие с десятикратным молярным избытком высокоаффинного пептида, предпо-

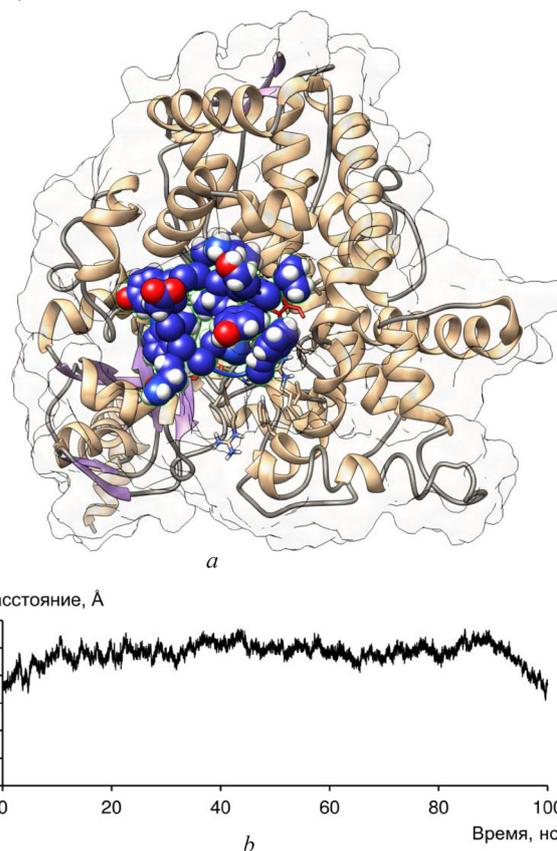


Рис. 6. Визуализация данных молекулярного докинга пептида к TXAS: *a* – трехмерная модель комплекса TXAS-пептид, где синим цветом изображен пептид; *b* – график динамики расстояния между центрами масс пептида и центра связывания на поверхности белка

Fig. 6. Visualization of molecular docking data of peptide to TXAS: *a* – 3D model of the TXAS-peptide complex, where the peptide color is blue; *b* – a graph of the dynamics of the distance between the peptide and the binding site on the surface of the protein centers of mass

Т а б л и ц а 2. Сравнение показателей активности фермента в присутствии различных эффекторов

T a b l e 2. Comparison of enzyme activity in the presence of various effectors

| Условия реакции Reaction conditions | Активность фермента по TXB ₂ Enzyme activity based on TXB ₂ product | Активность фермента по 12-ННТ Enzyme activity based on 12-NHT product | Активность фермента по МДА Enzyme activity based on MDA product |
|--|--|--|--|
| Без добавления фермента | Продукт не детектируется | Продукт не детектируется | Продукт не детектируется |
| Стандартные условия | 100 % | 100 % | 100 % |
| В присутствии CPR и NADPH | 47,24 ± 3,87 % | Продукт не детектируется | Продукт не детектируется |
| В присутствии CPR | 121,94 ± 10,51 % | 103,55 ± 1,15 % | 114,10 ± 1,68 % |
| В присутствии высокоаффинного пептида | 93,34 ± 7,33 % | 87,31 ± 0,52 % | 83,57 ± 0,50 % |

ложительно связывающегося с проксимальной, относительно гема, поверхностью TXAS, не влияет на специфическую активность фермента.

Нами сделано предположение о возможном наличии у TXAS гидроксилазной активности в реконструированной системе в присутствии CPR и NADPH. В качестве возможных субстратов использовались насыщенные жирные кислоты и производные арахидоновой кислоты (табл. 1). Анализ масс-спектров реакционной смеси, однако, не показал наличия гидроксированных продуктов реакции (данные не представлены). Таким образом, наличие у фермента гидроксилазной активности в присутствии CPR и NADPH остается не доказанным.

Скрининг лигандов активного центра тромбоксансинтазы среди производных имидазола и триазола. На данный момент отсутствует информация о взаимодействии тромбоксансинтазы с производными имидазола и триазола, используемыми в качестве противогрибковых препаратов широкого спектра действия и эффективных пестицидов, применяемых в сельском хозяйстве. Оценка данных взаимодействий представляет интерес для выявления соединений, способных модулировать активность тромбоксансинтазы и вызывать нежелательные побочные эффекты при их применении.

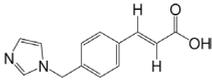
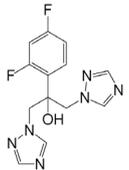
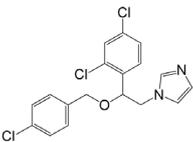
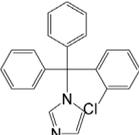
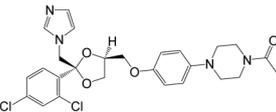
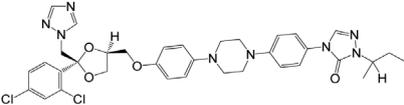
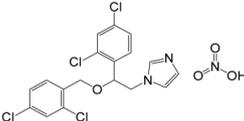
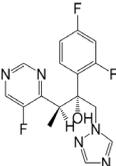
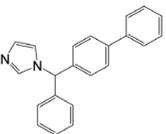
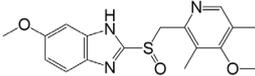
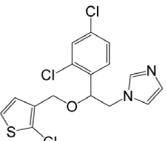
Скрининг лигандов активного центра рекомбинантной TXAS (табл. 3 и 4) среди производных имидазола и триазола показал, что большая группа соединений, используемых в настоящее время в качестве эффективных противогрибковых препаратов и высокоактивных пестицидов, обладает высокой аффинностью к активному центру фермента. Этот факт может говорить о наличии у данных соединений неспецифической ингибиторной активности по отношению к тромбоксансинтазе человека.

Нами показано, что из группы проанализированных азольных соединений наибольшей аффинностью к ферменту обладают клотримазол, эконазол, тиоконазол, бифоназол и кетоконазол (табл. 3) ($K_d = 0,26 \pm 0,05$, $0,28 \pm 0,04$, $0,29 \pm 0,0$, $0,37 \pm 0,07$ и $1,19 \pm 0,07$ мкМ соответственно). Аффинность этих соединений соразмерна или превышает таковую для озагреля – ингибитора тромбоксансинтазы, применяемого для снижения синтеза тромбосана A₂ [15]. Среди указанных препаратов лишь кетоконазол применяется системно и аккумулируется в крови в значительных концентрациях. При этом следует отметить, что одним из побочных эффектов кетоконазола является тромбоцитопения [16]. В связи с этим одним из факторов, вызывающих тромбоцитопению у больных, получающих препарат системно, может быть его способность неизбирательно ингибировать тромбоцитогенез посредством ингибирования активности TXAS, обусловленного высоким сродством к активному центру фермента.

При системном применении флуконазол, кетоконазол, итраконазол и вориконазол распределяются в большинстве тканей, органов и биологических жидкостей организма, присутствуя в них в высоких концентрациях. Системные азолы отличаются длительностью периода полувыведения: $T_{1/2}$ кетоконазола – около 8 ч, итраконазола и флуконазола – около 30 ч. Важно отметить, что азолы для местного применения (клотримазол, миконазол и др.) могут абсорбироваться через кожу. Например, при местном применении бифоназола 0,6–0,8 % абсорбируется здоровой кожей и 2–4 % – воспаленной. При вагинальном применении клотримазола абсорбция составляет 3–10 % [17]. Именно поэтому токсичность этих лекарственных препаратов может

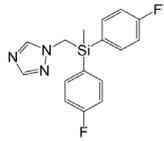
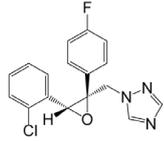
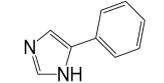
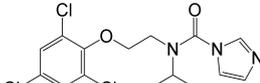
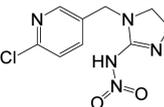
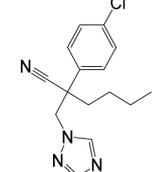
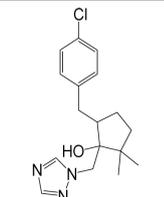
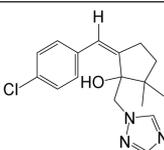
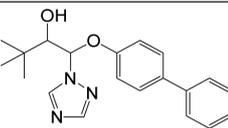
Т а б л и ц а 3. Результаты скрининга лигандов активного центра TXAS среди соединений азольной природы, применяемых в медицине

Table 3. The results of TXAS active site ligand screening among azoles used in medicine

| Лиганд Ligand | Структура Structure | Тип спектрального ответа Type of spectral response | ΔA_{\max} | K_d , мкМ K_d , μM |
|------------------|---|---|-------------------|--------------------------------------|
| Озагель |  | II тип | 0,05 | $2,30 \pm 0,36$ |
| Флуконазол |  | II тип | 0,05 | $13,77 \pm 0,99$ |
| Эконазол |  | II тип | 0,07 | $0,28 \pm 0,04$ |
| Клотримазол |  | II тип | 0,10 | $0,26 \pm 0,05$ |
| Кетоконазол |  | II тип | 0,11 | $1,19 \pm 0,07$ |
| Итраконазол |  | н/о | | |
| Миконазол |  | II тип | 0,05 | $2,36 \pm 1,19$ |
| Вориконазол |  | II тип | 0,03 | $18,71 \pm 4,50$ |
| Бифоназол |  | II тип | 0,10 | $0,37 \pm 0,07$ |
| Омепразол |  | н/о | | |
| Тиоконазол |  | II тип | 0,09 | $0,29 \pm 0,06$ |

Т а б л и ц а 4. Результаты скрининга лигандов активного центра TXAS среди соединений азольной природы, применяемых в сельском хозяйстве в качестве пестицидов

Table 4. The results of TXAS active site ligand screening among azoles used in agriculture as pesticides

| Лиганд Ligand | Структура Structure | Тип спектрального ответа Type of spectral response | ΔA_{\max} | K_d , мкМ K_d , μM |
|------------------|---|---|-------------------|--------------------------------------|
| Флузилазол |  | II тип | 0,07 | $0,18 \pm 0,03$ |
| Эпоксиконазол |  | II тип | 0,04 | $1,68 \pm 0,19$ |
| 4-Фенилимидазол |  | II тип | 0,07 | $10,48 \pm 1,03$ |
| Прохлораз |  | II тип | 0,05 | $0,83 \pm 0,14$ |
| Имидаклоприд |  | н/о | | |
| Миклобутанил |  | II тип | 0,07 | $20,26 \pm 1,69$ |
| Метконазол |  | II тип | 0,08 | $14,81 \pm 1,85$ |
| Тритиконазол |  | II тип | 0,03 | $24,73 \pm 5,17$ |
| Битерганол |  | II тип | 0,02 | $14,55 \pm 5,53$ |

приводить к развитию неспецифических побочных реакций со стороны кроветворной системы. Следует обратить внимание на то, что итраконазол, который является структурным гомологом кетоконазола, но обладает более объемной пространственной структурой, не связывается с активным ферментом, что говорит о том, что, скорее всего, возникают стерические затруднения при доступе этого соединения в активный центр. Наименьшие равновесные константы диссоциации характерны для производных имидазола, в то время как производные триазола имеют на порядок меньшую аффинность: K_d комплексов с флуконазолом и вориконазолом составила $13,77 \pm 0,99$ и $18,71 \pm 4,50$ мкМ соответственно.

Среди азолов, применяющихся в сельском хозяйстве (пестицидов, табл. 4) наибольшим сродством к ферменту обладают флузилазол, прохлораз и эпоксиконазол ($K_d = 0,18 \pm 0,03$ и $1,68 \pm 0,19$ мкМ соответственно). Флузилазол и эпоксиконазол применяются в качестве фунгицидов для обработки фруктов и пшеницы и обладают умеренным токсическим действием на человека. Прохлораз обладает доказанным антагонистическим действием на биосинтез стероидных гормонов, блокируя рецепторы этих гормонов [18] и ингибируя CYP17A1 [19] и ароматазу (CYP19A1) [20]. Тем не менее, можно сделать вывод, что высокая аффинность данных соединений к активному центру фермента может приводить к нежелательным токсическим эффектам на кроветворные клетки, снижая продукцию тромбоксанов.

Таким образом, скрининг лигандов TXAS среди производных имидазола и триазола показал, что высокоаффинное взаимодействие с ферментом характерно для соединений, являющихся производными имидазола и обладающих объемными гидрофобными заместителями по первому положению имидазольного кольца. Этот факт указывает на то, что для стабилизации лиганда в активном центре принципиальное значение имеет взаимодействие окружения азольного гетероцикла с аминокислотными остатками, образующими саму полость активного центра. При этом сам объем данной полости достаточно велик для того, чтобы связывать такие соединения, как кетоконазол, но в то же время не способен связывать более крупные молекулы, например, итраконазол.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что идентификация ряда соединений с субмикромольной аффинностью к активному центру TXAS позволяет рассматривать данные лиганды в качестве потенциальных неселективных ингибиторов тромбоксан синтазы человека и что данные соединения могут вызывать неспецифические реакции со стороны кроветворной системы при приеме их в качестве противогрибковых препаратов или их накоплении в результате употребления продуктов питания обработанных фунгицидами.

Заключение. В настоящей работе нами определена субстратная специфичность тромбоксансинтазы человека по отношению к различным жирным кислотам и их производным. Показано взаимодействие TXAS как с арахидоновой кислотой, так и с ее производными и рядом насыщенных жирных кислот, в то время как метил-разветвленные липиды не способны образовывать комплексы с активным центром фермента. Впервые показан перенос электронов с NADPH на TXAS с помощью NADPH-цитохром P450 редуктазы. Вместе с тем присутствие NADPH-цитохром P450 редуктазы в реакционной смеси снижает изомеразную активность TXAS и перенаправляет реакцию по механизму, ответственному за образование основного продукта. Во внутриклеточных условиях это может служить дополнительным механизмом регуляции фермента, продуктом реакции которого являются метастабильные, но крайне высокоактивные метаболиты.

Скрининг лигандов тромбоксансинтазы человека среди производных имидазола и триазола выявил соединения, способные с высокой аффинностью связываться с TXAS и, вероятно, эффективно ингибировать активность, при этом большей аффинностью характеризуются производные имидазола с гидрофобным заместителем по первому положению. Таким образом, прием этих соединений в качестве противогрибковых препаратов или употребление продуктов питания, обработанных фунгицидами, может приводить к нежелательным побочным эффектам со стороны кроветворной системы из-за неселективного ингибирования тромбоксансинтазы. Эта информация дополняет понимание механизма действия веществ, нарушающих работу эндокринной системы человека (endocrine-disrupting chemicals, EDC).

Благодарности. Работа выполнялась при поддержке БРРФИ (грант X16P-062). Коллектив авторов выражает благодарность старшему научному сотруднику лаборатории белковой инженерии Я. В. Диченко за помощь в постановке *in silico* экспериментов.

Acknowledgments. This work was supported by the Belarussian Foundation for Basic Research (grant no. X16P-062). Authors acknowledge Ya. V. Dichenko for assistance in carrying out *in silico* experiments.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ullrich, V. Prostacyclin and thromboxane synthase as P-450 enzymes / V. Ullrich, H. Graf // *Trends Pharmacol. Sci.* – 1984. – Vol. 5 – P. 352–355. doi.org/10.1016/0165-6147(84)90467-x
2. Ullrich, V. Thromboxane synthase. From isolation to function / V. Ullrich, R. Nüsing // *Stroke*. – 1990. – Vol. 21, N 12, Suppl. IV – P. 134–138.
3. Localization of thromboxane synthase in human tissues by monoclonal antibody Tü 300 / R. Nüsing [et al.] // *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* – 1992. – Vol. 421, N 3 – P. 249–254. doi.org/10.1007/bf01611182
4. Пептидный фаговый дисплей в скрининге пептидомиметиков тромбоксан синтазы / Д. О. Дормешкин [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2015. – Т. 59, № 2. – С. 53–60.
5. Locuson, C. W. Visible Spectra of Type II Cytochrome P450-Drug Complexes: Evidence that “Incomplete” Heme Coordination Is Common / C. W. Locuson, J. M. Hutzler, T. S. Tracy // *Drug Metab. Dispos.* – 2007. – Vol. 35, N 4. – P. 614–622. doi.org/10.1124/dmd.106.012609
6. Enzymatic Oxygen Scavenging for Photostability without pH Drop in Single-Molecule Experiments / M. Swoboda [et al.] // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6, N 7. – P. 6364–6369. doi.org/10.1021/nn301895c
7. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction / J. Yang [et al.] // *Nat. Methods*. – 2014. – Vol. 12, N 1. – P. 7–8. doi.org/10.1038/nmeth.3213
8. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures / R. A. Laskowski [et al.] // *J. Appl. Crystallogr.* – 1993. – Vol. 26, N 2. – P. 283–291. doi.org/10.1107/s002188992009944
9. Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking / M. Blaszczyk [et al.] // *Methods*. – 2016. – Vol. 93. – P. 72–83. doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.004
10. Functional Investigations of Thromboxane Synthase (CYP5A1) in Lipid Bilayers of Nanodiscs / A. Das [et al.] // *ChemBioChem*. – 2014. – Vol. 15, N 6. – P. 892–899. doi.org/10.1002/cbic.201300646
11. Identification of thromboxane A2 synthase active site residues by molecular modeling-guided site-directed mutagenesis / L. H. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271, N 33. – P. 19970–19975. doi.org/10.1074/jbc.271.33.19970
12. Hsu, P.-Y. Identification of Thromboxane Synthase Amino Acid Residues Involved in Heme-Propionate Binding / P.-Y. Hsu, A.-L. Tsai, L.-H. Wang // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – Vol. 383, N 1. – P. 119–127. doi.org/10.1006/abbi.2000.2041
13. Edson, K. Z. CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities / K. Z. Edson, A. E. Rettie // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 13, N 12. – P. 1429–1440. doi.org/10.2174/15680266113139990110
14. Products, Kinetics, and Substrate Specificity of Homogeneous Thromboxane Synthase from Human Platelets: Development of a Novel Enzyme Assay / M. Hecker [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1987. – Vol. 254, N 1. – P. 124–135. doi.org/10.1016/0003-9861(87)90088-9
15. Uchida, Y. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on cyclical reduction of coronary blood flow in dogs / Y. Uchida, S. Murao // *Jpn. Heart J.* – 1981. – Vol. 22, N 6. – P. 971–975. doi.org/10.1536/ihj.22.971
16. Effect of cytochrome P-450 inhibitors econazole, bifonazole and clotrimazole on prostanoid formation / H. C. Köfeler [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 130, N 6. – P. 1241–1246. doi.org/10.1038/sj.bjp.0703427
17. New Progress in Azole Compounds as Antimicrobial Agents / H.-Z. Zhang [et al.] // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 17, N 2. – P. 122–166. doi.org/10.2174/1389557516666160630120725
18. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action / A. M. Vinggaard [et al.] // *Int. J. Androl.* – 2006. – Vol. 29, N 1. – P. 186–192. doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x
19. Robitaille, C. N. Antiandrogenic Mechanisms of Pesticides in Human LNCaP Prostate and H295R Adrenocortical Carcinoma Cells / C. N. Robitaille, P. Rivest, J. T. Sanderson // *Toxicol. Sci.* – 2015. – Vol. 143, N 1. – P. 126–135. doi.org/10.1093/toxsci/kfu212
20. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells / J. T. Sanderson [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2002. – Vol. 182, N 1. – P. 44–54. doi.org/10.1006/taap.2002.9420

References

1. Ullrich V., Graf H. Prostacyclin and thromboxane synthase as P-450 enzymes. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1984, vol. 5, pp. 352–355. doi.org/10.1016/0165-6147(84)90467-x
2. Ullrich V., Nüsing R. Thromboxane synthase. From isolation to function. *Stroke*, 1990, vol. 21, no. 12, suppl. IV, pp. 134–138.
3. Nüsing R., Sauter G., Fehr P., Dürmüller U., Kasper M., Gudat F., Ullrich V. Localization of thromboxane synthase in human tissues by monoclonal antibody Tü 300. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology*, 1992, vol. 421, no. 3, pp. 249–254. doi.org/10.1007/bf01611182
4. Dormeshkin D. O., Svirid A. V., Gilep A. A., Usanov S. A. Screening of thromboxane synthase peptidomimetics by peptide phage display. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2015, vol. 59, no. 2, pp. 53–60 (in Russian).
5. Locuson C. W., Hutzler J. M., Tracy T. S. Visible Spectra of Type II Cytochrome P450-Drug Complexes: Evidence that “Incomplete” Heme Coordination Is Common. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, vol. 35, no. 4, pp. 614–622. doi.org/10.1124/dmd.106.012609
6. Swoboda M., Henig J., Cheng H.-M., Brugger D., Haltrich D., Plumeré N., Schlierf M. Enzymatic Oxygen Scavenging for Photostability without pH Drop in Single-Molecule Experiments. *ACS Nano*, 2012, vol. 6, no. 7, pp. 6364–6369. doi.org/10.1021/nn301895c

7. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 7–8. doi.org/10.1038/nmeth.3213
8. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 1993, vol. 26, no. 2, pp. 283–291. doi.org/10.1107/s0021889892009944
9. Blaszczyk M., Kurcinski M., Kouza M., Wieteska L., Debinski A., Kolinski A., Kmiecik S. Modeling of protein-peptide interactions using the CABS-dock web server for binding site search and flexible docking. *Methods*, 2016, vol. 93, pp. 72–83. doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.07.004
10. Das A., Varma S. S., Mularczyk C., Meling D. Functional Investigations of Thromboxane Synthase (CYP5A1) in Lipid Bilayers of Nanodiscs. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2014, vol. 15, no. 6, pp. 892–899. doi.org/10.1002/cbic.201300646
11. Wang L. H., Matijevic-Aleksic N., Hsu P. Y., Ruan K. H., Wu K. K., Kulmacz R. J. Identification of thromboxane A2 synthase active site residues by molecular modeling-guided site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, vol. 271, no. 33, pp. 19970–19975. doi.org/10.1074/jbc.271.33.19970
12. Hsu P.-Y., Tsai A.-L., Wang L.-H. Identification of Thromboxane Synthase Amino Acid Residues Involved in Heme-Propionate Binding. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, vol. 383, no. 1, pp. 119–127. doi.org/10.1006/abbi.2000.2041
13. Edson K. Z., Rettie A. E. CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2013, vol. 13, no. 12, pp. 1429–1440. doi.org/10.2174/15680266113139990110
14. Hecker M., Haurand M., Ullrich V., Diezfalusy U., Hammarström S. Products, Kinetics, and Substrate Specificity of Homogeneous Thromboxane Synthase from Human Platelets: Development of a Novel Enzyme Assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1987, vol. 254, no. 1, pp. 124–135. doi.org/10.1016/0003-9861(87)90088-9
15. Uchida Y., Murao S. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on cyclical reduction of coronary blood flow in dogs. *Japanese Heart Journal*, 1981, vol. 22, no. 6, pp. 971–975. doi.org/10.1536/ihj.22.971
16. Köfeler H. C., Fauler G., Windischhofer W., Leis H. J. Effect of cytochrome P-450 inhibitors econazole, bifonazole and clotrimazole on prostanoid formation. *British Journal of Pharmacology*, 2000, vol. 130, no. 6, pp. 1241–1246. doi.org/10.1038/sj.bjp.0703427
17. Zhang H.-Z., Gan L.-L., Wang H., Zhou C.-H. New Progress in Azole Compounds as Antimicrobial Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 17, no. 2, pp. 122–166. doi.org/10.2174/1389557516666160630120725
18. Vinggaard A. M., Hass U., Dalgaard M., Andersen H. R., Bonefeld-Jørgensen E., Christiansen S., Laier P., Poulsen M. E. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *International Journal of Andrology*, 2006, vol. 29, no. 1, pp. 186–192. doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x
19. Robitaille C. N., Rivest P., Sanderson J. T. Antiandrogenic Mechanisms of Pesticides in Human LNCaP Prostate and H295R Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicological Sciences*, 2015, vol. 143, no. 1, pp. 126–135. doi.org/10.1093/toxsci/kfu212
20. Sanderson J. T., Boerma J., Lansbergen G. W., van den Berg M. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2002, vol. 182, no. 1, pp. 44–54. doi.org/10.1006/taap.2002.9420

Информация об авторах

Свирид Андрей Васильевич – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svirid.andrei@gmail.com.

Шapiro Михаил Анатольевич – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mshapira2016@gmail.com.

Шагойко Павел Георгиевич – химик. Национальная антидопинговая лаборатория (аг. Лесной, 31, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: pavell1sg@gmail.com.

Походня Юрий Георгиевич – канд. биол. наук, начальник отдела. Национальная антидопинговая лаборатория (аг. Лесной, 31, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: pohodnia@yahoo.com.

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

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

Svirid Andrey Vasilievich – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svirid.andrei@gmail.com.

Shapira Michail Anatolievich – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mshapira2016@gmail.com.

Shahoika Pavel Georgievich – Chemist. National Anti-doping Laboratory (31, Lesnoy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: pavell1sg@gmail.com.

Pakhadnia Yury Georgievich – Ph. D. (Biology), Head of the Department. National Anti-doping Laboratory (31, Lesnoy, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: pohodnia@yahoo.com.

Gilep Andrei Aleksandrovich – Ph. D. (Chemistry), Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by.

Usanov Sergei Aleksandrovich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220014, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)
УДК 577.152.1 547.92

Поступило в редакцию 11.12.2017
Received 11.12.2017

**О. В. Панибрат, П. С. Шабуня, С. А. Фатыхова,
член-корреспондент В. Н. Жабинский, П. А. Киселев**

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

АНТИКАНЦЕРОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ БРАССИНОСТЕРОИДОВ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ПЕЧЕНИ

Аннотация. Впервые охарактеризовано влияние природных brassinosteroidов 24-эпибрасинолида (24-ЭБ) и 28-гомокастастерона (28-ГКС), а также синтетических аналогов (22*S*,23*S*)-24-эпибрасинолида и (22*S*,23*S*)-28-гомокастастерона на пролиферацию активности в раковой клеточной линии **Hep G2 (карцинома печени)**, а также на каталитическую активность цитохрома P450, который участвует в метаболизме большинства проканцерогенов. Все четыре соединения при высоких концентрациях были активными в подавлении клеточной пролиферации исследуемой линии. Интересным является и тот факт, что при низких концентрациях 24-ЭБ, (22*S*,23*S*)-24-ЭБ и (22*S*,23*S*)-28-ГКС достоверно активировали рост клеток Hep G2. Все исследуемые brassinosteroidы ингибировали активность CYP1A1 и CYP1B1, за исключением 28-ГКС. Оказываемый эффект зависел от структуры боковой цепи и был более выражен в случае SS-ориентации гидроксильных групп в положении C22 и C23 ((22*S*,23*S*)-28-гомокастастерон). Полученные результаты указывают на возможность использования исследуемых brassinosteroidов (в наибольшей степени (22*S*,23*S*)-28-ГКС) для создания более эффективных препаратов для профилактики и лечения опухолевых заболеваний.

Ключевые слова: brassinosteroidы, **Hep G2**, антипролиферативная активность, B[a]P-7,8-диол, индукция цитохрома P450, монооксигеназная активность

Для цитирования: Антиканцерогенная активность brassinosteroidов в опухолевых клетках карциномы печени / О. В. Панибрат [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 66–72.

**Olesya V. Panibrat, Polina S. Shabunya, Sviatlana A. Fatykhava,
Corresponding Member Vladimir N. Zhabinskii, Peter A. Kiselev**

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

ANTICANCEROGENIC ACTIVITY OF BRASSINOSTEROIDS IN LIVER TUMOR CELLS

Abstract. In this study, we first characterized the effect of natural brassinosteroids, 24-epibrassinolide (EBI) and 28-homocastasterone (HCS), and synthetic analogs, (22*S*,23*S*)-24-epibrassinolide and (22*S*,23*S*)-28-homocastasterone, on the growth of the cancer cell line Hep G2 (hepatocellular carcinoma), as well as on the catalytic activity of cytochrome P450, which participates in the metabolism of most procarcinogens. All four compounds at high concentrations suppressed the proliferation of the test cell line. It is also interesting that at low concentrations, 24-EBI, (22*S*,23*S*)-24-EBI and (22*S*,23*S*)-28-HCS activated significantly the Hep G2 cell growth. All studied brassinosteroids, except for 28-HCS, inhibited the activity of CYP1A1 and CYP1B1. The effect depended on the structure of the side chain and was more pronounced in the case of the SS orientation of the hydroxyl groups at the positions C22 and C23 ((22*S*,23*S*)-28-homocastasterone).

The results of this work suggest that the studied brassinosteroids (especially (22*S*,23*S*)-28-homocastasterone) can be used to create effective drugs for tumor prevention and treatment

Keywords: brassinosteroids, Hep G2, antiproliferative activity, B[a]P-7,8-diol, induction of cytochrome P450, monooxygenase activity

For citation: Panibrat O. V., Shabunya P. S., Fatykhava S. A., Zhabinskii V. N., Kiselev P. A. Anticancerogenic activity of brassinosteroids in liver tumor cells. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 66–72 (in Russian).

Введение. Брасиностероиды (БС) представляют собой группу фитогормонов, которые широко распространены как в высших, так и в низших растениях и способны влиять на различные физиологические процессы. БС стимулируют рост, отвечают за устойчивость к стрессовым факторам, в том числе болезням, участвуют в процессах клеточного сигналинга и т. д. Хотя БС встречаются практически у всех растений, их содержание весьма низкое (менее 10^{-7} г/г сырой массы). Это свидетельствует о том, что для проявления активности необходимы очень малень-

кие концентрации гормонов. Об активности БС у растений в настоящее время известно достаточно много [1]. Напротив, их действие в отношении организма млекопитающих, отдельные представители которых, в том числе и человек, потребляют растения с пищей, изучено относительно слабо. За последнее десятилетие в ряде работ была продемонстрирована способность БС подавлять пролиферацию раковых клеток [2–4]. В то же время было показано, что БС не влияют на деление нормальных клеток [2]. Механизм их антипролиферативного действия связывают с остановкой клеточного цикла в результате изменения уровня циклин-зависимых киназ, что в дальнейшем приводит к апоптозу [3].

Известно также, что ферменты суперсемейства цитохрома P450, в частности CYP1A1 и CYP1B1, участвуют в активации ряда соединений с проканцерогенной активностью, например, полиароматических углеводородов. К этим соединениям относится и классический ксенобиотик Б[а]П (бенз(а)пирен) (1), окисление которого цитохромами P450 приводит к образованию смеси (±)-Б[а]П-7,8-диол эпоксидов ДЭ2 и ДЭ1, первый из которых является канцерогенным, а другой не оказывает отрицательного воздействия [5] (рис. 1).

Каталитическая активность изоформ цитохромов P450 является высокочувствительной к разного рода воздействиям, например, такому явлению, как субстратная индукция [6]. Последняя представляет собой процесс, при котором увеличивается экспрессия генов фермента под воздействием субстрата, окисление которого катализирует этот фермент. Это в свою очередь может привести к наработке большого количества нежелательных генотоксичных продуктов при метаболизме проканцерогенов цитохромами P450 [7]. Напротив, ингибирование каталитической активности данных ферментов снижает вероятность образования ДНК-аддуктов метаболитов Б[а]П.

Ранее были проведены работы по исследованию способности брассиностероидов ингибировать каталитическую активность цитохромов P450 микросомальной фракции, выделенной из клеток линии MCF-7 (карцинома молочной железы человека) и печени крыс. Ярко выраженное ингибирование окисления Б[а]П БС наблюдалось для (22*S*,23*S*)-гомобрассинолида и (22*S*,23*S*)-гомокастастерона, причем характерно, что соединения именно такой структуры обладают наибольшей цитотоксичностью в отношении ряда опухолевых клеток [8]. Очевидно, что обнаружение взаимосвязи между противоопухолевым действием БС и их способностью ингибировать активность цитохромов может оказаться весьма полезным для поиска потенциальных противоопухолевых агентов среди БС и их аналогов, а путь к реализации такой возможности лежит через анализ результатов, полученных с применением новых клеточных моделей и новых структурных типов БС.

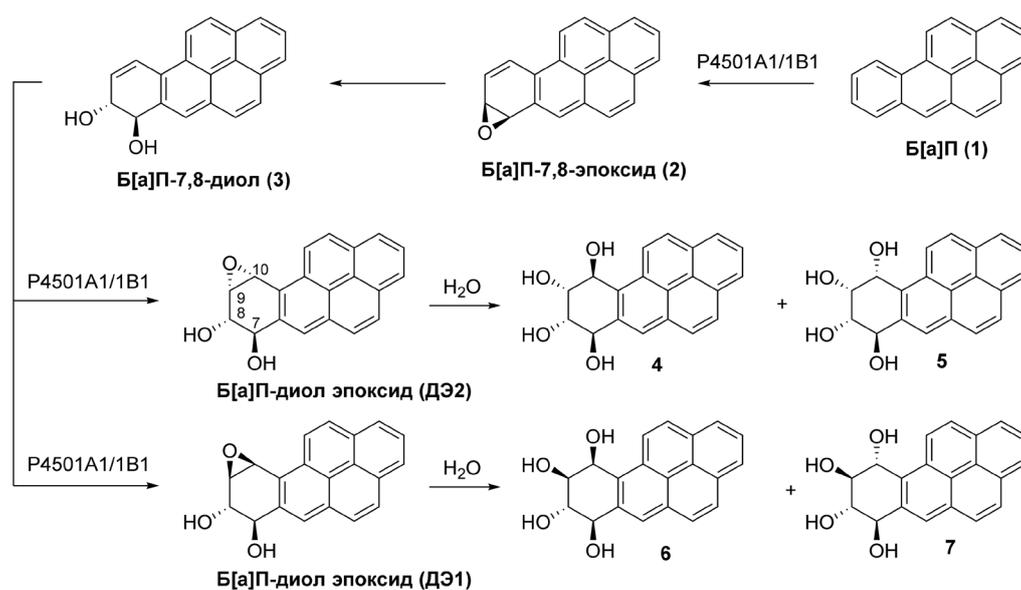


Рис. 1. Метаболизм Б[а]П CYP1A1/1B1 и его основные метаболиты

Fig. 1. Metabolism B[a]P by CYP1A1/1B1 and its major metabolites

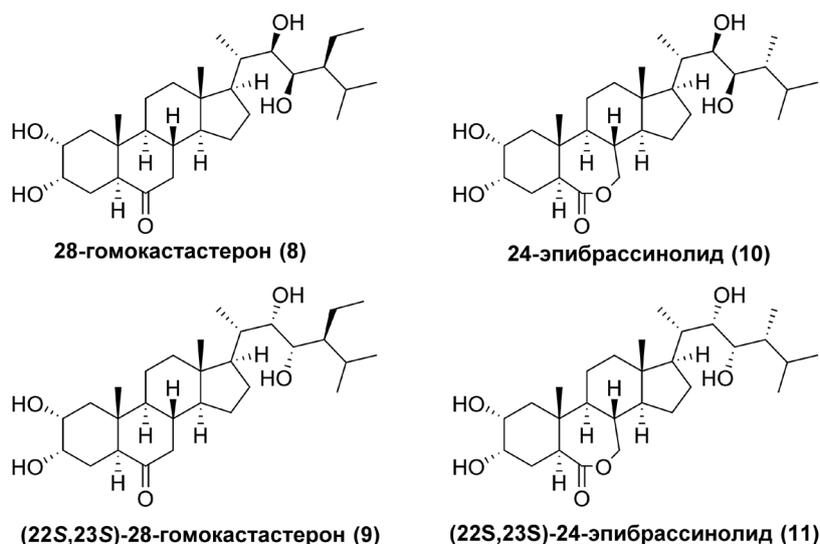


Рис. 2. Структура исследованных соединений

Fig. 2. Structure of the investigated compounds

В данной работе оценена антипролиферативная активность природных БС **8** и **10** и их синтетических аналогов **9** и **11** в отношении ранее не изучавшейся раковой клеточной линии Нер G2 (карцинома печени) (рис. 2).

Показано влияние данных соединений на каталитическую активность цитохромов P450, участвующих в метаболизме Б[а]П (**1**) и на образование канцерогенного метаболита Б[а]П – диол эпоксида ДЭ2 в этой линии клеток.

Материалы и методы исследования. Соединения. В работе использовали 28-гомокастастерон (28-ГКС) (**8**), (22S,23S)-28-гомокастастерон ((22S,23S)-28-ГКС) (**9**), 24-эпибрассинолид (24-ЭБ) (**10**) и (22S,23S)-24-эпибрассинолид ((22S,23S)-24-ЭБ) (**11**), синтезированные в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси. (±)-Транс-В[а]P-7,8-диол (**3**) любезно предоставлен NCI Chemical Carcinogen Repository, Midwest Research Institute (Kansas City, MO).

