

# ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

---

МИНСК. БЕЛОРУССКАЯ НАУКА. 2022. ТОМ 66. № 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, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

**А. В. Кильчевский**

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

**Т. П. Петрович**

(ведущий редактор журнала)

**С. В. Абламейко** – Белорусский государственный университет, Республика Беларусь

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

**И. Д. Вологовский** – Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,  
Республика Беларусь

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

**А. Я. Григорьев** – Институт механики металлополимерных систем имени В. А. Белого Национальной академии  
наук Беларуси, Республика Беларусь

**С. В. Губкин** – Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

**А. Е. Дайнеко** – Белорусский национальный технический университет, Республика Беларусь

**Н. Желев** – Абертейский университет, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии

**В. Г. Залесский** – Физико-технический институт Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

**А. И. Иванец** – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

**Н. С. Казак** – Научно-производственное объединение «Оптика, оптоэлектроника и лазерная техника»,  
Республика Беларусь

**Н. Н. Казанский** – Институт лингвистических исследований Российской академии наук, Российская Федерация

**С. П. Карпов** – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Российская Федерация

**С. Я. Килин** – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

(заместитель главного редактора)

**А. А. Коваленя** – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

**В. И. Корзюк** – Белорусский государственный университет, Республика Беларусь

**В. В. Лапа** – Институт почвоведения и агрохимии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

**М. Ларссон** – Университетский научный центр Алба Нова Стокгольмского университета, Королевство Швеция

- А. П. Ласковнев** – Физико-технический институт Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**В. Ф. Логинов** – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**Г. Маркрам** – Институт мозга, Центр неврологии и технологии Швейцарского федерального института технологий, Швейцария  
**А. А. Махнач** – Институт геологии, Республика Беларусь  
**А. Г. Наумовец** – Институт физики Национальной академии наук Украины, Украина  
**В. А. Орлович** – Институт физики им. Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**В. Н. Пармон** – Российская академия наук, Российская Федерация  
**О. Г. Пенязьков** – Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**И. Д. Рашаль** – Институт биологии Латвийского университета, Латвийская Республика  
**Б. А. Ривжа** – Латвийская академия сельскохозяйственных и лесных наук, Латвийская Республика  
**В. А. Садовничий** – Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Российская Федерация  
**А. М. Сергеев** – Российская академия наук, Российская Федерация  
**Н. С. Сердюченко** – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**В. И. Торчик** – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**А. В. Тузиков** – Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**Тяу Ван Минь** – Вьетнамская академия наук и технологий, Социалистическая Республика Вьетнам  
**С. А. Усанов** – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**Ю. С. Харин** – Научно-исследовательский институт прикладных проблем математики и информатики, Республика Беларусь  
**Л. В. Хотылева** – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
**А. Цайлингер** – Австрийская академия наук, Австрийская Республика  
**С. А. Чижик** – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь  
(*заместитель главного редактора*)  
**И. П. Шейко** – Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству, Республика Беларусь  
**В. И. Янчевский** – Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

*Адрес редакции:*

*ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, Минск, Республика Беларусь.  
Тел.: +375 17 272-19-19; e-mail: doklady\_nanb@mail.ru  
doklady.belnauka.by*

---

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ. 2022. Т. 66. № 1

*Выходит на русском, белорусском и английском языках*

---

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

Сдано в набор 17.02.2022. Выпуск в свет 25.02.2022. Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 142 экз. Заказ 28.

Цена: индивидуальная подписка – 12,67 руб.; ведомственная подписка – 29,77 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.

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».  
Доклады НАН Беларуси, 2022

# DOKLADY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

---

MINSK. BELARUSKAYA NAVUKA. 2022. Vol. 66. 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 G. Gusakov**

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

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

**Alexander V. Kilchevsky**

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

**Tatiana P. Petrovich**

(*Lead editor*)

**Sergey V. Ablameyko** – Belarusian State University, Republic of Belarus

**Chau Van Minh** – Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

**Sergey A. Chizhik** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

(*Associate Editor-in-Chief*)

**Alexey Ye. Dayneko** – Belarusian National Technical University, Republic of Belarus

**Sergey V. Gaponenko** – Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, Republic of Belarus

**Andrey Ya. Grigoriev** – Institute of Mechanics of Metal-Polymeric Systems named after V. A. Bely of the National  
Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

**Sergey V. Gubkin** – Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

**Andrei I. Ivanets** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

**Sergey P. Karpov** – Lomonosov Moscow State University, Russian Federation

**Nikolay S. Kazak** – State Research and Production Association “Optics, Optoelectronics and Laser Technics”,  
Republic of Belarus

**Nikolay N. Kazansky** – Institute for Linguistic Studies of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation

**Yuri S. Kharin** – Research Institute of Applied Problems of Mathematics and Informatics, Republic of Belarus

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

**Sergey Ya. Kilin** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

(*Associate Editor-in-Chief*)

**Viktor I. Korzuyk** – Belarusian State University, Republic of Belarus

- Alexander A. Kovalenya** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Vitaly V. Lapa** – Institute for Soil Science and Agrochemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Mats Larsson** – Alba Nova University Center of the University of Stockholm, Sweden  
**Alexander P. Laskovnev** – Physical-Technical Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Vladimir F. Loginov** – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Anatoly A. Makhnach** – Institute of Geology, Republic of Belarus  
**Henry Markram** – Brain Institute, Center for Neurology and Technology of the Swiss Federal Institute of Technology, Switzerland  
**Anton G. Naumovets** – Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine  
**Valentin A. Orlovich** – B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Valentin N. Parmon** – Russian Academy of Sciences, Russian Federation  
**Oleg G. Penyazkov** – A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Isaak D. Rashal** – Institute of Biology of the University of Latvia, Latvia  
**Baiba A. Rivza** – Latvian Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Latvia  
**Viktor A. Sadovnichiy** – Lomonosov Moscow State University, Russian Federation  
**Nikolay S. Serdyuchenko** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Alexander M. Sergeev** – Russian Academy of Sciences, Russian Federation  
**Ivan P. Sheyko** – Scientific and Practical Center for Animal Breeding, Republic of Belarus  
**Vladimir I. Torchik** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Alexander V. Tuzikov** – United Institute of Informatics Problems of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Sergey A. Usanov** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Petr A. Vityaz** – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Igor D. Volotovskiy** – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Vitali G. Zaleski** – Physical-Technical Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus  
**Anton Zeilinger** – Austrian Academy of Sciences, Austria  
**Nikolas Zhelev** – Abertay University, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland

*Address of the Editorial Office:*

*1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.*

*Phone: +375 17 272-19-19; e-mail: doklady\_nanb@mail.ru*

*doklady.belnauka.by*

---

DOKLADY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS. 2022. Vol. 66. No. 1

*Printed in Russian, Belarusian and English languages*

---

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

Sent for press 17.02.2022. Output 25.02.2022. Format 60×84<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Offset paper.  
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 142 copies. Order 28.  
Price: individual subscription – 12.67 BYN, departmental subscription – 29.77 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, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

### МАТЕМАТИКА

<b>Корзюк В. И., Рудько Я. В.</b> Классическое решение смешанной задачи для нелинейного уравнения .....	7
<b>Хоанг Тхи Киеу Ань.</b> Компактные разностные схемы для многомерного уравнения Клейна–Гордона .....	12
<b>Калинин А. И., Лавринович Л. И.</b> Применение метода возмущений к задаче оптимизации переходного процесса в квазилинейной динамической системе .....	21

### ФИЗИКА

<b>Федотова Ю. А.</b> Электрические свойства черного мышьяка.....	26
---	----

### ХИМИЯ

<b>Жук О. Н., Слиж Д. А., Литвиновская Р. П., Томанова М. А., Жабинский В. Н., Хрипач В. А.</b> Влияние брассиностероидов на развитие мицелия базидиального гриба <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	35
<b>Семенов Д. А., Куприенко О. С., Вашкевич И. И., Свиридов О. В.</b> Некоторые металлсвязывающие свойства рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансгенных коз .....	43

### БИОЛОГИЯ

<b>Наумович Н. И., Охремчук А. Э., Валентович Л. Н., Алещенкова З. М., Ананьева И. Н., Сафронова Г. В.</b> Молекулярно-генетическая характеристика галотолерантного штамма <i>Priestia megaterium</i> БИМ В-1314Д .....	55
---	----

### МЕДИЦИНА

<b>Матвеевков М. В., Храменкова О. М., Чешик И. А.</b> Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов из распространенных лишайников юго-востока Беларуси.....	65
<b>Лобанова В. В., Висмонт Ф. И., Губкин С. В.</b> Значимость активности аргиназы печени и клеток Купфера в процессах детоксикации и формировании тиреоидного статуса у крыс при хронической алкогольной интоксикации различной тяжести .....	76

### НАУКИ О ЗЕМЛЕ

<b>Чижик С. А., Журавков М. А., Петровский А. Б., Прушак В. Я., Пузанов Д. А.</b> Расчет эффективных механических характеристик подработанного массива горных пород (на англ. яз.).....	83
<b>Романов С. Л., Червань А. Н., Коробова Е. М.</b> Особенности пространственного распространения онкологических заболеваний на территории Гомельской и Могилевской областей Беларуси .....	91
<b>Айзберг Р. Е., Грибик Я. Г., Гарецкий Р. Г.</b> Тектонические особенности разнотипных нефтегазоносных бассейнов запада Восточно-Европейской платформы .....	104

### ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

<b>Жданок С. А., Леонович С. Н., Полонина Е. Н.</b> Синергетическое влияние наночастиц SiO <sub>2</sub> и углеродных нанотрубок на свойства бетона .....	109
<b>Ильющенко А. Ф., Талако Т. Л., Лешок А. В., Лецко А. И., Пинчук Т. И.</b> Исследование влияния добавок ультрадисперсного порошка системы NiAl/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> на триботехнические свойства фрикционного материала на основе меди .....	113

### АГРАРНЫЕ НАУКИ

<b>Пестис В. К., Пешко В. В., Епишко О. А., Ситько А. А.</b> Применение ДНК-тестирования крупного рогатого скота по генам LTF и MBL1 для повышения эффективности производства молока.....	122
---	-----

**CONTENTS***MATHEMATICS*

<b>Korzyuk V. I., Rudzko J. V.</b> Classical solution of the mixed problem for a nonlinear equation.....	7
<b>Hoang Thi Kieu Anh.</b> Compact difference schemes for multidimensional Klein–Gordon equations .....	12
<b>Kalinin A. I., Lavrinovich L. I.</b> Application of the perturbation method to the problem of optimizing the transient process in a quasi-linear dynamic system .....	21