Культивирование клеточной культуры. Применяли монослойную клеточную культуру Нер G2. Культивирование линии Нер G2 проводили в среде EMEM (Sigma, США), при 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Среда содержала 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США), 4 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, а также антимикотик амфотерицин В (25 мкг/мл) (Invitrogen, США). Клеточную культуру поддерживали на стадии логарифмического роста путем рутинной пересадки дважды в неделю. Контроль адгезии клеток на подложке, роста и возможной контаминации производили визуально с помощью инвертированного микроскопа AU-12 (ЛОМО, Россия).

Характеристика антипролиферативной активности в отношении линии Нер G2. Для определения антипролиферативной активности использовали МТТ-тест [9]. Клетки Нер G2 помещали на 96-луночный планшет (Sarstedt, Германия) в концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток/луночку и инкубировали в среде EMEM (Sigma, США), с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и антибиотиков – пенициллина (100 ед/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и антимикотика амфотерицина В (25 мкг/мл) (Invitrogen, США). Через 24 ч инкубирования при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂, среду сливали и заменяли ее на среду, содержащую брассиностероиды в концентрациях от 1 до 100 мкМ. Контрольные клетки инкубировали в среде с 1 % ДМСО (диметилсульфоксид). Через 72 ч в среду добавляли соль – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (Carl Roth, США) в концентрации 5 мг/мл. Через 4 ч экспозиции при 37 °C темно-фиолетовые гранулы формазана растворяли в ДМСО. Количество восстановленного продукта измеряли фотометрически при длине волны

570 нм на планшетном анализаторе АИФ-М/340. Пролиферативную активность клеток в присутствии исследуемого соединения рассчитывали по формуле: ОП опытных лунок / ОП контр. лунок · 100 %, где ОП – оптическая плотность.

Индукция монооксигеназной активности в клеточной линии Нер G2. Для индукции использовали раствор ТХДД (2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*пара*-диоксин) в ДМСО (концентрация маточного раствора – 10 мкМ). При 70–80 %-ной конfluентности образца питательную среду во флаконе меняли на свежую, с предварительно растворенным в ней ТХДД (конечная концентрация индуктора составляла 10 нМ, объем растворителя не превышал 0,1 % от общего объема). Экспонирование длилось 24 ч.

Определение каталитической активности цитохрома P450 в клеточной культуре по отношению к Б[а]П-7,8-диолу (3). Ферментативную реакцию проводили в культуральном флаконе, в котором находилось $3 \cdot 10^6$ клеток в логарифмической фазе роста в 1 мл 5 мМ КФБ (калий-фосфатный буфер), содержащего Б[а]П-7,8-диол (3). Конечная концентрация субстрата составляла 10,0 мкМ (объем растворителя – ДМСО не превышал 0,1 % от общего объема). Реакцию начинали добавлением 1,0 мМ НАДФН и проводили в течение 2 ч. Далее реакционную смесь отбирали, вносили 2 мл этилацетата и экстрагировали смесь в течение 1 мин с использованием встряхивателя Micro-Shaker-326m (Польша). Органическую фазу отбирали. Экстракцию проводили дважды, затем этилацетат выпаривали. Продукты экстракции растворяли в 500 мкл метанола.

ВЭЖХ-анализ продуктов биотрансформации Б[а]П-7,8-диола (3). Хроматографический анализ проводился на жидкостном хроматографе Agilent 1200 с флуоресцентным детектором FLD G1321A. Была использована колонка Agilent Zorbax Eclipse C18 длиной 150 мм, диаметром 2,1 мм, размер зерна – 1,8 мкм. Разделение компонентов проб проводили при следующих условиях: температура колонки +40 °С; скорость потока 0,4 мл/мин; объем инъекции 1 мкл; детектирование при длинах волн возбуждения 344 нм и испускания 398 нм; подвижная фаза А – деионизованная вода; подвижная фаза В – метанол. Был использован градиентный режим элюирования с изменением состава подвижной фазы от 40 до 47,3 % фазы В за 19 мин, затем до 60 % фазы В за 1 мин и с последующей изократической элюцией при 60 % фазы В в течение следующих 20 мин. Общее время анализа – 45 мин. Время удержания (6) составило $20,41 \pm 0,07$ мин, (7) – $23,87 \pm 0,27$ мин, (4) – $24,7 \pm 0,24$ мин, (5) – $26,43 \pm 0,6$ мин. Субстрат (рацемическая смесь) детектировали на $40,74 \pm 0,23$ мин.

Определение содержания (в %) продуктов реакции осуществляли на базе калибровки, построенной по стандартным образцам тетрагидрокси производных Б[а]П. Содержание (\pm)7 β ,8 α -дигидрокси-9 β ,10 β -эпокси-7,8,9,10-тетрагидро-бензо[а]пирена (ДЭ1) рассчитывали как сумму концентраций (\pm)7 β ,8 α ,9 β ,10 β -тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирена (6) и (\pm)7 β ,8 α ,9 β ,10 α -тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидро-бензо[а]пирена (7). Для (\pm)7 β ,8 α -дигидрокси-9 α ,10 α -эпокси-7,8,9,10-тетрагидро-бензо[а]пирена (ДЭ2) характеристичными тетролами были (\pm)7 β ,8 α ,9 α ,10 β -тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидробензо[а]пирен (4) и (\pm)7 β ,8 α ,9 α ,10 α -тетрагидрокси-7,8,9,10-тетрагидро-бензо[а]пирен (5).

Результаты и их обсуждение. Поиск соединений с антиканцерогенной активностью и выяснение механизма их действия базируются на предварительной оценке влияния исследуемых веществ на свойства культур опухолевых клеток. В случае природных БС и некоторых синтетических аналогов показана их антипролиферативная активность в отношении ряда раковых клеток [2–4; 10]. При этом, исходя из близости структур и функций стероидных регуляторов в растительных и животных системах, в первую очередь речь идет об андроген- и эстроген-зависимых клеточных линиях. Меньше известно о взаимосвязи между структурой соединений и их влиянием на поведение гормон-независимых органов и тканей.

Одна из задач настоящей работы – оценка воздействия природных БС и их синтетических аналогов на пролиферацию гормон-независимой опухолевой клеточной линии Нер G2 (карцинома печени). Для этого использован ставший уже классическим МТТ-тест. Как видно из рис. 3, все исследованные соединения показали достоверную антипролиферативную активность в отношении исследуемой линии клеток при высоких концентрациях. Так IC₅₀ для (22S,23S)-28-ГКС (9) составило 50 мкМ, для 28-гомокастестерона (8) и (22S,23S)-24-ЭБ (11) 100 мкМ. 24-эпибрас-

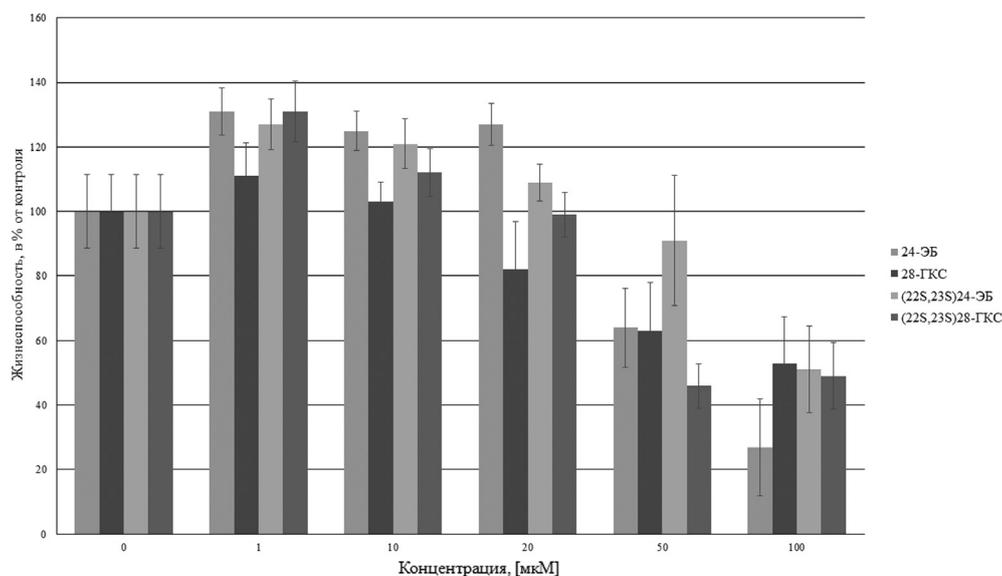


Рис. 3. Пролиферация раковых клеток линии Hep G2 под действием БС
 Fig. 3. Proliferation of Hep G2 cell cancer cells treated with brassinosteroids

синолид (**10**) при 100 мкМ ингибировал жизнеспособность клеток на 80 %. Следует отметить, что ранее было показано выраженное ингибирующее действие (22S,23S)-28-ГКС (**9**) в сравнимых концентрациях на жизнеспособность других опухолевых клеток: карциномы легкого (линия A549), лейкемии (линия СЕМ) и миеломы (линия RPMI 8226) [2; 4].

Необходимо особо подчеркнуть, что при низких концентрациях соединений (**9**)–(**11**) нами впервые наблюдалась достоверная активация роста клеток. Как видно на рис. 3, для большинства изученных веществ значения стимулирующих концентраций лежат в диапазоне 1–10 мкМ, а для отдельных соединений этот интервал еще более широк (до 20 мкМ). Сходное действие наблюдалось у эпибрасинолида и гомобрасинолида в отношении гриба *Phytophthora infestans*. В концентрациях 10^{-8} – 10^{-16} М они стимулировали рост мицелия гриба и образование спор, в то время как при концентрации 10^{-5} М, эпибрасинолид вызывал лизис зооспор [1].

Известно, что в метаболизме Б[а]П (**1**) участвуют ферменты трех классов: цитохромы P450, пероксидазы и альдокеторедуктазы [11]. Для того чтобы анализировать влияние исследуемых БС на метаболизм Б[а]П (**1**) цитохромами CYP1A1 и CYP1B1, их активность была индуцирована ТХДД в течение суток. Было показано, что в культуре Hep G2 каталитическая активность цитохромов индуцибельна. Так, при индукции ТХДД активность цитохромов P450 возрастала в 6,7 раза, что видно из соотношения продукт/субстрат в таблице. В индуцированных клетках линии Hep G2 образовывалось в 2,5 раза больше диол эпоксида ДЭ2 по сравнению с контрольными клетками.

При совместном инкубировании клеток с ТХДД в концентрации 10 нМ и исследуемых БС в течение суток наблюдалось различное их влияние как на степень индукции, так и на количество образующегося диол эпоксида ДЭ2. В клетках Hep G2 под действием (22S,23S)-28-ГКС (**9**) соотношение ДЭ2/суммарный продукт реакции снижалось приблизительно в 2 раза и было сопоставимо с таковым контрольных клеток.

Что касается степени индукции активности CYP450, то синтетические БС значительно снижали ее: (22S,23S)-24-ЭБ (**11**) – в 9 раз, (22S,23S)-28-ГКС (**9**) – в 30 раз, что в 4,5 раза меньше, чем активность цитохромов P450 в интактных клетках. Природный 24-ЭБ (**10**) снижал индукцию в 5 раз, в то время как 28-ГКС (**8**) повышал ее в 2 раза.

Из полученных результатов следует, что сочетанное действие ксенобиотиков на организм может стимулировать образование канцерогенного диол эпоксида ДЭ2 в тканях печени, что в свою очередь увеличивает риск развития опухоли. Подобный эффект был показан нами ранее на клеточной линии A549, где 20-метилхолантрен также направлял метаболизм Б[а]П в сторону образования диол эпоксида ДЭ2.

Влияние БС на образование генотоксичного продукта ДЭ2 в результате катализируемого цитохромом P450 окисления В[а]П-7,8-диола (3) в клетках Нер G2

Influence of brassinosteroids on generation of genotoxic product diol epoxide 2 (DE2) as a result of В[а]P-7,8-diol oxidation by cytochrome P450 in Нер G2 cells

| Показатель Index | Контроль Control | Индукция ТХДД (10 нМ) Induction with TCDD (10 nM) | Индукция ТХДД+24-ЭБ (50 мкМ) Induction with TCDD +24-EBI (50 μM) | Индукция ТХДД+28-ГКС (50 мкМ) Induction with TCDD +28-HCS (50 μM) | Индукция ТХДД+(22S,23S)-24-ЭБ (50 мкМ) Induction with TCDD+(22S,23S)-24-EBI (50 μM) | Индукция ТХДД+(22S,23S)-28-ГКС (50 мкМ) Induction with TCDD+(22S,23S)-28-HCS (50 μM) |
|----------------------------------|---------------------|--|---|--|--|---|
| ДЭ2 | 22 %* | 61 % | 47 % | 63 % | 52 % | 22 % |
| Суммарный продукт реакции | 88 % | 98 % | 91 % | 99 % | 84 % | 62 % |
| В[а]P-7,8-диол (3) (субстрат) | 12 % | 2 % | 9 % | 1 % | 16 % | 38 % |
| ДЭ2/продукт | 0,25 | 0,62 | 0,52 | 0,64 | 0,62 | 0,35 |
| Продукт/субстрат | 7,33 | 49 | 10,11 | 99 | 5,25 | 1,63 |

Примечание: * – % от общей площади пиков на хроматограмме.

Note: * – % of total peak area on the chromatogram.

Так как цитохромы P450 являются основными ферментами, трансформирующими проканцерогены, а их каталитическая активность очень чувствительна к экзогенным влияниям, в настоящее время активно ведется поиск ингибиторов цитохромов P450. В [12; 13] на клетках линии MCF-7 была показана ингибирующая активность веществ растительного происхождения – флавоноидов, в частности кверцетина, кемпферола, мирицитина и апигенина в отношении CYP1A1 и CYP1B1, метаболизирующих В[а]П (1).

Все исследуемые в данной работе БС (за исключением 28-ГКС (8)) также ингибировали активность CYP1A1 и CYP1B1. Самым эффективным оказался (22S,23S)-28-ГКС (9). Кроме того, наблюдалась взаимосвязь между ингибированием активности цитохрома P450 БС и ингибированием роста опухолевых клеток линии Нер G2.

Известно, что повышенная экспрессия отдельных изоформ цитохромов в опухолях может снижать эффективность химиотерапии рака [14]. В этом плане исследованные БС (в наибольшей степени (22S,23S)-28-ГКС (9)) могут стать основой для создания более эффективных препаратов для профилактики и лечения опухолевых заболеваний.

Список использованных источников

1. Khripach, V. A. Brassinosteroids. A new class of plant hormones / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, A. de Groot. – San Diego: Academic Press, 1999. – 456 p.
2. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids / J. Malíková [et al.] // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69, N 2. – P. 418–426. doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.028
3. Hoffmannová, L. Anticancer Activities of Brassinosteroids / L. Hoffmannová, J. Steigerová, M. Strnad // *Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health*. – Bentham Science Publishers, 2012. – P. 84–93. doi.org/10.2174/978160805298111201010084
4. Flow-cytometric analysis of reactive oxygen species in cancer cells under treatment with brassinosteroids / P. A. Kisselev [et al.] // *Steroids*. – 2017. – Vol. 117. – P. 11–15. doi.org/10.1016/j.steroids.2016.06.010
5. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants / D. Schwarz [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2001. – Vol. 22 (3). – P. 453–459. doi.org/10.1093/carcin/22.3.453
6. Tompkins, L. M. Mechanisms of cytochrome P450 induction / L. M. Tompkins, A. D. Wallace // *J. Biochem. Molecular Toxicology*. – 2007. – Vol. 21 (4). – P. 176–181. doi.org/10.1002/jbt.20180
7. Ляхович, В. В. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков / В. В. Ляхович, В. В. Цырлов. – Новосибирск: Наука, 1981. – 240 с.
8. Влияние структуры боковой цепи брассиностеридов на монооксигеназную активность микросом клеток печени / А. Г. Сыса [и др.] // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46, № 1. – С. 29–34.
9. Van Meerloo, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay / J. van Meerloo, G. J. Kaspers, J. Cloos // *Methods Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 731. – P. 237–245. doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
10. Zhabinskii, V. N. Steroid plant hormones: Effects outside plant kingdom / V. N. Zhabinskii, N. B. Khripach, V. A. Khripach // *Steroids*. – 2015. – Vol. 97. – P. 87–97. doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.025

11. The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones / Li Zhang [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 1–12. doi.org/10.3389/fphar.2012.00193
12. Chaudhary, A. Inhibition of human cytochrome CYP 1 enzymes by flavonoids of St. John's wort / A. Chaudhary, K. L. Willett // *Toxicology.* – 2006. – Vol. 217 (2–3). – P. 194–205. doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.010
13. Inhibition of 17 β -estradiol activation by CYP1A1: Genotype- and regioselective inhibition by St. John's Wort and several natural polyphenols / D. Schwarz [et al.] // *BBA-Proteins and Proteomics.* – 2011. – Vol. 1814 (1). – P. 168–174. doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.09.014
14. Zanger, U. M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation / U. M. Zanger, M. Schwab // *Pharmacol. Ther.* – 2013. – Vol. 138 (1). – P. 103–141. doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007

References

1. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., de Groot Ae. *Brassinosteroids. A new class of plant hormones.* San Diego: Academic Press, 1999. 456 p.
2. Malíková J., Swaczynová J., Kolár Z., Strnad M. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry*, 2008, vol. 69, no. 2, pp. 418–426. doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.07.028
3. Hoffmannová L., Steigerová J., Strnad M. Anticancer Activities of Brassinosteroids. *Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health.* Bentham, Science Publishers, 2012, pp. 84–93. doi.org/10.2174/978160805298111201010084
4. Kisselev P. A., Panibrat O. V., Sysa A. R., Anisovich M. V., Zhabinskii V. N., Khripach V. A. Flow-cytometric analysis of reactive oxygen species in cancer cells under treatment with brassinosteroids. *Steroids*, 2017, vol. 117, pp. 11–15. doi.org/10.1016/j.steroids.2016.06.010
5. Schwarz D., Kisselev P., Cascorbi I., Schunck W. H., Roots I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis*, 2001, vol. 22, no. 3, pp. 453–459. doi.org/10.1093/carcin/22.3.453
6. Tompkins L. M., Wallace A. D. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2007, vol. 21, no. 4, pp. 176–181. doi.org/10.1002/jbt.20180
7. Liahovich V. V., Cyrlov V. V. *Induction of xenobiotics metabolism enzymes.* Novosibirsk, Nauka, 1981. 240 p. (in Russian).
8. Sysa A. G., Kiselev P. A., Zhabinskii V. N., Khripach V. A. Effect of the structure of the brassinosteroid side chain on monooxygenase activity of liver microsomes. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2010, vol. 46, no. 1, pp. 23–27. doi.org/10.1134/s0003683810010035
9. Van Meerloo J., Kaspers G. J., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology*, 2011, vol. 731, pp. 237–245. doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
10. Zhabinskii V. N., Khripach N. B., Khripach V. A. Steroid plant hormones: Effects outside plant kingdom. *Steroids*, 2015, vol. 97, pp. 87–97. doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.025
11. Zhang L., Jin Y., Huang M., Penning T. M. The Role of Human Aldo-Keto Reductases in the Metabolic Activation and Detoxication of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Interconversion of PAH Catechols and PAH o-Quinones. *Frontiers in Pharmacology*, 2012, vol. 3, pp. 1–12. doi.org/10.3389/fphar.2012.00193
12. Chaudhary A., Willett K. L. Inhibition of human cytochrome CYP 1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. *Toxicology*, 2006, vol. 217, no. 2–3, pp. 194–205. doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.010
13. Schwarz D., Kisselev P., Schunck W. H., Roots I. Inhibition of 17 β -estradiol activation by CYP1A1: Genotype- and regioselective inhibition by St. John's Wort and several natural polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 2011, vol. 1814, no. 1, pp. 168–174. doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.09.014
14. Zanger U. M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 2013, vol. 138, no. 1, pp. 103–141. doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007

Информация об авторах

Панибрат Олеся Владимировна – научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: panibrat@iboch.bas-net.by.

Шабуня Полина Станиславовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: iboh_lfhi@rambler.ru.

Фатьхова Светлана Анатольевна – ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: iboh_lfhi@rambler.ru.

Жабинский Владимир Николаевич – член-корреспондент, д-р хим. наук, доцент, гл. науч. сотрудник, заместитель заведующего лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vz@iboch.bas-net.by.

Information about the authors

Panibrat Olesya Vladimirovna – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: panibrat@iboch.bas-net.by.

Shabunya Polina Stanislavovna – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iboh_lfhi@rambler.ru.

Fatykhava Sviatlana Anatol'evna – Senior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iboh_lfhi@rambler.ru.

Zhabinskii Vladimir Nikolaevich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Assistant professor, Chief researcher, Deputy Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus. E-mail: vz@iboch.bas-net.by.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 577.352.4

Поступило в редакцию 16.10.2017
Received 16.10.2017

В. А. Урбан, А. В. Дудко, В. Г. Вересов

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

**СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВЫТЕСНЕНИЯ БЕЛКА Bax
ИЗ КОМПЛЕКСА TOM/Bax БЕЛКОМ tBid ПРИ АПОПТОЗЕ**

(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)

Аннотация. Активация белка Bax, его встраивание в наружную мембрану митохондрий и последующая олигомеризация приводят к пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий и апоптозу. Механизмы активации белка Bax при апоптозе до настоящего времени остаются неясными. Недавно было установлено, что активация Bax иногда опосредуется его связыванием и взаимодействием с белком TOM22 комплекса TOM на наружной мембране митохондрий, однако понимание этого явления на структурном уровне до настоящего времени отсутствует. В настоящей работе установлены структурные факторы, вызывающие про-апоптотическую активацию белка Bax белком TOM22 комплекса TOM и BH3-only – белком tBid.

Ключевые слова: апоптоз, комплекс TOM, комплекс GIP, TOM22, Bax, tBid

Для цитирования: Урбан, В. А. Структурные детерминанты вытеснения белка Bax из комплекса TOM/Bax белком tBid при апоптозе / В. А. Урбан, А. В. Дудко, В. Г. Вересов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 73–77.

Viktor A. Urban, Hanna V. Dudko, Valery G. Veresov

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

**STRUCTURAL DETERMINANTS OF Bax DISPLACEMENT
FROM THE TOM/Bax COMPLEX BY tBid DURING APOPTOSIS**

(Communicated by Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina)

Abstract. Structural factors that induce the proapoptotic activation of Bax by the protein TOM22 of the TOM complex and BH3-only protein tBid are established.

Keywords: apoptosis, TOM-complex, GIP- complex, TOM22, Bax, tBid

For citation: Urban V. A., Dudko A. V., Veresov V. G. Structural determinants of Bax displacement from the TOM/Bax complex by tBid during apoptosis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 73–77 (in Russian).

Введение. Большинство митохондриальных белков кодируется в ядре, синтезируется на цитозольных рибосомах, после чего посттрансляционно импортируется в митохондрии. Импорт в митохондрии почти всех предшественников митохондриальных белков (так называемых пред-белков) осуществляется при посредничестве транслоказы наружной мембраны митохондрий (translocase of the outer membrane – TOM), которая является комплексом, включающим семь субъединиц: поверхностные рецепторы TOM20 и TOM70, а также пять субъединиц TOM40, TOM22, TOM5, TOM6 и TOM7, образующих так называемую общую пору импорта (General

Import Pore – GIP) [1]. Было предположено, что комплекс TOM участвует в tBid-опосредованной пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий (ПНММ) белком Вах, что приводит к выходу апоптогенных факторов, таких как цитохром с, из внутреннего митохондриального пространства в цитозоль и в конечном итоге к апоптозу [2; 3]. Однако механизмы ПНММ, опосредованной комплексом TOM и белком tBid, являются неясными, а данные – противоречивыми [4]. Недавно, базируясь на экспериментальных данных, полученных с применением крио-электронной микроскопии и кроссликинга, и используя подходы вычислительной структурной биологии, нами была получена 3-мерная модель GIP-комплекса с атомным уровнем разрешения. В настоящем исследовании эта модель использована для установления структурных механизмов TOM-опосредованного митохондриального апоптоза.

Материалы и методы исследования. В настоящей работе атомистическая модель GIP-комплекса [5] вместе с подходами вычислительной структурной биологии были использованы для установления структурных факторов митохондриального апоптоза, опосредованного комплексом TOM. Так как экспериментальные данные показывают, что взаимодействие белков Вах и tBid с субкомплексом TOM40/TOM22 комплекса TOM является критическим событием в TOM-опосредованном апоптозе, сначала осуществляли моделирование атомистических 3D-структур комплексов GIP/Вах и GIP/tBid. Моделирование осуществляли применяя пятистадийный процесс, в котором на первой стадии использовали глобальный поиск оптимального расположения белков-партнеров в приближении жестких тел, а последующие четыре стадии использовали для уточнения структурных моделей, полученных на первой стадии. На первой стадии исследовали 6-мерное ротационно-трансляционное пространство с применением программы PIPER, использующей быстрое преобразование Фурье (БПФ) [6; 7]. Четыре стадии уточнения включали последовательное применение протоколов ROSETTADOCK_{ld} [8; 9], GalaxyRefineComplex [10], ROSETTADOCK_{ld} и ROSETTADOCK_{ldk}. Оба протокола уточнения с использованием программы ROSETTADOCK включают переупаковку боковых цепей и используют локальный поиск в приближении «жестких твердых тел» с использованием метода Монте-Карло [8]. При использовании ROSETTADOCK_{ld} на второй стадии процедура уточнения была применена к нескольким десяткам лучших по энергии структур, полученным на первой стадии с использованием программы PIPER. На третьей стадии использовали программу GalaxyRefineComplex, которая позволяет учитывать гибкость белков внутри белкового интерфейса, тем самым позволяя учесть конформационные перестройки при связывании [10]. Если имели место экспонированные в цитозоль петли, конформации петель первоначально уточнялись с использованием программы RosettaLoop [11], а затем применяли на третьей стадии расчетов дополнительное уточнение с использованием программы GalaxyRefineComplex. Помимо этого кластеризация структур и энергетические воронки были использованы для нахождения корректной структуры белковых комплексов. В ROSETTADOCK_{ld} боковые цепи представлены в центроидном приближении, в то время как в ROSETTADOCK_{ldr} используется полноатомное приближение боковых цепей, что позволяет осуществлять более тонкое уточнение. Для оценки предпочтений определенных белков-партнеров образовывать комплексы определяли аффинности связывания (средство связывания) белков. Два различных подхода были применены для оценки средства: (1) посредством использования поверхностной оценочной функции Isc протокола ROSETTADOCK_{ldr}, а также (2) исходя из значений ΔG_{Pr} , предоставляемого сервером PRODIGY [12]. И I_{sc} ROSETTADOCK и ΔG_{Pr} являются оценками свободной энергии связывания, рассчитываемой как разность свободной энергии комплекса и свободной энергии белков-партнеров в несвязанном состоянии. Помимо этого оценивались такие важные факторы высокоаффинного связывания, как площадь погруженной поверхности (Buried Surface Area – BSA), геометрическая комплементарность (рассчитываемая как межмолекулярная энергия Ван дер Ваальса), количество солевых мостиков и водородных связей между взаимодействующими белками. Для установления этих факторов были использованы средства программного комплекса Rosetta3 Interface Analyzer [13] и PPCheck сервер [14].

Результаты и их обсуждение. При взаимодействии GIP-Вах имела место умеренная топологическая комплементарность ($E_{VDW} = -53,9$ ккал/моль; $BSA = 1839,1 \text{ \AA}^2$). Помимо этого, взаимодействие характеризовалось образованием 4 водородных связей (Glu31TOM22-Arg37Вах,

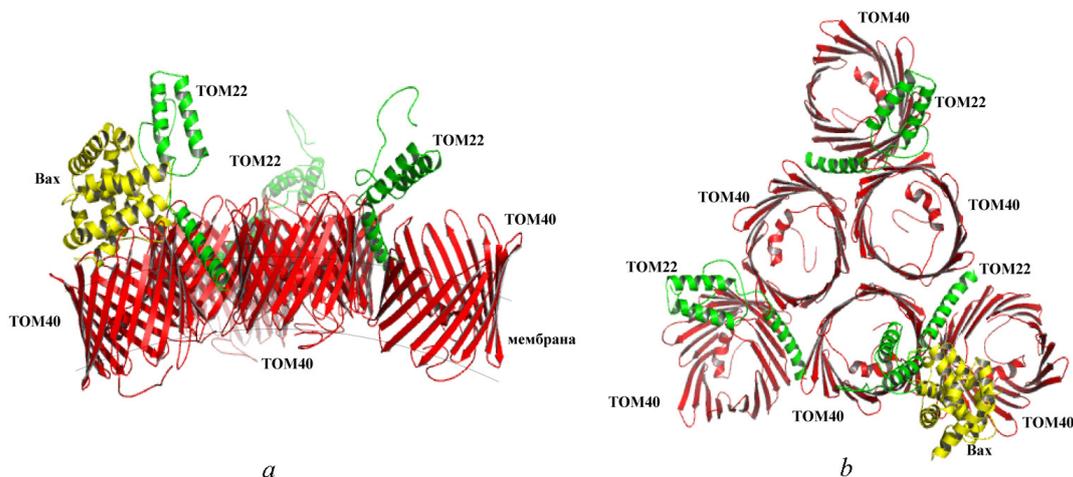


Рис. 1. Структурная модель комплекса GIP-Bax. Показаны вид сбоку (a) и вид сверху (b)
 Fig. 1. Structural model of the GIP/Bax complex. Shown are the side view (a) and the top view (b)

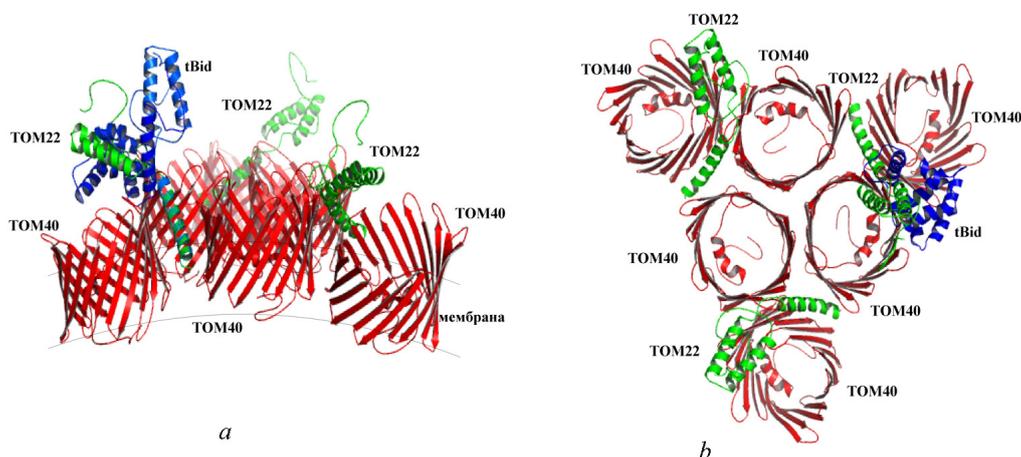


Рис. 2. Структурная модель комплекса GIP-tBid. Показаны вид сбоку (a) и вид сверху (b)
 Fig. 2. Structural model of the GIP/tBid complex. Shown are the side view (a) and the top view (b)

Lys76TOM22-Gly39Bax, Phe80TOM22-Glu41Bax, Ser81TOM22-Glu41Bax). Все вместе приводило к низкому значению поверхностной оценочной функции ($I_{sc} = -10,1$) и достаточно низкому значению $\Delta G_{Pr} = -7,6$, что говорит о высоком средстве связывания между комплексом GIP и белком Bax. Структура комплекса GIP-Bax представлена на рис. 1.

Существенно большая топологическая комплементарность имела место при взаимодействии GIP-tBid ($E_{VDW} = -87,4$ ккал/моль; $BSA = 3975,4 \text{ \AA}^2$). Помимо этого, взаимодействие характеризу-

Поверхностная оценочная функция (I_{sc}), средство связывания, полученное с использованием программы PRODIGY (ΔG_{Pr}), площадь погруженной поверхности (BSA), межмолекулярная энергия Ван дер Ваальса (E_{VDW}), энергия десольватации (E_{desolv}), число водородных связей (N_{hb}) и солевых мостиков (N_{sb}) для взаимодействий GIP-Bax и GIP-tBid

Surface scoring function (I_{sc}), Prodigy binding affinity (ΔG_{Pr}), Buried Surface Area (BSA), intermolecular Van der Waals Energy (E_{VDW}), desolvation energy (E_{desolv}), number of hydrogen bonds (N_{hb}), and number of salt bridges (N_{sb}) for interactions GIP-Bax and GIP-tBid

| Пары белков-партнеров | I_{sc} | ΔG_{Pr} | BSA, \AA^2 | E_{VDW} , ккал/моль | E_{desolv} , ккал/моль | N_{sb} | N_{hb} |
|-----------------------|----------|-----------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|----------|----------|
| GIP-Bax | -10,1 | -7,6 | 1839 | -53,9 | -2,3 | 0 | 4 |
| GIP-tBid | -15,8 | -12,7 | 3190 | -87,4 | 1,2 | 4 | 4 |

валось образованием 5 водородных связей (Asp36TOM22-Arg68tBid, Asp41TOM22-Arg68tBid, Ala63TOM22-Asn62tBid, Phe80TOM22-Asp95tBid, Ser81TOM22-Asp95tBid) и 4 солевых мостиков (Glu29TOM22-Lys157tBid, Asp36TOM22-Arg68tBid, Asp36TOM22-Arg68tBid, Asp41TOM22-Arg68tBid). Все вместе приводило к очень низкому значению поверхностной оценочной функции ($I_{sc} = -15,7$) и низкому значению $\Delta G_{Pr} = -12,7$, что говорит об очень высоком сродстве связывания между комплексом GIP и белком tBid. Структура комплекса GIP/tBid представлена на рис. 2. Наиболее важные параметры взаимодействий GIP-Вах и GIP-tBid приведены в таблице.

Заключение. Проведенные расчеты позволяют заключить, что при осуществлении апоптоза образующийся вследствие протеолиза белка Bid белок tBid будет вытеснять белок Вах из комплекса GIP/Вах, превращая Вах в белок, компетентный для пермеабиллизации наружной мембраны митохондрий и апоптоза.