*PHYSICS*

<b>Fedotova J. A.</b> Electric properties of black arsenic .....	26
--	----

*CHEMISTRY*

<b>Zhuk O. N., Slizh D. A., Litvinovskaya R. P., Tomanova M. A., Zhabinskii V. N., Khripach V. A.</b> Influence of brassinosteroids on the development of the mycelia of basidial mushroom <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	35
<b>Semenov D. A., Kuprienko O. S., Vashkevich I. I., Sviridov O. V.</b> Some metal binding properties of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic goats .....	43

*BIOLOGY*

<b>Naumovich N. I., Akhremchuk A. E., Valentovich L. N., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronova G. V.</b> Molecular-genetic characterization of halotolerant strain <i>Priestia megaterium</i> BIM B-1314D .....	55
---	----

*MEDICINE*

<b>Matveyenkau M. V., Khramchankova V. M., Cheshik I. A.</b> Cytotoxic and photomodifying properties of extracts from the distributed lichens of the South-East of Belarus .....	65
<b>Lobanova V. V., Vismont F. I., Gubkin S. V.</b> Significance of the activity of liver arginase and Kupffer cells in the detoxification processes and the thyroid status formation in rats under alcoholic intoxication of different severity.....	76

*EARTH SCIENCES*

<b>Chizhik S. A., Zhuravkov M. A., Petrovskiy A. B., Prushak V. Ya., Puzanov D. A.</b> Calculation of the effective mechanical characteristics of the undermined rock mass .....	83
<b>Romanov S. L., Chervan A. N., Korobova E. M.</b> Spatial features of the risk of oncological diseases in the territory of the Gomel and Mogilev regions of Belarus.....	91
<b>Aizberg R. E., Gribik Ya. G., Garetsky R. G.</b> Tectonic features of different types of oil and gas bearing basins in the west of the East European platform.....	104

*TECHNICAL SCIENCES*

<b>Zhdanok S. A., Leonovich S. N., Polonina E. N.</b> Synergistic influence of SiO <sub>2</sub> nanoparticles and carbon nanotubes on the properties of concrete.....	109
<b>Ilyushchanka A. Ph., Talako T. L., Leshok A. V., Letsko A. I., Pinchuk T. I.</b> Study of the influence of ultra disperse powder additives of the NiAl/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> system on the tribotechnical properties of the frictional material based on copper .....	113

*AGRARIAN SCIENCES*

<b>Pestis V. K., Peshko V. V., Epishko O. A., Sitko A. A.</b> Using of DNA-testing of cattle for the LTF and MBL1 genes to increase the milk production efficiency.....	122
---	-----

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

## МАТЕМАТИКА

### MATHEMATICS

УДК 517.957

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-7-11>

Поступило в редакцию 24.09.2021

Received 24.09.2021

Академик В. И. Корзюк<sup>1</sup>, Я. В. Рудзько<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

### КЛАССИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ СМЕШАННОЙ ЗАДАЧИ ДЛЯ НЕЛИНЕЙНОГО УРАВНЕНИЯ

**Аннотация.** В данном сообщении рассматривается первая смешанная задача для нелинейного гиперболического уравнения в четверти плоскости, где на нижнем основании задаются условия Коши, а на боковой границе задается условие Дирихле. Решение строится методом характеристик в неявном аналитическом виде как решение интегрального уравнения. Проводится исследование разрешимости интегральных уравнений, гладкости решений и их зависимости от начальных данных. Доказывается единственность и устанавливаются условия, при которых существует кусочно-гладкое и классическое решение смешанной задачи.

**Ключевые слова:** нелинейное уравнение, классическое решение, смешанная задача, метод характеристик

**Для цитирования.** Корзюк, В. И. Классическое решение смешанной задачи для нелинейного уравнения / В. И. Корзюк, Я. В. Рудзько // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 7–11. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-7-11>

Academician Viktor I. Korzyuk<sup>1</sup>, Jan V. Rudzko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

### CLASSICAL SOLUTION OF THE MIXED PROBLEM FOR A NONLINEAR EQUATION

**Abstract.** The first mixed problem for a nonlinear equation is considered in the quarter plane. The Cauchy conditions are set at the bottom of the boundary. The Dirichlet condition is set on the left part of the boundary. The solution is constructed using the method of characteristics in an implicit analytical form as a solution of the integral equation. The solvability of these integral equations, the smoothness of the solutions, and their dependence on the initial data are investigated. The uniqueness is proved and the conditions are established, under which there exists a piecewise smooth and classical solution of the first mixed problem.

**Keywords:** nonlinear equation, classical solution, mixed problem, method of characteristics

**For citation.** Korzyuk V. I., Rudzko J. V. Classical solution of the mixed problem for a nonlinear equation. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 7–11 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-7-11>

**Введение.** Строго говоря, все сплошные среды описываются нелинейными уравнениями. Выбор для описания среды линейных или нелинейных уравнений зависит от роли, которую играют нелинейные эффекты, и определяется конкретной физической ситуацией. Например, при описании распространения лазерных импульсов необходимо учитывать зависимость показателя преломления среды от интенсивности электромагнитного поля.

Линеаризация нелинейных уравнений математической физики не всегда ведет к содержательному результату. Может оказаться, что линеаризация имеет смысл, но линейные уравнения сохраняют применимость лишь конечное время. А даже если линеаризация нелинейных уравнений математической физики возможна, с точки зрения физики исключительно важны «существенно нелинейные» решения, качественно отличающиеся от решений линейных уравнений. Такими могут быть стационарные решения солитонного типа, локализованные в одном или нескольких измерениях, или решения типа волновых коллапсов, описывающие самопроизвольную концентрацию энергии в небольших областях пространства. Существенно нелинейными являются и стационарные решения уравнений гидродинамики. Весьма важен вопрос об устойчивости существенно нелинейных решений, в том числе гидродинамических течений и солитонов,

который решается либо при помощи линеаризации нелинейных уравнений на фоне изучаемых решений, либо при помощи вариационных оценок [1].

В данном сообщении, используя метод характеристик в сочетании с методом последовательных приближений, который ранее был успешно использован для нахождения слабого решения смешанной задачи для нелинейного уравнения параболического типа [2], мы строим решение первой смешанной задачи для гиперболического нелинейного уравнения второго порядка, доказываем единственность и непрерывную зависимость решения от начальных данных, а также выводим условия, при которых решение смешанной задачи будет классическим.

**Постановка задачи.** В области  $Q = (0, \infty) \times (0, \infty)$  двух независимых переменных  $(t, x) \in \bar{Q} \subset \mathbb{R}^2$  рассмотрим одномерное нелинейное уравнение

$$\square u(t, x) - \lambda(t, x)f(t, x, u(t, x)) = F(t, x), \quad (1)$$

где  $\square = \partial_t^2 - a^2 \partial_x^2$  (оператор Д'Аламбера);  $a > 0$  (для определенности);  $F$  и  $\lambda$  – функции, заданные на множестве  $\bar{Q}$ ;  $f$  – функция, заданная на множестве  $[0, \infty) \times [0, \infty) \times \mathbb{R}$  и удовлетворяющая условию Липшица с постоянной  $L$  по третьей переменной, т. е.  $|f(t, x, z_1) - f(t, x, z_2)| \leq L|z_1 - z_2|$ . К уравнению (1) присоединяются начальные условия

$$u(0, x) = \varphi(x), \quad \partial_t u(0, x) = \psi(x), \quad x \in [0, \infty), \quad (2)$$

и граничное условие

$$Bu(t, 0) = \mu(t), \quad t \in [0, \infty), \quad (3)$$

где  $\varphi, \psi, \mu$  – функции, заданные на множестве  $[0, \infty)$ ;  $B$  – некоторый оператор (может иметь различный вид), в данной работе будем полагать, что  $B = Id$  (тождественный оператор).

**Пример.** Если в уравнении (1) положить  $f(t, x, z) = \sin(z)$ ,  $\lambda \equiv 1$ ,  $F \equiv 0$  и  $a = 1$ , то получим уравнение синус-Гордона.

**Интегральное уравнение.** Область  $Q$  характеристикой  $\underline{x} - at = 0$  разделим на две подобласти  $Q^{(j)} = \{(t, x) | (-1)^j (at - x) > 0\}$ ,  $j = 1, 2$ . В замыкании  $\bar{Q}^{(j)}$  каждой из подобластей  $Q^{(j)}$  рассмотрим интегральные уравнения

$$u^{(j)}(t, x) = g^{(1,j)}(x - at) + g^{(2)}(x + at) - \frac{1}{4a^2} \int_0^{x-at} dy \int_{(-1)^j(at-x)}^{x+at} \left[ F\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) + \lambda\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) \times f\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(j)}\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right)\right) \right] dz. \quad (4)$$

Определим функцию  $u$  и решения интегральных уравнений (1) на всем замыкании  $\bar{Q}$  области  $Q$  формулой

$$u(t, x) = u^{(j)}(t, x), \quad (t, x) \in \bar{Q}^{(j)}, \quad j = 1, 2. \quad (5)$$

**Теорема 1.** *Функция  $u$  принадлежит классу  $C^2(\bar{Q}^{(1)})$ ,  $C^2(\bar{Q}^{(2)})$  и удовлетворяет уравнению (1) тогда и только тогда, когда она представима в виде (4), (5) и функции  $g^{(1,1)}$ ,  $g^{(1,2)}$  и  $g^{(2)}$  из классов  $C^2(\mathcal{D}(g^{(1,1)}))$ ,  $C^2(\mathcal{D}(g^{(1,2)}))$  и  $C^2(\mathcal{D}(g^{(2)}))$  соответственно.*

**Доказательство.** Пусть  $u \in C^2(\bar{Q}^{(j)})$ ,  $j = 1, 2$ , и удовлетворяет уравнению (4). Сделав невырожденную замену переменных независимых  $\xi = x - at$  и  $\eta = x + at$  получим новое дифференциальное уравнение  $\partial_\xi \partial_\eta u(\xi, \eta) + \frac{1}{4a^2} \lambda\left(\frac{\eta - \xi}{2a}, \frac{\eta + \xi}{2}\right) f\left(\frac{\eta - \xi}{2a}, \frac{\eta + \xi}{2}, u(\xi, \eta)\right) = -\frac{1}{4a^2} F\left(\frac{\eta - \xi}{2a}, \frac{\eta + \xi}{2}\right)$ . Его интегрируем дважды. В результате получаем уравнения

$$u^{(j)}(\xi, \eta) = g^{(1,j)}(\xi) + g^{(2)}(\eta) - \frac{1}{4a^2} \int_0^\xi dy \int_{(-1)^{j+1}\xi}^\eta \left( F\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) + \lambda\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) f\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(j)}(y, z)\right) \right) dz, \quad \left(\frac{\eta - \xi}{2a}, \frac{\eta + \xi}{2}\right) \in \bar{Q}^{(j)}, \quad j = 1, 2.$$

Возвращаясь к переменным  $t$  и  $x$ , получаем интегральное уравнение (4). Отсюда также следует принадлежность функций  $g^{(1,1)}$ ,  $g^{(1,2)}$  и  $g^{(2)}$  классам  $C^2(\mathcal{D}(g^{(1,1)}))$ ,  $C^2(\mathcal{D}(g^{(1,2)}))$  и  $C^2(\mathcal{D}(g^{(2)}))$  соответственно. Значит, любое решение уравнений (1) является решением уравнения (4). Теперь функцию  $u$ , определяемую формулами (4), (5), где функции  $g^{(1,1)}$ ,  $g^{(1,2)}$  и  $g^{(2)}$  из классов  $C^2(\mathcal{D}(g^{(1,1)}))$ ,  $C^2(\mathcal{D}(g^{(1,2)}))$  и  $C^2(\mathcal{D}(g^{(2)}))$  соответственно, подставляем в уравнение (1). В результате получаем верное равенство. Значит, любое решение уравнений (4) является решением уравнения (1).

**Т е о р е м а 2.** Пусть заданы непрерывные функции  $g^{(1,1)}$ ,  $g^{(1,2)}$  и  $g^{(2)}$ . Тогда решения уравнений (4) существуют, единственны и непрерывно зависят от исходных данных.

**Т е о р е м а 3.** Уравнения (4) имеют решения  $u^{(j)}$  ( $j=1, 2$ ) из класса  $C^2(\overline{Q^{(j)}})$ , если  $F \in C^1(\overline{Q})$ ,  $\lambda \in C^1(\overline{Q})$ ,  $f \in C^1(\overline{Q} \times \mathbb{R})$ ,  $f$  непрерывна и удовлетворяет условию Липшица с постоянной  $L$  по третьей переменной, т. е.  $|f(t, x, z_1) - f(t, x, z_2)| \leq L|z_1 - z_2|$ ,  $g^{(1,j)} \in C^2(\mathcal{D}(g^{(1,j)}))$ ,  $g^{(2)} \in C^2(\mathcal{D}(g^{(2)}))$ .

Для доказательства теорем 2, 3 необходимо воспользоваться методом последовательных приближений аналогично тому, как это было сделано в [3], и применить условие Липшица при вычислении оценок для последовательных приближений.

*Замечание.* Условия теоремы 3 могут быть ослаблены:  $g^{(1,j)} \in C^1(\mathcal{D}(g^{(1,j)}))$ ,  $g^{(2)} \in C^1(\mathcal{D}(g^{(2)}))$ , ( $j=1, 2$ ). Но в таком случае функции  $u^{(j)}$  будут из класса  $C^1(\overline{Q^{(j)}})$ .

**Построение решения смешанной задачи.** Теперь продемонстрируем наш метод решения смешанных задач на примере задачи (1)–(3) при  $B = Id$  (тождественный оператор), т. е. условие (3) имеет простой вид  $u(t, 0) = \mu(t)$  (условие Дирихле).

Функции  $g^{(1,1)}$  и  $g^{(2)}$  определяем из условий Коши (2). Подставляя соотношение (4) при  $j=1$  в условия (2) получим систему относительно функций  $g^{(1,1)}$  и  $g^{(2)}$

$$\begin{aligned} u^{(1)}(0, x) &= \varphi(x) = g^{(1,1)}(x) + g^{(2)}(x), \quad x > 0, \\ \partial_t u^{(1)}(0, x) &= \psi(x) = -aDg^{(1,1)}(x) + aDg^{(2)}(x) - \\ &- \frac{1}{2a} \int_0^x \left[ \lambda \left( \frac{x-y}{2a}, \frac{x+y}{2} \right) f \left( \frac{x-y}{2a}, \frac{x+y}{2}, u^{(1)} \left( \frac{x-y}{2a}, \frac{x+y}{2} \right) \right) + F \left( \frac{x-y}{2a}, \frac{x+y}{2} \right) \right] dy, \quad x > 0. \end{aligned}$$

Проинтегрировав второе уравнение от 0 до  $x$ , получим

$$\begin{aligned} g^{(1,1)}(x) + g^{(2)}(x) &= \varphi(x), \quad x > 0, \\ -g^{(1,1)}(x) + g^{(2)}(x) &= \frac{1}{a} \int_0^x \psi(z) dz + \frac{1}{2a^2} \times \\ &\times \int_0^x dz \int_0^z \left[ F \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) + \lambda \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) f \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(1)} \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) \right) \right] dy + 2C, \quad x > 0. \end{aligned}$$

Откуда

$$\begin{aligned} g^{(1,1)}(x) &= \frac{\varphi(x)}{2} - \frac{1}{2a} \int_0^x \psi(z) dz - C - \frac{1}{4a^2} \times \\ &\times \int_0^x dz \int_0^z \left[ F \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) + \lambda \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) f \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(1)} \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) \right) \right] dy, \quad x > 0, \end{aligned} \tag{6}$$

$$\begin{aligned} g^{(2)}(x) &= \frac{\varphi(x)}{2} + \frac{1}{2a} \int_0^x \psi(z) dz + C + \frac{1}{4a^2} \times \\ &\times \int_0^x dz \int_0^z \left[ F \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) + \lambda \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) f \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(1)} \left( \frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2} \right) \right) \right] dy, \quad x > 0, \end{aligned} \tag{7}$$

где  $C$  – произвольная константа из множества действительных чисел. Функцию  $g^{(1,2)}$  определяем из граничного условия. Подставляя соотношение (4) при  $j=2$  в условия (3) получим уравнение

относительно функции  $g^{(1,2)}$ :  $g^{(1,2)}(-at) + g^{(2)}(at) = \mu(t)$ . Сделав замену  $t = -z/a$ , получим  $g^{(1,2)}(z) = \mu(-z/a) - g^{(2)}(-z)$ . Отсюда

$$g^{(1,2)}(x) = \mu\left(-\frac{x}{a}\right) - \frac{\varphi(-x)}{2} - \frac{1}{2a} \int_0^{-x} \psi(z) dz - C - \frac{1}{4a^2} \times \\ \times \int_0^{-x} dz \int_0^z \left[ F\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) + \lambda\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) f\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(1)}\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right)\right) \right] dy, \quad x < 0. \quad (8)$$

Подставив формулы (6)–(8) в исходные интегральные уравнения (4), получим

$$u^{(1)}(t, x) = \frac{\varphi(x-at) + \varphi(x+at)}{2} + \frac{1}{2a} \int_{x-at}^{x+at} \psi(z) dz + \frac{1}{4a^2} \int_{x-at}^{x+at} dz \int_{x-at}^z \times \\ \times \left[ F\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) + \lambda\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) f\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(1)}\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right)\right) \right] dy, \quad (t, x) \in \overline{Q^{(1)}}, \\ u^{(2)}(t, x) = \mu\left(t - \frac{x}{a}\right) + \frac{\varphi(x+at) - \varphi(x-at)}{2} + \frac{1}{2a} \int_{at-x}^{x+at} \psi(z) dz - \\ - \frac{1}{4a^2} \int_0^{x-at} dy \int_{at-x}^{x+at} \left[ F\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) + \lambda\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) f\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(2)}\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right)\right) \right] dz + \\ + \frac{1}{4a^2} \int_{at-x}^{x+at} dz \int_0^z \left[ F\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) + \lambda\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right) f\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}, u^{(1)}\left(\frac{z-y}{2a}, \frac{z+y}{2}\right)\right) \right] dy, \quad (t, x) \in \overline{Q^{(2)}}. \quad (9)$$

**Л е м м а.** Пусть выполняются условия  $\lambda \in C^1(\overline{Q})$ ,  $f \in C^1(\overline{Q} \times \mathbb{R})$ ,  $F \in C^1(\overline{Q})$ ,  $\varphi \in C^2([0, \infty))$ ,  $\psi \in C^1([0, \infty))$ ,  $\mu \in C^2([0, \infty))$  и функция  $f$  удовлетворяет условию Липшица с постоянной  $L$  по третьей переменной, т. е.  $|f(t, x, z_1) - f(t, x, z_2)| \leq L|z_1 - z_2|$ . Тогда решения  $u^{(j)}$  ( $j = 1, 2$ ) уравнений (9) существует, единственно в классе  $C^2(\overline{Q})$  и непрерывно зависит от начальных функций  $\varphi, \psi, \mu$ .

**Д о к а з а т е л ь с т в о.** Утверждение данной леммы следует из теоремы 3.

Таким образом, построено кусочно-гладкое решение задачи (1)–(3), которое определяется формулами (8) и (5).

**Анализ решения смешанной задачи.** Чтобы функция  $u$  принадлежала множеству  $C^2(\overline{Q})$ , кроме требований гладкости для функций  $f, F, \lambda$ , необходимо совпадение на характеристике  $x - at$  значений  $u^{(j)}(t, x)$  функций  $u^{(j)}$  ( $j = 1, 2$ ) и их производных первого и второго порядков, т. е.

$$\partial_t^k \partial_x^p u^{(1)}(t, x=at) = \partial_t^k \partial_x^p u^{(2)}(t, x=at), \quad 0 \leq k + p \leq 2. \quad (10)$$

При  $p = k = 0$  равенство (10) эквивалентно  $\mu(0) = \varphi(0)$ . Предельные значения производных первого порядка на характеристике  $x - at = 0$  совпадают, если выполняется условие

$$\mu'(0) - \psi(0) + \frac{1}{4a} \int_0^{2at} \lambda\left(\frac{z}{2a}, \frac{z}{2}\right) \left[ f\left(\frac{z}{2a}, \frac{z}{2}, u^{(2)}\left(\frac{z}{2a}, \frac{z}{2}\right)\right) - f\left(\frac{z}{2a}, \frac{z}{2}, u^{(1)}\left(\frac{z}{2a}, \frac{z}{2}\right)\right) \right] dz = 0. \quad (11)$$

Теперь, в предположении выполнения равенства (10) при  $p = k = 0$  и непрерывности функции  $f$ , равенство (11) будет эквивалентно  $\mu'(0) = \psi(0)$ . Аналогично, если выполнены условия  $\mu(0) = \varphi(0)$  и  $\mu'(0) = \psi(0)$ , и функция  $f$  будет непрерывно-дифференцируема, то условие (10) при  $p + k = 2$  будет эквивалентно выражению  $\mu''(0) = \frac{1}{2} \lambda(0, 0) (f(0, 0, \mu(0)) + f(0, 0, \varphi(0))) + F(0, 0) + a^2 \varphi''(0)$ . Результат сформулируем в виде теоремы.