Список использованных источников

1. Bohnert, M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins / M. Bohnert, N. Pfanner, M. van der Laan // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2015. – Vol. 33. – P. 92–102. doi.org/10.1016/j.sbi.2015.07.013
2. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax / G. Bellot [et al.] // *Cell Death and Differentiation*. – 2007. – Vol. 14. – P. 785–794. doi.org/10.1038/sj.cdd.4402055
3. Veresov, V. G. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by MTCH2, VDAC2, TOM40 and TOM22 / V. G. Veresov, A. I. Davidovskii // *Cellular Signalling*. – 2014. – Vol. 26, N 2. – P. 370–382. doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.016
4. Preprotein Transport Machineries of Yeast Mitochondrial Outer Membrane Are not Required for Bax-induced Release of Intermembrane Space Proteins / L. K. S. Szklarz [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 368, N 1. – P. 44–54. doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.016
5. Dudko, A. V. Cryo-electron microscopy-based Integrative atomic-resolution modeling of the TOM GIP complex [Electronic resource] / A. V. Dudko, V. G. Veresov // 8th Moscow Conference on Computational Molecular Biology, July 27–30, 2017, Moscow, Russia. – Moscow: Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), 2017. – Mode of access: <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/proceedings/abstracts/25.pdf>
6. PIPER: an FFT-Based protein docking program with pairwise potentials / D. Kozakov [et al.] // *Proteins*. – 2006. – Vol. 65, N 2. – P. 392–406. doi.org/10.1002/prot.21117
7. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes / S. R. Comeau [et al.] // *Bioinformatics*. – 2004. – Vol. 20, N 1. – P. 45–50. doi.org/10.1093/bioinformatics/btg371
8. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations / J. J. Gray [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2003. – Vol. 331, N 1. – P. 281–299. doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3
9. Lyskov, S. The RosettaDock server for local protein-protein docking / S. Lyskov, J. J. Gray // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36. – P. 233–238. doi.org/10.1093/nar/gkn216
10. Heo, L. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking / L. Heo, H. Park, C. Seok // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41. – P. 384–388. doi.org/10.1093/nar/gkt458
11. Mandell, D. J. Sub-angstrom accuracy in protein loop reconstruction by robotics-inspired conformational sampling / D. J. Mandell, E. A. Coutsias, T. Kortemme // *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6, N 8. – P. 551–552. doi.org/10.1038/nmeth0809-551
12. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes / L. C. Xue [et al.] // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32, N 23. – P. 3676–3678. doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514
13. Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts / B. J. Bender [et al.] // *Biochemistry*. – 2016. – Vol. 55, N 34. – P. 4748–4763. doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444
14. Sukhwal, A. PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots / A. Sukhwal, R. Sowdhamini // *Bioinformatics and Biology Insights*. – 2015. – Vol. 9. – P. 141–151. doi.org/10.4137/bbi.s25928

References

1. Bohnert M., Pfanner N., van der Laan M. Mitochondrial machineries for insertion of membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, vol. 33, pp. 92–102. doi.org/10.1016/j.sbi.2015.07.013
2. Bellot G., Cartron P.-F., Er E., Oliver L., Juin P., Armstrong L. C., Bornstein P., Mihara K., Manon S., Vallette F. M. TOM22, a core component of the mitochondria outer membrane protein translocation pore, is a mitochondrial receptor for the proapoptotic protein Bax. *Cell Death and Differentiation*, 2007, vol. 14, pp. 785–794. doi.org/10.1038/sj.cdd.4402055
3. Veresov V. G., Davidovskii A. I. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by MTCH2, VDAC2, TOM40 and TOM22. *Cellular Signalling*, 2014, vol. 26, no. 2, pp. 370–382. doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.11.016
4. Szklarz L. K. S., Kozjak-Pavlovic V., Vögtle F.-N., Chacinska A., Milenkovic D., Vogel S., Dürr M., Westermann B., Guiard B., Martinou J.-C., Borner C., Pfanner N., Meisinger C. Preprotein Transport Machineries of Yeast Mitochondrial Outer

Membrane Are not Required for Bax-induced Release of Intermembrane Space Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2007, vol. 368, no. 1, pp. 44–54. doi.org/10.1016/j.jmb.2007.01.016

5. Dudko A. V., Veresov V. G. Cryo-electron microscopy-based Integrative atomic-resolution modeling of the TOM GIP complex. *8th Moscow Conference on Computational Molecular Biology, July 27–30, 2017, Moscow, Russia*. Moscow, Institute for Information Transmission Problems of the Russian Academy of Sciences (Kharkevich Institute), 2017. Available at: <http://mccmb.belozersky.msu.ru/2017/proceedings/abstracts/25.pdf>

6. Kozakov D., Brenke R., Comeau S. R., Vajda S. PIPER: an FFT-Based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, vol. 65, no. 2, pp. 392–406. doi.org/10.1002/prot.21117

7. Comeau S. R., Gatchell D. W., Vajda S., Camacho C. J. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, 2004, vol. 20, no. 1, pp. 45–50. doi.org/10.1093/bioinformatics/btg371

8. Gray J. J., Moughon S., Chu Wang, Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C. A., Baker D. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations. *Journal of Molecular Biology*, 2003, vol. 331, no. 1, pp. 281–299. doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00670-3

9. Lyskov S., Gray J. J. The RosettaDock server for local protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 2008, vol. 36, pp. 233–238. doi.org/10.1093/nar/gkn216

10. Heo L., Park H., Seok C. GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 2013, vol. 41, pp. 384–388. doi.org/10.1093/nar/gkt458

11. Mandell D. J., Coutsias E. A., Kortemme T. Sub-angstrom accuracy in protein loop reconstruction by robotics-inspired conformational sampling. *Nature Methods*, 2009, vol. 6, no. 8, pp. 551–552. doi.org/10.1038/nmeth0809-551

12. Xue L. C., Rodrigues J. P., Kastiris P. L., Bonvin A. M., Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32, no. 23, pp. 3676–3678. doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514

13. Bender B. J., Cisneros A., Duran A. M., Finn J. A., Fu D., Lokits A. D., Mueller B. K., Sangha A. K., Sauer M. F., Sevy A. M., Sliwoski G., Sheehan J. H., DiMaio F., Meiler J., Moretti R. Protocols for Molecular Modeling with Rosetta3 and RosettaScripts. *Biochemistry*, 2016, vol. 55, no. 34, pp. 4748–4763. doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00444

14. Sukhwal A., Sowdhamini R. PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2015, vol. 9, pp. 141–151. doi.org/10.4137/bbi.s25928

Информация об авторах

Урбан Виктор Андреевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: urban@ibp.org.by.

Дудко Анна Викторовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dudko@ibp.org.by.

Вересов Валерий Гаврилович – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: veresov@ibp.org.by.

Information about the authors

Urban Viktor Andreevich – Junior researcher. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: urban@ibp.org.by.

Dudko Hanna Viktorovna – Junior researcher. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dudko@ibp.org.by.

Veresov Valery Gavrilovich – D. Sc. (Biology), Chief researcher. Institute Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: veresov@ibp.org.by.

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.21:575.174.015.3

Поступило в редакцию 27.12.2017

Received 27.12.2017

А. Н. Щаюк¹, Э. В. Крупнова¹, М. Н. Шепетько², Е. П. Михаленко¹, Н. В. Чеботарёва¹,
С. Ю. Дедик², академик А. В. Кильчевский¹

¹Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Аннотация. Ключевым процессом в патогенезе любых злокачественных новообразований, в том числе и немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), является ангиогенез, который активируется двумя тирозинкиназными каскадами (RAS/RAF/MAPK и PI3K/AKT/mTOR). Основными генами, контролирующими эти пути, являются *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA* и *PTEN*. В исследовании проанализированы мутации в 18–21 экзонах гена *EGFR*, 2 экзоне гена *KRAS*, 9 и 20 экзонах гена *PIK3CA* и 7 экзоне гена *PTEN* у пациентов с НМРЛ, проживающих на территории Беларуси, и изучена их связь с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Полученные результаты показали, что мутации в гене *EGFR* достоверно чаще в 5 раз встречаются у пациентов с НМРЛ, чем в контрольной группе. Классические мутации в гене *EGFR* обнаружены только у пациентов с аденокарциномой легкого, преимущественно у женщин. Мутации гена *KRAS* встречаются только у мужчин, причем у пациентов с аденокарциномой в 3 раза чаще, чем у пациентов с плоскоклеточным раком легкого. В данном исследовании не выявлено соматических мутаций в генах *PIK3CA* и *PTEN* у пациентов с НМРЛ.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома легкого, плоскоклеточный рак легкого, ангиогенез, мутации гена *EGFR*, мутации гена *KRAS*, мутации гена *PIK3CA*, мутации гена *PTEN*

Для цитирования: Генетический полиморфизм внутриклеточных сигнальных путей у пациентов с немелкоклеточным раком легкого / А. Н. Щаюк [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 78–85.

Anna N. Shchayuk¹, Evelina V. Krupnova¹, Michail N. Shapetska², Alena P. Mikhalkenka¹,
Natalia V. Chebotareva¹, Sergej Y. Dedik², Academician Aleksandr V. Kilchevsky¹

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

GENETIC POLYMORPHISM OF INTRACELLULAR SIGNAL PATHWAYS IN PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Abstract. The key process in the pathogenesis of any malignant neoplasms, including non-small cell lung cancer (NSCLC), is the angiogenesis that is activated by two tyrosine kinase cascades (RAS/RAF/MAPK and PI3K/AKT/mTOR). The main genes controlling these pathways are *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA* and *PTEN*. The study analyzed the mutations in 18–21 exons of the *EGFR* gene, 2 exons of the *KRAS* gene, 9 and 20 exons of the *PIK3CA* gene and 7 exons of the *PTEN* gene in patients with NSCLC living in Belarus and their relationship with the clinical and morphological characteristics of the tumor. Our results revealed that mutations in the *EGFR* gene are significantly frequent more than 5 times in patients with non-small cell lung cancer than those in the control group. Classical mutations in the *EGFR* gene are found only in patients with lung adenocarcinoma, predominantly in women. Mutations of the *KRAS* gene are found only in men, and in patients with adenocarcinoma it is 3 times more likely than in patients with squamous cell lung carcinoma. There are no somatic mutations in the *PIK3CA* and *PTEN* genes in patients with NSCLC in this study.

Keywords: non-small cell lung cancer, lung adenocarcinoma, squamous cell lung cancer, angiogenesis, mutations of the *EGFR* gene, mutations of the *KRAS* gene, mutations of the *PIK3CA* gene, mutations of the *PTEN* gene

For citation: Shchayuk A. N., Krupnova E. V., Shapetska M. N., Mikhalkenka A. P., Chebotareva N. V., Dedik S. Y., Kilchevsky A. V. Genetic polymorphism of intracellular signal pathways in patients with non-small cell lung cancer. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 78–85 (in Russian).

Введение. Рак легкого (РЛ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований. Группа немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) составляет 85 % от всех типов рака легкого. НМРЛ представлен наиболее часто встречающимися типами: аденокарциномой легкого (АК) и плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ).

Ключевым процессом в патогенезе любых злокачественных новообразований, в том числе и НМРЛ, является ангиогенез. Известно, что ангиогенез данных гистологических типов – ПКРЛ и АК – осуществляется путем активации двух разных тирозинкиназных каскадов (RAS/RAF/MAPK и PI3K/AKT/mTOR), которые регулируют различные клеточные функции, такие как пролиферация, выживание, дифференциация, рост и подвижность клеток [1–3]. Основными генами, контролирующими эти пути, являются *EGFR*, *KRAS*, *PIK3CA* и *PTEN*.

Ген *EGFR* кодирует тирозинкиназный рецептор эпидермального фактора роста, который в свою очередь является одним из основных трансмембранных рецепторов, передающих сигнал внутрь клетки через пути RAS/RAF/MAPK и PI3K/AKT/mTOR, тем самым запуская процесс ангиогенеза. Соматические мутации в гене *EGFR* приводят к тому, что рецептор может активироваться в отсутствие фактора роста EGF, автономно передавая сигнал фосфорилирования на внутриклеточные сигнальные каскады [4–6].

Протоонкоген *KRAS*, кодирующий одноименный белок, является основным компонентом внутриклеточных сигнальных путей ангиогенеза. Во многих опухолевых клетках RAS-зависимые сигнальные каскады находятся в постоянно активном состоянии вследствие возникновения мутаций в гене *KRAS* [7].

Соматические мутации в гене *PIK3CA*, кодирующем каталитическую субъединицу p110 α фосфатидил-инозитол 3'-киназы (PI3K), играют значительную роль в патогенезе и прогрессии опухолей [8; 9]. Показано, что эти мутации повышают киназную активность PI3K, ведут к усиленной активации нижележащей киназы Akt и передаче сигнала в ядро клетки [10]. PI3K инактивируется фосфатазой, кодируемой геном-онкосупрессором PTEN. Мутации этого гена приводят к инактивации фосфатазы и обуславливают развитие онкологических заболеваний [11].

Учитывая многоплановую роль генов внутриклеточных сигнальных каскадов в патогенезе рака, представляется перспективным их исследование с целью выявления маркеров, отражающих закономерности развития онкозаболевания, и, зная, как будет протекать ангиогенез, можно скорректировать индивидуальную противоопухолевую терапию.

Целью данного исследования является изучение мутаций в 18–21 экзонах гена *EGFR*, 2 экзонах гена *KRAS*, 9 и 20 экзонах гена *PIK3CA* и 7 экзоне гена *PTEN* у пациентов с НМРЛ, проживающих на территории Беларуси.

Материалы и методы исследования. В исследование вошли 106 пациентов с гистологически и морфологически подтвержденным диагнозом НМРЛ, находившихся на лечении в УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер» с 2003 по 2017 годы. Среди них у 51 человека установлен диагноз ПКРЛ, а у 55 – АК легкого. Гистологический тип НМРЛ устанавливался согласно гистологическим критериям ВОЗ.

Контрольную группу составил 81 человек, умерший от неонкологических заболеваний.

ДНК выделяли из образцов опухолевой и неопухолевой ткани легкого пациентов и из ткани легкого людей контрольной группы. Ткани гомогенизировали и подготавливали для выделения ДНК методом, адаптированным в лаборатории криоконсервации генетических ресурсов Института генетики и цитологии НАН Беларуси, дальнейшее выделение ДНК из образцов опухолевой и неопухолевой ткани проводили методом Mathew [12].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили на амплификаторе MyCycler™ Thermal cycler (BIORAD). Праймеры, использованные в работе, синтезировались ОДО «Праймтех» (Минск). Изготовитель реагентов для проведения ПЦР и ПДРФ–ПЦР – НПО «Fermentas» (Вильнюс).

Анализ мутаций проводили путем ПЦР с последующим секвенированием и анализом полученных результатов путем капиллярного фореза с помощью автоматического генетического анализатора Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer.

Статистическая обработка материала проводилась с использованием пакета прикладных программ Excel, Statistica 7.0, GraphPad InStat 3.05 и онлайн-программы SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web). Для проверки достоверности при сравнении частот генотипов в группах применяли точный критерий Фишера. Связь между мутациями и возникновением заболевания оценивали по отношению шансов OR (95 % CI).

Результаты и их обсуждение. В исследовании изучали мутации в 18–21 экзонах гена *EGFR*, кодирующих тирозинкиназный домен рецептора, во 2 экзоне гена *KRAS*, 9 и 20 экзонах гена *PIK3CA* и 7 экзоне гена *PTEN*. Мутации в данных экзонах исследуемых генов могут нарушать структуру и функции белков, которые играют ключевую роль в активации рассматриваемых сигнальных путей. В исследуемой группе пациентов с НМРЛ не выявлено носителей мутаций в 9 и 20 экзонах гена *PIK3CA* и 7 экзоне гена *PTEN*.

Анализ мутаций гена *EGFR* показал, что в исследуемой группе пациентов с НМРЛ выявлены как классические, так и молчащие мутации гена *EGFR* (табл. 1). Частота встречаемости всех мутаций гена *EGFR* у пациентов с НМРЛ составила 24,5 %, что в 5 раз достоверно выше, чем в контрольной группе (OR = 6,26; 95 % CI 2,08–18,77).

Т а б л и ц а 1. Частота встречаемости мутаций генов внутриклеточных сигнальных путей в контрольной группе и у пациентов с АК и ПКРЛ

Table 1. Frequency of occurrence of gene mutations of intracellular signal pathways in patients with lung adenocarcinoma and with squamous cell lung carcinoma

| Тип мутации Mutation type | Мутации, n (%) Mutations, n (%) | | | |
|--|--|------------------|-------------|--------------|
| | Контроль, n = 81 Control, n = 81 | НМРЛ, n = 106 | АК, n = 51 | ПКРЛ, n = 55 |
| Все мутации <i>EGFR</i> , из них: | 4 (4,9)* | 26 (24,5)* | 18 (35,2)** | 8 (14,5)** |
| 1. Классические мутации <i>EGFR</i> | 0 (–) | 12 (11,3) | 12 (23,5) | 0 (–) |
| Делеции в 19 экзоне (p.E746_A750del, p.L747_P753delinsS) | 0 (–) | 7 (6,6) | 7 (13,7) | 0 (–) |
| Инсерции в 20 экзоне (p.A763_Y764insFQEA) | 0 (–) | 4 (3,8) | 4 (7,8) | 0 (–) |
| Миссенс-мутация в 21 экзоне (p.L858R) | 0 (–) | 1 (0,9) | 1 (2,0) | 0 (–) |
| 2. Молчащие мутации <i>EGFR</i> | 4 (4,9) | 14 (13,2) | 6 (11,7) | 8 (14,5) |
| 18 интрон (с.2184+19G>A) | | | | |
| Гетерозиготная мутация (GA) | 3 (3,7) | 10 (9,4) | 4 (7,3) | 6 (11,8) |
| Гомозиготная мутация (AA) | 0 (–) | 1 (0,9) | 0 (–) | 1 (2,0) |
| 21 экзон (с.2508C>T) | | | | |
| Гетерозиготная мутация (CT) | 1 (1,2) | 3 (2,8) | 2 (3,9) | 1 (1,8) |
| Мутации 2 экзона гена <i>KRAS</i> | 0 (–) | 4 (3,8) | 3 (5,9) | 1 (1,8) |
| p.G12C (с.34G>T) | 0 (–) | 2 (1,9) | 2 (3,9) | 0 (–) |
| p.G12D (с.35G>A) | 0 (–) | 1 (0,9) | 0 (–) | 1 (1,8) |
| p.G13C (с.37G>T) | 0 (–) | 1 (0,9) | 1 (2,0) | 0 (–) |

Примечание: * – $p = 0,0002$, ** – $p = 0,0228$. НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого, АК – аденокарцинома, ПКРЛ – плоскоклеточный рак легкого.

Note: * – $p = 0.0002$, ** – $p = 0.0228$. НМРЛ – non-small cell lung cancer, АК – adenocarcinoma, ПКРЛ – squamous cell lung carcinoma.

При анализе ассоциации мутаций гена *EGFR* с определенным гистологическим типом НМРЛ выявлено, что в АК мутации гена *EGFR* встречаются достоверно чаще, чем в ПКРЛ (OR = 3,21; 95 % CI 1,25–8,24).

В общей исследуемой группе пациентов с НМРЛ частота встречаемости классических мутаций в гене *EGFR* составила 11,3 %, причем обнаружены они только у пациентов с АК, что составляет 23,5 % пациентов с данным гистологическим типом (табл. 1). Анализ полученных результатов секвенирования гена *EGFR* выявил три типа классических мутаций: делеции в 19 экзоне, инсерции в 20 экзоне и миссенс мутацию L858R в 21 экзоне.

В 19 экзоне гена *EGFR* при делеции p.E746_A750del выпадают четыре аминокислоты (глутаминовая кислота, лейцин, аргинин, аланин), а при делеции p.L747_P753delinsS выпадают 6 аминокислот (лейцин, аргинин, аланин, тирозин, серин, пролин) и происходит вставка серина. Эти делеции приводят к изменению позиции аминокислот в АТФ-связывающей петле и конститутивной активации рецептора *EGFR*. Из обнаруженных делеций в 19 экзоне наиболее часто встречается делеция p.E746_A750del (85 % от всех обнаруженных делеций).

При инсерции р.А763_Y764insFQEA в 20 экзоне гена *EGFR* происходит вставка четырех аминокислот: фенилаланина, глутамина, глутаминовой кислоты и аланина. Инсерции, расположенные до метионина в 766 положении, приводят к изменению конформации активационной петли тирозинкиназного домена, в результате чего рецептор *EGFR* активируется автономно.

Замена лейцина на аргинин в 21 экзоне в 858 положении в нашей популяции встречается редко, определена только у одного человека (4 % от всех обнаруженных классических мутаций). Эта мутация изменяет конформацию активационной петли тирозинкиназного домена и так же, как и делеции в 19 экзоне, служит причиной конститутивной активации рецептора *EGFR*.

Все обнаруженные классические мутации гена *EGFR* выявлены только в опухолевой ткани пациентов и отсутствуют в контрольной группе, что является маркерным признаком опухоли.

Классические мутации в гене *EGFR* приводят к конститутивной активации тирозинкиназного домена рецептора, в результате чего происходит постоянная передача сигнала, что способствует агрессивному росту опухолей, независимо от наличия или отсутствия сигналов от рецепторов факторов роста. Наличие в нашем исследовании классических мутаций только у пациентов с АК (табл. 1) соответствует данным ряда опубликованных работ, в которых показано преобладание среди пациентов с мутациями именно пациентов с аденокарциномой легкого, и эти мутации чаще встречаются у некурящих женщин азиатского происхождения [4; 13].

Помимо классических мутаций, изменяющих структуру тирозинкиназного домена рецептора *EGFR*, в исследуемой группе пациентов с НМРЛ были обнаружены молчащие мутации гена *EGFR*, которые не влияют на функцию рецептора (табл. 1), но могут оказывать на него влияние на посттранскрипционном уровне. В исследуемой группе пациентов обнаружены точечные замены в 18 интроне (с.2184+19G>A) и в 21 экзоне (с.2508C>T). Эти мутации выявлены в опухолевой и неопухолевой ткани, а также в крови пациентов с НМРЛ. Кроме того, данные мутации встречаются и в контрольной группе. Однако в общей исследуемой группе пациентов с НМРЛ частота встречаемости молчащих мутаций в 2,7 раз выше, чем в контрольной группе (13,2 и 4,9 % соответственно).

Анализ ассоциации данных мутаций с определенным гистологическим типом НМРЛ показал (табл. 1), что в 18 интроне гетерозиготная мутация с.2184+19GA гена *EGFR* чаще встречается у пациентов с ПКРЛ, чем с АК (11,8 и 7,3 % соответственно) и значительно выше по сравнению с контролем. Гомозиготная мутация с.2184+19AA гена *EGFR* выявлена только у пациентов с ПКРЛ (2,0 %) и не встречается как у пациентов с АК, так и в контроле. Частота замены в 21 экзоне (с.2508C>T) у пациентов с АК в 2 раза выше, чем у пациентов с ПКРЛ и в 3 раза выше, чем в контроле (3,9; 1,8 и 1,2 % соответственно).

Молчащая мутация с.2184+19G>A гена *EGFR* располагается в начале 18 интрона в GA-богатой области, ответственной за вырезание интрона в процессе сплайсинга белка. В результате мутации происходит конформационное изменение матричной РНК гена *EGFR* и факторы сплайсинга не могут присоединиться к данному участку. В результате чего сплайсосома не собирается, и процесс вырезания интрона нарушается. Это изменяет структуру рецептора, что влияет на его функции – рецептор находится в постоянно активном состоянии без присоединения лиганда и способствует стимуляции ангиогенеза в опухоли [5].

Мутация с.2508C>T в 21 экзоне располагается в кодирующей области гена *EGFR*, однако не приводит к замене аминокислоты и изменению структуры рецептора. Выявление этих мутаций не только в тканях, но и в крови позволит заранее определить развитие АК или ПКРЛ у пациентов с НМРЛ и даст возможность скорректировать применяемую терапию.

Исследование мутаций во 2 экзоне гена *KRAS* в общей группе пациентов с НМРЛ выявило три типа мутаций: замена в 12 кодоне глицина на аспарагиновую кислоту (р.G12D) и замена глицина на цистеин (р.G12C), а также замена в 13 кодоне глицина на цистеин (р.G13C). Частота встречаемости этих мутаций составила 3,8 % (табл. 1). Данные мутации обнаружены только в опухолевой ткани пациентов с НМРЛ, в контрольной группе – не выявлены. Анализ ассоциации мутаций гена *KRAS* с определенным гистологическим типом НМРЛ показал, что у пациентов с АК мутации встречаются в 3 раза чаще, чем у пациентов с ПКРЛ, что составляет 5,9 и 1,8 % соответственно. В исследуемой группе пациентов мутации р.G12C и р.G13C гена *KRAS* встречаются только у пациентов с ПКРЛ, а мутация р.G12D гена *KRAS* у пациентов с АК легкого.

Мутации в гене *KRAS* приводят к конститутивной активации белка, в результате чего происходит постоянная передача сигнала. *KRAS* играет важную роль в нисходящем сигнальном пути RAS/RAF/MAPK и передает сигнал от EGFR внутрь клетки, что приводит к активации пролиферации клеток и стимуляции ангиогенеза. Данный путь преимущественно активируется при аденокарциноме, тогда как альтернативный путь – PI3K/AKT/mTOR – характерен для плоскоклеточного рака, и его активация осуществляется преимущественно через фосфоинозитол-3-киназу (PI3K) [14]. Однако в исследуемой популяции не выявлено мутаций в генах *PIK3CA* и *PTEN*. Можно предположить, что активация киназы PI3K и соответствующего сигнального пути идет не непосредственно через рецепторы факторов роста, а путем первоначальной активации белка RAS и передачи сигнала на PI3K/AKT/mTOR-путь.

На следующем этапе работы был проведен анализ распределения частоты встречаемости изучаемых мутаций в зависимости от пола пациентов (табл. 2). Выявлено, что мутации гена *EGFR* достоверно чаще встречаются у женщин с НМРЛ по сравнению с женщинами контрольной группы (OR = 14,22; 95 % CI 3,51–57,51; $p < 0,0001$) и достоверно чаще, чем у мужчин с НМРЛ (OR = 9,07; 95 % CI 3,33–24,66; $p < 0,0001$).

Т а б л и ц а 2. Частота встречаемости мутаций генов внутриклеточных сигнальных путей в зависимости от пола пациентов

Table 2. Frequency of occurrence of gene mutations of intracellular signal pathways depending on the patient sex

| Тип мутации Mutation type | Мутации, n (%) Mutations, n (%) | | | |
|--|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | Мужчины Men | | Женщины Women | |
| | Контроль, n = 46 Control, n = 46 | Пациенты, n = 78 Patients, n = 78 | Контроль, n = 35 Control, n = 35 | Пациенты, n = 28 Patients, n = 28 |
| Все мутации <i>EGFR</i> , из них: | 1 (2,2) | 10 (12,8)** | 3 (8,6)* | 16 (57,1)** |
| 1. Классические мутации <i>EGFR</i> | 0 (–) | 1 (1,3) | 0 (–) | 11 (39,3) |
| Делеции в 19 экзоне (p.E746_A750del, c.L747_P753delinsS) | 0 (–) | 0 (–) | 0 (–) | 7 (25,0) |
| Инсерции в 20 экзоне (p.A763_Y764insFQEA) | 0 (–) | 1 (1,3) | 0 (–) | 3 (10,7) |
| Миссенс-мутация в 21 экзоне (p.L858R) | 0 (–) | 0 (–) | 0 (–) | 1 (3,6) |
| 2. Молчащие мутации <i>EGFR</i> | 1 (2,2) | 9 (11,5) | 3 (8,6) | 5 (17,8) |
| 18 интрон (c.2184+19G>A) | | | | |
| Гетерозиготная мутация (GA) | 1 (2,2) | 8 (10,3) | 2 (5,7) | 2 (7,1) |
| Гомозиготная мутация (AA) | 0 (–) | 0 (–) | 0 (–) | 1 (3,6) |
| 21 экзон (c.2508C>T) | | | | |
| Гетерозиготная мутация (CT) | 0 (–) | 1 (1,3) | 1 (2,9) | 2 (7,1) |
| Мутации 2-го экзона гена <i>KRAS</i> | 0 (–) | 4 (5,2) | 0 (–) | 0 (–) |
| p.G12C (c.34G>T) | 0 (–) | 2 (2,6) | 0 (–) | 0 (–) |
| p.G12D (c.35G>A) | 0 (–) | 1 (1,3) | 0 (–) | 0 (–) |
| p.G13C (c.37G>T) | 0 (–) | 1 (1,3) | 0 (–) | 0 (–) |

Примечание: * – $p < 0,0001$, ** – $p < 0,0001$.

Note: * – $p < 0,0001$, ** – $p < 0,0001$.

Установлено, что классические мутации гена *EGFR* обнаружены преимущественно у женщин: в группе пациентов женского пола частота мутаций составила 39,3 %, а среди мужчин только 1,3 %. Мутация представлена в виде инсерции p.A763_Y764insFQEA в 20 экзоне гена *EGFR* (табл. 2).

Частота встречаемости молчащих мутаций гена *EGFR* у мужчин и женщин с НМРЛ составляет 11,5 и 17,8 % соответственно (табл. 2). У мужчин с НМРЛ эти мутации встречаются в 5 раз чаще, чем у мужчин контрольной группы, у женщин-пациенток – в 2 раза чаще по сравнению с женщинами контрольной группы. Гетерозиготная мутация c.2184+19GA в 18 интроне встречается и у мужчин, и у женщин (10,3 и 7,1 %), а гомозиготная мутация c.2184+19AA обнаружена

только у женщин (3,6 %). Мутация с.2508C>T в 21 экзоне встречается в 2 раза чаще у женщин с НМРЛ, чем у женщин контрольной группы, и в 5,5 раз чаще по сравнению с мужчинами с НМРЛ (7,1, 2,9 и 1,3 % соответственно).

Соматические мутации гена *EGFR* являются молекулярным маркером чувствительности опухоли легкого к лечению таргетными препаратами, направленными на ингибирование тирозинкиназ. С одной стороны, наличие таких мутаций может являться одним из ключевых механизмов опухолевой прогрессии, так как приводит к избыточной активности мутантного рецептора после его связывания с лигандом, а с другой стороны – может способствовать эффективному и более длительному связыванию лекарственных препаратов. Поэтому в таком случае тирозинкиназные ингибиторы в большей степени блокируют активность мутантного рецептора, чем не-мутированного *EGFR*. Эти препараты обладают мощным терапевтическим действием посредством избирательного повреждающего воздействия на опухолевую ткань. Их эффект направлен на инактивацию рецептора с целью блокирования механизмов передачи ростового сигнала в опухоли, подавления пролиферации, дифференцировки и ангиогенеза [2–5]. Следовательно, выявление пациентов с такими мутациями позволит корректировать эффективность лечения у конкретного пациента и максимально индивидуализировать и усилить терапевтический подход в лечении НМРЛ.

В исследуемой популяции мутации в гене *KRAS* обнаружены только у мужчин (5,2 % от общего числа пациентов мужского пола) и не выявлены у женщин (табл. 2). Мутации генов *KRAS* и *EGFR* являются взаимоисключающими, т. е. у одного и того же пациента может быть мутация либо в гене *EGFR*, либо в гене *KRAS*, так как и те и другие приводят к активации сигнального каскада RAS/RAF/МАРК. Этим и можно объяснить наличие в нашем исследовании мутаций гена *KRAS* только у мужчин и мутаций гена *EGFR* преимущественно у женщин. Полученные результаты соответствуют данным, полученным Н. Н. Мазуренко и соавт., согласно которым также выявлено преобладание мужчин среди пациентов с мутациями гена *KRAS* [15].

Пациенты с мутациями гена *KRAS* являются нечувствительными к таргетным препаратам, ингибирующим тирозинкиназный рецептор *EGFR*, поэтому определение этих мутаций позволит выделить группу пациентов, которым необходимо выбирать другую тактику лечения, помимо таргетной терапии.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в исследуемой группе мутации генов *EGFR* и *KRAS* играют важную роль в патогенезе НМРЛ. Таким образом, молекулярно-генетический анализ определения нарушений в генах, контролирующих ангиогенез опухоли, является важным для прогнозирования развития НМРЛ и корректировки индивидуальной терапии пациентов.

Заключение. В исследуемой популяции важную роль в активации внутриклеточных сигнальных путей при НМРЛ играют мутации генов *EGFR* и *KRAS*. Мутации в гене *EGFR* достоверно чаще в 5 раз встречаются у пациентов с НМРЛ, чем в контрольной группе. Классические мутации в гене *EGFR* обнаружены только у пациентов с АК, преимущественно у женщин. Мутации гена *KRAS* встречаются только у мужчин, причем у пациентов с АК в 3 раза чаще, чем у пациентов с ПКРЛ. Определение мутаций в генах *EGFR* и *KRAS* позволит выделить группы пациентов, чувствительных и нечувствительных к таргетной терапии, что даст возможность правильного и индивидуального применения к пациентам таргетных препаратов, направленных на ингибирование тирозинкиназных рецепторов. В данном исследовании не выявлено соматических мутаций в генах *PIK3CA* и *PTEN* у пациентов с НМРЛ.

Список использованных источников

1. Epidermal growth factor receptor pathway mutation and expression profiles in cervical squamous cell carcinoma: therapeutic implications / S. Bumrungthai [et al.] // *J. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 13, N 244. doi.org/10.1186/s12967-015-0611-0
2. Genomic profiling toward precision medicine in non-small cell lung cancer: getting beyond EGFR / A. L. Richer [et al.] // *Pharmacogenomics and Personalized Medicine.* – 2015. – Vol. 8. – P. 63–79. doi.org/10.2147/pgpm.s52845
3. Nedergaard, M. K. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Solid Tumor Malignancies / M. K. Nedergaard, C. J. Hedegaard, H. S. Poulsen // *Biodrugs.* – 2012. – Vol. 26, N 2. – P. 83–99. doi.org/10.2165/11599760-000000000-00000
4. Xiao-Li, Jia. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with adenocarcinoma of the lung / Xiao-Li Jia, Gang Chen // *Lung Cancer.* – 2011. – Vol. 74, N 3. – P. 396–400. doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.04.005

5. Mitsudomi, T. Molecular epidemiology of lung cancer and geographic variations with special reference to EGFR mutations / T. Mitsudomi // *Transl. Lung Cancer Res.* – 2014. – Vol. 3, N 4. – P. 205–211.
6. Targeting KRAS mutated non-small cell lung cancer: A history of failures and a future of hope for a diverse entity / A. Matikas [et al.] // *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* – 2017. – Vol. 110. – P. 1–12. doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.12.005
7. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome / N. T. Ihle [et al.] // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2012. – Vol. 104, N 3. – P. 228–239. doi.org/10.1093/jnci/djr523
8. PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer / S. Loi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2010. – Vol. 107, N 22. – P. 10208–10213. doi.org/10.1073/pnas.0907011107
9. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging / L. S. Steelman [et al.] // *Aging.* – 2011. – Vol. 3, N 3. – P. 192–222. doi.org/10.18632/aging.100296
10. Knockin of mutant PIK3CA activates multiple oncogenic pathways / J. P. Gustin [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, N 8. – P. 2835–2840. doi.org/10.1073/pnas.0813351106
11. Song, M. S. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor / M. S. Song, L. Salmena, P. P. Pandolfi // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 13, N 5. – P. 283–296. doi.org/10.1038/nrm3330
12. Mathew, C. C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA / C. C. Mathew // *Nucleic Acids. Methods in Molecular Biology* / ed. J. M. N. J. Walker. – Clifton: Human Press, 1984. – Vol. 2. – P. 31–34. doi.org/10.1385/0-89603-064-4:31
13. Prospective Analysis of Oncogenic Driver Mutations and Environmental Factors: Japan Molecular Epidemiology for Lung Cancer Study / T. Kawaguchi [et al.] // *J. Clin. Oncol.* – 2016. – Vol. 34, N 19. – P. 2247–2257. doi.org/10.1200/jco.2015.64.2322
14. Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in NonSmall-Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP) / O. Arrieta [et al.] // *J. Thorac. Oncol.* – 2015. – Vol. 10, N 5. – P. 838–843. doi.org/10.1097/jto.0000000000000481
15. Мутации *EGFR* и *KRAS*, важные для таргетной терапии немелкоклеточного рака легкого / Н. Н. Мазуренко [и др.] // *Молекулярная медицина.* – 2013. – № 6. – С. 55–59.

References

1. Bumrungrathai S., Munjal K., Nandekar S., Cooper K., Ekalaksananan T., Pientong C., Evans M. F. Epidermal growth factor receptor pathway mutation and expression profiles in cervical squamous cell carcinoma: therapeutic implications. *Journal of Translational Medicine*, 2015, vol. 13, no. 244. doi.org/10.1186/s12967-015-0611-0
2. Richer A. L., Friel J., Carson V., Inge L., Whitsett T. G. Genomic profiling toward precision medicine in non-small cell lung cancer: getting beyond EGFR. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, 2015, vol. 8, pp. 63–79. doi.org/10.2147/pgpm.s52845
3. Nedergaard M. K., Hedegaard C. J., Poulsen H. S. Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Solid Tumor Malignancies. *Biodrugs*, 2012, vol. 26, no. 2, pp. 83–99. doi.org/10.2165/11599760-000000000-00000
4. Xiao-Li Jia, Gang Chen. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, 2011, vol. 74, no. 3, pp. 396–400. doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.04.005
5. Mitsudomi T. Molecular epidemiology of lung cancer and geographic variations with special reference to EGFR mutations. *Translational Lung Cancer Research*, 2014, vol. 3, no. 4, pp. 205–211.
6. Matikas A., Mistriotis D., Georgoulis V., Kotsakis A. Targeting KRAS mutated non-small cell lung cancer: A history of failures and a future of hope for a diverse entity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2017, vol. 110, pp. 1–12. doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.12.005
7. Ihle N. T., Byers L. A., Kim E. S., Saintigny P., Lee J. J., Blumenschein G. R., Tsao A., Liu S., Larsen J. E., Wang J., Diao L., Coombes K. R., Chen L., Zhang S., Abdelmelek M. F., Tang X., Papadimitrakopoulou V., Minna J. D., Lippman S. M., Hong W. K., Herbst R. S., Wistuba I. I., Heymach J. V., Powis G. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2012, vol. 104, no. 3, pp. 228–239. doi.org/10.1093/jnci/djr523
8. Loi S., Haibe-Kains B., Majjaj S., Lallemand F., Durbecq V., Larsimont D., Gonzalez-Angulo A. M., Pusztai L., Symmans W. F., Bardelli A., Ellis P., Tutt A. N. J., Gillett C. E., Hennessy B. T., Mills G. B., Phillips W. A., Piccart M. J., Speed T. P., McArthur G. A., Sotiriou C. PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, vol. 107, no. 22, pp. 10208–10213. doi.org/10.1073/pnas.0907011107
9. Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Kempf C. R., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M. C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Bäsecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli A. M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J. A. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 192–222. doi.org/10.18632/aging.100296
10. Gustin J. P., Karakas B., Weiss M. B., Abukhdeir A. M., Lauring J., Garay J. P., Cosgrove D., Tamaki A., Konishi H., Konishi Y., Mohseni M., Wang G., Rosen D. M., Denmeade S. R., Higgins M. J., Vitolo M. I., Bachman K. E., Park B. H. Knockin of mutant PIK3CA activates multiple oncogenic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol. 106, no. 8, pp. 2835–2840. doi.org/10.1073/pnas.0813351106

11. Song M. S., Salmena L., Pandolfi P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, vol. 13, no. 5, pp. 283–296. doi.org/10.1038/nrm3330
12. Mathew C. C. The isolation of high molecular weight eucaryotic DNA. Walker J. M. N. J. (ed.) *Nucleic Acids. Methods in Molecular Biology*, vol. 2. Clifton, Human Press, 1984, pp. 31–34. doi.org/10.1385/0-89603-064-4:31
13. Kawaguchi T., Koh Y., Ando M., Ito N., Takeo S., Adachi H., Tagawa T., Kakegawa S., Yamashita M., Kataoka K., Ichinose Y., Takeuchi Y., Serizawa M., Tamiya A., Shimizu S., Yoshimoto N., Kubo A., Isa S., Saka H., Matsumura A. Prospective Analysis of Oncogenic Driver Mutations and Environmental Factors: Japan Molecular Epidemiology for Lung Cancer Study. *Journal of Clinical Oncology*, 2016, vol. 34, no. 19, pp. 2247–2257. doi.org/10.1200/jco.2015.64.2322
14. Arrieta O., Cardona A. F., Martín C., Más-López L., Corrales-Rodríguez L., Bramuglia G., Castillo-Fernandez O., Meyerson M., Amieva-Rivera E., Campos-Parra A. D., Carranza H., Gómez de la Torre J. C., Powazniak Y., Aldaco-Sarvide F., Vargas C., Trigo M., Magallanes-Maciél M., Otero J., Sánchez-Reyes R., Cuello M., Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in NonSmall-Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP). *Journal of Thoracic Oncology*, 2015, vol. 10, no. 5, pp. 838–843. doi.org/10.1097/jto.0000000000000481
15. Mazurenko N. N., Tsyganova I. V., Gagarin I. M., Chuev I. V., Mochalnikova V. V., Kolomeyeva A. A., Gorbunova V. A. EGFR and KRAS mutations important for non-small cell lung cancer target therapy. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular medicine*, 2013, no. 6, pp. 55–59 (in Russian).