**Т е о р е м а 4.** Пусть выполняются условия  $\lambda \in C^1(\overline{Q})$ ,  $f \in C^1(\overline{Q} \times \mathbb{R})$ ,  $F \in C^1(\overline{Q})$ ,  $\varphi \in C^2([0, \infty))$ ,  $\psi \in C^1([0, \infty))$ ,  $\mu \in C^2([0, \infty))$ , и функция  $f$  удовлетворяет условию Липшица с постоянной  $L$  по

третьей переменной, т. е.  $|f(t, x, z_1) - f(t, x, z_2)| \leq L|z_1 - z_2|$ . Первая смешанная задача (1)–(3) имеет единственное решение и, определенное формулами (5) и (9), из класса  $C^2(\bar{Q})$  тогда и только тогда, когда  $\mu''(0) = \lambda(0, 0)f(0, 0, \varphi(0)) + F(0, 0) + a^2\varphi''(0)$ ,  $\mu'(0) = \psi(0)$  и  $\mu(0) = \varphi(0)$ .

Доказательство теоремы 4 следует из леммы и рассуждений выше.

**Заключение.** В сообщении были сформулированы необходимые и достаточные условия, при выполнении которых существует единственное классическое решение первой смешанной задачи в четверти плоскости для одномерного гиперболического нелинейного уравнения. Показана зависимость гладкости решения от гладкости начальных функций. Одним из важнейших результатов является то, что предложен метод для вывода необходимых и достаточных условий существования классических решений для смешанных задач для нелинейных уравнений. В дальнейшем планируется изучить другие смешанные задачи для нелинейных уравнений.

### Список использованных источников

1. Физическая энциклопедия: в 5 т. / редкол.: А. М. Прохоров (гл. ред.) [и др.]. – М., 1992. – Т. 3. – 642 с.
2. Evans, L. C. *Partial differential equations* / L. C. Evans. – Providence, R. I., 2010. – 749 p. <https://doi.org/10.1090/gsm/019>
3. Столярчук, И. И. Классические решения смешанных задач для уравнения Клейна–Гордона–Фока / И. И. Столярчук. – Гродно, 2020. – 124 л.

### References

1. Prokhorov A. M. [et al.], eds. *Physical Encyclopedia: in 5 vol.* Moscow, 1992, vol. 3. 642 p. (in Russian).
2. Evans L. C. *Partial differential equations*. Providence, R. I., 2010. 749 p. <https://doi.org/10.1090/gsm/019>
3. Staliarchuk I. I. *Classical solutions of the problems for Klein–Gordon–Fock equation*. Hrodna, 2020. 124 p. (in Russian).

### Информация об авторах

*Корзюк Виктор Иванович* – академик, д-р физ.-мат. наук, профессор. Институт математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: korzyuk@bsu.by.

*Рудько Ян Вячеславович* – магистрант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: janycz@yahoo.com. Orcid: 0000-0002-1482-9106.

### Information about the authors

*Korzyuk Viktor I.* – Academician, D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor. Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: korzyuk@bsu.by.

*Rudzko Jan V.* – Master's degree student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: janycz@yahoo.com. Orcid: 0000-0002-1482-9106.

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 519.63

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-12-20>

Поступило в редакцию 08.09.2021

Received 08.09.2021

**Хоанг Тхи Киеу Ань<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*<sup>2</sup>*Университет природных ресурсов и окружающей среды, Хошимин, Вьетнам***КОМПАКТНЫЕ РАЗНОСТНЫЕ СХЕМЫ  
ДЛЯ МНОГОМЕРНОГО УРАВНЕНИЯ КЛЕЙНА–ГОРДОНА***(Представлено членом-корреспондентом П. П. Матусом)*

**Аннотация.** В настоящей работе рассматриваются компактные разностные схемы порядка  $O(|h|^4 + \tau^2)$  для уравнения Клейна–Гордона в многомерном случае. При изучении устойчивости этих разностных схем используется теория операторно-разностных схем А. А. Самарского и доказывается сильная устойчивость разностного решения по отношению к малому возмущению начальных условий, правой части и коэффициентов уравнений. Теоретические результаты подтверждаются тестовыми численными расчетами.

**Ключевые слова:** компактная разностная схема, многомерное уравнение Клейна–Гордона, априорные оценки, устойчивость, сходимость

**Для цитирования.** Хоанг Тхи Киеу Ань. Компактные разностные схемы для многомерного уравнения Клейна–Гордона / Хоанг Тхи Киеу Ань // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 12–20. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-12-20>

**Hoang Thi Kieu Anh<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup>*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*<sup>2</sup>*Ho Chi Minh City University of Natural Resources and Environment, Vietnam***COMPACT DIFFERENCE SCHEMES FOR MULTIDIMENSIONAL KLEIN–GORDON EQUATIONS***(Communicated by Corresponding Member Petr P. Matus)*

**Abstract.** In this article, we consider a compact difference approximation of the schemes of order  $O(|h|^4 + \tau^2)$ ,  $h = (h_1, h_2, \dots, h_p)$  for the Klein–Gordon equations in the multidimensional case. In studying the stability of these difference schemes, the theory of operator-difference schemes by A. A. Samarskii is used, and the strong stability of difference schemes is proved with respect to a small perturbation of the initial conditions, the right-hand side and the coefficients of the equations. The theoretical results are confirmed by test numerical calculations.

**Keywords:** compact difference schemes, multidimensional Klein–Gordon equation, priori estimates, stability, convergence

**For citation.** Hoang Thi Kieu Anh. Compact difference schemes for multidimensional Klein–Gordon equations. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 12–20 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-12-20>

**Введение.** Перспективным направлением разработки высокоточных разностных схем для уравнений гиперболического типа является их поиск среди схем, обладающих минимальным пространственным шаблоном, т. е. среди так называемых компактных схем [1; 2]. Такие схемы строятся и изучаются, например, для двумерных уравнений гиперболического типа в [3] и [4]. Компактные схемы четвертого порядка аппроксимации для волнового уравнения рассматриваются в работах А. А. Злотника [5; 6]. Там доказывается условная устойчивость разностных схем.

В [7] рассматривались трехточечные компактные разностные схемы для уравнения Клейна–Гордона в одномерном случае. Это уравнение, в частности, используется при изучении солитонов и в физике конденсированного вещества [8]. В настоящей работе компактные разностные схемы обобщены на случай многомерного уравнения Клейна–Гордона. Доказана устойчивость по

начальным данным, правой части и коэффициентам. Теоретические выводы подтверждаются результатами проведенных тестовых расчетов.

**Постановка задачи и разностная схема.** Пусть  $\bar{G} = \{x = (x_1, \dots, x_p); 0 \leq x_\alpha \leq l_\alpha; \alpha = 1, \dots, p\}$  является  $p$ -мерным прямоугольным параллелепипедом,  $\Gamma$  – его граница, так что  $\bar{G} = G \cup \Gamma$ . В цилиндре  $\bar{Q}_T = \bar{G} \times [0 \leq t \leq T]$  рассмотрим начально-краевую задачу для многомерного уравнения Клейна–Гордона

$$\frac{\partial^2 u}{\partial t^2} = \sum_{\alpha=1}^p L_\alpha u - mu + f(x, t), \quad m > 0, \quad (x, t) \in Q_T = G \times [0 < t \leq T], \quad (1)$$

$$u(x, 0) = u_0(x), \quad x \in \bar{G}, \quad \frac{\partial u}{\partial t}(x, 0) = \bar{u}_0(x), \quad x \in G, \quad (2)$$

$$u(x, t) = \mu(x, t), \quad x \in \Gamma, \quad 0 < t \leq T, \quad (3)$$

где  $L_\alpha u = \frac{\partial^2 u}{\partial x_\alpha^2}$ ,  $\alpha = 1, \dots, p$ .

Уравнение Клейна–Гордона (1) является обобщением волнового уравнения и используется для описания быстро движущихся частиц, имеющих массу покоя [7]. Здесь и далее относительно решения дифференциальной задачи будем предполагать, что оно существует, единственно и обладает всеми непрерывными в  $\bar{Q}_T$  производными, необходимыми по ходу изложения.

В  $\bar{G}$  построим разностную сетку:  $\bar{\omega}_h = \{x_i = (i_1 h_1, \dots, i_p h_p); i_\alpha = 0, 1, \dots, N_\alpha; h_\alpha = l_\alpha / N_\alpha; \alpha = 1, \dots, p\} = \omega_h \cup \gamma_h$  и равномерную сетку  $\bar{\omega}_\tau = \{t_n = n\tau; 0 \leq n \leq N_0; \tau = T / N_0\} = \omega_\tau \cup T$ . Сетка  $\bar{\omega}_h$  равномерна по каждой из пространственных переменных. Здесь  $\gamma_h = \{x_i \in \Gamma \cap \bar{\omega}_h\}$  – множество узлов сетки  $\bar{\omega}_h$ , которые принадлежат границе  $\Gamma$ . На построенной сетке узлов  $\bar{\omega} = \bar{\omega}_h \times \bar{\omega}_\tau$  напомним для исходной задачи (1)–(3) разностную схему

$$y_{\bar{n}} = \sum_{\alpha=1}^p \Lambda_\alpha y^{(\sigma_\alpha, \sigma_\alpha)} + \frac{1}{12} \sum_{\substack{\alpha, \beta=1 \\ \alpha \neq \beta}}^p h_\alpha^2 \Lambda_\alpha \Lambda_\beta y - m y^* + \varphi, \quad (x, t) \in \omega_h \times \omega_\tau, \quad (4)$$

$$y(x, 0) = u_0(x), \quad x \in \bar{\omega}_h, \quad y_t(x, 0) = u_1(x), \quad x \in \omega_h, \quad (5)$$

$$y(x, t) = \mu(x, t), \quad x \in \gamma_h, \quad t \in \omega_\tau, \quad (6)$$

где

$$\Lambda_\alpha y = y_{\bar{x}_\alpha x_\alpha}, \quad \varphi = f^*, \quad v^* = v + \frac{1}{12} \sum_{\alpha=1}^p h_\alpha^2 \Lambda_\alpha v,$$

$$\sigma_\alpha = \sigma - \frac{h_\alpha^2}{12\tau^2}, \quad |h| = \sqrt{h_1^2 + \dots + h_p^2}, \quad \alpha = 1, \dots, p,$$

$$u_1(x) = \bar{u}_0(x) + \frac{\tau}{2} \left[ \sum_{\alpha=1}^p L_\alpha u(x, 0) - m u(x, 0) + f(x, 0) \right], \quad x \in \omega_h.$$

В работе используются обозначения из [9; 10].

На основе результатов работы А. А. Самарского для многомерного уравнения теплопроводности [11], нетрудно показать, что разностная схема (4)–(6) имеет порядок погрешности аппроксимации  $O(|h|^4 + \tau^2)$ . Для разностного уравнения (4) рассмотрим невязку

$$\psi = -u_{\bar{n}} + \sum_{\alpha=1}^p \Lambda_\alpha u + \sum_{\alpha=1}^p \left( \sigma\tau^2 - \frac{h_\alpha^2}{12} \right) \Lambda_\alpha u_{\bar{n}} + \frac{1}{12} \sum_{\substack{\alpha, \beta=1 \\ \alpha < \beta}}^p (h_\alpha^2 + h_\beta^2) \Lambda_\alpha \Lambda_\beta u - m u^* + \varphi.$$

Так как  $\sum_{\alpha=1}^p \Lambda_{\alpha} u = \sum_{\alpha=1}^p L_{\alpha} u + \frac{1}{12} \sum_{\alpha=1}^p h_{\alpha}^2 \Lambda_{\alpha} (u_{\bar{t}} + mu - f) - \frac{1}{12} \sum_{\substack{\alpha, \beta=1 \\ \alpha < \beta}}^p (h_{\alpha}^2 + h_{\beta}^2) \Lambda_{\alpha} \Lambda_{\beta} u + O(|h|^4 + \tau^2)$ , и, следовательно,

$$\|\Psi\| \leq M(|h|^4 + \tau^2), \quad M = \text{const} > 0. \quad (7)$$

Для погрешности аппроксимации второго начального условия имеет место оценка

$$\left\| \overset{o}{\Psi} \right\| = \|u_1 - u_t^0\| \leq M_1 \tau^2, \quad M_1 = \text{const} > 0. \quad (8)$$

Итак, разностная схема (4)–(6) аппроксимирует исходную дифференциальную задачу с порядком  $O(|h|^4 + \tau^2)$ .

**Устойчивость по начальным данным и правой части.** Аналогично случаю  $p = 1$  [12, с. 527], в двумерном случае  $p = 2$  мы рассмотрим такую же задачу для возмущения  $\bar{y} = \tilde{y} - y$ , в которой  $\tilde{y}$  – это возмущенное решение, полученное по разностной схеме (4)–(6) с возмущенной правой частью  $\tilde{f}$  и возмущенными начальными условиями  $\tilde{u}_0, \tilde{u}_1$ . И тогда для изучения устойчивости по начальным данным и правой части этих схем можно использовать общую теорию операторно-разностных схем А. А. Самарского [12].

Пусть задано вещественное конечномерное гильбертово пространство  $H = H_h$ , состоящее из сеточных функций, заданных на  $\bar{\omega}_h$  и равных нулю на  $\gamma_h$ , со скалярным произведением

$$(u, v) = \sum_{x \in \omega_h} h_1 h_2 u(x) v(x) = \sum_{i_1=1}^{N_1-1} \sum_{i_2=1}^{N_2-1} h_1 h_2 u(i_1 h_1, i_2 h_2) v(i_1 h_1, i_2 h_2)$$

и нормой  $\|y\| = \sqrt{(y, y)}$ . Оператор  $(A\bar{y})_{i_1 i_2} = -\bar{y}_{\bar{x}_1 x_1, i_1 i_2} - \bar{y}_{\bar{x}_2 x_2, i_1 i_2} = (A_1 \bar{y})_{i_1 i_2} + (A_2 \bar{y})_{i_1 i_2}$  самосопряжен и положителен в  $H$ . Норма в энергетическом пространстве  $H_A$  имеет вид

$$\|y\|_A = \left\| y_{\bar{x}_1} \right\|^2 + \left\| y_{\bar{x}_2} \right\|^2,$$

где  $\left\| y_{\bar{x}_\alpha} \right\| = (y_{\bar{x}_\alpha}, y_{\bar{x}_\alpha})^{1/2} = \left( \sum_{i_1=1}^{N_1} \sum_{i_2=1}^{N_2} h_1 h_2 y_{\bar{x}_\alpha, i_1 i_2} \right)^{1/2}$ ,  $\alpha = 1, 2$ .

Задача для возмущения  $\bar{y} = \tilde{y} - y$  может быть записана в операторном виде

$$D\bar{y}_{\bar{t}} + A_0 \bar{y} = \bar{\varphi}, \quad (9)$$

$$\bar{y}(0) = \bar{u}_0, \quad \bar{y}_t(0) = \bar{u}_1, \quad (10)$$

в котором

$$D = E + \tau^2 (\sigma_1 A_1 + \sigma_2 A_2), \quad (11)$$

$$A_0 = A_1 + A_2 - \frac{h_1^2 + h_2^2}{12} A_1 A_2 + mE - \frac{m}{12} (h_1^2 A_1 + h_2^2 A_2), \quad (12)$$

$$\bar{u}_0 = \tilde{u}_0 - u_0, \quad \bar{u}_1 = \tilde{u}_1 - u_1, \quad \bar{\varphi} = \tilde{\varphi} - \varphi.$$

Пусть  $\delta = \frac{1}{3}(4\bar{l} + m)$ ,  $\bar{l} = \min \left\{ \frac{8}{l_1^2}, \frac{8}{l_2^2} \right\}$ . Так как операторы  $A_1, A_2$  положительны и самосопряжены на  $H$ , то  $\delta E < A_0^* = A_0$ :

$$A_0 = \left( E - \frac{h_1^2}{12} A_1 \right) A_2 + \left( E - \frac{h_2^2}{12} A_2 \right) A_1 + mE - \frac{m}{12} (h_1^2 A_1 + h_2^2 A_2) \geq \geq \frac{2}{3} (A_1 + A_2) + \frac{m}{3} E \geq \delta E.$$

Для получения априорных оценок разностного решения воспользуемся следующим утверждением.

**Л е м м а 1** [9, с. 373]. Пусть в канонической форме (9), (10) операторы  $D, A_0$  являются постоянными, положительными и самосопряженными в  $H$ , выполнено неравенство

$$D \geq \frac{1+\varepsilon}{4} \tau^2 A_0, \quad \varepsilon > 0 - \text{любое число.} \tag{13}$$

Тогда для решения схемы (9), (10) имеет место априорная оценка

$$\| \bar{y}^{n+1} \|_D \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \| \bar{y}(0) \|_D + \| D \bar{y}_t(0) \|_{A_0^{-1}} + \sum_{s=1}^n \tau \| \bar{\varphi}_s \|_{A_0^{-1}} \right). \tag{14}$$

В частности, для

$$D \geq E, \quad A_0^{-1} \leq \frac{1}{\delta} E,$$

оценка (14) примет вид

$$\| \bar{y}^{n+1} \| \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \| \bar{y}(0) \|_D + \frac{1}{\delta} \| D \bar{y}_t(0) \| + \frac{1}{\delta} \sum_{s=1}^n \tau \| \bar{\varphi}_s \| \right), \tag{15}$$

где  $\| v \|_D^2 = (Dv, v), v \in H$ .

Очевидно, что при условиях

$$\frac{1+\varepsilon}{4} + \frac{|h|^2}{12\tau^2} \leq \sigma \leq 1, \quad \tau \leq \tau_0, \quad \tau_0 = \frac{2}{\sqrt{(1+\varepsilon)m}} \tag{16}$$

$E < D^* = D$  и неравенство (13) выполнено. В самом деле, подставим в (13) выражения (11), (12):

$$D - \frac{1+\varepsilon}{4} \tau^2 A_0 = \left( 1 - \frac{1+\varepsilon}{4} m \tau^2 \right) E + \tau^2 \sum_{\alpha=1}^2 \left( \sigma_\alpha - \frac{1+\varepsilon}{4} \right) A_\alpha + \frac{1+\varepsilon}{4} \tau^2 \left( \frac{h_1^2 + h_2^2}{12} A_1 A_2 + \frac{m}{12} \sum_{\alpha=1}^2 h_\alpha^2 A_\alpha \right).$$

В силу положительности операторов  $A_1, A_2$  условие (13) выполнено, т. е.  $D - \frac{1+\varepsilon}{4} \tau^2 A_0 \geq 0$ , если  $1 - \frac{1+\varepsilon}{4} m \tau^2 \geq 0$  и  $\sigma_\alpha - \frac{1+\varepsilon}{4} \geq 0, \alpha = 1, 2$ . Это приводит к условиям (16). Тогда можно воспользоваться оценкой (15) для априорной оценки разностного решения задачи (9), (10).

Итак, имеет место следующее утверждение.

**Т е о р е м а 1.** Пусть выполнены следующие условия

$$\frac{1+\varepsilon}{4} + \frac{|h|^2}{12\tau^2} \leq \sigma \leq 1, \quad \tau \leq \tau_0, \quad \tau_0 = \frac{2}{\sqrt{(1+\varepsilon)m}}. \tag{17}$$

Тогда решение разностной схемы (9), (10) устойчиво по начальным данным, правой части и для его решения имеет место априорная оценка

$$\| \bar{y}^{n+1} \| \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \| \bar{u}_0 \|_D + \frac{1}{\delta} \| D \bar{u}_1 \| + \frac{1}{\delta} \sum_{s=1}^n \tau \| \bar{\varphi}_s \| \right), \quad \forall n = 0, 1, \dots, N_0 - 1. \tag{18}$$

**З а м е ч а н и е 1.** В трехмерном случае  $p = 3$  при выполнении условия (17) разностные схемы (9) и (10) устойчивы по начальным данным, правой части и справедлива оценка

$$\|\bar{y}^{n+1}\| \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \|\bar{u}_0\|_D + \frac{1}{\delta_1} \|D\bar{u}_1\| + \frac{1}{\delta_1} \sum_{s=1}^n \tau \|\bar{\varphi}_s\| \right), \quad \forall n = 0, 1, \dots, N_0 - 1,$$

где  $\delta_1 = 8\bar{l}_1$ ,  $\bar{l}_1 = \min \left\{ \frac{1}{l_1^2}, \frac{1}{l_2^2}, \frac{1}{l_3^2} \right\}$ .