Информация об авторах

Шчаюк Анна Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: anna.shchayuk@tut.by.

Крупнова Эвелина Вячеславовна – канд. биол. наук, доцент. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Krupnova@igc.by.

Шепетько Михаил Николаевич – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shepetjko@gmail.com.

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

Чеботарёва Наталья Вячеславовна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: N.Chebotareva@igc.by.

Дедик Сергей Юрьевич – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shepetjko@gmail.com.

Кильчевский Александр Владимирович – академик, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kilchev@presidium.bas-net.by.

Information about of authors

Shchayuk Anna Nikolaevna – Junior researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anna.shchayuk@tut.by.

Krupnova Evelina Vjacheslavovna – Ph. D. (Biology), Assistant Professor. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Krupnova@igc.by.

Shapetska Michail Nikolaevich – Ph. D. (Medicine), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shepetjko@gmail.com.

Mikhalenka Alena Petrovna – 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.Michalenko@igc.by.

Chebotareva Natalia Vjacheslavovna – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: N.Chebotareva@igc.by.

Dedik Sergej Yurjevich – Junior researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shepetjko@gmail.com.

Kilchevsky Aleksandr Vladimirovich – Academician, 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: kilchev@presidium.bas-net.by.

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 599.742.1:577.212.3:591.65(476.7)

Поступило в редакцию 15.01.2018

Received 15.01.2018

Е. Э. Хейдорова¹, А. В. Шпак¹, К. В. Гомель¹, В. Е. Сидорович¹, В. В. Демянчик²,
В. В. Прокопчук³, академик М. Е. Никифоров¹

¹Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам,
Минск, Республика Беларусь

²Полесский аграрно-экологический институт Национальной академии наук Беларуси,
Брест, Республика Беларусь

³Национальный парк «Беловежская пуца», Каменюки, Республика Беларусь

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНВАЗИВНОГО ВИДА – ШАКАЛА АЗИАТСКОГО (*CANIS AUREUS*) НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ

Аннотация. Обыкновенный, или азиатский, шакал (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) – вид млекопитающих семейства Псовые (Canidae), широко распространенный в Южной Азии и на Балканах. В последние десятилетия для данного вида характерно стремительное расширение ареала в Европе. В Беларуси первое сообщение о регистрации шакала появилось в 2012 г. и касалось животного, добытого на юго-востоке Брестской области в конце 2011 г. Однако данная находка на тот момент не получила научного подтверждения. Целью данной работы явилось установить с помощью молекулярно-генетических методов видовую принадлежность «шакалоподобных» особей, добытых в разное время на территории Беларуси. Молекулярно-генетическими исследованиями, проведенными на биоматериале трех животных с неясной видовой принадлежностью, подтвержден факт первой регистрации на территории Беларуси в декабре 2011 г. шакала азиатского, имеющего связь с балканским центром распространения. Другие две «шакалоподобные» особи по материнской линии являлись представителями вида *Canis lupus*. При этом не исключено, что их не совсем типичные для волка морфологические особенности являются следствием гибридизации с домашними собаками, что требует дальнейшего изучения на основе ядерного генома.

Ключевые слова: шакал, ДНК-баркодинг, цитохром b, ареал, инвазия, межвидовая гибридизация

Для цитирования: Молекулярно-генетическая идентификация инвазивного вида – шакала азиатского (*Canis aureus*) на территории Беларуси / Е. Э. Хейдорова [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 86–92.

Ekaterina E. Kheidorova¹, Aliaksei V. Shpak¹, Konstantin V. Homel¹, Vadim E. Sidorovich¹, Victor V. Demianchuk²,
Vadzim V. Prakapchuk³, Academician Mikhail E. Nikiforov¹

¹Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources,
Minsk, Republic of Belarus

²Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Brest, Republic of Belarus

³National Park «Belovezhskaya Pushcha», Kamenyuki, Republic of Belarus

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF THE INVASIVE SPECIES – ASIAN JACKAL (*CANIS AUREUS*) IN THE TERRITORY OF BELARUS

Abstract. An ordinary jackal (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) is a mammal species of the Canidae family that has been characterized by a rapid expansion of the range in recent decades. In Belarus, the first report on the registration of the jackal appeared in 2012 and concerned an animal that was found in the southeast of the Brest region at the end of 2011. However, this finding was not scientifically confirmed at that time. The purpose of this work was to establish by means of molecular genetic methods the species affiliation of “jackal-like” individuals hunted at different times in the territory of Belarus. Molecular genetic studies conducted on the biomaterial of three animals with unclear species affiliation confirmed the fact of the first registration of the Asian jackal in the territory of Belarus in December 2011. It is given that an Asian jackal has a connection with the Balkan distribution center. The other two “jackal-like” individuals were the representatives of the species *Canis lupus* on the maternal line. However, it is possible that their morphological features unusual for wolves are a consequence of their hybridization with domestic dogs. This requires a further careful study based on the nuclear genome.

Keywords: jackal, DNA-barcoding, cytochrome b, areal, invasion, interspecific hybridization

For citation: Kheidorova E. E., Shpak A. V., Gomel K. V., Sidorovich V. E., Demianchuk V. V., Prakapchuk V. V., Nikiforov M. E. Molecular genetic identification of the invasive species – asian jackal (*Canis aureus*) in the territory of Belarus. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 86–92 (in Russian).

Введение. Обыкновенный, или азиатский, шакал (*Canis aureus* Linnaeus, 1758) – вид млекопитающих семейства Псовые (Canidae). Встречающееся иногда в научно-популярной литературе и СМИ название «золотистый шакал» является дословным переводом латинского названия.

Ареал обыкновенного шакала охватывает Южную Азию и простирается на территорию Южной Европы, где до недавнего времени он был локализован на Балканском полуострове [1; 2]. Здесь в 1960-е годы в ряде регионов он практически вымер из-за сокращения среды обитания и использования отравленных приманок [3]. Разрозненные популяции отмечались только в некоторых областях Болгарии, Турции, Хорватии и Греции [4–6]. После введения законодательной защиты данного вида в Албании, Сербии и в 1962 г. в Болгарии шакал заново колонизировал Болгарию [3] и в 1980-х начал расселяться в пространстве прежнего ареала в Румынии и Сербии [2], Венгрии [7], Македонии [8].

Кроме того, с 1980-х годов шакал начал стремительно распространяться за пределы своего прежнего европейского ареала. В 1985 г. он был отмечен в Италии [9], в 1987 г. – в Австрии [10], в 1989 г. – в Словакии [11], в 1996 г. – в восточной Германии [12]. В Украине первая регистрация шакала произошла в 1998 г. в низовьях Дуная [13]. До 2014 г. шакал был отмечен в 10 из 25 областей Украины: Одесской, Николаевской, Херсонской, Запорожской областях и Крыму на юге; Закарпатской и Хмельницкой областях на западе; Донецкой и Луганской областях на востоке и Житомирской области на севере, охватив более 50 % территории страны [14]. Согласно модели, предложенной И. Загороднюком, существует три независимых волны и направления экспансии вида в Украине: Дунайско-Полесский (наиболее мощный), Донско-Донецкий (средней мощности) и Закарпатский (наименьший). В Латвии и Эстонии шакал был отмечен в 2013 г., в Польше – в 2015 г. [15] вблизи границы с Германией. Самой северной точкой регистрации обыкновенного шакала в Европе на настоящий момент является Дания, где он был отмечен в 2015 г. Схожая тенденция к экспансии наблюдается в России. На рубеже 1980–1990-х годов шакал достиг территории Саратовской области, где сформировал устойчивую популяцию. При этом высказываются предположения, что расселение этого вида к северу на территории саратовского Заволжья продолжается [16].

Следует отметить, что несмотря на значительное количество регистраций обыкновенного шакала в Центральной и Восточной Европе, ближайшие к Беларуси устойчивые популяции к настоящему времени сформировались в Украине на территории Северного Причерноморья от Дуная и Днестра до Днепра и Буга, где шакал населяет, главным образом, поймы и дельты указанных рек [14].

В Беларуси первое сообщение о регистрации шакала появилось в 2012 г. и касалось животного, добытого на юго-востоке Брестской области в конце 2011 г. Однако данная находка на тот момент не получила научного подтверждения. В последующие несколько лет было отмечено еще несколько «шакалоподобных» особей, видовая принадлежность которых, впрочем, не была однозначно подтверждена.

Целью данной работы явилось установить с помощью молекулярно-генетических методов видовую принадлежность «шакалоподобных» особей, добытых в разное время на территории Беларуси.

Материалы и методы исследования. В январе 2018 г. проведен молекулярно-генетический анализ проб биологического материала (шкурки и мышечной ткани) трех животных с неясной видовой принадлежностью: образец 1 (Sample 1) – животное (самец), добытое в Берестовицком районе Гродненской области в сентябре 2016 г. (рис. 1); образец 2 (Sample 2) – животное (самец), добытое в окрестностях дер. Селяхи Брестского района в декабре 2011 г. (рис. 2); образец 3 (Sample 3) – животное (лактацирующая самка), добытое в Каменецком районе Брестской области в августе 2017 г. (рис. 3).

Выделение ДНК проводили с помощью коммерческого набора NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany) по протоколу производителя. Участок гена цитохрома *b* (около 500 п. н.) амплифицировали с использованием универсальных праймеров MVZ04 (5' GCA GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT C 3') и MVZ05 (5' CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G 3'), рекомендованных для изучения млекопитающих [17]. ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси,



Рис. 1. Животное с неясной видовой принадлежностью, добытое в Берестовицком районе Гродненской области в сентябре 2016 г.

Fig. 1. Animal with an unclear species affiliation found in the Berestovitsa district of the Grodno region in September 2016



Рис. 2. Животное с неясной видовой принадлежностью, добытое в окрестностях дер. Селяхи Брестского района в декабре 2011 г.

Fig. 2. Animal with an unclear species affiliation found near the village of Selyakhi of the Brest district in December 2011



Рис. 3. Животное с неясной видовой принадлежностью, добытое в Каменецком районе Брестской области летом 2017 г.

Fig. 3. Animal with an unclear species affiliation found in the Kamenetsk district of the Brest region in summer 2017

содержащей 1x Taq-буфер (Праймтех, Беларусь), 3,0 mM MgCl₂, 1x dNTPs, 1U Taq-полимеразы (Праймтех, Беларусь), в амплификаторе модели CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc. USA) с использованием следующего режима: предварительная денатурация – 94 °C, 3 мин, затем 40 циклов денатурации (94 °C, 1 мин), отжига (45 °C, 1 мин) и удлинения цепи (72 °C, 1 мин) с последующей заключительной достройкой цепи (72 °C, 4 мин). Полученные ПЦР-продукты очищали с помощью набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Германия) и секвенировали с использованием GenomLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit (Beckman Coulter, Германия) и системы генетического анализа GenomeLAB GEXP (Beckman Coulter, Германия).

Полученные последовательности были обработаны при помощи программы BLAST, позволяющей посредством статистического анализа установить степень подобия полученных нами последовательностей с расположенными в международной базе GenBank и таким образом достоверно определить их видовую принадлежность. Для подтверждения результатов была построена дендрограмма генетических различий (Tamura 3-parameters model, maximum likelihood method, bootstrap 500) с использованием программы MEGA ver. 6. При этом в качестве сторонних групп выбраны последовательности *cyt b Sus scrofa* Linnaeus, 1758 и *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758).

Результаты и их обсуждение. Анализ последовательностей при помощи программы BLAST показал статистически значимое соответствие образцов 1 и 3 виду *Canis lupus* Linnaeus, 1758. Последовательность образца 2 достоверно соответствует аналогичным последовательностям вида *C. aureus* Linnaeus, 1758 (рис. 4).

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--|
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_DS5 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717935 kt 447758.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_DS4 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717933 kt 447757.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_DS3 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717931 kt 447756.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_DS2 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717929 kt 447755.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_DS1 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717927 kt 447754.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_VP53 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717925 kt 447753.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_VP4 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717923 kt 447752.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_VP3 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717921 kt 447751.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_VP2 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717919 kt 447750.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Serbia_VP1 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717917 kt 447749.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Egypt155 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717883 kt 447732.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1331 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717881 kt 447731.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1330 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717879 kt 447730.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1328 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717875 kt 447728.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1327 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717873 kt 447727.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1326 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717871 kt 447726.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel54 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717869 kt 447725.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel50 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717867 kt 447724.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1342 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717857 kt 447719.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1345 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717855 kt 447718.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1344 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717849 kt 447715.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1335 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 699 | 699 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717845 kt 447713.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Afghanistan_N2234 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 693 | 693 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717915 kt 447748.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1332 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 693 | 693 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717843 kt 447712.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1332 mitochondrion, partial genome | 691 | 691 | 100% | 0.0 | 99% | gi 926459877 kt 448274.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Israel_RKW1329 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 688 | 688 | 100% | 0.0 | 99% | gi 925717877 kt 447729.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus cytochrome b gene, complete cds: mitochondrial | 676 | 676 | 100% | 0.0 | 99% | gi 34016841 ay 291433.1 |
| <input type="checkbox"/> Canis aureus isolate CAU_Morocco_3644 cytochrome b (CYB) gene, complete cds: mitochondrial | 612 | 612 | 98% | 3e-171 | 96% | gi 925717943 kt 447762.1 |

Рис. 4. Соответствие нуклеотидной последовательности образца 2 последовательностям шакала, депонированным в базе данных Genbank

Fig. 4. Coincidence of the nucleotide sequence of species 2 with jackal sequences deposited in the database Genbank

Дендрограмма генетических различий (рис. 5) подтверждает результаты анализа BLAST, относя образцы 1 и 3 в кладу *Canis lupus/familiaris*. Образец 2 формирует отдельный кластер в купе с последовательностями вида *C. aureus*, причем характер гаплотипического распределения позволяет предполагать связь добытой особи с балканским центром распространения.

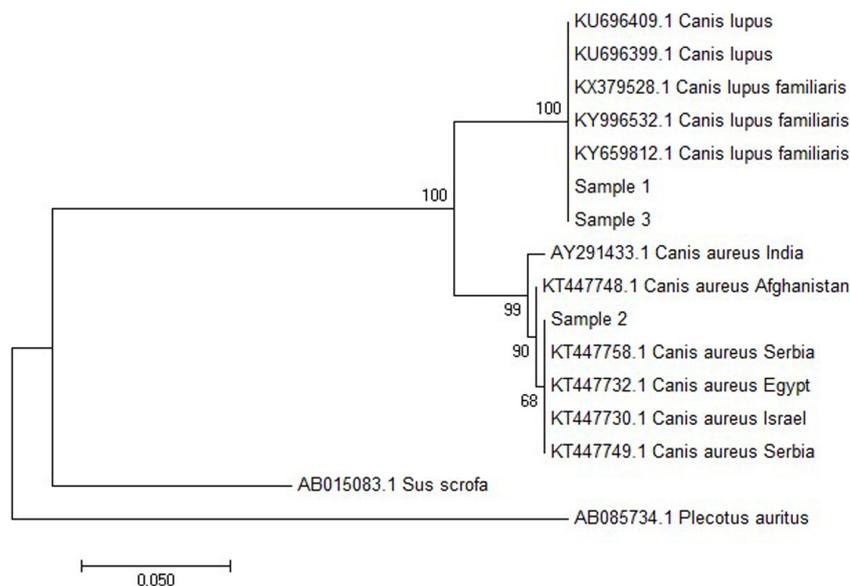


Рис. 5. Дендрограмма генетических различий исследованных животных с неясной видовой принадлежностью (ML, T92, bootstrap 500)

Fig. 5. Dendrogram of genetic distinctions in the studied animals with unclear species affiliation (ML, T92, bootstrap 500)

Заключение. Молекулярно-генетическими исследованиями, проведенными на биоматериале трех животных с неясной видовой принадлежностью, подтвержден факт первой регистрации на территории Беларуси в декабре 2011 г. шакала азиатского, имеющего связь с балканским центром распространения. Другие две «шакалоподобные» особи по материнской линии являлись представителями вида *Canis lupus*. При этом не исключено, что их необычные для волка морфологические особенности являются следствием гибридизации с домашними собаками, что требует дальнейшего изучения на основе ядерного генома.

Благодарности. Авторы выражают признательность охотнику Николаю Карнацевичу и инженеру-охотоведу Волковыского лесхоза Анатолию Пронину за предоставленный биологический материал.

Acknowledgements. The authors are very grateful to the hunter Nikolai Karnatsevich and the engineer-hunter of the Volkovysk forestry Anatoly Pronin for the presented biological material.

Список использованных источников

1. Demeter, A. *Canis aureus* L., 1758 – Schakal, Goldschakal / A. Demeter, N. Spassov // Handbuch Der Säugetiere Europas. – 1993. – Vol. 3. – P. 107–138.
2. Kryštufek, B. Present distribution of the Golden Jackal *Canis aureus* in the Balkans and adjacent regions / B. Kryštufek, D. Murariu, C. Kurtonur // Mammal Review. – 1997. – Vol. 27, N 2. – P. 109–114. doi.org/10.1111/j.1365-2907.1997.tb00375.x
3. Spassov, N. The position of Jackals in the *Canis* genus and life-history of the Golden Jackal (*Canis aureus* L.) in Bulgaria and on the Balkans / N. Spassov // Historia Naturalis Bulgarica. – 1989. – N 1. – P. 44–56.
4. Spassov, N. The jackal / N. Spassov // Ecocurrer. – 1993. – N 3. – P. 40–41.
5. Giannatos G. Conservation Action Plan for the Golden Jackal (*Canis aureus* L. 1758) in Greece / G. Giannatos. – Greece, 2004.
6. Spassov, N. The Jackal, *Canis aureus* (Linnaeus 1758) / N. Spassov // The Mammals, Important for Conservation in Bulgaria. – 2007. – N 6. – P. 234–238.
7. Expansion range of the golden jackal in Hungary between 1997 and 2006 / L. Szabó [et al.] // Mammalia. – 2009. – Vol. 73, N 4. – P. 307–311. doi.org/10.1515/mamm.2009.048
8. Kryštufek, B. New record of the jackal *Canis aureus* Linnaeus, 1758 in Macedonia (Mammalia, Carnivora) / B. Kryštufek, S. Petkovski // Fragmenta Balcanica Musei Macedonici Scientiarum Naturalium. – 1990. – N 14. – P. 131–138.

9. Lapini, L. Lo sciacallo dorato (*Canis aureus* L., 1758) specie nuova per la fauna Italiana (Mammalia, Carnivora, Canidae) / L. Lapini, F. Perco // *Atti Museo Friuli Storia Naturale*. – 1988. – N 10. – P. 213–228.
10. Humer, A. Goldschakale in Österreich. Aktueller Status und Managementstrategien unter besonderer Berücksichtigung der Einstellung und des Wissens zum Thema Goldschakal bei österreichischen Bezirksjägermeistern: Diploma thesis / A. Humer. – Vienna, Austria: Institute of Wildlife Biology and Game Management, University of Natural Resources and Life Sciences, 2006.
11. Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe / J. Arnold [et al.] // *Mammal Review*. – 2012. – Vol. 42, N 1. – P. 1–11. doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00185.x
12. Möckel, R. Ein Goldschakal (*Canis aureus*) in Südburgenland – Erstnachweis für Deutschland / R. Möckel // *Säugetierkundliche Informationen*. – 2000. – N 4. – P. 477–481.
13. Волох А. М., Роженко Н. В., Лобков В. А. Первая встреча обыкновенного шакала на юго-западе Украины // *Научные труды зоологического музея ОГУ*. – Одесса, 1998. – Т. 3. – С. 87–88.
14. Загороднюк, І. Шакал (*Canis aureus*) в Україні: сучасна експансія та статус виду / І. Загороднюк // *Вісник Національного науково-природничого музею*. – 2014. – Т. 12. – С. 100–105.
15. Range expansion of the golden jackal (*Canis aureus*) into Poland: first records / R. Kowalczyk [et al.] // *Mammal Research*. – 2015. – Vol. 60, N 4. – P. 411–414. doi.org/10.1007/s13364-015-0238-9
16. О современной границе ареала шакала (*Canis aureus* L.) в Волго-Уральском междуречье / М. Л. Опарин [и др.] // *Поволжский эколог. журн.* – 2008. – № 4. – С. 386–388.
17. Smith, M. F. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae) / M. F. Smith, J. L. Patton // *Mol. Biol. Evol.* – 1991. – Vol. 8, N 1. – P. 85–103. doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040638

References

1. Demeter A., Spassov N. *Canis aureus* L., 1758 – Schakal, Goldschakal. *Handbuch Der Säugetiere Europas*, 1993, vol. 3, pp. 107–138.
2. Kryštufek B., Murariu D., Kurtonur C. Present distribution of the Golden Jackal *Canis aureus* in the Balkans and adjacent regions. *Mammal Review*, 1997, vol. 27, no. 2, pp. 109–114. doi.org/10.1111/j.1365-2907.1997.tb00375.x
3. Spassov N. The position of Jackals in the *Canis* genus and life-history of the Golden Jackal (*Canis aureus* L.) in Bulgaria and on the Balkans. *Historia Naturalis Bulgarica*, 1989, no. 1, pp. 44–56.
4. Spassov N. The jackal. *Ecocourier*, 1993, no. 3, pp. 40–41.
5. Giannatos G. *Conservation Action Plan for the Golden Jackal (Canis aureus L. 1758) in Greece*. WWF, Athens, Greece, 2004.
6. Spassov N. The Jackal, *Canis aureus* (Linnaeus 1758). *The Mammals, Important for Conservation in Bulgaria*, 2007, no. 6, pp. 234–238.
7. Szabó L., Heltai M., Szucs E., Lanski J., Lehoczki R. Expansion range of the golden jackal in Hungary between 1997 and 2006. *Mammalia*, 2009, vol. 73, no. 4, pp. 307–311. doi.org/10.1515/mamm.2009.048
8. Kryštufek B., Petkovski S. New record of the jackal *Canis aureus* Linnaeus, 1758 in Macedonia (Mammalia, Carnivora). *Fragmenta Balcanica Musei Macedonici Scientiarum Naturalium*, 1990, no. 14, pp. 131–138.
9. Lapini L., Perco F. Lo sciacallo dorato (*Canis aureus* L., 1758) specie nuova per la fauna Italiana (Mammalia, Carnivora, Canidae). *Atti Museo Friuli Storia Naturale*, 1988, no. 10, pp. 213–228 (in Italian).
10. Humer A. *Goldschakale in Österreich. Aktueller Status und Managementstrategien unter besonderer Berücksichtigung der Einstellung und des Wissens zum Thema Goldschakal bei österreichischen Bezirksjägermeistern*. Diploma thesis. Vienna, Austria, Institute of Wildlife Biology and Game Management, University of Natural Resources and Life Sciences, 2006 (in German).
11. Arnold J., Humer A., Heltai M., Murariu D., Spassov N., Hackländer K. Current status and distribution of golden jackals *Canis aureus* in Europe. *Mammal Review*, 2012, vol. 42, no. 1, pp. 1–11. doi.org/10.1111/j.1365-2907.2011.00185.x
12. Möckel R. Ein Goldschakal (*Canis aureus*) in Südburgenland – Erstnachweis für Deutschland. *Säugetierkundliche Informationen*, 2000, no. 4, pp. 477–481 (in German).
13. Volokh A. M., Rozhenko N. V., Lobkov V. F. First record of the common jackal (*Canis aureus* L.) in the southwest of Ukraine. *Nauchnye trudy Zoologicheskogo muzeya Odesskogo natsional'nogo universiteta = Transactions of Zoological museum of Odessa national university*, Odessa, 1998, vol. 3, pp. 87–88 (in Russian).
14. Zagorodniuk I. Golden jackal (*Canis aureus*) in Ukraine: modern expansion and status of species. *Visnik Natsional'nogo naukovo-prirodничого музею = Proceedings of the National Museum of Natural History*, 2014, no. 12, pp. 100–105 (in Ukrainian).
15. Kowalczyk R., Kołodziej-Sobocińska M., Ruczyńska I., Wójcik J. M. Range expansion of the golden jackal (*Canis aureus*) into Poland: first records. *Mammal Research*, 2015, vol. 60, no. 4, pp. 411–414. doi.org/10.1007/s13364-015-0238-9
16. Oparin M. L., Oparina O. S., Kondratenkov I. A., Khrustov A. V. About current area border of golden jackal (*Canis aureus* L.) in Volga-Ural interfluvium. *Povolzhskiy ekologicheskij zhurnal = Povolzhskiy Journal of Ecology*, 2008, no. 4, pp. 386–388 (in Russian).
17. Smith M. F., Patton J. L. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in natural populations of South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution*, 1991, vol. 8, no. 1, pp. 85–103. doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040638

Информация об авторах

Хейдорова Екатерина Эдуардовна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, ученый секретарь. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: hejkat@mail.ru.

Шпак Алексей Викторович – науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: shpak.dvergr@gmail.com.

Гомель Константин Вячеславович – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: homelkv@gmail.com.

Сидорович Вадим Евгеньевич – д-р биол. наук, профессор. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vadim.sidorovich@gmail.com.

Демянчик Виктор Викторович – мл. науч. сотрудник. Полесский аграрно-экологический институт НАН Беларуси (ул. Московская, 204, 224021, Брест, Республика Беларусь). E-mail: koktebel.by@mail.ru.

Прокопчук Вадим Васильевич – ст. лаборант. Национальный парк «Беловежская пуща» (225063, агрогородок Каменюки, Каменецкий район, Брестская область, Республика Беларусь). E-mail: peregrinus-@mail.ru.

Никифоров Михаил Ефимович – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikif@tut.by.

Information about the authors

Kheidorova Ekaterina Eduardovna – Ph. D. (Biology), Leading researcher, Scientific Secretary. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: hejkat@mail.ru.

Shpak Aliaksei Vitarovich – Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shpak.dvergr@gmail.com.

Homel Konstantin Vyacheslavovich – Ph. D. (Biology), Researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: homelkv@gmail.com.

Sidorovich Vadim Evgen'evich – D. Sc. (Biology), Professor. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vadim.sidorovich@gmail.com.

Demianchyk Vitar Vitarovich – Junior Researcher. The Polesie Agrarian Ecological Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (204, Moskovskaya Str., 224021, Brest, Republic of Belarus). E-mail: koktebel.by@mail.ru.

Prakapchuk Vadzim Vasil'evich – Senior laboratory assistant. National Park «Bielaviežskaja Pušča» (225063, Kamianiuki, Kamianiec district, Brest region, Republic of Belarus). E-mail: peregrinus-@mail.ru.

Nikiforov Mikhail Efimovich – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Chief researcher. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Bioresources (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikif@tut.by.

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

МЕДИЦИНА
MEDICINE

УДК 57.053:577.333:577.164.2

Поступило в редакцию 11.09.2017

Received 11.09.2017

**Г. Г. Мартинович¹, И. В. Мартинович¹, А. В. Вчерашняя¹, Н. К. Зенков²,
Е. Б. Меньщикова², академик С. Н. Черенкевич¹**¹*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*²*Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины,
Новосибирск, Российская Федерация***РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ И ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК АСКОРБАТОМ НАТРИЯ**

Аннотация. Исследовано влияние аскорбата в физиологических концентрациях на пролиферативную активность и химиорезистентность клеток карциномы гортани человека линии Нер-2. Установлено, что при действии аскорбата в концентрации 60 мкМ скорость пролиферации опухолевых клеток увеличивается в 1,5 раза. Аскорбат вызывает изменение функционального состояния опухолевых клеток, в результате которого увеличивается их резистентность к доxorубину и тимохинону. Показано, что ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин блокирует стимулирующий эффект антиоксиданта. Полученные результаты свидетельствуют об участии активных форм кислорода, продуцируемых НАДФН-оксидазой, в механизме активации адаптационного ответа клеток, индуцированного аскорбатом.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, химиорезистентность, опухолевые клетки, антиоксиданты, редокс-сигнализация, НАДФН-оксидаза

Для цитирования: Регуляция пролиферативной активности и химиорезистентности опухолевых клеток аскорбатом натрия / Г. Г. Мартинович [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 93–100.

**Grigory G. Martinovich¹, Irina V. Martinovich¹, Aleksandra V. Vcherashniaya¹, Nikolai K. Zenkov²,
Elena B. Menshchikova², Academician Sergei N. Cherenkevich¹**¹*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*²*Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, Russian Federation***REGULATION OF THE PROLIFERATIVE ACTIVITY
AND CHEMORESISTANCE IN TUMOR CELLS BY SODIUM ASCORBATE**

Abstract. The effect of ascorbate in physiological concentrations on the proliferative activity and chemoresistance in human larynx carcinoma Нер-2 cells was studied. Ascorbate in a concentration of 60 μM was found to increase the cancer cells proliferation rate 1.5 times. Ascorbate changes the functional state of the cancer cells, thereby increasing their resistance to doxorubicin and thymoquinone. It was shown that apocynin (NADPH oxidase inhibitor) blocks the stimulating effect of the antioxidant. The results obtained suggest that reactive oxygen species produced by NADPH oxidase participate in the mechanism of cell adaptive response induced by ascorbate.

Keywords: ascorbic acid, chemoresistance, tumor cells, antioxidants, redox signaling, NADPH oxidase

For citation: Martinovich G. G., Martinovich I. V., Vcherashniaya A. V., Zenkov N. K., Menshchikova E. B., Cherenkevich S. N. Regulation of the proliferative activity and chemoresistance in tumor cells by sodium ascorbate. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 93–100 (in Russian).

Введение. Поиск и разработка эффективных средств регуляции окислительно-восстановительных процессов в клетках относится к актуальным задачам современной медицинской биофизики. Важное место среди клеточных редокс-регуляторов занимает аскорбиновая кислота, широко используемая во многих биомедицинских технологиях.

Аскорбиновая кислота участвует в ряде биохимических процессов, включая гидроксильрование коллагена, метаболизм тирозина, биосинтез карнитина и норадреналина [1]. При физиологических значениях рН аскорбиновая кислота находится в форме сопряженного основания (аскорбата) и является одним из основных внутриклеточных и внеклеточных восстановителей. В зависимости от локальных физико-химических условий (типа и концентрации окислителей, величины рН, концентрации металлов переменной валентности и др.) аскорбиновая кислота может проявлять как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства. Предполагается, что прооксидантные свойства аскорбиновой кислоты определяют ее цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, что создает предпосылки для использования данного редокс-активного соединения в противоопухолевой терапии.

Первые исследования противоопухолевых свойств аскорбиновой кислоты выполнены Е. Cameron и L. Pauling в 1970-х годах [2]. Было показано, что при введении 10 г аскорбиновой кислоты снижается смертность пациентов на поздней стадии рака. В исследованиях, проведенных позже С. Moertel и соавт. [3], не наблюдалось улучшения состояния здоровья у онкологических больных, принимавших по 10 г аскорбиновой кислоты, что поставило под сомнение возможность ее использования в качестве терапевтического агента в противоопухолевой терапии. Противоречивость результатов исследований противоопухолевых свойств аскорбиновой кислоты *in vivo* объясняется использованием разных методов введения аскорбиновой кислоты в организм пациента. В работах С. Moertel и соавт. аскорбиновую кислоту вводили только *per os*, а в исследованиях Е. Cameron и L. Pauling использовали также внутривенное введение. Показано, что внутривенное введение высоких доз антиоксиданта позволяет увеличить концентрацию аскорбиновой кислоты в крови в 70 раз, тогда как употребление высоких доз аскорбиновой кислоты *per os* увеличивает концентрацию антиоксиданта в крови только в несколько раз [4].

С использованием 43 линий опухолевых клеток и 5 линий нормальных клеточных типов показано, что аскорбиновая кислота в концентрациях свыше 4 мМ индуцирует гибель только опухолевых клеток [5]. В экспериментах *in vivo* на крысах также установлено, что аскорбиновая кислота в высоких дозах подавляет рост и метастазирование при гормонально-резистентном раке предстательной железы [6].

Исследования, проведенные *in vitro*, позволяют предположить, что цитотоксичность аскорбиновой кислоты в высоких концентрациях опосредована образованием пероксида водорода с участием металлов переменной валентности. Тем не менее, возможность осуществления такого механизма *in vivo* считается маловероятной [7]. Следует также отметить, что образование H_2O_2 в присутствии аскорбиновой кислоты не является убедительным доказательством цитотоксических свойств последней, поскольку H_2O_2 обладает как токсическим, так и регуляторным действием [8].

Ранее нами было показано, что цитотоксическое действие аскорбиновой кислоты в высоких концентрациях может быть обусловлено регуляцией кальциевой сигнализации в опухолевых клетках [9]. Механизм аскорбат-зависимой регуляции Ca^{2+} -сигнализации клеток включает усиление локальной продукции активных форм кислорода (АФК) в клетках за счет участия специфических оксидоредуктаз – НАДН:убихинон оксидоредуктазы (ЕС 1.6.5.3) и убихинол:цитохром с оксидоредуктазы (Е.С. 1.10.2.2) [10]. Согласно предложенному механизму, кроме редокс-активных соединений и их мишеней в редокс-регуляторных процессах участвуют также белки-ферменты – оксидоредуктазы, локализация которых вблизи белков-мишеней определяет специфический отклик клеток. При этом регуляторный эффект действия редокс-активных соединений определяется не конкретной молекулой, а группой взаимодействующих участников, образующих электрон-транспортные цепи (редокс-цепи), и зависит от величин параметров редокс-гомеостаза [11]. Компонентами биологических электрон-транспортных цепей являются оксидоредуктазы и эндогенные редокс-активные соединения, включая АФК и антиоксиданты. С участием электрон-транспортных цепей в биосистемах регулируются программа клеточной гибели и пролиферация клеток.

Близкие по структуре эндогенные и экзогенные антиоксиданты могут выступать участниками разных электрон-транспортных цепей, запуская при этом различные клеточные ответы. Так,

нами показано, что водорастворимые фенольные серосодержащие антиоксиданты 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия (ТС-13) и 3,5-диметил-4-гидроксипропилиэтанол калия (БЭК-11-К) вызывают в опухолевых клетках регуляторные эффекты противоположно направленного действия [12]. Обнаружено, что ТС-13 ингибирует, а БЭК-11-К стимулирует пролиферацию опухолевых клеток в культуре. Указанные эффекты синтетических антиоксидантов проявляются при концентрациях, равных физиологическим значениям концентрации аскорбата в плазме крови. На основании полученных ранее результатов мы предположили, что аскорбат может выполнять функции регулятора пролиферативной активности опухолевых клеток в концентрациях, соответствующих физиологическим значениям. Несмотря на многочисленные исследования эффектов действия аскорбиновой кислоты на опухолевые клетки в высоких фармакологических концентрациях, действие аскорбата на опухолевые клетки в низких физиологических концентрациях остается малоизученным. В данной работе исследовано действие аскорбата в физиологических концентрациях на скорость пролиферации и на химиорезистентность опухолевых клеток.