**Сильная устойчивость.** При исследовании корректности начально-краевых задач для нестационарных уравнений математической физики основное внимание уделяется устойчивости решения по начальным данным и правой части. В более общей ситуации необходимо требовать непрерывную зависимость и от возмущения операторов задачи, например, от коэффициентов уравнения. В этом случае говорят о сильной устойчивости. В этой работе исследуется сильная устойчивость разностных схем, когда имеет место возмущение коэффициента  $\tilde{m}$ :

$$\tilde{y}_{\bar{n}} = \sum_{\alpha=1}^p \Lambda_{\alpha} \tilde{y}^{(\sigma_{\alpha}, \sigma_{\alpha})} + \frac{1}{12} \sum_{\substack{\alpha, \beta=1 \\ \alpha \neq \beta}}^p h_{\alpha}^2 \Lambda_{\alpha} \Lambda_{\beta} \tilde{y} - \tilde{m} \tilde{y}^* + \tilde{\varphi}, \quad (x, t) \in \omega_h \times \omega_{\tau}, \quad (19)$$

$$\tilde{y}(x, 0) = \tilde{u}_0(x), \quad x \in \bar{\omega}_h, \quad \tilde{y}_t(x, 0) = \tilde{u}_1(x), \quad x \in \omega_h, \quad (20)$$

$$\tilde{y}(x, t) = \mu(x, t), \quad x \in \gamma_h, \quad t \in \omega_{\tau}. \quad (21)$$

Вычитая из уравнений (19)–(21) соответствующие уравнения (4)–(6), получим задачу

$$D\bar{y}_{\bar{n}} + \tilde{A}_0 \bar{y} = \bar{\varphi} - (\tilde{A}_0 - A_0)y,$$

$$\bar{y}(0) = \bar{u}_0, \quad \bar{y}_t(0) = \bar{u}_1,$$

$$D = E + \tau^2(\sigma_1 A_1 + \sigma_2 A_2), \quad \tilde{A}_0 = A_1 + A_2 - \frac{h_1^2 + h_2^2}{12} A_1 A_2 + \tilde{m}E - \frac{\tilde{m}}{12} (h_1^2 A_1 + h_2^2 A_2).$$

**Т е о р е м а 2.** Пусть выполнены следующие соотношения

$$\frac{1+\varepsilon}{4} + \frac{|h|^2}{12\tau^2} \leq \sigma \leq 1, \quad \tau \leq \tau_0, \quad \tau_0 = \frac{2}{\sqrt{(1+\varepsilon)\tilde{m}}}, \quad \bar{m} = \max\{m, \tilde{m}\}. \quad (22)$$

Тогда решение разностной схемы (4)–(6) сильно устойчиво и для ее возмущения  $\bar{y} = \tilde{y} - y$  имеет место априорная оценка

$$\|\tilde{y}^{n+1} - y^{n+1}\| \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left\{ \|\tilde{u}_0 - u_0\|_D + \frac{1}{\delta} \|D(\tilde{u}_1 - u_1)\| + \frac{1}{\delta} \sum_{s=1}^n \tau \left( \|\tilde{\varphi}_s - \varphi_s\| + \frac{1}{3} |\tilde{m} - m| k_s \right) \right\},$$

$$n = 0, 1, \dots, N_0 - 1.$$

Здесь  $k_s = \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \|u_0\|_D + \frac{1}{\delta} \|Du_1\| + \frac{1}{\delta} \sum_{r=1}^n \tau \|\varphi_r\| \right)$ ,  $\tilde{\delta} = \frac{1}{3} (4\bar{l} + \tilde{m})$ .

**Д о к а з а т е л ь с т в о.** Нетрудно показать, что  $\tilde{\delta}E = \frac{1}{3} (4\bar{l} + \tilde{m})E \leq \tilde{A}_0 = \tilde{A}_0^*$ . Кроме этого, если выполнены условия (22), тогда  $E < D = D^*$  и  $D \geq \frac{1+\varepsilon}{4} \tau^2 \tilde{A}_0$ ,  $\varepsilon > 0$ , – любое число. При этом для решения  $\bar{y}$  получается оценка

$$\|y^{n+1}\| \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \|u_0\|_D + \frac{1}{\delta} \|Du_1\| + \frac{1}{\delta} \sum_{s=1}^n \tau \left\{ \|\bar{\varphi}_s\| + \|(\tilde{A}_0 - A_0)y_s\| \right\} \right).$$

Так как  $\|A_1\| < 4/h_1^2$ ,  $\|A_2\| < 4/h_2^2$  (см. [9, гл. IV, § 4]), то из оценки (18) находим

$$\|(\tilde{A}_0 - A_0)y_s\| = \left\| (\tilde{m} - m) \left( E - \frac{h_1^2}{12} A_1 - \frac{h_2^2}{12} A_2 \right) y_s \right\| < \frac{1}{3} |\tilde{m} - m| \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \|u_0\|_D + \frac{1}{\delta} \|Du_1\| + \frac{1}{\delta} \sum_{r=1}^n \tau \|\varphi_r\| \right).$$

Теорема доказана.

**Теорема о сходимости.** Посмотрим теперь задачу для погрешности метода  $z = y - u$ :

$$z_{\bar{n}} = \sum_{\alpha=1}^p \Lambda_{\alpha} z^{(\sigma_{\alpha}, \sigma_{\alpha})} + \frac{1}{12} \sum_{\substack{\alpha, \beta=1 \\ \alpha \neq \beta}}^p h_{\alpha}^2 \Lambda_{\alpha} \Lambda_{\beta} z - mz^* + \psi, \quad (x, t) \in \omega_h \times \omega_{\tau}, \quad (23)$$

$$z(x, 0) = 0, \quad x \in \bar{\omega}_h, \quad z_t(x, 0) = \psi, \quad x \in \omega_h, \quad (24)$$

$$z(x, t) = 0, \quad x \in \gamma_h, \quad t \in \omega_{\tau}. \quad (25)$$

Для получения оценки погрешности  $z$  будем использовать результаты теоремы 1.

**Т е о р е м а 3.** Пусть выполнены условия (17). Тогда решение разностной задачи (4)–(6) сходится к точному решению дифференциальной задачи (1)–(3) в сеточной норме  $L_2(\omega_h)$  и для ее решения имеет место оценка точности вида

$$\|y^n - u^n\| \leq M_2(|h|^4 + \tau^2), \quad n = 0, 1, \dots, N_0, \quad M_2 = \text{const} > 0. \quad (26)$$

**Д о к а з а т е л ь с т в о.** Так как задача для возмущения  $\bar{y} = \tilde{y} - u$  и задача для погрешности (23)–(25) при  $p = 2$  идентичны, тогда в силу теоремы 1 получаем для  $z$  неравенство

$$\|z^{n+1}\| \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \frac{1}{\delta} \|D\psi\| + \frac{1}{\delta} \sum_{s=1}^n \tau \|\psi_s\| \right) \leq \sqrt{\frac{1+\varepsilon}{\varepsilon}} \left( \frac{1}{\delta} \|D\psi\| + \frac{T}{\delta} \max_{t \in \omega_{\tau}} \|\psi(t)\| \right).$$

Отсюда и из оценок (7), (8) следует оценка (26). Случай  $p = 3$  рассматривается аналогично.

Теорема доказана.

**Тестовые расчеты.** Далее приводятся результаты численных расчетов при решении начально-краевой задачи (1)–(3) в двумерном случае  $p = 2$ . Ее параметры выбираются следующим образом:  $m = 2$ ,  $T = 1$ ,  $0 \leq l_1 \leq 1$ ,  $0 \leq l_2 \leq \pi$ . Начальные и краевые условия определяются из точного решения

$$u(x_1, x_2, t) = (\cos t + \sin t)(\cos 2x_2 + \sin 2x_2)e^{x_1}.$$

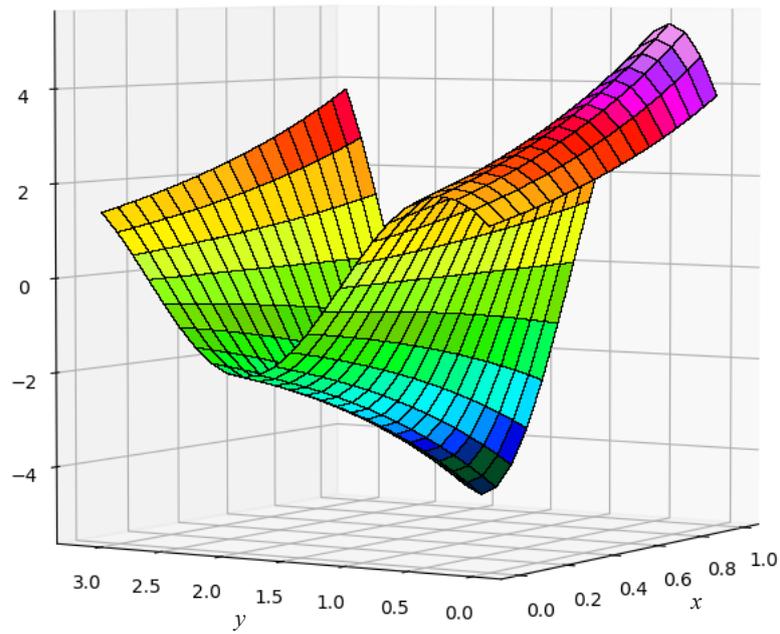
Погрешность метода в  $L_{\infty}$  (рисунок) определена по формуле

$$\|z^n\|_{L_{\infty}} = \max_{\substack{0 \leq i_1 \leq N_1 \\ 0 \leq i_2 \leq N_2}} |y_{i_1 i_2}^n - u_{i_1 i_2}^n|, \quad n = 0, 1, \dots, N_0.$$

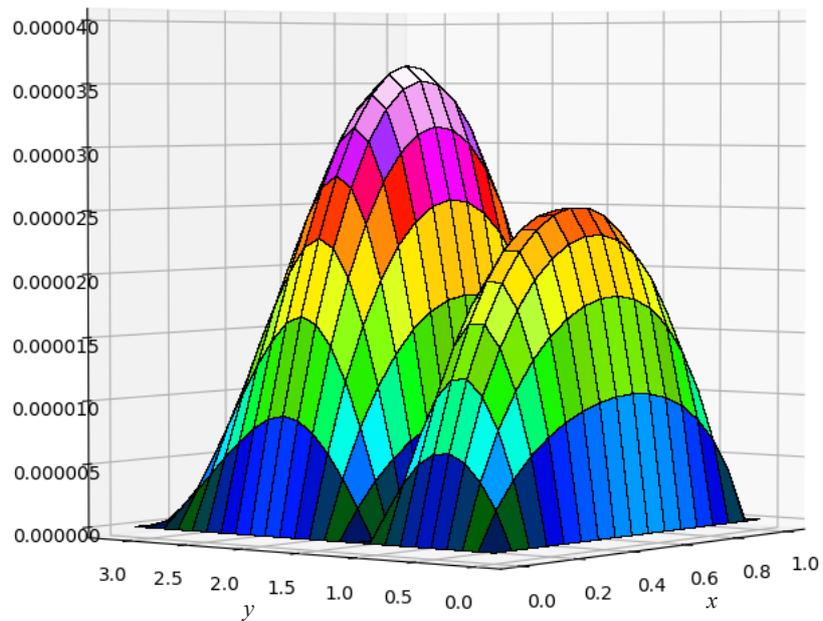
Для нахождения порядка сходимости по временной  $p^h$  и пространственной переменным  $p^{\tau}$  в нормах  $L_2$  и  $L_{\infty} = C$  используются формулы

$$p_{\infty}^h = \log_2 \frac{\|z(2h_1, 2h_2, \tau)\|_{L_{\infty}}}{\|z(h_1, h_2, \tau)\|_{L_{\infty}}}, \quad p_{\infty}^{\tau} = \log_2 \frac{\|z(h_1, h_2, 2\tau)\|_{L_{\infty}}}{\|z(h_1, h_2, \tau)\|_{L_{\infty}}}.$$

Численные результаты, приведенные в табл. 1 и 2, показывают, что приближенное решение сходится к точному со скоростью четвертой по пространству и второй по времени.



a



b

Численное решение (a) и погрешность (b) при  $t_n = T$  с шагами  $h_1 = L_1 / 16$ ,  $h_2 = L_2 / 24$ ,  $\tau = 0,0001$

Numerical solution (a) and  $L_\infty$ -error (b) at  $t_n = T$  with steps  $h_1 = L_1 / 16$ ,  $h_2 = L_2 / 24$ ,  $\tau = 0,0001$

Т а б л и ц а 1. Скорость сходимости по пространственному направлению

Т а b l e 1. Convergence rate in the spatial direction

$h_1 = L_1 / 2$	$h_2 = L_2 / 3$	$\tau = 0,0001$	$\ z\ _{L_\infty}$	$\rho_{L_\infty}^h$	$\ z\ _{L_2}$	$\rho_{L_2}^h$
$h_1$	$h_2$	$\tau$	1,66E-01	—	1,23E-01	—
$h_1 / 2$	$h_2 / 2$	$\tau$	9,49E-03	4,12727	7,85E-03	3,96944
$h_1 / 2^2$	$h_2 / 2^2$	$\tau$	5,70E-04	4,05728	4,80E-04	4,03123
$h_1 / 2^3$	$h_2 / 2^3$	$\tau$	3,64E-05	3,96667	2,98E-05	4,0094
$h_1 / 2^4$	$h_2 / 2^4$	$\tau$	2,30E-06	3,9877	1,88E-06	3,9883

## Т а б л и ц а 2. Скорость сходимости по временному направлению

T a b l e 2. Convergence rate in the time direction

$h_1$	$h_2$	$\tau = 0,25$	$\ =\ _{L^\infty}$	$p_\infty^\tau$	$\ =\ _{L_2}$	$p_{L_2}^\tau$
0,01	0,01	$\tau$	8,86E-02	–	7,38E-02	–
0,01	0,01	$\tau / 2$	2,28E-02	1,96088	1,78E-02	2,05225
0,01	0,01	$\tau / 2^2$	4,93E-03	2,20588	4,04E-03	2,13774
0,01	0,01	$\tau / 2^3$	1,19E-03	2,05376	9,68E-04	2,06277
0,01	0,01	$\tau / 2^4$	2,91E-04	2,0311	2,38E-04	2,02516

**Благодарности.** Автор выражает благодарность профессору П. П. Матусу за внимание к работе и полезные советы, полученные при подготовке настоящей работы.

**Acknowledgments.** The author expresses her sincere gratitude to Professor P. P. Matus for help, advice and recommendations received during the preparation of this work.

## Список использованных источников

1. Рогов, Б. В. Высокоточная монотонная компактная схема бегущего счета для многомерных уравнений гиперболического типа / Б. В. Рогов // Журн. вычисл. математики и матем. физ. – 2013. – Т. 53, № 2. – С. 264–274. <https://doi.org/10.7868/S0044466913020130>
2. Толстых, А. И. Компактные разностные схемы и их применение в задачах аэрогидродинамики / А. И. Толстых. – М., 1990. – 230 с.
3. Li, Q. Compact difference scheme for two-dimensional fourth-order hyperbolic equation / Qing Li, Qing Jang // Adv. Differ. Equ. – 2019. – Vol. 2019. – Art. 328. <https://doi.org/10.1186/s13662-019-2094-4>
4. Ding, H. A new fourth-order compact finite difference scheme for the two-dimensional second-order hyperbolic equation / Henfei Ding, Yuxin Zhang // Journal of Computational and Applied Mathematics. – 2009. – Vol. 230, N 2. – P. 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.cam.2009.01.001>
5. Zlotnik, A. On compact 4th order finite-difference schemes for the wave equation / Alexander Zlotnik, Olga Kireeva [Electronic resource]. – Mode of access: <http://arxiv.org/abs/2011.14104v2>. – Date of access: 08.09.2021.
6. Zlotnik, A. On higher-order compact ADI schemes for the variable coefficient wave equation / Alexander Zlotnik, Raimondas Ciegis // Applied Mathematics and Computation. – 2022. – Vol. 412. – Art. 126565. <https://doi.org/10.1016/j.amc.2021.126565>
7. Матус, П. П. Компактные разностные схемы для уравнения Клейна–Гордона / П. П. Матус, Хоанг Тхи Киеу Ань // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 5. – С. 526–533. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-5-526-533>
8. Caudrey, P. J. The Sine-Gordon equation as a model classical field theory / P. J. Caudrey, J. C. Eilbeck, J. D. Gibbon // II Nuovo Cimento B Series 11. – 1975. – Vol. 25, N 2. – P. 497–512. <https://doi.org/10.1007/bf02724733>
9. Самарский, А. А. Теория разностных схем / А. А. Самарский. – М., 1989. – 616 с.
10. Самарский, А. А. Разностные схемы с операторными множителями / А. А. Самарский, П. Н. Вабищевич, П. П. Матус. – Минск, 1998. – 442 с.
11. Самарский, А. А. Схемы повышенного порядка точности для многомерного уравнения теплопроводности / А. А. Самарский // Журн. вычисл. математики и матем. физ. – 1963. – Т. 3, № 5. – С. 812–840.
12. Матус, П. П. Компактные разностные схемы на трехточечном шаблоне для гиперболических уравнений второго порядка / П. П. Матус, Хоанг Тхи Киеу Ань // Дифференциальные уравнения. – 2021. – Т. 57, № 7. – С. 963–975. <https://doi.org/10.31857/s0374064121070098>

## References

1. Rogov B. V. High-order accurate monotone compact running scheme for multidimensional hyperbolic equations. *Computational Mathematics and Mathematics and Mathematical Physics*, 2013, vol. 53, no. 2, pp. 205–214. <https://doi.org/10.1134/s0965542513020097>
2. Tolstykh A. I. *Compact difference schemes and their application to problems of aerohydrodynamics*. Moscow, 1990. 230 p. (in Russian).
3. Qing Li, Qing Yang. Compact difference scheme for two-dimensional fourth-order hyperbolic equation. *Advances in Difference Equations*, 2019, vol. 2019, art. 328. <https://doi.org/10.1186/s13662-019-2094-4>
4. Henfei Ding, Yuxin Zhang. A new fourth-order compact finite difference scheme for the two-dimensional second-order hyperbolic equation. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 2009, vol. 230, no. 2, pp. 626–632. <https://doi.org/10.1016/j.cam.2009.01.001>
5. Zlotnik A., Kireeva O. On compact 4th order finite-difference schemes for the wave equation. Available at: <http://arxiv.org/abs/2011.14104v2> (accessed 08 September 2021).
6. Zlotnik A., Ciegis R. On higher-order compact ADI schemes for the variable coefficient wave equation. *Applied Mathematics and Computation*, 2022, vol. 412, art. 126565. <https://doi.org/10.1016/j.amc.2021.126565>

7. Matus P. P., Hoang Thi Kieu Anh. Compact difference schemes for Klein–Gordon equation. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 5, pp. 526–533 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-5-526-533>
8. Caudrey P. J., Eilbeck J. C., Gibbon J. D. The sine-Gordon equation as a model classical field theory. *II Nuovo Cimento B Series II*, 1975, vol. 25, no. 2, pp. 497–512. <https://doi.org/10.1007/bf02724733>
9. Samarskii A. A. *Theory of difference schemes*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. 761 p. <https://doi.org/10.1201/9780203908518>
10. Samarskii A. A., Matus P. P., Vabishchevich P. N. *Difference schemes with operator factors*. Dordrecht, 2002. 384 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9874-3>
11. Samarskii A. A. Schemes of high-order accuracy for the multi-dimensional heat conduction equation. *USSR Computational Mathematics and Mathematical Physics*, 1963, vol. 3, no. 5, pp. 1107–1146. [https://doi.org/10.1016/0041-5553\(63\)90104-6](https://doi.org/10.1016/0041-5553(63)90104-6)
12. Matus P. P., Hoang Thi Kieu Anh. Compact difference schemes with a three-point stencil for second-order hyperbolic equations. *Differential Equations*, 2021, vol. 57, no. 7, pp. 934–946. <https://doi.org/10.1134/s0012266121070090>

### Информация об авторе

Хоанг Тхи Киеу Ань – аспирант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [kieuanhhoang86@gmail.com](mailto:kieuanhhoang86@gmail.com).

### Information about the author

Hoang Thi Kieu Anh – Postgraduate student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [kieuanhhoang86@gmail.com](mailto:kieuanhhoang86@gmail.com).