Материалы и методы исследования. В работе использовали культуру клеток эпидермоидной карциномы гортани человека линии НЕР-2 (коллекция клеточных культур Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии (Минск, Беларусь)). Клетки линии НЕР-2 культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и гентамицина (0,08 мг/мл). Культивирование клеток осуществлялось в CO₂-инкубаторе HERAccl 150 (Thermo Scientific) при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Для оценки пролиферативной активности клетки линии НЕР-2 в концентрации $5 \cdot 10^4$ кл/мл высевали в чашки Петри диаметром 35 мм и культивировали 4 сут. При проведении спектрофлуориметрических исследований клетки выращивали в культуральных пластиковых флаконах с ростовой поверхностью 25 см² и снимали через 7 сут. культивирования. Конечный объем питательной среды в обоих способах культивирования составлял 5 мл. Для определения влияния препаратов на пролиферативную активность опухолевых клеток исследуемое соединение в растворе объемом 5 мкл (разведение 1 : 1000) добавляли в чашки Петри через сутки после пересева клеток. Подсчет клеток проводили через трое суток культивирования. Пролиферативную активность оценивали по индексу пролиферации, равному отношению количества клеток в среде после 4 сут. культивирования к количеству клеток при посеве. Чувствительность модифицированных клеток к действию противоопухолевых агентов оценивали при их культивировании во втором пассаже без антиоксидантов. Долю выживших клеток ($D_{ж}$) по отношению к контролю определяли по формуле

$$D_{ж} = \frac{N}{N_0} 100 \%,$$

где N – число жизнеспособных клеток в исследуемом образце; N_0 – число жизнеспособных клеток в контроле. Для подсчета концентрации клеток удаляли питательную среду и обрабатывали их раствором трипсина в смеси с раствором Версена в соотношении объемов 1 : 3. Затем клетки осаждали центрифугированием (600 g, 3 мин) и ресуспензировали в HEPES-буфере. Процент жизнеспособных клеток определяли при помощи суправитального окрашивания с использованием 0,4 %-ного раствора трипанового синего. Подсчет жизнеспособных клеток проводили визуально с помощью светового микроскопа в камере Горяева (подсчет клеток в количестве не менее 100 повторяли 3 раза).

Для оценки резистентности клеток к противоопухолевым соединениям использовали доксорубин (Белмедпрепараты, Беларусь) и 2-изо-пропил-5-метил-1,4-бензохинон (тимохинон) (Sigma-Aldrich). **Противоопухолевое соединение добавляли в чашки Петри в концентрации, индуцирующей 50 %-ное ингибирование роста клеток (IC_{50}).** Экспериментально определенная величина концентрации 50 %-ного ингибирования роста клеток линии НЕР-2 в культуре для доксорубина составила 0,2 мкМ, для тимохинона – 8 мкМ.

Внутриклеточную продукцию АФК определяли на основе анализа скорости окисления флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H₂DCF). Измерения проводили при темпе-

ратуре 37 °С в HEPES-буфере следующего состава: NaCl – 131 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 1,3 мМ, MgSO₄ – 1,3 мМ, KH₂PO₄ – 0,4 мМ, HEPES – 20 мМ, глюкоза – 6 мМ, pH 7,4. Суспензию клеток нагружали диацетатом H₂DCF (Sigma-Aldrich), инкубируя с 10 мкМ зонда в течение 45 мин при температуре 37 °С в HEPES-буфере. Затем клетки дважды отмывали в HEPES-буфере (600 г, 3 мин). Интенсивность флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF), образующегося при окислении H₂DCF, измеряли при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 530 нм с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (Солар, Беларусь).

В работе использовали аскорбат натрия (Sigma-Aldrich). В качестве антиоксидантов сравнения применяли водорастворимые фенольные соединения БЭК-11-К (3,5-диметил-4-гидроксибензилтиоэтанат калия) и ТС-13 (3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфат натрия), синтезированные в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск, Россия), а также серосодержащий антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (NAC) (Sigma-Aldrich). В работе использовали также ингибитор НАДФН-оксидазы апоцинин (1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)этанон) (Sigma-Aldrich). При проведении экспериментов в суспензии клеток апоцинин добавляли при загрузке клеток H₂DCF-DA, инкубируя с 500 мкМ ингибитора в течение 45 мин при температуре 37 °С в HEPES-буфере.

Приведенные в работе кинетические зависимости являются типичными для серии трех-пяти независимых экспериментов. Результаты представлены как средние значения плюс-минус стандартное отклонение среднего для трех-пяти независимых экспериментов. Различия между группами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, достоверными считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для определения влияния аскорбата на пролиферативную активность опухолевых клеток использовали антиоксидант в концентрациях от 10 до 200 мкМ. При введении аскорбата в культуру в концентрациях от 10 до 40 мкМ скорость роста клеток карциномы гортани человека линии HEP-2 не изменялась (рис. 1). При культивировании клеток с аскорбатом в концентрациях от 40 до 100 мкМ скорость роста опухолевых клеток была выше, чем в контроле. Максимальный эффект наблюдали при культивировании клеток линии HEP-2 с аскорбатом в концентрации 60 мкМ, в этом случае скорость их пролиферации увеличивалась на $50 \pm 10\%$ в сравнении с контролем, принятым за 100% ($p < 0,01$, $n = 8$).

Сравнение регуляторного действия аскорбата и других антиоксидантов (БЭК-11-К, ТС-13 и NAC) показало, что эффект стимуляции пролиферативной активности клеток наблюдается только для определенных антиоксидантов. При действии фенольного антиоксиданта ТС-13 в концентрации 60 мкМ наблюдалось снижение числа клеток в культуре. Действие БЭК-11-К

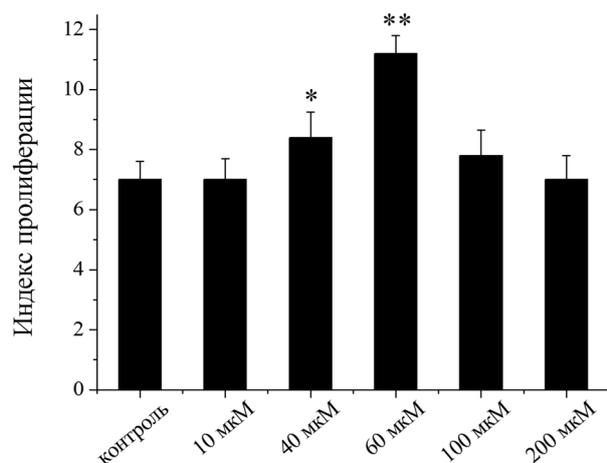


Рис. 1. Изменение пролиферативной активности клеток линии HEP-2 при культивировании с аскорбатом: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контролем

Fig. 1. Change of proliferative activity of HEP-2 cell cultivated with ascorbate: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ in comparison to control

в концентрации 60 мкМ приводило к стимулированию пролиферативной активности клеток. При введении в культуру NAC в концентрации 60 мкМ скорость роста опухолевых клеток в культуре не изменялась. Таким образом, увеличение пролиферативной активности клеток зависит от типа антиоксиданта и, вероятно, является составляющей адапционного ответа клетки на изменение концентрации специфических антиоксидантов во внеклеточной среде.

Известно, что опухолевые клетки, характеризующиеся более высокой скоростью пролиферации, обладают также повышенной устойчивостью к действию противоопухолевых агентов в сравнении с клетками, растущими медленнее. Нами показано, что изменение функционального состояния опухолевых клеток, приводящее к увеличению их пролиферативной активности, сопровождается также

усилением резистентности к противоопухолевым агентам. В культуре клеток, модифицированных аскорбатом, количество выживших клеток при действии доксорубицина было в 1,5 раз выше, чем в культуре не модифицированных клеток (рис. 2). При изменении функционального состояния опухолевых клеток в результате действия фенольного антиоксиданта БЭК-11-К также увеличивалась их резистентность к доксорубину. Наблюдаемое сходство функциональных изменений при культивировании клеток с аскорбатом и БЭК-11-К позволяет предположить участие одной и той же сигнальной системы в реализации клеточного отклика на действие антиоксидантов. В свою очередь, культивирование клеток с антиоксидантом НАС в низких (60 мкМ) и высоких (1 мМ) концентрациях не влияло на их резистентность к доксорубину.

Следует также отметить, что модифицированные аскорбатом клетки проявляют резистентность и к другим агентам, индуцирующим их гибель. Ранее нами было показано, что при действии тимохинона – биологически активного компонента *Nigella sativa*, в результате локального повышения продукции АФК в клетках линии Нер-2 индуцируется митохондриально-опосредованный апоптоз [13]. Токсическое действие тимохинона на клетки, до пересева культивировавшиеся в присутствии 60 мкМ аскорбата, было менее выраженным, чем на клетки в контроле (рис. 2). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что при действии аскорбата в концентрации 60 мкМ происходит активация адаптационного ответа клеток, в результате которого наблюдается увеличение пролиферативной активности и химиорезистентности опухолевых клеток. В биологических системах специфические рецепторы для аскорбата не обнаружены, что предполагает его участие в механизмах регуляции функций клеток в качестве метаболического регулятора, эффект действия которого проявляется только после внутриклеточных метаболических преобразований агента.

Одним из ключевых механизмов повышения резистентности клеток к стрессовым и повреждающим факторам является активация фактора транскрипции Nrf2 (Nuclear E2-related factor 2), регулирующего экспрессию генов, в промоторных областях которых содержится последовательность ARE (Antioxidant Respons(ive) Element). Транскрипционная активность Nrf2 регулируется редокс-зависимым ингибитором Keap1 (Kelch-like ECH-associating protein 1), модификация SH-групп которого за счет их окисления или электрофильного присоединения приводит к нарушению убиквитинирования и стабилизации Nrf2, его транспорту в клеточное ядро и связыванию с ARE [14].

При изучении ARE-индуцирующей способности фенольных антиоксидантов установлена зависимость их действия от расположения окисляющихся групп в молекуле фенола, позволяющая предположить, что активация ARE происходит в результате двухэлектронного окисления-восстановления, в котором могут участвовать фенолы со взаимным *орто*- и *пара*-, но не *мета*-расположением гидроксильных групп [15]. Дегидроаскорбат, окисленная форма аскорбиновой кислоты, также может участвовать в двухэлектронных окислительно-восстановительных трансформациях. В отличие от ряда оксифенилкарбоновых кислот, не проявляющих ARE-индуцирующей активности, аскорбиновая кислота стимулирует экспрессию ARE-контролируемых генов [16]. Образование дегидроаскорбата из аскорбата в биологических системах происходит с участием

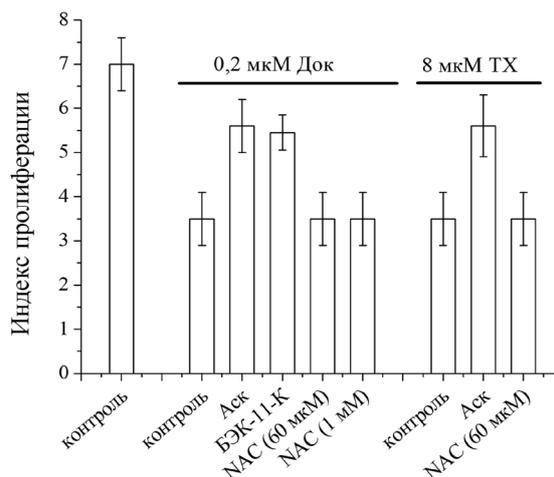


Рис. 2. Изменение числа клеток линии Нер-2 при культивировании с доксорубицином (Док) и тимохиноном (ТХ). Аск – клетки до пересева культивировали с аскорбатом (60 мкМ), БЭК-11-К – клетки до пересева культивировали с БЭК-11-К (60 мкМ), НАС (60 мкМ) – клетки до пересева культивировали с НАС в концентрации 60 мкМ, НАС (1 мМ) – клетки до пересева культивировали с НАС в концентрации 1 мМ

Fig. 2. Changes in the number of HEP-2 cells cultivated with doxorubicin (Док) and thymoquinone (ТХ). Аск – cells before reseeding cultivated with ascorbate (60 μM), БЭК-11-К – cells before reseeding cultivated with БЭК-11-К (60 μM), НАС (60 μM) – cells before reseeding cultivated with НАС (60 μM), НАС (1 mM) – cells before reseeding cultivated with НАС (1 mM)

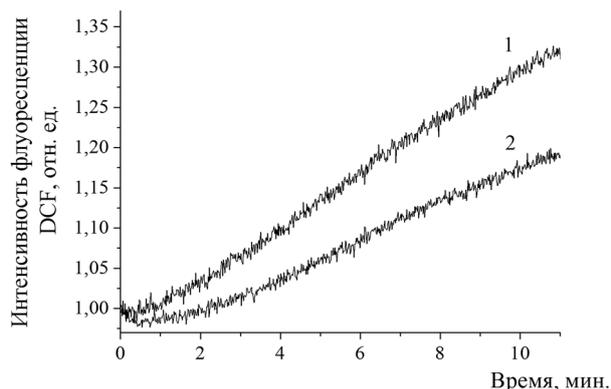


Рис. 3. Влияние апоцинина на продукцию АФК клетками линии HEp-2: 1 – изменение интенсивности флуоресценции DCF в клетках (контроль), 2 – изменение интенсивности флуоресценции DCF в клетках после обработки клеток апоцинином

Fig. 3. Effect of apocynin on ROS production by HEp 2 cells: 1 – changes in the DCF fluorescence intensity in cells (control), 2 – changes in the DCF fluorescence intensity in cells under the influence of apocynin

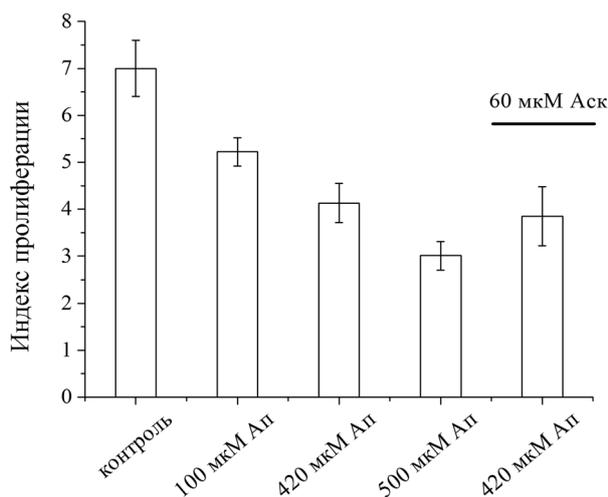


Рис. 4. Изменение пролиферативной активности клеток линии HEp-2 при культивировании с апоцинином (Ап)

Fig. 4. Change of proliferative activity of HEp-2 cell cultivated with apocynin (Ап)

приводит к снижению его уровня в крови до 10 мкМ. Обнаруженные в работе новые регуляторные эффекты аскорбата проявляются при его физиологических концентрациях, что может свидетельствовать о возможной роли запускаемого механизма в регуляции свойств клеток *in vivo*.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при действии аскорбата в физиологических концентрациях происходит активация специфических сигнальных механизмов, индуцирующих повышение пролиферативной активности и усиление резистентности опухолевых клеток к противоопухолевым агентам. Индуцируемое при действии аскорбата усиление химиорезистентности наблюдается для разных противоопухолевых агентов, что позволяет предполагать формирование множественной лекарственной устойчивости у опухолевых клеток. Необходимым этапом для активации адапционного ответа клеток, индуцированного аскорбатом, является продукция АФК с участием НАДФН-оксидазы. Таким образом, в отношении опухолевых клеток аскорбат проявляет как токсическое действие, так и способность индуцировать усиление химиорезистентности. Данный эффект необходимо учитывать при разработке противо-

АФК, продуцируемых внутриклеточными оксидоредуктазами. В рамках данного механизма ингибирование ключевых оксидоредуктаз приведет к ослаблению наблюдаемого эффекта.

В продукции внутриклеточных АФК в опухолевых тканях участвуют различные ферменты, включая НАДФН-оксидазу и оксидоредуктазы митохондрий. Вероятно, в регуляции роста клеток участвуют АФК, продуцируемые НАДФН-оксидазой, как это показано для ряда клеток, включая эндотелиальные [17]. Для оценки вклада НАДФН-оксидазы нами использовался специфический ингибитор фермента – апоцинин. Предварительная инкубация клеток с апоцинином приводила к снижению выхода АФК по сравнению с контролем (рис. 3), что свидетельствует об участии НАДФН-оксидазы в механизмах продукции АФК опухолевыми клетками.

Также обнаружено, что ингибирование сборки НАДФН-оксидазы при действии апоцинина в клетках карциномы гортани человека линии HEp-2 вызывало снижение их пролиферативной активности в культуре (рис. 4). В свою очередь, добавление аскорбата в концентрации 60 мкМ в культуру клеток, предварительно обработанных апоцинином, не приводило к увеличению их пролиферативной активности. Таким образом, НАДФН-оксидаза является ключевым ферментом, регулирующим формирование адапционного ответа опухолевых клеток при действии аскорбата.

Величина концентрации аскорбата в плазме крови является гомеостатическим параметром и поддерживается в диапазоне 40–80 мкМ [1]. При употреблении высоких доз аскорбиновой кислоты *per os* содержание антиоксиданта в крови может достигать 200 мкМ [4]. С другой стороны, дефицит аскорбата в организме

опухолевых биомедицинских технологий, особенно тех, в которых для индуцирования гибели опухолевых клеток используется аскорбиновая кислота. С другой стороны, способность аскорбата в низких физиологических концентрациях усиливать пролиферативную активность может использоваться для ускоренного производства биоматериала в клеточных технологиях и клеточной инженерии.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № M16P-022) и РФФИ (грант № 16-54-00050).

Acknowledgements. The work is sponsored by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. M16P-022) and by the Russian Foundation for Basic Research (grant no. 16-54-00050).

Список использованных источников

1. Du, J. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer / J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1826, N 2. – P. 443–457. doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003
2. Cameron, E. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer / E. Cameron, L. Pauling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1976. – Vol. 73, N 10. – P. 3685–3689. doi.org/10.1073/pnas.73.10.3685
3. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy A randomized double-blind comparison / C. G. Moertel [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 1985. – Vol. 312, N 3. – P. 137–141. doi.org/10.1056/nejm198501173120301
4. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use / S. J. Padayatty [et al.] // *Ann. Intern. Med.* – 2004. – Vol. 140, N 7. – P. 533–537. doi.org/10.7326/0003-4819-140-7-200404060-00010
5. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice / Q. Chen [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – Vol. 105, N 32. – P. 11105–11109. doi.org/10.1073/pnas.0804226105
6. Pharmacological ascorbic acid suppresses syngeneic tumor growth and metastases in hormone-refractory prostate cancer / H. B. Pollard [et al.] // *In Vivo.* – 2010. – Vol. 24. – P. 249–255.
7. Suh, J. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide / J. Suh, B. Zhu, B. Frei // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 34, N 10. – P. 1306–1314. doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00147-3
8. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / С. Н. Черенкевич [и др.] // *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2013. – № 1. – С. 92–108.
9. Martinovich, G. G. Effects of ascorbic acid on calcium signaling in tumor cells / G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, S. N. Cherenkevich // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2009. – Vol. 147, N 4. – P. 469–472. doi.org/10.1007/s10517-009-0555-6
10. Redox regulation of calcium signaling in cancer cells by ascorbic acid involving the mitochondrial electron transport chain / G. G. Martinovich [et al.] // *Journal of Biophysics.* – 2012. – Vol. 2012. – Art. 921653. doi.org/10.1155/2012/921653
11. Martinovich, G. G. Redox regulation of cellular processes: a biophysical model and experiment / G. G. Martinovich, I. V. Martinovich, S. N. Cherenkevich // *Biophysics.* – 2011. – Vol. 56, N 3. – P. 444–451. doi.org/10.1134/s0006350911030171
12. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway / G. G. Martinovich [et al.] // *Biophysics.* – 2015. – Vol. 60, N 1. – P. 94–100. doi.org/10.1134/s0006350915010194
13. Thymoquinone, a biologically active component of *Nigella sativa*, induces mitochondrial production of reactive oxygen species and programmed death of tumor cells / G. G. Martinovich [et al.] // *Biophysics.* – 2016. – Vol. 61, N 6. – P. 963–970. doi.org/10.1134/s0006350916060154
14. Mazes of Nrf2 Regulation / N. K. Zenkov [et al.] // *Biochemistry (Mosc).* – 2017. – Vol. 82, N 5. – P. 556–564. doi.org/10.1134/s0006297917050030
15. Dinkova-Kostova, A. T. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1) / A. T. Dinkova-Kostova, J. W. Fahey, P. Talalay // *Meth. Enzymol.* – 2004. – Vol. 382. – P. 423–448. doi.org/10.1016/s0076-6879(04)82023-8
16. Ascorbic acid reduces HMGB1 secretion in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells and improves survival rate in septic mice by activation of Nrf2/HO-1 signals / S. R. Kim [et al.] // *Biochemical Pharmacology.* – 2015. – Vol. 95, N 4. – P. 279–289. doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.007
17. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration / M. Abid [et al.] // *FEBS Letters.* – 2000. – Vol. 486, N 3. – P. 252–256. doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02305-x

References

1. Du J., Cullen J. J., Buettner G. R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer*, 2012, vol. 1826, no. 2, pp. 443–457. doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003
2. Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1976, vol. 73, no. 10, pp. 3685–3689. doi.org/10.1073/pnas.73.10.3685
3. Moertel C. G., Fleming T. R., Creagan E. T., Rubin J., O’Connell M. J., Ames M. M. High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy – A randomized double-blind comparison. *New England Journal of Medicine*, 1985, vol. 312, no. 3, pp. 137–141. doi.org/10.1056/nejm198501173120301

4. Padayatty S. J., Sun H., Wang Y. H., Riordan H. D., Hewitt S. M., Katz A., Wesley R. A., Levine M. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Annals of Internal Medicine*, 2004, vol. 140, no. 7, pp. 533–537. doi.org/10.7326/0003-4819-140-7-200404060-00010
5. Chen Q., Espey M., Sun A., Pooput C., Kirk K., Krishna M., Khosh D., Drisko J., Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no. 32, pp. 11105–11109. doi.org/10.1073/pnas.0804226105
6. Pollard H. B., Levine M. A., Eidelman O., Pollard M. Pharmacological ascorbic acid suppresses syngeneic tumor growth and metastases in hormone-refractory prostate cancer. *In Vivo*, 2010, vol. 24, pp. 249–255.
7. Suh J., Zhu B., Frei B. Ascorbate does not act as a pro-oxidant towards lipids and proteins in human plasma exposed to redox-active transition metal ions and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 2003, vol. 34, no. 10, pp. 1306–1314. doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00147-3
8. Cherenkevich S. N., Martinovich G. G., Martinovich I. V., Gorudko I. V., Shamova E. V. Redox regulation of cellular activity: concepts and mechanisms. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2013, no. 1, pp. 92–108 (in Russian).
9. Martinovich G. G., Martinovich I. V., Cherenkevich S. N. Effects of ascorbic acid on calcium signaling in tumor cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2009, vol. 147, no. 4, pp. 469–472. doi.org/10.1007/s10517-009-0555-6
10. Martinovich G. G., Golubeva E. N., Martinovich I. V., Cherenkevich S. N. Redox regulation of calcium signaling in cancer cells by ascorbic acid involving the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biophysics*, 2012, vol. 2012, art. 921653. doi.org/10.1155/2012/921653
11. Martinovich G. G., Martinovich I. V., Cherenkevich S. N. Redox regulation of cellular processes: a biophysical model and experiment. *Biophysics*, 2011, vol. 56, no. 3, pp. 444–451. doi.org/10.1134/s0006350911030171
12. Martinovich G. G., Martinovich I. V., Zenkov N. K., Menshchikova E. B., Kandalintseva N. V., Cherenkevich S. N. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway. *Biophysics*, 2015, vol. 60, no. 1, pp. 94–100. doi.org/10.1134/s0006350915010194
13. Martinovich G. G., Martinovich I. V., Vcherashniaya A. V., Shadyro O. I., Cherenkevich S. N. Thymoquinone, a biologically active component of *Nigella sativa*, induces mitochondrial production of reactive oxygen species and programmed death of tumor cells. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 6, pp. 963–970. doi.org/10.1134/s0006350916060154
14. Zenkov N. K., Kozhin P. M., Chechushkov A. V., Martinovich G. G., Kandalintseva N. V., Menshchikova E. B. Mazes of Nrf2 Regulation. *Biochemistry (Moscow)*, 2017, vol. 82, no. 5, pp. 556–564. doi.org/10.1134/s0006297917050030
15. Dinkova-Kostova A. T., Fahey J. W., Talalay P. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinine oxidoreductase 1 (NQO1). *Methods in Enzymology*, 2004, vol. 382, pp. 423–448. doi.org/10.1016/s0076-6879(04)82023-8
16. Kim S. R., Ha Y. M., Kim Y. M., Park E. J., Kim J. W., Park S. W., Kim H. J., Chung H. T., Chang K. C. Ascorbic acid reduces HMGB1 secretion in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells and improves survival rate in septic mice by activation of Nrf2/HO-1 signals. *Biochemical Pharmacology*, 2015, vol. 95, no. 4, pp. 279–289. doi.org/10.1016/j.bcp.2015.04.007
17. Abid M., Kachra Z., Spokes K. C., Aird W. C. NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS Letters*, 2000, vol. 486, no. 3, pp. 252–256. doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02305-x

Информация об авторах

Мартинovich Григорий Григорьевич – д-р биол. наук, доцент, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: martinovichgg@bsu.by.

Мартинovich Ирина Викторовна – ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: parkun@bsu.by.

Вчерашняя Александра Васильевна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tuata_de_danann@mail.ru.

Зенков Николай Константинович – д-р биол. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины (ул. Академика Тимакова, 2, 630117, Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: lemen@centercem.ru.

Меньщикова Елена Брониславовна – д-р мед. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины (ул. Академика Тимакова, 2, 630117, Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: lemen@centercem.ru.

Черенкевич Сергей Николаевич – академик, д-р биол. наук, профессор. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: cherenkevich@bsu.by.

Information about the authors

Martinovich Grigory Grigorievich – D. Sc. (Biology), Assistant Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: martinovichgg@bsu.by.

Martinovich Irina Viktorovna – Senior researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: parkun@bsu.by.

Vcherashniaya Aleksandra Vasilievna – Junior researcher. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tuata_de_danann@mail.ru.

Zenkov Nikolai Konstantinovich – D. Sc. (Biology), Leading researcher. Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (2, Academician Timakov Str., 630117, Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: lemen@centercem.ru.

Menshchikova Elena Bronislavovna – D. Sc. (Medicine), Assistant Professor, Chief researcher. Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (2, Academician Timakov Str., 630117, Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: lemen@centercem.ru.

Cherenkevich Sergei Nikolaevich – Academician, D. Sc. (Biology), Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cherenkevich@bsu.by.

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 616.379-008.64:616-008.9:612.018:611.16.778

Поступило в редакцию 27.09.2017

Received 27.09.2017

**Е. И. Калиновская, Л. И. Арчакова, Т. Е. Кузнецова, Е. Л. Рыжковская,
Т. А. Митюкова, О. Е. Полулях, А. А. Басалай, Т. В. Балашевич**

Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА КОЖИ И ОРГАНОВ, СОПУТСТВУЮЩЕГО ГОРМОНАЛЬНО-БИОХИМИЧЕСКОГО ФОНА У КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА

(Представлено членом-корреспондентом И. В. Залуцким)

Аннотация. На фоне сахарного диабета в сосудах микроциркуляторного русла чаще всего наблюдается спазм артериол (утолщение слоя гладкомышечных клеток) и десквамация эндотелия, нейтрофильная периваскулярная инфильтрация. Микроангиопатии кожи и внутренних органов развиваются параллельно и сопоставимы по характеру морфологических изменений. При сахарном диабете происходит достоверное повышение уровня ренина, что свидетельствует о раннем включении механизмов развития почечной патологии и формирования артериальной гипертензии, и снижение остеокальцина, что сопряжено с выраженным (возможно, необратимым) нарушением метаболизма костной ткани и гибели остеобластов.

Ключевые слова: сахарный диабет, микроангиопатии, микроциркуляторное русло

Для цитирования: Изменения микроциркуляторного русла кожи и органов, сопутствующего гормонально-биохимического фона у крыс линии Вистар при моделировании сахарного диабета / Е. И. Калиновская [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 101–108.

**Elena I. Kalinovskaya, Lyudmila I. Archakova, Tatyana E. Kuznetsova, Elena L. Ryzhkovskaya,
Tatyana A. Mityukova, Olga E. Poluliakh, Anastasia A. Basalai, Tatyana V. Balashevich**

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

CHANGES OF THE MICROCIRCULATORY SKIN BED AND ORGANS ASSOCIATED WITH THE HORMONAL-BIOCHEMICAL BACKGROUND IN WISTAR RATS WHEN MODELING DIABETES MELLITUS

(Communicated by Corresponding Member Iosiph V. Zalutsky)

Abstract. Spasm of arterioles (thickening of the smooth muscle cell layer), endothelial desquamation and neutrophilic perivascular infiltration are often observed in the microvasculature on the background of diabetes mellitus. Microangiopathies of the skin and internal organs develop in parallel and are comparable in nature with morphological changes. The level of renin significantly increases in diabetes mellitus, which indicates an early involving of mechanisms of renal pathology and development of arterial hypertension. Osteocalcin reduces in diabetes mellitus, which is associated with severe (possibly irreversible) metabolic disorders of bone tissue and osteoblast death.

Keywords: diabetes mellitus, microangiopathy, microcirculatory bed

For citation: Kalinovskaya E. I., Archakova L. I., Kuznetsova T. E., Ryzhkovskaya E. L., Mityukova T. A., Poluliakh O. E., Basalai A. A., Balashevich T. V. Changes of the microcirculatory skin bed and organs associated with the hormonal-biochemical background in Wistar rats when modeling diabetes mellitus. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 101–108 (in Russian).

Введение. Сахарный диабет (СД) – это патологическое состояние, которое характеризуется хронически повышенным уровнем сахара в крови (гипергликемия), развивающееся в результате воздействия генетических и/или внешних факторов и связанное с нарушением функции β -клеток поджелудочной железы.

Тяжесть данного заболевания сопряжена в первую очередь с развитием осложнений со стороны сердечно-сосудистой, нервной систем, почек.

При развитии диабетических микроангиопатий первоочередное значение принадлежит эндотелию, поскольку в патогенезе формирования сосудистых осложнений основную роль играет

его состояние, дисбаланс между факторами, обеспечивающими тонус сосудов, местные процессы гомеостаза, пролиферация и миграция клеток в сосудистую стенку.

Ранние, и в ряде случаев, обратимые сосудисто-метаболические нарушения при сахарном диабете длительное время могут протекать бессимптомно, и нередко начинают формироваться задолго до клинической манифестации сахарного диабета [1; 2].

Сегодня продолжается поиск наиболее доступных объектов для изучения малых сосудов с целью использования последних как маркеров при развитии возможных сосудистых осложнений на системном уровне, в связи с чем нами и была предпринята попытка параллельной оценки микроангиопатий сосудов кожи, мышц и внутренних органов, а также сопутствующего гуморального и биохимического фона организма на экспериментальной модели сахарного диабета.

Цель работы – изучить в эксперименте морфологические, биохимические и гормональные аспекты формирования СД.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах линии Вистар ($n = 31$), которые были разделены на экспериментальную ($n = 21$) и контрольную ($n = 10$) группы. Экспериментальный СД моделировали однократным введением раствора стрептозотоцина (Sigma, США) в брюшную полость в дозе 50 мг/кг. Стрептозотозин растворяли непосредственно перед введением в цитратном буфере. Животных выводили из эксперимента в условиях наркоза (тиопентал натрия, 40 мг/кг) путем декапитации.

Биохимические исследования проводили на анализаторе BS-200 (Китай), электролитный состав крови оценивали по уровню содержания натрия, калия и хлора, используя электролитный анализатор EasyLite PLUS (США).

Уровень гормонов ренина и остеокальцина в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом на ИФ-анализаторе Chem Well (США) с использованием тест-системы «ELISA».

Для морфологического исследования извлекали поджелудочную железу, печень, почки и предварительно депилированный участок кожи поверхности бедра. Для светооптических исследований применяли окраску гематоксилином и эозином. Для оценки состояния терминальных сосудов в гистологических препаратах использовали способ полуколичественной оценки микроциркуляторных нарушений. Критериями микроциркуляторных нарушений являлись:

- 1 – наличие и частота выявления спазма или пареза сосудов;
- 2 – наличие и выраженность десквамации эндотелия сосуда;
- 3 – наличие и частота периваскулярных кровоизлияний;
- 4 – наличие и частота тромбоза микрососудов;
- 5 – наличие и частота периваскулярной воспалительной инфильтрации.

Критерии 2–5 отражают так называемые органические патологические изменения, критерий 1 – «функциональные» нарушения. Оценивали частоту встречаемости этих признаков.

Для электронно-микроскопического исследования образцы тканей заливали в аралдит по общепринятой схеме, изложенной в руководстве Н. Н. Боголепова. Срезы приготавливали на ультратоме ЛКВ-III, контрастировали цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100B.

Экспериментальные работы выполнены с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для лабораторных или иных целей.

Все полученные данные подвергали статистической обработке методом вариационной статистики с применением пакета программ Statistica 6.0. Достоверными считали различия между сравниваемыми группами при значениях $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Для подтверждения модели сахарного диабета проведены морфологические исследования ткани поджелудочной железы. В органе на 21-е сутки после введения стрептозотоцина отмечалось выраженное повреждение инсулярного аппарата островков Лангерганса в виде дегрануляции β -клеток, уменьшения количества островков и их коллапса за счет деструкции и прогрессирующей убыли β -эндокриноцитов, сопровождающиеся изменениями в микроциркуляторном русле органа. Так, в 53 % случаев отмечалась десквамация эндотелиальных клеток (рис. 1, а), умеренная нейтрофильная инфильтрация, выявляемая вблизи арте-

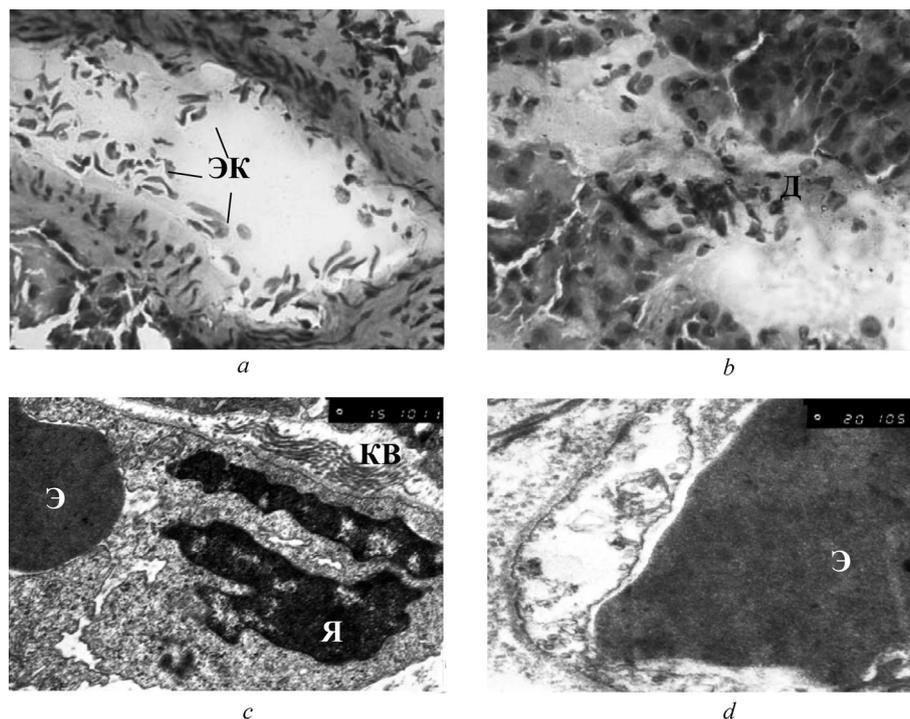


Рис. 1. Структурная организация сосудов микроциркуляторного русла поджелудочной железы контрольной (а) и опытной (b–d) крыс. Микрофото. Окраска гематоксилином и эозином (а, b). Электроннограммы (с, d). Условные обозначения: ЭК – эндотелиальные клетки, Д – диапедезное кровоизлияние, Э – эритроцит, Я – ядро эндотелиоцита, КВ – коллагеновые волокна. Увеличение: $\times 100$ (а, b), $\times 15\,000$ (с), $\times 20\,000$ (d)

Fig. 1. Structural organization of the vessels of the microcirculatory bed of the pancreas of the control (a) and experimental (b–d) rats. Microphoto. Staining with hematoxylin and eosin (a, b). Electronograms (c, d). Legend: ЭК – endothelial cells, Д – diapedesis hemorrhage, Э – erythrocyte, Я – nucleus of endotheliocyte, КВ – collagen fibers. Increase: $\times 100$ (a, b), $\times 15\,000$ (c), $\times 20\,000$ (d)

риол – в 86 %, диапедез эритроцитов и периваскулярные кровоизлияния регистрировались в 20 % сосудов (рис. 1, b). Описанные изменения указывали на развитие микроангиопатии.

Это подтверждалось данными электронно-микроскопического исследования. После введения стрептозотоцина неравномерность контуров эндотелия выражена на всех участках: на люминальной и на базальной поверхности плазмолеммы определялись микроворсинки, выросты и складки. Увеличение количества цитоплазматических выростов, впадающих в просвет капилляра, препятствовало кровотоку (рис. 1, c). Эндотелий резко истончен, на некоторых его участках определялась фрагментация эндотелиоцитов. Околоядерные зоны эндотелиоцитов выступали в просвет микрососудов, ядра изменяли свою форму, гетерохроматин конденсировался возле кариолеммы. Наблюдалось относительное увеличение количества вакуолей в цитоплазме эндотелиоцитов. В части эндотелиоцитов выявлялся отек, снижение в них количества органелл и пиноцитозных пузырьков (рис. 1, d). Отмечалась адгезия эритроцитов к мембране эндотелиоцита. Базальная мембрана разрыхлялась, без нарушения ее целостности. На отдельных участках наблюдалось отслоение эндотелиальных клеток от базальной мембраны. Выявлялся перикапиллярный отек, скопление коллагеновых фибрилл вблизи сосудов.

Учитывая результаты наших предыдущих исследований, для морфологического исследования внутренних органов были выбраны печень и почки.

В сосудах микроциркуляторного русла печени (рис. 2) наблюдались явления застоя крови различной степени выраженности, десквамация эндотелия в просвет сосуда (72 %), образование микротромбов в различных участках сосудистой сети (43 %), периваскулярные кровоизлияния (22 %) и полиморфноклеточная инфильтрация (83 %).

В результате электронно-микроскопического исследования печени крыс со стрептозотониновым сахарным диабетом выявлено полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, слад-

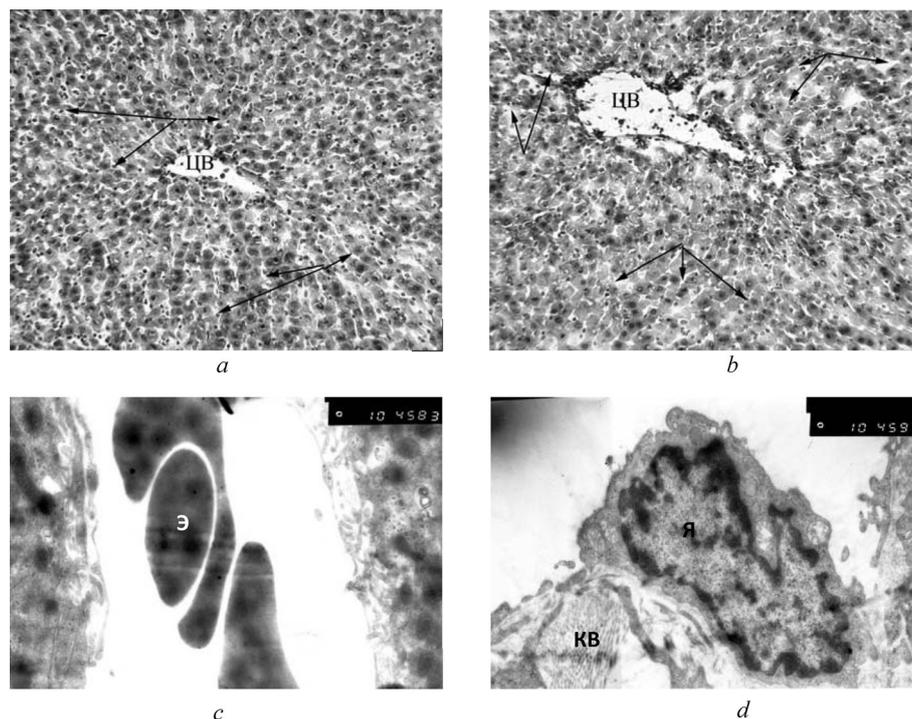


Рис. 2. Структурная организация сосудов микроциркуляторного русла печени контрольной (а) и опытной (b–d) крыс. Микрофото. Окраска гематоксилином и эозином (а, b). Электроннограммы (с, d). Условные обозначения: синусоидальные капилляры (черные стрелки), ЦВ – центральная вена, Э – эритроциты (сладж), Я – ядро, КВ – коллагеновые волокна. Увеличение: $\times 100$ (а, b), $\times 10\,000$ (с, d)

Fig. 2. Structural organization of the vessels of the microcirculatory bed of the liver of the control (a) and experimental (b–d) rats. Microphoto. Staining with hematoxylin and eosin (a, b). Electronograms (c, d). Legend: sinusoidal capillaries (black arrows), ЦВ – central vein, Э – erythrocytes (sladge), Я – nucleus, КВ – collagen fibers. Increase: $\times 100$ (a, b), $\times 10\,000$ (c, d)

жирование эритроцитов (рис. 2, c), набухание эндотелия, который часто выступал в просвет капилляра. Эндотелиоциты капилляров содержали темные ядра неправильной формы. Ядерный хроматин находился в конденсированном состоянии, который в виде плотного кольца располагался вблизи ядерной мембраны. В цитоплазме содержались единичные митохондрии, обладающие электронно-плотным матриксом.

В просвете синусоидов часто наблюдались форменные элементы крови – эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Отмечалось увеличение численности клеток Купфера и их миграция в перисинусоидальное пространство. В просвете синусоида и по ходу эндотелиальной выстилки выявлялись коллагеновые волокна в виде пучков различной плотности и длины (рис. 2, d).

Изменение состояния сосудов микроциркуляторного русла коркового слоя почки крыс на фоне системного введения стрептозотоцина прежде всего выражалось в уменьшении диаметра (за счет спазма) артериол и капилляров, утолщении слоя гладкомышечных клеток (94 %), десквамации эндотелия (80 %) (рис. 3). Отмечалась агглютинация эритроцитарными, лимфоцитарными или тромбоцитарными тромбами микрососудов коркового вещества (31 %) и выраженная периваскулярная инфильтрация (89 %).

В результате проведенного сравнительного электронно-микроскопического анализа почек крыс контрольной и опытной групп выявлены изменения ультраструктурной организации сосудов микроциркуляторного русла и клеток клубочкового аппарата почечного тельца. У крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом наблюдались участки неравномерного утолщения, набухания, разрыхления и гомогенизации гломерулярной базальной мембраны с повышением её проницаемости (рис. 3, c). Капиллярные петли в большинстве своем были полнокровны с явлениями стаза и сладжа. Утолщение гломерулярной базальной мембраны во многих случаях сочеталось с диффузным расширением мезангиального матрикса и с умеренной пролиферацией мезангиальных клеток. Следует отметить, что в почках контрольных крыс в отдельных клубочках

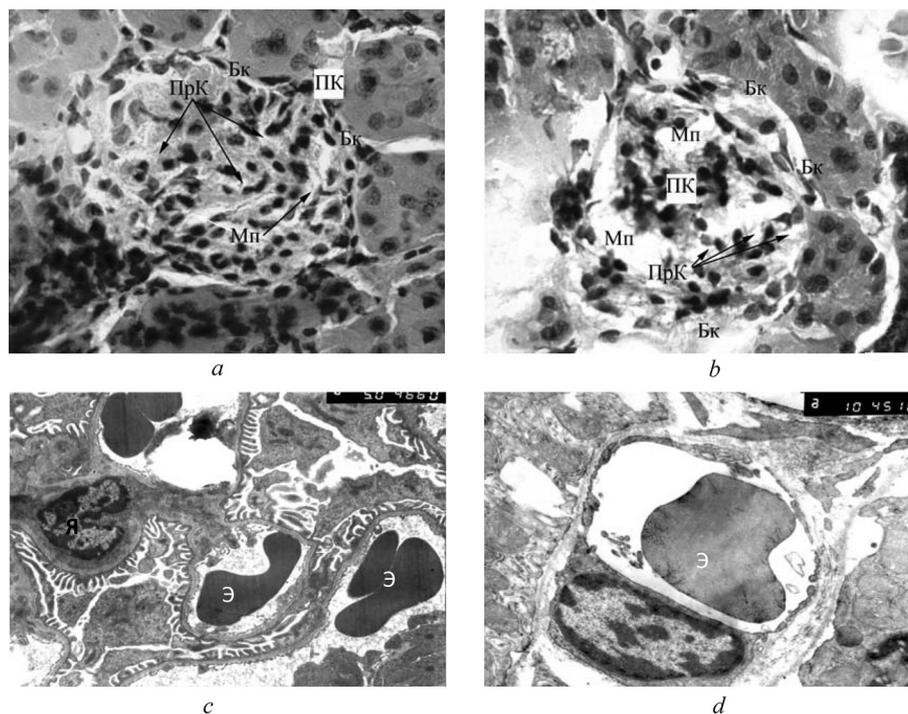


Рис. 3. Структурная организация сосудов микроциркуляторного русла (капилляры сосудистых клубочков) почек контрольной (*a*) и опытной (*b*) крыс. Окраска гематоксилином и эозином (*a, b*). Электроннограммы (*c, d*). Условные обозначения: ПК – почечный клубочек, Бк – Боуменова капсула, ПрК – просвет капилляра, Мп – мезангиальное пространство, Э – эритроцит, Я – ядро эндотелиоцита. Увеличение: $\times 100$ (*a, b*), $\times 5\,000$ (*c*), $\times 10\,000$ (*d*)

Fig. 3. Structural organization of the vessels of the microcirculatory bed (capillaries of the vascular glomeruli) of the kidneys of the control (*a*) and experimental (*b*) rats. Staining with hematoxylin and eosin (*a, b*). Electronograms (*c, d*). Legend: ПК – renal glomerulus, Бк – Bowman capsule, ПрК – capillary lumen, Мп – mesangial space, Э – erythrocyte, Я – nucleus of endotheliocyte. Increase: $\times 100$ (*a, b*), $\times 5\,000$ (*c*), $\times 10\,000$ (*d*)

также отмечалось незначительное утолщение гломерулярной базальной мембраны, однако, ее структура была сохранена.

Характерными ультраструктурными изменениями эндотелиоцитов сосудов микроциркуляторного русла коркового слоя почки являлись нарушения со стороны ядерного аппарата и митохондрий (рис. 3, *d*). В ядрах эндотелиоцитов глыбки хроматина скапливались преимущественно около внутреннего листка ядерной оболочки. Митохондрии часто имели плотный, лизированный матрикс и нечеткие, размытые кристы. В большинстве капилляров отмечалось набухание, фрагментация и отшнуровка цитоплазмы, в ней содержалось незначительное количество микропиноцитозных везикул (рис. 3, *c*).

В подоцитах наблюдалось уменьшение количества митохондрий, прикрепленных и свободных рибосом, утолщение и частичное слияние малых отростков (рис. 3, *c*). В цитоплазме эпителиоцитов извитых канальцев определялось большое количество вакуолей, набухание митохондрий, расширение цистерн гранулярного и гладкого эндоплазматического ретикулама и комплекса Гольджи.

В коже крыс на 21-е сутки после введения стрептозотоцина произошли нарушения микроциркуляторного русла преимущественно функционального характера. Большая часть артериол (85 %) была в состоянии умеренного спазма. Десквамация эндотелия – в 67 % случаев, начальные признаки тромбообразования обнаруживались в 24 %. Периваскулярные кровоизлияния присутствовали в 15 % случаев (рис. 4).

Результаты биохимических показателей крови крыс с сахарным диабетом показали увеличение уровня триглицеридов (на 51 %) и снижение холестерина (на 20 %) относительно контрольной группы животных. Это подтверждает наличие у животных нарушений жирового обмена в результате индукции сахарного диабета стрептозотоцином, который вызывает необратимое

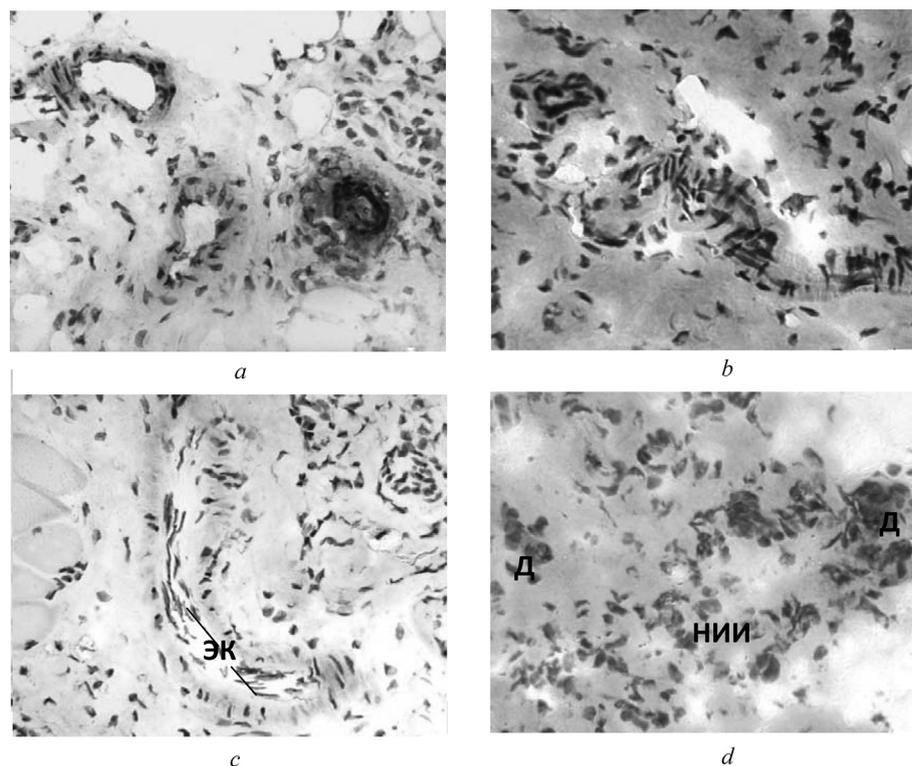


Рис. 4. Изменения в микроциркуляторном русле кожи крысы на 21-е сутки после введения стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг: спазм артериолы с периваскулярным отеком (b), десквамация эндотелия в просвет сосуда (c), диapedезные кровоизлияния (d). a – контроль; b–c – введение стрептозотоцина. ЭК – эндотелиальные клетки, Д – диapedез эритроцитов, НИ – нейтрофильная инфильтрация. Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение: $\times 250$

Fig. 4. Changes in the microcirculatory bed of the rat skin on the 21st day after the administration of streptozotocin at a dose of 50 mg/kg: spasm of the arteriolus with perivascular edema (b), desquamation of the endothelium into the lumen of the vessel (c), diapedemic hemorrhages (d). a – control; b–d – injection of streptozotocin. ЭК – endothelial cells, Д – diapedesis of erythrocytes, НИ – neutrophil infiltration. Color: hematoxylin-eosin. Magnification: $\times 250$

повреждение β -клеток островков Лангенганса. Липопротеиды высокой и низкой плотности также были достоверно снижены в опытной группе крыс. При этом их соотношение (ЛПВП к ЛПНП) изменялось от 2,1 в контрольной группе до 2,4 в опытной группе.

Анализ также выявил 4-кратное увеличение глюкозы в крови опытной группы крыс относительно контрольной. Данное явление, по-видимому, вызвано прогрессирующим разрушением β -клеток поджелудочной железы стрептозотоцином, которое привело к дефициту синтеза проинсулина и, как следствие, к гипергликемии.

Анализ ионов крови показал достоверное снижение уровня хлора и фосфора в опытной группе крыс по отношению к контрольной группе, которой вводился цитратный буфер. Гипофосфат- и гипохлоремия могут быть обусловлены диабетической нефропатией и диабетическим кетоацидозом в результате усиления метаболизма углеводов и расстройства кислотно-щелочного баланса в организме.

Из гормонов для анализа были выбраны ренин – как гормон, от уровня которого зависит развитие реноваскулярной артериальной гипертензии и остеокальцин – как маркер состояния костной ткани, формирование которой при сахарном диабете нарушается.

При системном введении стрептозотоцина произошло достоверное повышение уровня ренина – скорее всего, за счет снижения объема циркулирующей крови, так как клетки юкстагломерулярного аппарата, где синтезируется проренин, контролируют приток крови к нефрону и оценивают объем приходящей жидкости. На таком раннем этапе развития патологии (через 21 день после системного введения стрептозотоцина) четкая тенденция к повышению уровня ренина свидетельствует о раннем включении механизмов развития почечной патологии и формирования артериальной гипертензии.

Достоверное снижение остеокальцина, который продуцируется остеобластами, в данном случае может свидетельствовать о выраженном (возможно, необратимом) нарушении метаболизма костной ткани и гибели остеобластов.

Данные изменений представлены в таблице.

Значения показателей ренина и остеокальцина сыворотки крови крыс при системном введении стрептозотоцина

Values of renin and osteocalcin indices of blood serum of rats with systemic administration of streptozotocin

| Показатель Index | Контроль (n = 10) Control (n = 10) | Сахарный диабет (n = 21) Diabetes (n = 21) |
|---------------------|---------------------------------------|---|
| Ренин, mU/ml | 2,60 ± 0,51 | 7,22 ± 2,20 |
| Остеокальцин, pg/ml | 1,65 ± 0,15 | 0,83 ± 0,23* |

Примечания: среднее ± ошибка среднего, * – достоверность U-критерий Манна–Уитни ($p \leq 0,05$).

Note: mean ± error of the mean, * – reliability of the U-Mann–Whitney test ($p \leq 0.05$).

Заключение. Морфологические данные, иллюстрирующие особенности развития микроангиопатий в сосудах кожи, внутренних органов на фоне системного введения стрептозотоцина, свидетельствуют о следующих механизмах развития ангиопатий: спазм, десквамация эндотелия, образование микротромбов и диапедез.

На фоне системного введения стрептозотоцина происходит выраженное нарушение (возможно, необратимое) метаболизма костной ткани и гибель остеобластов, раннее включение механизмов развития почечной патологии и формирования артериальной гипертензии.

Список использованных источников

1. Кубарко, А. И. Контрастно-цветовая чувствительность зрения как биомаркер состояния гемодинамики в сосудах системного и микроциркуляторного русла / А. И. Кубарко, Н. П. Кубарко, Ю. А. Кубарко // *Здравоохранение*. – 2014. – № 9. – С. 57–66.
2. Detecting hypertensive retinopathy using retinal vascular geometry / A. Triantafyllou [et al.] // *J. Hypertens.* – 2015. – Vol. 33. doi.org/10.1097/01.hjh.0000467625.92095.c6
3. Shaw, J. E. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030 / J. E. Shaw, R. A. Sicree, P. Z. Zimmet // *Res. Clin. Pract.* – 2010. – Vol. 87, N 1. – P. 4–14. doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007
4. Морфологические особенности поражения микроциркуляторного русла и характер изменения уровня гормона жировой ткани висфатина у крыс на модели алиментарного ожирения / Е. И. Калиновская [и др.] // *Журн. Гродненского гос. мед. ун-та*. – 2015. – № 4. – С. 48–53.
5. Мохорт, Т. В. Хронические осложнения сахарного диабета: фокус на пентоксифиллин / Т. В. Мохорт // *Мед. новости*. – 2015. – № 4. – С. 4–9.
6. Дервянко, И. А. Структурно-функциональные особенности миокарда крыс с длительным декомпенсированным сахарным диабетом / И. А. Дервянко, С. А. Новаковская // *Новости медико-биол. наук*. – 2017. – Т. 15, № 2. – С. 19–23.
7. Адипокиновый и цитокиновый профили эпикардиальной и подкожной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца / О. В. Груздева [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2017. – Т. 163, № 5. – С. 560–563.
8. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus / A. Kibel [et al.] // *Journal of International Medical Research*. – 2017. – Vol. 45, N 6. – P. 1901–1929. doi.org/10.1177/0300060516675504

References

1. Kubarko A. I., Kubarko N. P., Kubarko J. A. Contrast-color sensitivity as biomarker of hemodynamic condition in systemic circulation and in small vessels. *Zdravoohranenie = Healthcare*, 2014, no. 9, pp. 57–66 (in Russian).
2. Triantafyllou A., Al-Diri B., Anyfanti P., Hunter A., Douma S. Detecting hypertensive retinopathy using retinal vascular geometry. *Journal of Hypertension*, 2015, vol. 33. doi.org/10.1097/01.hjh.0000467625.92095.c6
3. Shaw J. E., Sicree R. A., Zimmet P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2010, vol. 87, no. 1, pp. 4–14. doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007
4. Kalinouskaya E. I., Kuznetsova I. V., Hapaluk A. V., Kondrashova S. B., Pavlovets L. V., Blagun E. V., Lesko E. S., Derevyanko I. A. Morphological features of the damage of microvasculature and changes in the levels of adipose tissue hormone visfatin in rat model of alimentary obesity. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of the Grodno State Medical University*, 2015, no. 4, pp. 48–53 (in Russian).

5. Mokhort T. V. Chronic complications of diabetes mellitus: focus on pentoxifylline. *Meditinskije novosti = Medical News*, 2015, no. 4, pp. 4–9 (in Russian).

6. Dervyanko I. A., Novakovskaya S. A. Structural and functional features of the myocardium of rats with long decompensated diabetes mellitus. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of biomedical sciences*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 19–23 (in Russian).

7. Gruzdeva O. V., Dyleva Y. A., Antonova L. V., Matveeva V. G., Uchasova E. G., Fanaskova E. V., Karetnikova V. N., Ivanov S. V., Barbarash O. L., Akbasheva O. E. Adipokine and cytokine profiles of epicardial and subcutaneous adipose tissue in patients with coronary heart disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, vol. 163, no. 5, pp. 608–611. doi.org/10.1007/s10517-017-3860-5

8. Kibel A., Selthofer-Relatic K., Drenjancevic I., Bacun T., Bosnjak I., Kibel D., Gros M. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus. *Journal of International Medical Research*, 2017, vol. 45, no. 6, pp. 1901–1929. doi.org/10.1177/0300060516675504

Информация об авторах

Калиновская Елена Игоревна – канд. мед. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zolotuhinaelena@mail.ru.

Арчакова Людмила Ивановна – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник, профессор. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Кузнецова Татьяна Евгеньевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Рыжковская Елена Леонидовна – ст. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Митюкова Татьяна Алексеевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь).

Полулях Ольга Евгеньевна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: reanzy@yandex.ru.

Басалай Анастасия Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: anastasiya.basalay@gmail.com.

Балашевич Татьяна Викторовна – науч. сотрудник. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tbalashevich@bk.ru.

Information about the authors

Kalinovskaya Elena Igorevna – Ph. D. (Medicine), Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zolotuhinaelena@mail.ru.

Archachova Lyudmila Ivanovna – D. Sc. (Biology), Chief Researcher, Professor. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Kuznetsova Tatyana Evgenievna – Ph. D. (Biology). Head of the Laboratory. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Ryzhkovskaya Elena Leonidovna – Senior Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Mityukova Tatyana Alekseevna – Ph. D. (Biology), Leading researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus).

Poluliakh Olga Evgenievna – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: reanzy@yandex.ru.

Basalai 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.

Balashovich Tatyana Viktorovna – Researcher. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tbalashevich@bk.ru.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ
TECHNICAL SCIENCES

UDC 536.24

Received 13.09.2017
Поступило в редакцию 13.09.2017

**Tatiana A. Baranova¹, Valery L. Zhdanov¹, Dmitrii A. Ivanov¹,
Yaroslav I. Smulskii², Viktor I. Terekhov²**

¹*Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

²*Kutateladze S. S. Institute of Thermophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation*

NUMERICAL ANALYSIS OF A REATTACHED FLOW BEHIND A RIB

(Communicated by Academician Oleg G. Penyazkov)

Abstract. Turbulent characteristics of a reattached flow separated from a rib in an air flat channel were numerically analyzed by RANS and LES methods. The both methods showed low pressure regions in corners formed by the rib and the channel walls that caused a vorticity tube to be formed along the rib. Nevertheless in RANS, a reattached flow was identified as two-dimensional with a velocity decreasing near the channel bottom wall. In LES, the low pressure regions caused transverse and normal motions in the separation region that resulted in redistributions between velocity components, Reynolds stresses and the velocity decrease near the channel bottom wall, i.e., the formation of three-dimensional reattached flow.

Keywords: reattached turbulent flow, rib, LES, RANS, flat channel

For citation: Baranova T. A., Zhdanov V. L., Ivanov D. A., Smulskij Ya. I., Terekhov V. I. Numerical analysis of a reattached flow behind a rib. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 109–114.

Т. А. Баранова¹, В. Л. Жданов¹, Д. А. Иванов¹, Я. И. Смутьский², В. И. Терехов²

¹*Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Институт теплофизики им. С. С. Кутателадзе Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Российская Федерация*

ЧИСЛЕННЫЙ АНАЛИЗ ПРИСОЕДИНЕННОГО ТЕЧЕНИЯ ЗА РЕБРОМ

(Представлено академиком О. Г. Пенязковым)

Аннотация. Турбулентные характеристики присоединенного течения срывающегося с ребра в плоском воздушном канале численно анализируются методами RANS (осредненные уравнения Рейнольдса) и LES (метод крупных вихрей). Оба метода показали формирование симметричных зон низкого давления в углах, образованных ребром со стенками канала. Эти зоны вызывали генерацию вихревой трубки вдоль длины ребра. Тем не менее, присоединенное течение было идентифицировано в RANS как двумерное с уменьшением скорости у нижней стенки канала. Метод крупных вихрей показал возникновение в отрывной зоне течений в поперечном и нормальном направлениях. Они приводили к изменению соотношений между компонентами скорости и напряжений Рейнольдса, а также к снижению скорости присоединенного течения у нижней стенки канала, т. е. к формированию трехмерного течения.

Ключевые слова: возвратный турбулентный поток, ребро, LES, RANS, плоский канал

Для цитирования: Численный анализ присоединенного течения за ребром / Т. А. Баранова [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 109–114.

Introduction. Separated flows are common in several engineering applications such as aircraft wings, turbine and compressor blades, diffusers, buildings, suddenly expanding pipes, combustors, etc. These flows drastically changed transport of momentum, heat and mass. Due to the fact, interest

in separation control draws attention of researchers over decades. A flow, separated from a rib due to a favorable pressure gradient, reattached the wall at some distance downstream, forming a separation region. In earlier studies, the reattachment length of a separated flow was usually a primary parameter of interest because in many cases it is desirable to make it as short as possible. With advances in measuring techniques and discovery of the coherent structures influence on progress of the separation region, main interest has been shifted to study structure variations caused by different sources of separation [1–6]. To date, researchers are also concentrating on reattached parameters of separated flows because they influence flow progress downstream.

Originally, a main source of information on transport processes in separated flows was experiment, but with progress in computer facilities, numerical simulations became a powerful tool of research. Nowadays, numerical methods allow getting characteristics of a three-dimensional flow with high spatial resolution and, at the same time, visualizing a flow in different directions. Two methods – RANS (Reynolds-averaged Navier-Stokes) and LES (Large Eddy Simulation) – are mostly used in investigations. Historically, RANS is the first method extensively applied to study flow characteristics, including separated flows. The method is mostly suitable for studying steady flows, but separated flows are unsteady. RANS showing a good correlation of integral parameters (velocity, reattachment length) with experiment, shades structure features of flow. Developed very intensively over last decades LES permits highlighting unsteady flow nature, but at the expense of computer resources and computation time.

The present study aims to show distinctions of the same reattached flow behind a rib, applying RANS and LES.

RANS and LES simulations of two-dimensional laminar flows separated from a backward-facing step were compared using OpenFoam [7]. For a lower Reynolds number ($Re = 389$), the RANS and LES results were in a good correlation with experiment. For a higher Reynolds number ($Re = 1000$), the RANS simulations were poor but the LES simulations showed a good agreement with experiment.

Subject of investigation. Investigations were carried out in an air flat channel, whose sizes of a cross section (0.021×0.150 m ($H \times B$)) were identical to the ones of the experimental setup described elsewhere [1]. A rib of a height (Δ) equal to 0.003 m with its thickness of 0.005 m was located across the channel width, ahead of a back-facing step.

Simulation methods. A three-dimensional velocity field was computed by RANS using ANSYS Fluent 18 and two models: $k-\Omega$ SST and $k-\varepsilon$ with standard wall functions. LES computations were done by OpenFOAM (Open Field Operation and Manipulation) using two eddy viscosity models: Smagorinsky [8] and one-equation (oneEqEddy) [9]. The velocity and pressure fields were linked by a PIMPLE (merged PISO-SIMPLE) algorithm.

In numerical computations, the developed velocity profile (power law of 1/7) was assigned at the channel entrance. The Reynolds number based on the channel height and bulk velocity ($U_0 = 25$ m/s) was $Re_H = 36167$. A turbulence intensity of 5 % was set for each velocity components.

The computational domains included the channel part before the rib as well as the length of the recirculation zone behind the backward-facing step. In RANS, the domain was one meter in length with a computational grid of 12000000 cells. In LES, the domain was shorter – 0.5 m and the grid had 2209500 cells.

Results. The experiment [10] showed that low pressure regions were generated in corners formed by the rib and the channel sidewalls. The same regions were identified by both numerical methods (fig. 1).

Fluid was sucked into these regions, which were the sources of a vorticity tube formed along the rib, involved into the tube and issued in the middle part of the channel.

Mean and turbulent characteristics were calculated at the boundary of reattached flow for two heights 0.2Δ , 0.5Δ and in two cases: a) without rib; b) with rib.

RANS investigations. A longitudinal velocity profiles (U_x) along the channel height and width were normalized by a maximum velocity (U_{max}) in the channel center. The nume-

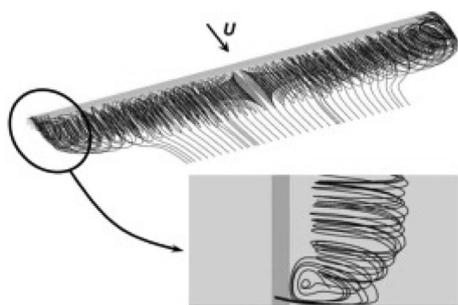


Fig. 1. Vorticity tube behind a rib

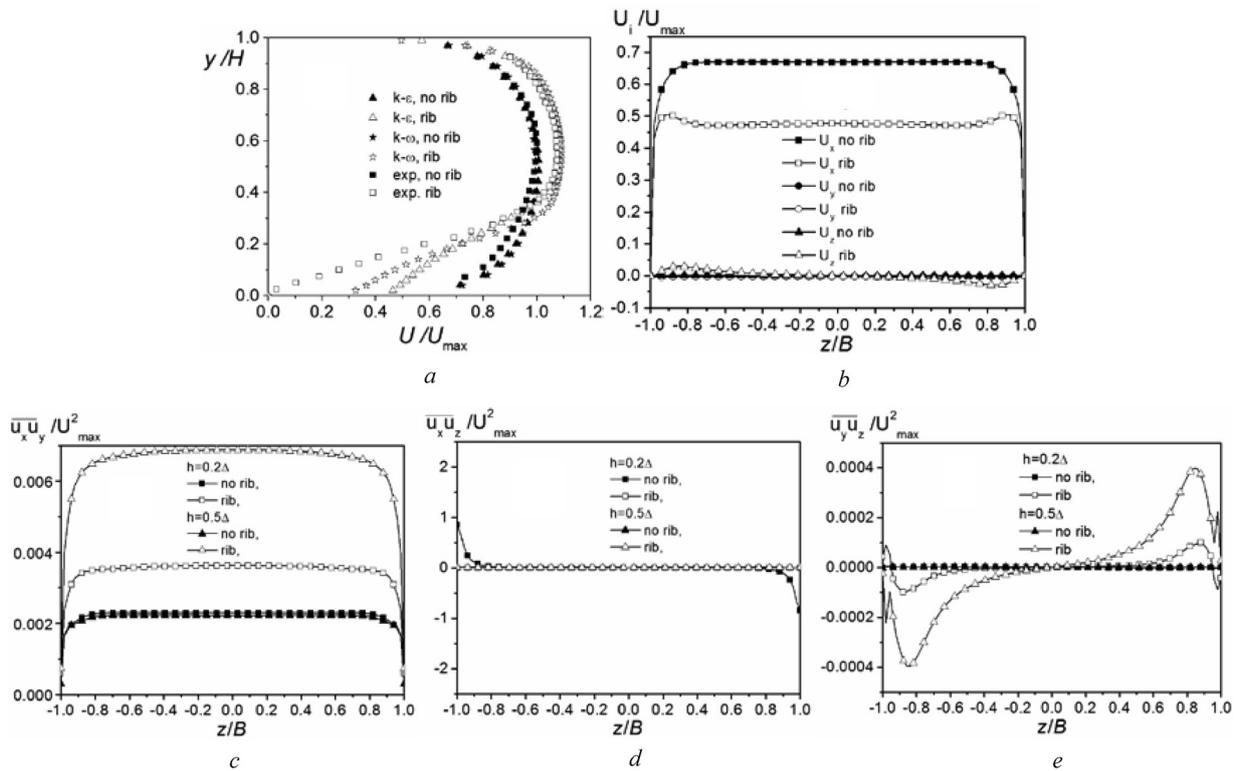


Fig. 2. Velocity and Reynolds stress distributions across the channel: a – along the height; b, c, d, e – along the width

rical profiles differed from the experimental one due to the asymmetry of the latter only near the lower wall (fig. 2, a).

Because of the rib, the velocity decreased near the channel bottom (stronger in experiment) and increased in the channel upper part. The velocity variation across the channel height did not influence a two-dimensional character of the flow identified by the both models. Distributions of flow turbulent characteristics across the channel were presented only for the $k-\epsilon$ model.

Small deviations from uniformity were observed for longitudinal and transverse velocity components only near the sidewalls at a height of 0.5Δ as their response to the low pressure regions (fig. 2, b).

Reynolds stresses sensitive to structure transformations also showed rather uniform distributions $\overline{u_x'u_y'}$ across the channel width at different heights (fig. 2, c). The stress $\overline{u_x'u_z'}$ was almost zero along the channel width and the stress $\overline{u_y'u_z'}$ deviated from zero to the sidewalls and the stronger the larger is the parameter h (fig. 2, d, e). But these deviations were more than by an order of magnitude smaller in comparison with the stress $\overline{u_x'u_y'}$.

Thus, the flow parameters changes at the boundary of the reattached flow due to the rib was shown mostly only in the decreased velocity at the channel bottom wall as measured in experiment [1] and the reattached flow remained two-dimensional.

LES investigations. In the channel without rib, the longitudinal velocity profiles computed by the Smagorinsky and oneEqEddy models at the reattachment of the separated flow were more flat in the channel central part and lower at the walls in comparison to the experimental and RANS ones (fig. 3, a). Apparently, in LES, it was a result of a shorter computational domain. The velocity normalization was the same as in RANS.

The Smagorinsky model showed a stronger velocity decrease near the wall due to the rib and demonstrated a better qualitative agreement with experiment. It seems the distinctions in velocity profiles were caused by a different reattached length of the separation regions behind the rib. When the Smagorinsky model was used the region ended at 10Δ ahead of the step edge while this region calculated by the One Equation model ended at 4Δ ahead of the step edge. The length of the last region was nearly

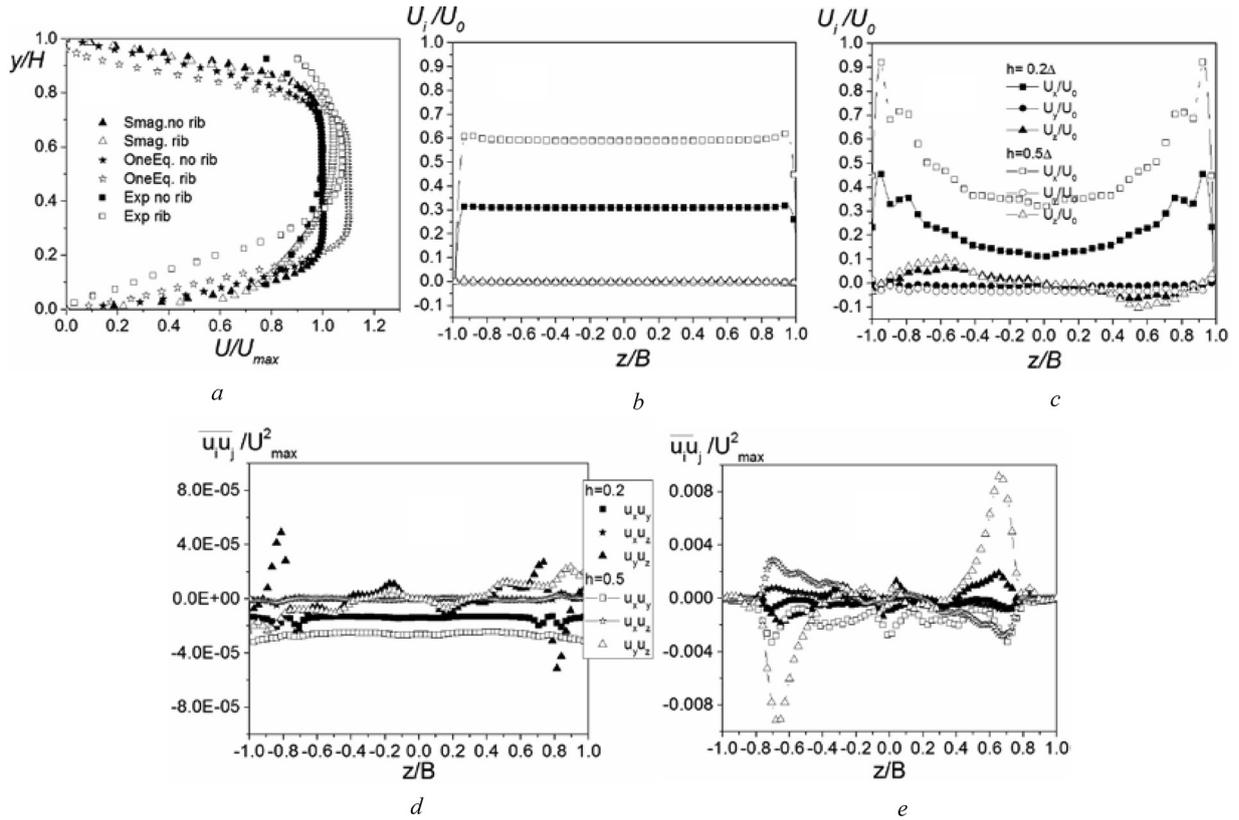


Fig. 3. Velocity distributions along the height (a) and width (b, c) of the channel; Reynolds stress across the channel (d) without rib; e) with rib

the same as the one calculated by RANS ($k-\epsilon$ model) so the analysis of flow characteristics across the flow ahead of the step edge was done using the one EqEddy model.

In the channel without rib, the velocity field was two-dimensional: the velocity component U_x uniformly distributed across the channel and others components were equal to zero. The rib caused the velocity components U_x and U_z to increase strongly near the sidewalls in comparison with their values in the channel center (fig. 3, c). The normal velocity (U_y) slightly decreased with increasing parameter h .

Small Reynolds stresses were distributed rather uniformly in the channel without rib, which is typical for a two-dimensional flow (fig. 3, d). These stresses increased due to the rib by two orders of magnitude and enhanced to the sidewalls, reflecting a three-dimensional flow structure (fig. 3, e).

The increase of the stresses $u'_x u'_z$ and $u'_y u'_z$ showed the growth of transverse and normal interactions in the flow.

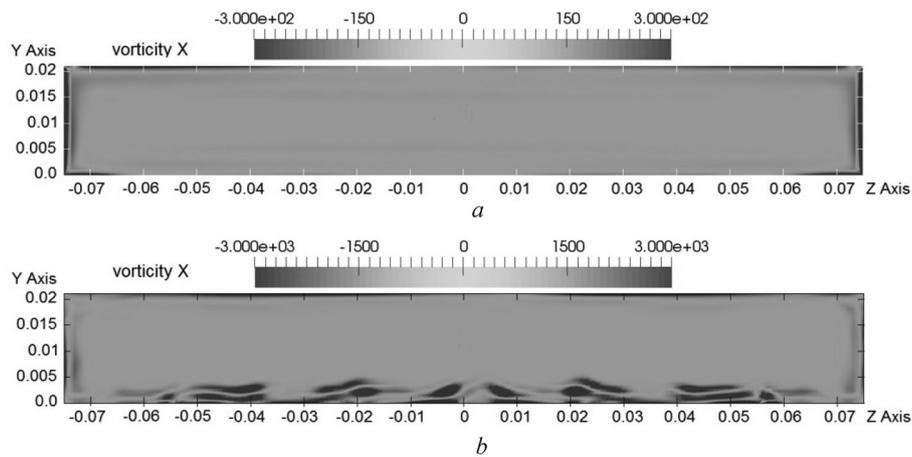


Fig. 4. Vorticity field across the channel at the reattachment position: a – channel without rib; b – channel with rib

The vorticity $\omega_x = (\partial U_z / \partial y - \partial U_y / \partial z)$ was generated mostly near the walls being almost zero across the channel without rib (fig. 4, a).

The rib caused pairs of opposite-sign vortices to be formed near the channel bottom (fig. 4, b). The vorticity intensity of these pairs was by an order of magnitude higher than the maximum vorticity in the channel without rib. The generated vortices resulted in energy redistribution within the channel cross section, which was shown in a longitudinal velocity decrease at the channel bottom.

Conclusions. Parameters of a reattached flow separated from a rib were documented by two numerical methods: RANS and LES using different turbulence models: $k-\epsilon$, $k-\Omega$ and Smagorinsky and oneEqEddy respectively. The both methods showed a velocity decrease at the boundary of the reattached flow, but in RANS, this flow was identified as two-dimensional, while in LES – as three-dimensional.

Acknowledgement. The study was made within the framework of Grants T16P-005 (BFFR) and 16-58-00018 (RFFR).

References

1. Terekhov V. I., Smuls'kii Ya. I., Sharov K. A. Experimental study of the separated flow structure behind a backward-facing step and a passive disturbance. *Journal of Applied Mechanics and Technical Physics*, 2016, vol. 57, no. 1, pp. 180–187. doi.org/10.1134/s002189441601020x
2. Isomoto K., Honami S. The effect of inlet turbulence intensity on the reattachment process over a backward-facing step. *Journal of Fluids Engineering*, 1989, vol. 111, no. 1, pp. 87–92. doi.org/10.1115/1.3243604
3. Park H., Jeon W., Choi H., Yoo J. Y. Mixing enhancement behind a backward-facing step using tabs. *Physics of Fluids*, 2007, vol. 19, no. 10, pp. 105103. doi.org/10.1063/1.2781597
4. Miao J., Chou J. H., Lee K. C., Chen M. H. Control of separated flow by a two-dimensional oscillating fence. *AIAA Journal*, 1991, vol. 29, no. 7, pp. 1140–1148. doi.org/10.2514/3.10715
5. Chun K. B., Sung H. J. Control of turbulent separated flow over a backward-facing step by local forcing. *Experiments in Fluids*, 1996, vol. 21, no. 6, pp. 417–426. doi.org/10.1007/bf00189044
6. Yoshioka S., Obi S., Masuda S. Organized vortex motion in periodically perturbed turbulent separated flow over a backward-facing step. *International Journal of Heat and Fluid Flow*, 2001, vol. 22, pp. 301–307. doi.org/10.1016/s0142-727x(01)00092-3
7. Gong Y., Tanner F. X., Comparison of RANS and LES Models in the laminar limit for a flow over a backward-facing step using OpenFOAM. *19th Int. Multidimensional Engine Modeling Meeting SAE Congress*. Detroit, Michigan, USA, 2009. Available at: http://www.erc.wisc.edu/documents/10-MTU_Gong-Tanner.pdf
8. Pope S. B. *Turbulent Flows*. Cambridge, Cambridge University Press, 2000. 773 p. doi.org/10.1017/cbo9780511840531
9. Schumann U. Subgrid scale model for finite difference simulations of turbulent flows in plane channels and annuli. *Journal of Computational Physics*, 1975, vol. 18, pp. 376–404. doi.org/10.1016/0021-9991(75)90093-5
10. Terekhov V. I., Bogatko T. V., Djachenko A. Ju., Smulskii Ya. I., Yarygina N. I. *Heat transfer in subsonic separated flows*. Novosibirsk, Novosibirsk State Technical University, 2016. 272 p. (in Russian).

Список использованных источников

1. Terekhov, V. I. Experimental study of the separated flow structure behind a backward-facing step and a passive disturbance / V. I. Terekhov, Ya. I. Smuls'kii, K. A. Sharov // *J. Applied Mech. and Technical Phys.* – 2016. – Vol. 57, N 1. – P. 180–187. doi.org/10.1134/s002189441601020x
2. Isomoto, K. The effect of inlet turbulence intensity on the reattachment process over a backward-facing step / K. Isomoto, S. Honami // *ASME Trans. J. Fluids Eng.* – 1989. – Vol. 111, N 1. – P. 87–92. doi.org/10.1115/1.3243604
3. Mixing enhancement behind a backward-facing step using tab / H. Park [et al.] // *Phys. Fluids.* – 2007. – Vol. 19, N 10. – P. 105103. doi.org/10.1063/1.2781597
4. Control of separated flow by a two-dimensional oscillating fence / J. Miao [et al.] // *AIAA J.* – 1991. – Vol. 29, N 7. – P. 1140–1148. doi.org/10.2514/3.10715
5. Chun, K. B. Control of turbulent separated flow over a backward-facing step by local forcing / K. B. Chun, H. J. Sung // *Exp. Fluids.* – 1996. – Vol. 21, N 6. – P. 417–426. doi.org/10.1007/bf00189044
6. Yoshioka, S. Organized vortex motion in periodically perturbed turbulent separated flow over a backward-facing step / S. Yoshioka, S. Obi, S. Masuda // *Int. J. Heat Fluid Flow.* – 2001. – Vol. 22, N 3. – P. 301–307. doi.org/10.1016/s0142-727x(01)00092-3
7. Gong, Y. Comparison of RANS and LES Models in the laminar limit for a flow over a backward-facing step using OpenFOAM / Y. Gong, F. X. Tanner // *19th Int. Multidimensional Engine Modeling Meeting SAE Congress.* – Detroit; Michigan, USA, 2009.
8. Pope, S. B. *Turbulent Flows* / S. B. Pope. – Cambridge: Cambridge University Press, 2000. – 773 p. doi.org/10.1017/cbo9780511840531
9. Schumann, U. Subgrid scale model for finite difference simulations of turbulent flows in plane channels and annuli / U. Schumann // *J. Comput. Phys.* – 1975. – Vol. 18, N 4. – P. 376–404. doi.org/10.1016/0021-9991(75)90093-5
10. Теплообмен в дозвуковых отрывных потоках / В. И. Терехов [и др.]. – Новосибирск: Изд-во НГТУ, 2016. – 272 с.

Information about the authors

Baranova Tatiana Anatolievna – Researcher. A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (15, P. Brovka Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bartat@hmti.ac.by.

Zhdanov Valery Lvovich – D. Sc. (Engineering), Leading researcher. A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (15, P. Brovka Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valery.zhdanov@hmti.ac.by.

Ivanov Dmitry Aleksandrovich – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior researcher. A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (15, P. Brovka Str., Minsk, Republic of Belarus). E-mail: divanov@hmti.ac.by.

Smul'skii Yaroslav Iosiphovich – Leading specialist. Kutateladze S. S. Institute of Thermophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (2, Lavrentiev Ave., 630090, Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: smul@ngs.ru.

Terekhov Viktor Ivanovich – D. Sc. (Engineering), Professor, Head of the Department. Kutateladze S. S. Institute of Thermophysics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (2, Lavrentiev Ave., 630090, Novosibirsk, Russian Federation). E-mail: terekhov@itp.nsc.ru.

Информация об авторах

Баранова Татьяна Анатольевна – науч. сотрудник. Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси (ул. П. Бровки, 15, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bartat@hmti.ac.by.

Жданов Валерий Львович – д-р техн. наук, вед. науч. сотрудник. Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси (ул. П. Бровки, 15, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: valery.zhdanov@hmti.ac.by.

Иванов Дмитрий Александрович – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси (ул. П. Бровки, 15, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: divanov@hmti.ac.by.

Смульский Ярослав Иосифович – вед. специалист. Институт теплофизики им. С. С. Кутателадзе СО РАН (пр. Академика Лаврентьева, 2, 630090, Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: smul@ngs.ru.

Терехов Виктор Иванович – д-р техн. наук, профессор, заведующий отделом. Институт теплофизики им. С. С. Кутателадзе СО РАН (пр. Академика Лаврентьева, 2, 630090, Новосибирск, Российская Федерация). E-mail: terekhov@itp.nsc.ru.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)
УДК 621.762.04

Поступило в редакцию 29.06.2017
Received 29.06.2017

Член-корреспондент А. Ф. Ильющенко, В. И. Овчинников

*Институт порошковой металлургии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ОСОБЕННОСТИ ЗАРОЖДЕНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ В УСЛОВИЯХ ИОНИЗАЦИИ ПРОДУКТОВ ВЗРЫВА

Аннотация. Обсуждается формирование электромагнитного поля при взрыве кумулятивного заряда в процессе ионизации продуктов детонации. В качестве физической модели изменения электромагнитного поля во времени в различных направлениях предложено рассмотреть движение заряженной плоскости, представляющей поток ионизированной неидеальной плазмы, ускоренной кумулятивным зарядом. Показано, что в результате взрыва кумулятивного заряда образуется ионизированный поток продуктов детонации (неидеальной плазмы), вокруг которого формируется магнитное поле.

Ключевые слова: взрывчатые вещества, неидеальная плазма, ионизированный поток, кумуляция, магнитные поля

Для цитирования: Ильющенко, А. Ф. Особенности зарождения электромагнитного поля в условиях ионизации продуктов взрыва / А. Ф. Ильющенко, В. И. Овчинников // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 115–119.

Corresponding Member Alexander F. Ilyushchenko, Vladimir I. Ovchinnikov

Powder Metallurgy Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ORIGIN OF AN ELECTROMAGNETIC FIELD UNDER IONIZATION CONDITIONS OF EXPLOSION PRODUCTS

Abstract. The issue of formation of an electromagnetic field at the explosion of a shaped charge in the ionization process of detonation products is discussed. As a physical model of electromagnetic field time variation in different directions, it is proposed to consider the motion of a charged plane that represents a flow of ionized nonideal plasma accelerated by a shaped charge. It is shown that as a result of explosion of a shaped charge, the ionized flow of detonation products (nonideal plasma) develops, around which the magnetic field is formed.

Keywords: explosives, non-ideal plasma, the ionized flux accumulation, the magnetic field

For citation: Ilyushchenko A. F., Ovchinnikov V. I. Origin of an electromagnetic field under ionization conditions of explosion products. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 115–119 (in Russian).

Введение. Особый интерес вызывают процессы кумуляции энергии при использовании в качестве ее источника взрывчатых веществ (ВВ). При этом следует учитывать, что число параметров, подлежащих определению при использовании различных взрывчатых веществ и способов их применения, может достигать нескольких десятков. Формирование магнитных полей и их распределение несут информацию о физике детонационных процессов. Интерес к исследованиям магнитодинамических процессов в условиях высокоскоростной детонации и кумуляции энергии обусловлен в первую очередь физикой электромагнитных свойств вещества при высоких плотностях энергии, применением ВВ для получения сильных магнитных полей и создания ускорителей для разгона частиц.

Однако несмотря на многолетнюю историю изучения составов, термодинамических, электрофизических параметров взрывчатых веществ, представляющих многокомпонентные многофазные химические системы, находящихся при экстремально высоких давлениях и температурах, многие параметры остаются до настоящего времени недостаточно изученными, в том числе процессы зарождения и поведения магнитных полей. Это связано со сложностью самого явления и получения достоверных экспериментальных данных. Отсутствие методик описания и экс-

периментальных измерений магнитных полей ограничивает применение метода магнитодинамики к исследованию физики детонации и кумулятивных процессов, сдерживает их применение для изучения влияния на ускорение потоков вещества и характера их взаимодействия с преградой.

В сообщении рассматривается вопрос формирования электромагнитного поля в результате ионизации продуктов взрыва и процесса его распространения в условиях магнитодинамической кумуляции.

Цель работы – изучение процесса зарождения и распределения электромагнитного поля при ионизации продуктов взрыва в условиях кумуляции.

Материалы и методы исследования. В процессе взрыва кумулятивного заряда взрывчатого вещества происходят сложные химические превращения взрывчатых веществ CHNO в продукты детонации (ПД) состава (N_2 , CO_2 , H_2O и т. п.), находящиеся при экстремально высоких давлениях и температурах. В результате происходит их частичная ионизация, образуется неидеальная плазма продуктов детонации и их смесей. За счет кумулятивных процессов идет направленное ускорение потока неидеальной плазмы (ПД). Направленное движение зарядов (ионов плазмы) формирует магнитное поле.

В результате столкновения ускоренного потока неидеальной плазмы с металлической преградой также создается магнитное поле. Основываясь на основных принципах магнитодинамики и уравнений Максвелла [1], рассмотрим случай движущегося поля при изменении одной из координат, т. е. решая одномерную задачу, представленную на рис. 1.

Модельное представление ионизированного потока вещества ускоренного взрывным ускорителем. В области фокуса ионизированного потока ускоренного взрывным ускорителем (рис. 1) вырежем заряженную плоскость, для простоты в виде монослоя, помещенного на плоскости yz . Сначала монослой неподвижен, а затем мгновенно в результате ускорения взрывным ускорителем приобретает скорость в направлении y и движется с этой постоянной скоростью. В результате, получаем поверхностный ток J (J – ток на единицу ширины в z -направлении). Чтобы упростить проблему, предположим, что имеется еще один неподвижный монослой, заряженный противоположно и наложенный на плоскость yz , так, что электрические эффекты отсутствуют.

Если имеется монослой с током в положительном y -направлении, возникнет магнитное поле, направленное в отрицательном z -направлении при $x > 0$ и в положительном z -направлении при $x < 0$. Можно найти величину B магнитного поля, используя тот факт, что контурный интеграл от магнитного поля будет равен току J деленному на $\epsilon_0 c^2$. Тогда $B = J / 2\epsilon_0 c^2$ (поскольку контурный интеграл от B есть $2\pi r$)

$$2\pi r B = \frac{J}{\epsilon_0 c^2}.$$

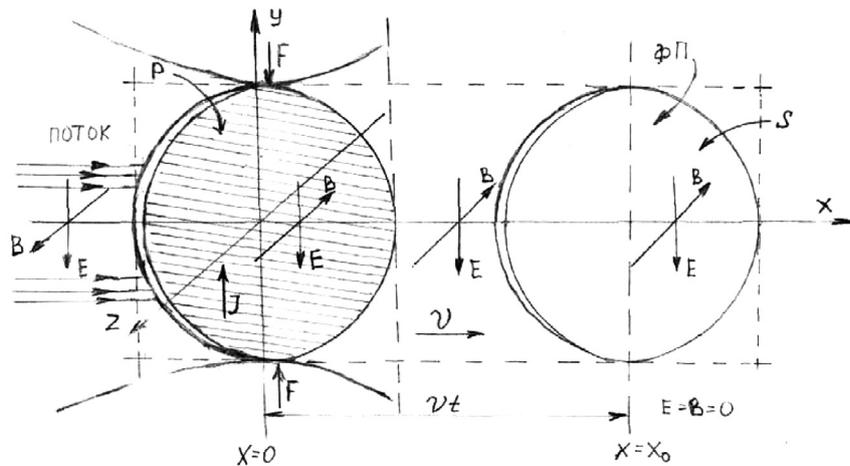


Рис. 1. Движение заряженной плоскости и распространение электромагнитных и электрических полей: P – заряженная плоскость; ФП – фронт распространения полей; F – фокус потока; S – второй монослой; v – скорость движения заряженной плоскости

Fig. 1. Motion of a charged plane and propagation of electromagnetic and electric fields: P – charged plane; ФП – field propagation front; F – field focus; S – second monolayer; v – charged plane velocity

Определим поле вблизи монослоя для малых значений x , но, поскольку монослой считаем бесконечным, попробуем получить магнитное поле и для больших значений x . Однако это означает, что в момент, когда появляется ток, магнитное поле внезапно изменяется от нуля до конечной величины. При внезапном изменении магнитного поля могут возникнуть электрические эффекты. (Как бы магнитное поле ни менялось, электрические эффекты возникнут.) Так что в результате движения заряженного монослоя создается переменное магнитное поле и, следовательно, электрические эффекты [2].

Характеристика электрического поля меняется от 0 до определенной величины. Имеем производную dE / dt , которая будет вносить вклад вместе с током J в создание магнитного поля [3; 4]. Поле B , которое мы вычислили, создается вблизи монослоя с током (для малых x). Но поле B подальше (для больших x) сначала равно нулю. Как только производим взрыв и тем самым создаем поток заряженных частиц (ионов продуктов детонации), появляется ток, носителем которого является поток зарядов и одновременно вблизи него появляется магнитное поле с постоянным значением B , распространяющееся от источника. Вследствие симметрии поле распространяется как в положительном, так и в отрицательном x -направлении [5; 6].

Таким же образом меняется и электрическое поле E . До момента $t = 0$ (когда появляется ток) поле повсюду равно нулю. Затем, спустя время t , как E , так и B постоянны вплоть до момента когда $x = vt$, а за ним равны нулю. Поля продвигаются вперед, подобно волне с постоянной скоростью v . Зависимость величины E или B от x и времени t показана на рис. 2.

Учитывая, что измерение индукции магнитного поля прибором РЭМИ-01 проводили с помощью трехкоординатного датчика Холла в трех направлениях одновременно, проведем количественный анализ, рассмотрев два поперечных разреза: вид сверху, если смотреть вниз вдоль оси y (рис. 3, a), и вид сбоку, если смотреть назад вдоль оси z (рис. 3, b). Рассмотрим вид сбоку. Заряженный монослой движется вверх; магнитное поле направлено внутрь страницы для $+x$ и от страницы для $-x$, а электрическое поле направлено вниз всюду, вплоть до $x = \pm vt$.

Проверим, согласуются ли такие поля с уравнениями Максвелла. Возьмем петлю в виде прямоугольника Γ_2 . Как видно на рис. 3, b одна сторона прямоугольника проходит в области, где есть

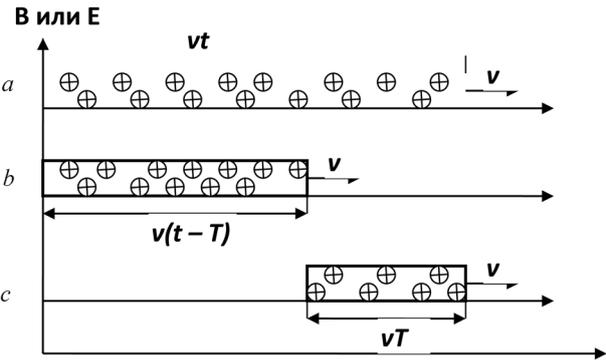


Рис. 2. Зависимость величины B (или E) от x : a – спустя время t после начала движения заряженной плоскости; b – поля от заряженной плоскости, начавшей двигаться в момент $t = T$ в сторону отрицательных y ; c – сумма a и b

Fig. 2. B (or E) as a function of x : a – after time t after the start of motion of a charged plane; b – fields of a charged plane starting to move at the moment $t = T$ towards negative values of y ; c – sum of a and b

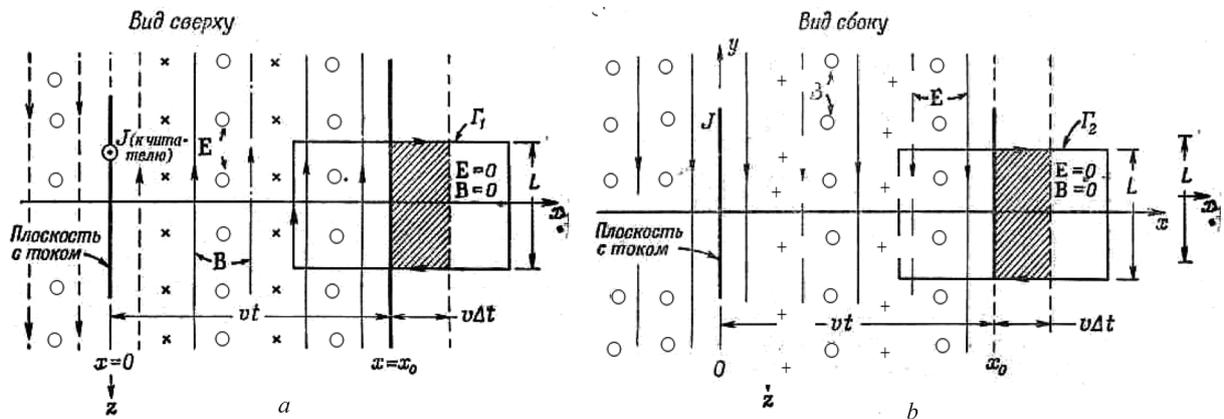


Рис. 3. Движение заряженного монослоя в различных плоскостях: a – вид сверху, b – вид сбоку

Fig. 3. Motion of a charged monolayer in different planes: a – view from above, b – view from side

поля, а другая – в области, до которой поля еще не дошли. Через эту петлю проходит определенный магнитный поток. Его изменение сопровождается появлением э. д. с. вдоль петли. Если волновой фронт движется, магнитный поток меняется, поскольку поверхность, внутри которой существует поле B , непрерывно увеличивается со скоростью v . Поток внутри Γ_2 равен произведению B на ту часть поверхности внутри Γ_2 , где есть магнитное поле. Скорость изменения потока (поскольку величина B постоянна) равна величине поля, умноженной на скорость изменения поверхности. Скорость изменения поверхности определяется следующим образом. Если ширина прямоугольника Γ_2 равна L , то поверхность, в которой B существует, меняется как $Lv\Delta t$ за отрезок времени Δt (рис. 3, *b*). Скорость изменения потока при этом равна BLv . По закону Фарадея она должна быть равна контурному интегралу от E вокруг Γ_2 , который есть просто EL . Получаем равенство

$$E = vB. \quad (1)$$

Таким образом, если отношение E к B равно v , то рассматриваемые поля будут удовлетворять уравнению Фарадея. Но есть еще уравнение, связывающее E и B :

$$c^2 \nabla \times B = \frac{j}{\varepsilon_0} + \frac{\partial E}{\partial t}. \quad (2)$$

В соответствии с рис. 3, *a* определяем применимость уравнения (2). Это уравнение дает значение вблизи заряженного монослоя. Кроме того, для любой петли, расположенной вне монослоя, но позади волнового фронта, где нет ни ротора B , ни j или меняющегося поля E , так что уравнение там выполнимо. В петле Γ_1 , которая пересекает волновой фронт, как показано на рис. 3, *a*, нет токов, поэтому уравнение (2) можно записать в интегральной форме

$$c^2 \oint_{\Gamma_1} B ds = \frac{d}{dt} \int_{\text{внутри } \Gamma_1} E nda.$$

Контурный интеграл от B есть просто произведение B на L . Скорость изменения потока E возникает только благодаря продвигающемуся волновому фронту. Область внутри Γ_1 , где E не равно нулю, увеличивается со скоростью vL . Правая сторона равна vLE . Тогда уравнение приобретает вид

$$c^2 B = Ev. \quad (3)$$

Попробуем получить решение, когда поля B и E постоянны за фронтом, причем оба направлены под прямыми углами к направлению, в котором движется фронт, и под прямыми углами друг к другу. Уравнения Максвелла определяют отношение E к B . Из (1) и (3) получаем

$$E = vB \text{ и } E = \frac{c^2}{v} B.$$

Получены два разных выражения для отношения E / B . Возможно ли существование таких полей, где имеется лишь одна скорость v , для которой оба уравнения могут быть справедливы, а именно при $v = c$. Волновой фронт должен передвигаться со скоростью c . Что произойдет, если внезапно остановить заряженный монослой (в нашем эксперименте поток плазмы встретился с преградой), после того как он двигался в течение короткого времени T ? Будем исходить из принципа суперпозиции. В начале эксперимента ток равен нулю, в результате взрыва он внезапно появляется. Решение для этого случая определили выше. Добавим другой ряд полей. Возьмем другой заряженный монослой (допустим отраженный от преграды) и внезапно начнем его двигать в противоположном направлении с той же скоростью, только спустя время T после начала движения первого монослоя. Полный ток от двух слоев вместе сначала равен нулю, потом он появляется в течение времени T , затем появляется снова, потому что оба тока погашаются. Таким образом, получаем прямоугольный «импульс» тока (рис. 4).

Если снова обратимся к рис. 2 в момент t , то увидим, что область между $x = \pm vt$ «занята» полями, но они еще не достигли области за ней. Так как монослой заряжен, а следовательно, поля E и B простираются бесконечно далеко в y - и z -направлениях.

Новый отрицательный ток создает такие же поля, как и положительный, но с обратными знаками и, разумеется, с запаздыванием во времени T . Волновой фронт по-прежнему движется со скоростью c . В момент времени t он достигает расстояния $x = \pm c(t - T)$ (рис. 2, *b*). Итак, мы имеем два «элемента» поля, перемещающихся со скоростью c (рис. 2, *a* и *b*). Соединенные поля будут такими, как показано на рис. 2, *c*. Для $x > ct$ поля равны нулю, между $x = c(t - T)$ и $x = ct$ они постоянны (со значениями, которые получены выше), и для $x < c(t - T)$ они снова равны нулю.

Результаты и их обсуждение. Представленная физическая модель позволяет провести анализ движения заряженного высокоскоростного потока вещества, представляющего собой неидеальную плазму продуктов взрыва и произвести расчет индукции магнитного поля.

По расчетам индукция магнитного поля B индуцированного зарядами неидеальной плазмы взрыва (массой 200 г) и разогнанных взрывным ускорителем до скорости 1–1,2 км/с по представленной модели составляла ~58–70 мТ, что на 7–8 % выше значений измеренных, это объясняется как погрешностью измерений, так и тем, что измерения проводились на расстоянии 10–15 см от ускорителя потока неидеальной плазмы. Более подробные результаты экспериментальных исследований будут представлены в следующей работе.

Заключение. На основании проведенных исследований с применением теоретических основ электродинамики и расчетов с использованием уравнений Максвелла показана возможность физико-математического представления модели движения ионизированного потока частиц разогнанных взрывным ускорителем кумулятивного принципа действия, позволяющей проводить расчеты индукции магнитного поля и изучать процессы взаимодействия заряженных частиц с твердым телом.

Список использованных источников

1. Фушич, В. И. Симметрия уравнений Максвелла / В. И. Фушич, А. Г. Никитин. – Киев: Наукова думка, 1983. – 200 с.
2. Астахов, А. В. Курс физики / А. В. Астахов, Ю. М. Широков. – Москва: Наука, 1980. – Т. II: Электромагнитное поле. – 360 с.
3. Ландау, Л. Д. Электродинамика сплошных сред / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. – Москва: Физматлит, 2005. – 656 с.
4. Батыгин, В. В. Современная электродинамика / В. В. Батыгин, И. Н. Топтыгин. – Москва, 2005. – Ч. 1: Микроскопическая теория. – 736 с.
5. Топтыгин, И. Н. Современная электродинамика / И. Н. Топтыгин. – Москва, 2005. – Ч. 2: Теория электромагнитных явлений в веществе. – 848 с.
6. Гинзбург, В. Л. Распространение электромагнитных волн в плазме / В. Л. Гинзбург. – 2-е изд. – Москва: Наука, 1967. – 683 с.

References

1. Fushchich V. I., Nikitin A. G. *Symmetry of Maxwell's equations*. Kiev, Naukova Dumka Publ., 1983, 200 p. (in Russian).
2. Astakhov A. V., Shirokov Yu. M. *Course of physics. Vol. II: Electromagnetic field*. Moscow, Nauka Publ., 1980. 360 p. (in Russian).
3. Landau L. D., Lifshitz E. M. *Electrodynamics of continuous media*. Moscow, Fizmatlit Publ., 2005. 656 p. (in Russian).
4. Batygin V. V., Toptygin I. N. *Modern electrodynamics. Part 1. Microscopic theory*. Moscow, 2005. 736 p. (in Russian).
5. Toptygin I. N. *Modern electrodynamics. Part 2. Theory of electromagnetic phenomena in matter*. Moscow, 2005. 848 p. (in Russian).
6. Ginzburg V. L. *Propagation of electromagnetic waves in plasma*. 2nd ed. Moscow, Nauka Publ., 1967. 683 p. (in Russian).

Информация об авторах

Ильющенко Александр Федорович – член-корреспондент, д-р техн. наук, профессор, директор. Институт порошковой металлургии НАН Беларуси (ул. Платонова, 41, 220005, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Alexil@mail.belpak.by.

Овчинников Владимир Ильич – канд. техн. наук, заведующий лабораторией. Институт порошковой металлургии НАН Беларуси (ул. Платонова, 41, 220005, Минск, Республика Беларусь). E-mail: OvchinnikovVI@yandex.ru.

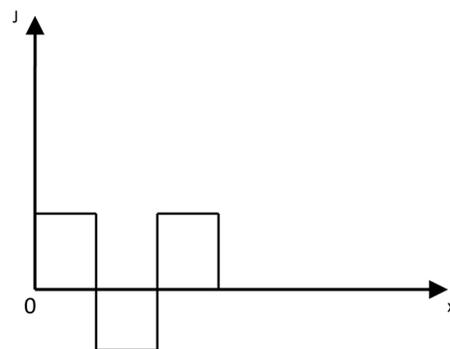


Рис. 4. Импульс тока, создаваемый двумя движущимися заряженными слоями

Fig. 4. Current pulse created by two moving charged layers

Information about the authors

Ilyushchenko Alexander Fedorovich – Corresponding Member, D. Sc. (Engineering), Professor, Director. Powder Metallurgy Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (41, Platonov Str., 220005, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Alexil@mail.belpak.by.

Ovchinnikov Vladimir Ilyich – Ph. D. (Engineering), Head of the Laboratory. Powder Metallurgy Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (41, Platonov Str., 220005, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: OvchinnikovVI@yandex.ru.

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)
УДК 620.22:678.6

Поступило в редакцию 23.10.2017
Received 23.10.2017

В. В. Дубровский, В. Н. Адери́ха, В. А. Шаповалов, член-корреспондент С. С. Песе́цкий

*Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого
Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь*

ВЛИЯНИЕ ГИБРИДНОГО НАПОЛНЕНИЯ КОРОТКИМ СТЕКЛОВОЛОКНОМ И ТЕРМОРАСШИРЕННЫМ ГРАФИТОМ НА СТРУКТУРУ И СВОЙСТВА ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТА

Аннотация. Исследовано влияние добавок коротких стеклянных волокон (СВ) и терморасширенного графита (ТРГ), вводимых в полиэтилентерефталат (ПЭТ), на механические, в том числе динамические механические, и реологические свойства, а также особенности структуры получаемых композитов. Компаундирование материалов осуществляли смешением в расплаве ПЭТ методом реакционной экструзии при использовании двухшнекового реактора-смесителя с односторонним вращением шнеков и $L / D = 40$. Исследуемые композиты содержали от 15 до 60 мас. % СВ, а концентрация ТРГ составляла 0,5 и 3,0 мас. %. Показано, что при гибридном наполнении ПЭТ наблюдается синергическое повышение модуля упругости композитов, предельные значения которого превышают 22 ГПа, а также динамического модуля сдвига в широком интервале температур. При введении ТРГ в композиты ПЭТ/СВ повышается кристалличность связующего. Обнаружен эффект аномального снижения характеристической вязкости растворов ПЭТ и повышения текучести расплава композитов при повышенной >30 мас. % концентрации наполнителей, что обусловлено углублением деструкции макромолекул.

Ключевые слова: полиэтилентерефталат, короткое стекловолокно, терморасширенный графит, гибридное наполнение

Для цитирования: Влияние гибридного наполнения коротким стекловолокном и терморасширенным графитом на структуру и свойства полиэтилентерефталата / В. В. Дубровский [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 120–128.

Vladislav V. Dubrovsky, Vladimir N. Aderikha, Vitaly A. Shapovalov, Corresponding Member Stepan S. Pesetskii

V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

INFLUENCE OF HYBRID FILLING WITH SHORT GLASS FIBERS AND THERMALLY EXPANDED GRAPHITE ON THE STRUCTURE AND PROPERTIES POLYETHYLENETEREPHTALATE

Abstract. The effect of short glass fibers (GFs) and thermally expanded graphite (TEG), added to polyethyleneterephthalate (PET), on mechanical, including dynamical mechanical, and rheological properties, as well as the structural features of the produced composites is studied. Compounding with the PET melt is realized by reactive extrusion using a co-rotating twin screw extruder-reactor with $L / D = 40$. Analyzed composites contained from 15 to 60 wt. % of GFs, and the TEG concentration was 0.5 and 3.0 wt. It is found that hybrid filling of PET results in a synergetic increase of the tensile modulus of the composites reaching the values more than 22 GPa, as well as that of the dynamic shear modulus in a wide temperature range. Adding TEG into PET/GF composites increases the degree of binder crystallinity. An effect of an anomalous decrease in the intrinsic viscosity of PET solutions and an increase in the melt flow index of the melt composites observed at higher GF concentrations is attributed to a deeper degradation of polymer.

Keywords: polyethyleneterephthalate, short glass fiber, thermally expanded graphite, hybrid filling

For citation: Dubrovsky V. V., Aderikha V. N., Shapovalov V. A., Pesetskii S. S. Influence of hybrid filling with short glass fibers and thermally expanded graphite on the structure and properties of polyethyleneterephthalate. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 1, pp. 120–128 (in Russian).

Введение. Большой объем производства полиэтилентерефталата (ПЭТ) (мировой выпуск в 2015 г. свыше 55 млн т [1]), и значительные масштабы его рециклинга определяют необходимость постоянного расширения исследований и разработки новых технически ценных композитов на его основе. Особый интерес представляют композиты на основе ПЭТ, армированного короткими стеклянными волокнами (СВ) [2–4]. Стекловолокна, модуль упругости которых равен ≈ 72 ГПа, что существенно превышает модуль упругости исходного ПЭТ (≈ 2 ГПа), будучи

введенными в данный полиэфир, как и в другие термопласты, оказывают упрочняющее влияние на полимерную матрицу. Причем упрочняющий эффект может обеспечиваться не только вследствие собственно армирующего действия СВ, как высокомодульного наполнителя, но и в результате их влияния на молекулярно-структурные параметры, релаксационные и реологические свойства матричного ПЭТ [3].

Межфазная адгезия в системе ПЭТ–поверхность СВ, структура и свойства межфазных слоев в композитах ПЭТ/СВ и, как следствие, механические характеристики материалов в значительной степени определяются молекулярной структурой матричного полиэфира и степенью его молекулярно-структурных превращений на стадиях компаундирования и переработки материалов. Макромолекулярные превращения, протекающие в расплаве ПЭТ, сравнительно подробно изучены для исходного (немодифицированного) полиэфира [4]. Имеются отдельные работы, направленные на анализ сущности физико-химических процессов, происходящих при компаундировании и переработке композитов ПЭТ/СВ [3; 6]. В зависимости от конкретных условий в расплаве ПЭТ возможно протекание разнообразных реакций с участием сложноэфирной группы, концевых гидроксильных и карбоксильных групп, а также мономерных звеньев [4]. Наиболее типичной является деструкция макромолекул. Ее негативное влияние проявляется в падении вязкости раствора и расплава полимера вследствие снижения молекулярной массы, образовании новых концевых карбоксильных и гидроксильных групп и низкомолекулярных продуктов. По данным работ [3; 7], существенное влияние на макромолекулярные превращения в расплавах ПЭТ, в частности степень деструкции макромолекул, оказывают добавки СВ. При повышенной концентрации СВ может интенсифицироваться деструкция макромолекул полиэфира [3].

Установлено, что короткие СВ при получении композитов, в свою очередь также претерпевают существенные изменения (снижаются их прочность и длина) [4]. Очевидно, что степень указанных изменений и их влияние на свойства композитов ПЭТ/СВ должны зависеть от многих факторов: технологических параметров компаундирования, состава композита (наличия в нем сопутствующих добавок), конструкции экструзионного реактора-смесителя, степени воздействия силовых факторов на движущийся расплав и т. п. [4]. Учитывая ограниченное число публикаций в данной области, требуется накопление и обобщение экспериментальных данных, направленных на выяснение причинно-следственных связей между технологией композитов ПЭТ/СВ и спецификой их структуры и свойств.

В последние годы повышенный интерес многих научных школ вызывают гибридно наполненные композиты, в которых в качестве наполнителей одновременно используются нано- и микрочастицы, в том числе волокнистой структуры. В подобных системах может реализоваться синергический эффект улучшения отдельных свойств материалов [8]. Так синергическое усиливающее влияние гибридных наполнителей (коротких СВ и органоглин) установлено, например, для композитов полиамид 6/СВ [9], полипропилен/СВ [10], базальтовых волокон и органоглин [11], углеродных волокон и органоглин [12].

Синергическое улучшение свойств наблюдали также при гибридном наполнении эпоксидной смолы СВ и нанокристаллами целлюлозы [13], полимеров, содержащих углеродные наноматериалы и волокнистый наполнитель [14].

Следует ожидать, что исследование полимерных систем с гибридным микро- и наноуполнением позволит научно обосновать разработку прорывных технологий армированных пластиков с уникальными свойствами [8].

С учетом изложенного, представляло научный и практический интерес изучить влияние гибридного наполнения короткими СВ и углеродными наночастицами, в качестве которых в данной работе использован терморасширенный графит (ТРГ), на структурные превращения ПЭТ и механические свойства получаемых композитов.

Экспериментальная часть. В работе применяли ПЭТ марки «Экопэт 84» производства ОАО «ЭКОПЭТ», РФ (характеристическая вязкость 0,84 дл/г) и алюмоборосиликатный стеклоровинг марки ЕС13-2400Н-54С производства ОАО «Полоцк-Стекловолокно» (ТУ РБ 300059047.051–2003, диаметр моноволокон 13 мкм). Терморасширяемый графит марки Graft-350 (КНР) для получения ТРГ термообработывали на воздухе при 550 °С в течение 10 мин и измельчали в высокоскорост-

ном блендере до размеров частиц не более 0,5 мм. Для интенсификации адгезионного взаимодействия макромолекул ПЭТ с поверхностью частиц наполнителей в состав композитов вводили жидкофазный модификатор гетероцепных термопластов марки МГТ-Ж (ТУ ВУ 40084698.265–2014), содержащий в своем составе ароматический диизоцианат, являющийся одновременно удлинителем цепи (УЦ) для полиэфиров [4]. Стабилизатором термоокислительной деструкции ПЭТ служил Irganox В 561 производства BASF, ФРГ (смесь термостабилизатора Irganox 168 и антиоксиданта Irganox 1010 при их массовом соотношении 4 : 1). Составы исследуемых композитов приведены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Составы исследуемых композитов

Table 1. Test composite compounds

| Состав Composition | Компонент, %* Component, %* | | | | |
|---------------------------|--------------------------------|--------|-------|----|-----|
| | ПЭТ | B561** | МГТ-Ж | СВ | ТРГ |
| <i>Без ТРГ</i> | | | | | |
| I | 83,895 | 0,255 | 0,85 | 15 | – |
| II | 69,79 | 0,21 | 0,7 | 30 | – |
| III | 54,295 | 0,165 | 0,55 | 45 | – |
| IV | 38,88 | 0,12 | 0,4 | 60 | – |
| <i>С 0,5 % ТРГ</i> | | | | | |
| V | 83,855 | 0,25 | 0,845 | 15 | 0,5 |
| VI | 68,595 | 0,21 | 0,695 | 30 | 0,5 |
| VII | 53,791 | 0,164 | 0,545 | 45 | 0,5 |
| VIII | 38,985 | 0,12 | 0,395 | 60 | 0,5 |
| <i>С 3 % ТРГ</i> | | | | | |
| IX | 80,934 | 0,246 | 0,82 | 15 | 3 |
| X | 66,13 | 0,2 | 0,67 | 30 | 3 |
| XI | 51,324 | 0,156 | 0,52 | 45 | 3 |
| XII | 36,52 | 0,11 | 0,37 | 60 | 3 |
| <i>Контрольный состав</i> | | | | | |
| XIII | 98,7 | 0,3 | 1 | – | – |

Примечания: * – здесь и далее концентрация выражена в массовых процентах; ** – [B561] = 0,3 % от веса ПЭТ.
Notes: * – here and below, the concentration is expressed in mass percents; ** – [B561] = 0.3 % of PET weight.

Исследуемые композиты, как и в [3], получали методом реакционной экструзии на экструзионно-грануляционной линии на базе двухшнекового экструдера TSSK-35/40 ($D = 35$ мм, $L / D = 40$, десять независимо обогреваемых секций) с однонаправленным вращением шнеков. Стеклоровинг в состоянии поставки (остаточная влажность $\approx 0,45$ %) подавался в четвертую секцию материального цилиндра экструдера, снабженную кулачковыми элементами специальной конструкции для измельчения волокна за счет перетирания и воздействия сдвиговых усилий. Гранулят высушенного до остаточной влажности $\approx 0,05$ % ПЭТ предварительно механически смешивали с ТРГ, УЦ и стабилизатором В-561 и подавали из загрузочного бункера в основную загрузочную секцию материального цилиндра экструдера. ТРГ перед компаундированием сушили при 150 °С в течение 4 ч. Температура в основных смесительных секциях экструдера (IV–VIII) составляла 275 °С. Из материального цилиндра расплав материала выходил в виде 4 стренг, которые после прохождения водяной ванны и охлаждения в ней гранулировали на грануляторе роторного типа. Далее полученный гранулят высушивали в вакууме до остаточной влажности $\leq 0,05$ % и использовали для анализа показателя текучести расплава (ПТР), а также для получения экспериментальных образцов литьем под давлением на термопластавтомате EN-30 (производство Тайвань, объем впрыска 30 см³). Температура литья составляла 270 °С.

Показатели механических свойств определяли при испытаниях методом растяжения. Экспериментальные образцы представляли собой лопатки (ГОСТ 11262–80, тип 2, размер рабочей части $60 \times 10 \times 4$ мм). Испытания производили на машине Instron 5657 (Великобритания) при

скорости деформирования 1 мм/мин. Деформацию образца при определении модуля упругости находили с помощью экстензометра.

Фактическое содержание СВ в образцах определяли прокаливанием композитов до постоянного веса при 700 °С на воздухе (отклонение фактической от задаваемой в рецептуре [СВ] не превышало 3 мас. %).

Реологическое поведение расплавов материалов оценивали по значениям ПТР и вязкости (η), определяемым на приборе 5MPCA (RAY-RAN TEST EQUIPMENT Ltd., Великобритания) в соответствии с ГОСТ 11645–73 при температуре 275 °С и нагрузке 21,6 Н (диаметр капилляра 2,095 мм, длительность выдержки расплава в плавильном цилиндре прибора 4 мин).

Характеристическую вязкость растворов ($[\eta]$) в дихлоруксусной (ДХУ) кислоте измеряли на капиллярном вискозиметре Убеллоде (тип Ubellohde, производитель LAUDA DR. R.WOBSE R GmbH & CO. KG, ФРГ), растворы предварительно центрифугировали (центрифуга ОПн-12, ТУ 2924-15946272-017–2005; частота вращения ротора – 6000 об/мин, продолжительность центрифугирования – 5 мин). Следует отметить, что частицы ТРГ при этом не удавалось полностью отделить от раствора ни центрифугированием, ни фильтрованием. Высокая стабильность и отсутствие признаков визуального расслаивания образовавшихся суспензий ТРГ в ДХУ при длительном хранении (более месяца), вероятно, обусловлены малым размером частиц ТРГ и высокой степенью его интеркаляции в растворе. Это обстоятельство делало невозможным измерение $[\eta]$ для композитов с 3 %-ным содержанием ТРГ.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) применяли для анализа кристаллической структуры. В качестве пробы использовали центральные слои средней части брусков 80 × 10 × 4 мм, полученных литьем под давлением. Исследования выполняли на микрокалориметре Diamond DSC (Perkin Elmer, США) в токе азота при навеске ≈ 7 мг, скоростях нагрева и охлаждения 15 °С/мин. Степень кристалличности рассчитывали по площади эндотермического пика первого цикла плавления за вычетом теплоты холодной кристаллизации по формуле $(\Delta H_{\text{пл}} - \Delta H_{\text{хк}}) / H_{\text{пл}}^0 \times 1 / (1 - w) 100$ %, где $\Delta H_{\text{пл}}$ – теплота плавления исследуемого образца, $H_{\text{пл}}^0$ – теплота плавления ПЭТ со 100 %-ной кристалличностью, равная 140 Дж/г [15], $\Delta H_{\text{хк}}$ – теплота холодной кристаллизации образца и w – массовая доля неполимерных компонентов в образце.

Динамический механический анализ (ДМА) производили на приборе DMA 8000 фирмы Perkin Elmer (США) при частоте нагружения 1 Гц. Используемые образцы – бруски размером 30 × 7 × 2 мм вырезали из дисков диаметром 50 мм толщиной 2 мм. Испытания проводили в режиме консольного изгиба при деформации 0,05 мм и расстоянии между опорами 15 мм. Скорость нагрева образцов составляла 2 °С/мин. В связи с ростом погрешности измерения динамического модуля сдвига (G') при температурах выше температур холодной кристаллизации вследствие усадки, для определения G' при 160 °С образцы предварительно термообработывали в течение 2 ч при 130 °С.

Определение длины волокон в композитах осуществляли следующим образом. Навеску композиционного материала помещали в ДХУ при 65 °С до полного растворения полиэфира. СВ осаждали при помощи центрифугирования и отделяли от раствора. Далее полученные волокна распределяли в глицерине на предметном стекле и производили их микрофотосъемку. Затем при помощи программного обеспечения ImageJ по изображению определяли усредненную длину около 1000 отдельных волокон [3].

Результаты и их обсуждение. Особый интерес представляет оценка влияния гибридного наполнения на жесткость материалов, характеризуемую модулем упругости, поскольку именно для данного параметра неоднократно наблюдался синергический эффект от совокупного действия нано- и микронаполнителей [8].

Как видно на рис. 1, величина модуля упругости при растяжении (E_p) повышается с ростом концентрации СВ. Для композитов ПЭТ/СВ, не содержащих ТРГ, при увеличении концентрации СВ от 15 до 60 % (в 4 раза), E_p возрастает от ≈ 4 до ≈ 16 ГПа, т. е. практически в 4 раза. Введением добавок ТРГ достигается дополнительный прирост E_p независимо от [СВ] в композите. Важно отметить, что при предельно высокой [СВ], принятой в данной работе (60 %), величина модуля упругости гибридных композитов превышает 20 ГПа, что более, чем на 25 % выше значений E_p

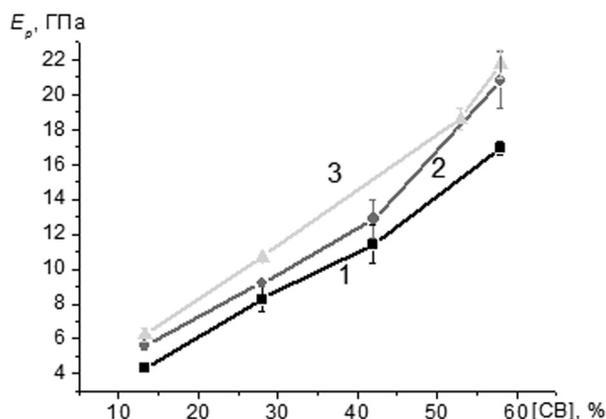


Рис. 1. Влияние концентрации стекловолокна ([СВ]) на модуль упругости при растяжении (E_p) композитов: 1 – ПЭТ/СВ (без добавок ТРГ); 2 – ПЭТ/СВ/ ТРГ–0,5 %; 3 – ПЭТ/СВ/ТРГ–3 %

Fig. 1. Effect of GF concentration ([GF]) on the tensile modulus (E_p) of the composites: 1 – PET/GF; 2 – PET/GF/TEG–0.5 %; 3 – PET/GF/TEG–3 %

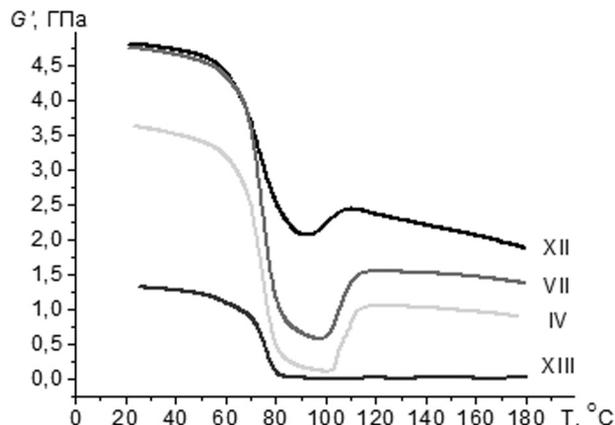


Рис. 2. Температурные зависимости динамического модуля сдвига (G') полиэфирных материалов: обозначение кривых – составы согласно табл. 1, без термообработки

Fig. 2. Temperature dependences of the dynamic shear modulus (G') of the polyester composites: designation of the curves according to Table 1, without heat treatment

для бинарного композита ПЭТ/СВ–60 % и на один десятичный порядок превышает модуль упругости исходного полиэфира, что позволяет отнести данные материалы к разряду высокомодульных. Следует отметить, что уровень значений E_p во всем интервале концентраций СВ для композитов с добавкой 3 % ТРГ более высокий, чем для композитов, содержащих 0,5 % ТРГ (рис. 1, кривые 2, 3). Таким образом, гибридное наполнение ПЭТ коротким СВ и ТРГ позволяет получить композиты с существенно более высокой жесткостью по сравнению с материалами ПЭТ/СВ.

Поскольку ПЭТ является аморфно-кристаллическим полимером с превалированием в его структуре аморфной фазы с температурой стеклования $T_c \approx 80$ °С, представлялось важным изучить влияние температуры на изменение жесткости композитов.

Как видно из температурных зависимостей динамического модуля сдвига, полученных методом ДМА (рис. 2, табл. 2), добавки ТРГ оказывают сильное влияние как на их характер, так и на величину G' во всем интервале температур испытаний.

На температурных зависимостях G' можно выделить три характерные области. Первая из них приходится на область температур от 23 до ≈ 70 °С, когда аморфная фаза ПЭТ находится

Т а б л и ц а 2. Влияние температуры на значения динамического модуля сдвига композитов (термообработка, 130 °С, 2 ч)

Table 2. Temperature influence on the values of the dynamic shear modulus of composites (heat treatment, 130 °C, 2 h)

| Состав (обозначение согласно табл. 1) Composition (designations as given in Table 1) | Значения G' , ГПа, при температуре, °С G' values, GPa; temperature, °C | | |
|---|---|-------|-------|
| | 23 | 90 | 160 |
| I | 1,835 | 0,027 | 0,410 |
| II | 2,190 | 1,955 | 0,584 |
| III | 2,975 | 2,658 | 1,042 |
| IV | 3,875 | 3,477 | 1,608 |
| V | 1,914 | 1,706 | 0,452 |
| VI | 2,244 | 2,045 | 0,775 |
| VII | 3,084 | 0,253 | 1,15 |
| VIII | 4,760 | 4,345 | 2,03 |
| IX | 2,282 | 2,055 | 0,568 |
| X | 3,161 | 0,152 | 0,903 |
| XI | 4,007 | 0,472 | 1,915 |
| XII | 4,810 | 4,393 | 2,208 |
| XIII | 1.319 | 1.098 | 0,11 |

в стеклообразном состоянии. Вторая область лежит в интервале температур от 80 до 105–120 °С, в котором аморфная фаза ПЭТ растеклована и значения G' минимальны. Третья область охватывает интервал температур выше температуры его холодной кристаллизации (105–120 °С) и вплоть до температуры плавления. Чем выше [СВ], тем более высокие значения G' присущи композитам независимо от температуры испытаний, что обусловлено армирующим действием коротких волокон. Введение добавок ТРГ усиливает армирующий эффект, причем, более ярко он проявляется при $T > T_c$, когда аморфная фаза находится в высокоэластическом состоянии. Данный эффект является несомненным следствием интенсификации межфазных взаимодействий в системе полимер–наполнитель в присутствии ТРГ. Уровень значений G' в высокотемпературной области (160–180 °С) определяет деформационную теплостойкость композитов. Поскольку при введении ТРГ величина G' существенно превышает таковую для бинарных систем ПЭТ/СВ, то очевидно, что гибридное наполнение приводит к существенному (синергическому) повышению деформационной теплостойкости композитов. Данный эффект наиболее явно выражен для материалов, содержащих 3 % ТРГ (рис. 2).

Таким образом, при гибридном наполнении ПЭТ короткими СВ и ТРГ представляется возможным создание высокомодульных композитов с повышенной теплостойкостью. Чем выше концентрация СВ и ТРГ в исследованных пределах, тем более высокие значения E_p и G' присущи композитам.

Однако, как свидетельствуют экспериментальные данные, механическая прочность гибридно наполненных материалов изменяется экстремально с максимумом при относительно умеренных (30–45 %-ных) концентрациях СВ (рис. 3).

Причем эффект снижения σ_p при [СВ] > 30 % более выражен при [ТРГ] = 3 % (рис. 3). Следовательно, при гибридном наполнении ПЭТ коротким СВ и ТРГ в условиях данного эксперимента не удастся обеспечить одновременно супервысокие жесткость и механическую прочность композитов.

Причинами, обуславливающими снижение прочности гибридно наполненных композитов при [СВ] \geq 45 %, могут быть снижение длины СВ и уменьшение вследствие этого характеристического отношения длина/диаметр волокна (l_f / d_p), что должно снизить эффективность армирования, ухудшение когезионных характеристик ПЭТ вследствие углубления степени деструкции макромолекул при повышенной концентрации наполнителя и неблагоприятные структурные превращения связующего [3; 4].

Действительно, как следует из экспериментальных данных (табл. 3), от концентрации наполнителей зависит комплекс молекулярно-структурных параметров связующего. В частности, при увеличении [СВ] в композитах ПЭТ/СВ снижается характеристическая вязкость, возрастает текучесть расплава (растет ПТР), что свидетельствует об углублении степени деструкции макромолекул. Введение в композиты добавок ТРГ интенсифицирует деструкционные процессы, причем в большей степени это характерно для материалов с повышенной (3 %) концентрацией ТРГ (табл. 3).

Снижение молекулярной массы ПЭТ вследствие углубления деструкционных процессов может приводить к ухудшению когезионной прочности связующего, накоплению в его объеме олигомерных и низкомолекулярных продуктов, что должно неизбежно обусловить снижение межфазной адгезии (межфазной сдвиговой прочности) в композитах и зависящей от нее величины σ_p [4].

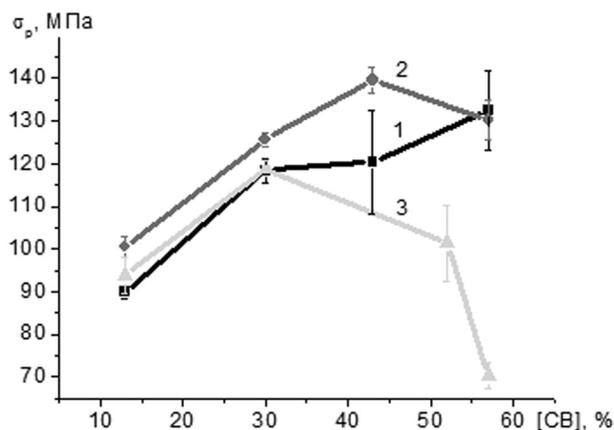


Рис. 3. Зависимость прочности при растяжении (σ_p) композитов от концентрации СВ при содержании ТРГ: 1 – 0 %; 2 – 0,5 %; 3 – 3 %

Fig. 3. Dependence of the tensile strength of the composites (σ_p) on GF concentration at TEG content of 1 – 0 %; 2 – 0.5 %; 3 – 3 %

Т а б л и ц а 3. Средняя длина СВ в композитах, показатели их реологических и морфологических свойств

T a b l e 3. Mean length of GFs in composites, indices of their rheological and morphological properties

| Состав (обозначение согласно табл. 1) Composition (designations as given in Table 1) | l_f , мкм | $[\eta]$, дл/г | ПТР, г/10 мин | $T_{кр}$, °С | α , % |
|---|-------------|-----------------|---------------|---------------|--------------|
| I | 0,326 | 0,74 | 24,5 | 193,6 | 9,7 |
| II | 0,278 | 0,67 | 24,7 | 195,5 | 17,9 |
| III | 0,189 | 0,55 | 28,5 | 196,4 | 16,7 |
| IV | 0,134 | 0,47 | 31,7 | 195,9 | 22,8 |
| V | 0,302 | 0,68 | 26,2 | 206,0 | 26,5 |
| VI | 0,295 | 0,66 | 28,8 | 208,7 | 27,3 |
| VII | 0,274 | 0,56 | 30,8 | 213,8 | 24,0 |
| VIII | 0,176 | 0,47 | 31,8 | 214,1 | 36,1 |
| IX | 0,297 | 0,67 | 24,7 | 211,0 | 19,9 |
| X | 0,299 | – | 26,9 | 213,6 | 21,9 |
| XI | 0,23 | – | 28,6 | 217,6 | 28,0 |
| XII | 0,17 | – | 30,2 | 220,8 | 36,8 |
| XIII | – | 0,87 | 15,4 | 188,2 | 9,0 |

Причинами углубления степени деструкции макромолекул ПЭТ при высокой концентрации гибридного наполнителя могут быть механохимическая деструкция макромолекул, особенно в секции материального цилиндра экструдера, где происходит диспергирование стеклоровинга. В ней возникают высокие сдвиговые напряжения в движущемся расплаве, а также интенсифицируется трение полимера о волокна, частицы ТРГ, поверхности стенок материального цилиндра и элементов шнеков.

Кроме того, важнейшим фактором, ускоряющим протекание деструкционных процессов в связующем может быть вода, концентрация которой в стеклоровинге, используемом в данной серии экспериментов в состоянии поставки, составляет $\approx 0,45$ %. Вследствие этого, в секции измельчения волокон и при последующем продвижении расплава вдоль материального цилиндра могут идти процессы гидролитического распада макромолекул [4]. Очевидно, что деструкционные процессы в связующем не позволяют в условиях данного эксперимента полностью реализовать потенциальные возможности армирующего действия гибридных наполнителей и обеспечить получение композитов с комплексом рекордно высоких механических характеристик.

Следует отметить, что при увеличении [СВ] несколько снижается средняя длина волокон (табл. 3), что, как уже упоминалось, может быть одной из причин снижения эффективности армирования при высокой концентрации волокон. В присутствии добавок ТРГ l_f несколько возрастает, что может быть следствием снижения трения между волокнами, стенкой цилиндра и поверхностью шнеков за счет антифрикционных свойств ТРГ.

По данным табл. 3, добавки ТРГ оказывают сильное влияние на молекулярно-структурные параметры ПЭТ в гибридных композитах, что видно, прежде всего, по изменению значений $T_{кр}$ и α . Причиной этого может быть высокая степень диспергирования, огромная поверхность его ультра- и нанодисперсных частиц, на поверхности которых присутствуют полярные кислородсодержащие группы, способные каталитически ускорять деструкцию макромолекул ПЭТ, в частности, их гидролитический распад [4]. Рост значений температуры кристаллизации ПЭТ может быть вызван повышением молекулярной подвижности в результате деструкции макромолекул, а также нуклеирующего влияния ТРГ на кристаллизацию.

Таким образом, при гибридном наполнении ПЭТ короткими СВ и ТРГ наблюдается синергический эффект повышения жесткости композитов. Этот эффект проявляется в области температур как ниже, так и выше температуры стеклования ПЭТ. Высокий уровень значений динамического модуля сдвига G' , а значит и модуля Юнга, в области высоких температур, когда аморфная фаза ПЭТ находится в высокоэластическом состоянии, свидетельствует о возможности создания композитов с повышенной деформационной теплостойкостью за счет гибридного наполнения.

Дополнительным резервом улучшения комплекса механических характеристик гибридно наполненных композитов может быть оптимизация технологии их компаундирования за счет снижения концентрации воды в расплаве ПЭТ, а также использования конструктивно-технологических приемов, направленных на повышение средней величины l_f степени диспергирования агрегатов ТРГ и межфазной адгезии в системе связующее–наполнитель.

Список использованных источников

1. Полиэтилентерефталат, 2016: Замки на песке [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://plastinfo.ru/information/articles/557/>. – Дата доступа: 20.10.2017.
2. Injection moulding of long glass fiber reinforced poly(ethylene terephthalate): Influence of carbon black and nucleating agents on impact properties / L. Cilleruelo [et al.] // *Express Polymer Lett.* – 2012. – Vol. 6, N 9. – P. 706–718. doi.org/10.3144/expresspolymlett.2012.76
3. О влиянии коротких стекловолокон на молекулярно-структурные параметры, механические и реологические свойства полиэтилентерефталата / В. В. Дубровский [и др.] // *Материалы. Технологии. Инструменты.* – 2013. – Т. 18, № 4. – С. 50–57.
4. 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. – Elsevier, Oxford, 2015. – Ch. 9. – P. 302–337. doi.org/10.1016/b978-0-323-26434-1.00009-x
5. Awaja, F. Recycling of PET / F. Awaja, D. Pavel // *European Polymer Journal.* – 2005. – Vol. 41, N 7. – P. 1453–1477. doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.005
6. An investigation on the rheology, morphology, thermal and mechanical properties of recycled poly(ethylene terephthalate) reinforced with modified short glass fibers / I. Rezaeian [et al.] // *Polymer Composites.* – 2009. – Vol. 30, N 7. – P. 993–999. doi.org/10.1002/pc.20647
7. Pegoretti, A. Recycled poly(ethyleneterephthalate) and its short glass fibres composites: effect of hydrothermal aging on the thermo-mechanical behavior / A. Pegoretti, A. Penati // *Polymer.* – 2004. – Vol. 45, N 23. – P. 7995–8004. doi.org/10.1016/j.polymer.2004.09.034
8. Песецкий, С. С. Гибридное микро- и наноупаковка конструкционных пластиков: синергизм армирующего действия / С. С. Песецкий // *Полимерные материалы и технологии.* – 2015. – Т. 1, № 2. – С. 5.
9. Cho, J. W. Nylon 6 nanocomposites by melt compounding / J. W. Cho, D. R. Paul // *Polymer.* – 2001. – Vol. 42, N 3. – P. 1083–1094. doi.org/10.1016/s0032-3861(00)00380-3
10. Pedrazzoli, D. Silica nanoparticles as coupling agents for polypropylene/glass composites / D. Pedrazzoli, A. Pegoretti // *Composites Science and Technology.* – 2013. – Vol. 76. – P. 77–83. doi.org/10.1016/j.compscitech.2012.12.016
11. Песецкий, С. С. Упрочнение полиамида 6 при гибридном наполнении коротким базальтовым волокном и наноглиной / С. С. Песецкий, С. П. Богданович, Т. М. Содылева // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2017. – Т. 61, № 2. – С. 74–83.
12. Морфология и свойства гибридных композитов ПА6 с короткими углеродными волокнами и органоглиной / С. С. Песецкий [и др.] // *Полимерные материалы и технологии.* – 2016. – Т. 2, № 3. – С. 45–57.
13. Improving the interfacial and mechanical properties of short glass fiber/epoxy composites by coating the glass fibers with cellophane nanocrystals / A. Asadi [et al.] // *Express Polymer Letters.* – 2016. – Vol. 10, N 7. – P. 587–597. doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.54
14. Munoz-Vulez, M. F. Effect of fiber surface treatment on the incorporation of carbon nanotubes and on the micro-mechanical properties of a single-carbon fiber-epoxy matrix composite / M. F. Munoz-Vulez, A. Valadez-Gonzalez, P. J. Herrera-Franco // *Express Polymer Letters.* – 2017. – Vol. 11, N 9. – P. 704–718. doi.org/10.3144/expresspolymlett.2017.68
15. Wunderlich, B. Equilibrium melting of flexible linear macromolecules / B. Wunderlich // *Polym. Eng. Sci.* – 1978. – Vol. 18, N 6. – P. 431–436. doi.org/10.1002/pen.760180603

References

1. Polyethylenterephthalate 2016: Castles in the sand. Available at: <https://plastinfo.ru/information/articles/557/> (accessed 20 October 2017) (in Russian).
2. Cilleruelo L., Lafranche E., Krawczak P., Pardo P., Lucas P. Injection moulding of long glass fiber reinforced poly(ethylene terephthalate): Influence of carbon black and nucleating agents on impact properties. *Express Polymer Letters*, 2012, vol. 6, no. 9, pp. 706–718. doi.org/10.3144/expresspolymlett.2012.76
3. Dubrovsky V. V., Koval V. N., Bogdanovich S. P., Pesetskii S. S. On influence of short glass fibers on molecular and structural parameters, mechanical and rheological properties of polyethylene terephthalate. *Materialy. Tehnologii. Instrumenty = Materials. Technologies. Tools*, 2013, vol. 18, no. 4, pp. 50–57 (in Russian).
4. Pesetskii S. S., Shevchenko V. V., Dubrovsky V. V. Reactive compatibilization in technology of poly(alkylene terephthalate)-based composites: polyester blends, short fiber-filled materials, and nanocomposites. Friedrich K., Breuer U., ed. *Multifunctionality of polymer Composites*, Oxford, Elsevier, 2015, ch. 9, pp. 302–337. doi.org/10.1016/b978-0-323-26434-1.00009-x

5. Awaja F., Pavel D. Recycling of PET. *European Polymer Journal*, 2005, vol. 41, no. 7, pp. 1453–1477. doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.005
6. Rezaeian I., Jafari S. H., Zahedi P., Nouri S. An investigation on the rheology, morphology, thermal and mechanical properties of recycled poly (ethylene terephthalate) reinforced with modified short glass fibers. *Polymer Composites*, 2009, vol. 30, no. 7, pp. 993–999. doi.org/10.1002/pc.20647
7. Pegoretti A., Penati A. Recycled poly(ethyleneterephthalate) and its short glass fibres composites: effect of hydrothermal aging on the thermo-mechanical behavior. *Polymer*, 2004, vol. 45, no. 23, pp. 7995–8004. doi.org/10.1016/j.polymer.2004.09.034
8. Pesetskii S. S. Hibrid micro- and nanofilling of plastics: synergism of reinforcing. *Polimernye materialy i tehnologii = Polymer materials and Technologies*, 2015, vol. 1, no. 2, pp. 5 (in Russian).
9. Cho J. W., Paul D. R. Nylon 6 nanocomposites by melt compounding. *Polymer*, 2001, vol. 42, no. 3, pp. 1083–1094. doi.org/10.1016/s0032-3861(00)00380-3
10. Pedrazzoli D., Pegoretti A. Silica nanoparticles as coupling agents for polypropylene/glass composites. *Composites Science and Technology*, 2013, vol. 76, pp. 77–83. doi.org/10.1016/j.compscitech.2012.12.016
11. Pesetskii S. S., Bogdanovich S. P., Sodyleva T. M. Polyamide 6 reinforcement by hybrid short basalt fiber and organo-clay filling. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 2, pp. 74–83 (in Russian).
12. Pesetskii S. S., Bogdanovich S. P., Dubrovsky V. V., Sodyleva T. M., Aderiha V. N., Usova V. N. Morphology and properties of PA6 hybrid composites filled with short carbon fibers and organoclay. *Polimernye materialy i tehnologii = Polymer materials and Technologies*, 2016, vol. 2, no. 3, pp. 45–57 (in Russian).
13. Asadi A., Miller M., Moon R. J., Kalaitzidou K. Improving the interfacial and mechanical properties of short glass fiber/epoxy composites by coating the glass fibers with cellylose nanocrystals. *Express Polymer Letters*, 2016, vol. 10, no. 7, pp. 587–597. doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.54
14. Munoz-Vulez M. F., Valadez-Gonzalez A., Herrera-Franco P. J. Effect of fiber surface treatment on the incorporation of carbon nanotubes and on the micromechanical properties of a single-carbon fiber-epoxy matrix composite. *Express Polymer Letters*, 2017, vol. 11, no. 9, pp. 704–718. doi.org/10.3144/expresspolymlett.2017.68
15. Wunderlich B. Equilibrium melting of flexible linear macromolecules. *Polymer Engineering and Science*, 1978, vol. 18, no. 6, pp. 431–436. doi.org/10.1002/pen.760180603

Информация об авторах

Дубровский Владислав Викторович – науч. сотрудник. Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси (ул. Кирова, 32а, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: vlad.dubrovskii@gmail.com.

Адериха Владимир Николаевич – канд. хим. наук, заведующий сектором. Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси (ул. Кирова, 32а, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: vнад@tut.by.

Шаповалов Виталий Андреевич – науч. сотрудник. Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси (ул. Кирова, 32а, 246050, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: shva.seven@gmail.com.

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.

Information about the authors

Dubrovsky Vladislav Viktorovich – Researcher. V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (32-a, Kirov Str., Gomel, Republic of Belarus). E-mail: vlad.dubrovskii@gmail.com.

Aderikha Vladimir Nikolaevich – Ph. D. (Chemistry), Head of the Department. V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (32-a, Kirov Str., Gomel, Republic of Belarus). E-mail: vнад@tut.by.

Shapovalov Vitaly Andreevich – Researcher. V. A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (32-a, Kirov Str., Gomel, Republic of Belarus). E-mail: shva.seven@gmail.com.

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., Gomel, Republic of Belarus). E-mail: otdel5mpri@tut.by.