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

УДК 517.977  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-21-25>

Поступило в редакцию 06.10.2021  
Received 06.10.2021

**А. И. Калинин, Л. И. Лавринович**

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

## **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВОЗМУЩЕНИЙ К ЗАДАЧЕ ОПТИМИЗАЦИИ ПЕРЕХОДНОГО ПРОЦЕССА В КВАЗИЛИНЕЙНОЙ ДИНАМИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ**

*(Представлено членом-корреспондентом В. В. Гороховиком)*

**Аннотация.** Рассматривается задача оптимизации переходного процесса в квазилинейной динамической системе с критерием качества, который представляет собой линейную комбинацию энергетических затрат и длительности процесса. Строятся асимптотические приближения заданного порядка к решению этой задачи.

**Ключевые слова:** малый параметр, квазилинейная система, оптимальное управление, асимптотические приближения

**Для цитирования.** Калинин, А. И. Применение метода возмущений к задаче оптимизации переходного процесса в квазилинейной динамической системе / А. И. Калинин, Л. И. Лавринович // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 21–25. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-21-25>

**Anatoliy I. Kalinin, Leonid I. Lavrinovich**

*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

## **APPLICATION OF THE PERTURBATION METHOD TO THE PROBLEM OF OPTIMIZING THE TRANSIENT PROCESS IN A QUASI-LINEAR DYNAMIC SYSTEM**

*(Communicated by Corresponding Member Valentin V. Gorokhovich)*

**Abstract.** The problem of optimizing the transient process in a quasi-linear dynamic system with a performance index, being a linear combination of the energy costs and the process duration, is considered. Asymptotic approximations of a given order to the solution of this problem are constructed.

**Keywords:** small parameter, quasilinear system, optimal control, asymptotic approximations

**For citation.** Kalinin A. I., Lavrinovich L. I. Application of the perturbation method to the problem of optimizing the transient process in a quasi-linear dynamic system. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 21–25 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-21-25>

**Введение.** Динамические системы, содержащие малые параметры при нелинейностях, принято называть квазилинейными. В рамках математической теории оптимальных процессов [1] задачам оптимизации таких систем уделяется значительное внимание. Интерес к ним вызван эффективностью асимптотических методов их решения, при применении которых исходные по существу нелинейные задачи сводятся к сравнительно несложной коррекции решений задач оптимизации линейных систем.

Настоящее сообщение посвящено построению асимптотических приближений к решению задачи оптимизации переходного процесса в квазилинейной системе, в которой помимо энергетических затрат учитывается длительность процесса.

**Постановка задачи.** В классе  $r$ -мерных управляющих воздействий  $u(t)$  рассмотрим следующую задачу оптимального управления:

$$\dot{x} = A(t)x + \mu f(x, t) + B(t)u, \quad x(t_0) = x_0, \quad (1)$$

$$x(t_1) = 0, \quad J(u) = \frac{1}{2} \int_{t_0}^{t_1} (1 + x^T Q(t)x + u^T P(t)u) dt \rightarrow \min, \quad (2)$$

где  $\mu$  – малый (по модулю) параметр;  $t_0$  – заданный начальный момент времени;  $t_1$  – нефиксированный конечный момент времени;  $x$  –  $n$ -вектор;  $f(x, t)$ ,  $x \in R^n$ ,  $t \geq t_0$ , – нелинейная вектор-функция;  $Q(t)$  – неотрицательно-определенная симметрическая матрица, а  $P(t)$  – положительно-определенная симметрическая матрица для всех  $t \geq t_0$ . Предполагается, что элементы матриц  $A(t)$ ,  $B(t)$ ,  $Q(t)$ ,  $P(t)$ ,  $\partial f(x, t) / \partial x$ ,  $x \in R^n$ ,  $t \geq t_0$ , принадлежат классу  $C^p$ ,  $p \geq 1$ .

Критерий качества в этой задаче представляет собой линейную комбинацию энергетических затрат и длительности процесса. Заметим, что если учесть только энергетические затраты, то задача, как правило, не будет иметь решения, а на минимизирующей последовательности длительность процесса будет стремиться к бесконечности.

Уточним, что будем понимать под асимптотическими приближениями к решению рассматриваемой задачи.

**О п р е д е л е н и е.** Управление  $u^{(N)}(t, \mu)$ ,  $t \in [t_0, t_1^{(N)}(\mu)]$ , назовем асимптотически субоптимальным управлением  $N$ -го порядка ( $N = 0, 1, 2, \dots$ ) в задаче (1), (2), если оно переводит систему (1) в состояние  $O(\mu^{N+1})$  и отклоняется по критерию качества  $J(u)$  от оптимального управления на величину того же порядка малости.

Ниже предлагается алгоритм, с помощью которого для заданного числа  $N$  ( $N < p$ ) можно построить асимптотически субоптимальное управление  $N$ -го порядка в рассматриваемой задаче.

**Базовая задача.** Вычисления при построении асимптотических приближений начинаются с решения базовой задачи, которая формально получается из исходной при  $\mu = 0$ , и в отличие от нее является задачей оптимизации линейной системы.

**П р е д п о л о ж е н и е 1.** Динамическая система в базовой задаче является вполне управляемой [2].

Заметим, что это предположение для стационарной динамической системы эквивалентно требованию  $\text{rank}(B, AB, \dots, A^{n-1}B) = n$ .

При выполнении предположения 1 в базовой задаче существуют допустимые управления, а тогда эта задача имеет единственное решение, которое является нормальной экстремалью [3].

Последнее означает, что принцип максимума [1] в данном случае может быть сформулирован следующим образом: пусть  $u^0(t)$ ,  $x^0(t)$ ,  $t \in T^0 = [t_0, t_1^0]$ , – оптимальные управление и траектория в базовой задаче, тогда существует такое решение  $\psi(t)$ ,  $t \in T^0$ , сопряженной системы  $\dot{\psi} = -A^T(t)\psi + Q(t)x^0(t)$ , что выполняются условия

$$\psi^{0T}(t)B^T(t)u^0(t) - \frac{1}{2}u^{0T}(t)P(t)u^0(t) = \max_{u \in R^r} \left( \psi^{0T}(t)B^T(t)u - \frac{1}{2}u^T P(t)u \right), \quad t \in T^0, \quad (3)$$

$$2\psi^{0T}(t_1^0)B(t_1^0)u^0(t_1^0) - u^{0T}(t_1^0)P(t_1^0)u^0(t_1^0) = 1. \quad (4)$$

Из условия (3) непосредственно следует

$$u^0(t) = P^{-1}(t)B^T(t)\psi^0(t), \quad t \in T^0. \quad (5)$$

Условие (4), с учетом (5), может быть записано в виде

$$\psi^{0T}(t_1^0)B(t_1^0)P^{-1}(t_1^0)B^T(t_1^0)\psi^0(t_1^0) = 1.$$

Пусть  $v_0 = \psi^0(t_0)$ , тогда  $x^0(t)$ ,  $\psi^0(t)$ ,  $t \in T^0$ , есть решение следующей начальной задачи:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= A(t)x + B(t)P^{-1}(t)B^T(t)\psi(t), \quad x(t_0) = x_0, \\ \dot{\psi} &= Q(t)x(t) - A^T(t)\psi, \quad \psi(t_0) = v_0. \end{aligned} \quad (6)$$

Введем в рассмотрение фундаментальную матрицу  $F(t)$ ,  $t \in T^0$ , системы (6) как решение начальной задачи  $\dot{F} = \bar{A}(t)F$ ,  $F(t_0) = E_{2n}$ , в которой

$$\bar{A}(t) = \begin{pmatrix} A(t) & B(t)P^{-1}(t)B^T(t) \\ Q(t) & -A^T(t) \end{pmatrix}.$$

Разобьем матрицу  $F$  на блоки размеров  $n \times n$ :

$$F = \begin{pmatrix} F_{11} & F_{12} \\ F_{21} & F_{22} \end{pmatrix}.$$

После решения базовой задачи формируется матрица

$$I_0 = \begin{pmatrix} F_{12}(t_1^0) & \dot{x}^0(t_1^0) \\ 2(F_{22}(t_1^0)B(t_1^0)u^0(t_1^0))^T & \frac{d}{dt_1}(u^{0T}(t_1^0)P(t_1^0)u^0(t_1^0)) \end{pmatrix}. \quad (7)$$

**Предположение 2.** *Выполнено условие  $\det I_0 \neq 0$ .*

Заметим, что из результатов, полученных в [4], следует  $\det F_{12}(t_1^0) \neq 0$ .

**Построение асимптотических приближений.** Рассмотрим начальную задачу

$$\begin{aligned} \dot{x} &= A(t)x + \mu f(x, t) + B(t)P^{-1}(t)B^T(t)\psi(t), \quad x(t_0) = x_0, \\ \dot{\psi} &= Q(t)x(t) - \left( A(t) + \mu \frac{\partial f}{\partial x}(x, t) \right)^T \psi, \quad \psi(t_0) = v, \end{aligned} \quad (8)$$

в которой  $t \in T^0$ . В силу теоремы о дифференцируемости решений обыкновенных дифференциальных уравнений по начальным данным и параметрам существуют такие положительные числа  $\varepsilon_0, \mu_0$ , что задача (8) имеет единственное решение  $x(t, v, \mu), \psi(t, v, \mu)$ , принадлежащее классу  $C^p$ , продолжимое на любой конечный промежуток  $[t_0, t_1]$ , если только  $\|v - v_0\| < \varepsilon_0, |\mu| < \mu_0$ .

Сформулируем теорему, на которую опираются дальнейшие вычисления при построении асимптотически субоптимальных управлений.

**Т е о р е м а.** *При выполнении предположений 1, 2 в задаче (1), (2) с достаточно малым по модулю  $\mu$  существует единственное оптимальное управление, которое представимо в виде*

$$u^0(t, \mu) = P^{-1}(t)B^T(t)\psi(t, v(\mu), \mu), \quad t \in [t_0, t_1(\mu)]. \quad (9)$$

*Оптимальный конечный момент времени  $t_1(\mu)$  и начальное значение (в момент времени  $t_0$ ) вектора сопряженных переменных  $v(\mu)$  удовлетворяют системе уравнений*

$$\begin{cases} x(t_1, v, \mu) = 0, \\ \psi^T(t_1, v, \mu)B(t_1)P^{-1}(t_1)B^T(t_1)\psi(t_1, v, \mu) - \mu\psi^T(t_1, v, \mu)f(0, t_1) - 1 = 0, \end{cases} \quad (10)$$

*причем  $t_1(\mu) \in C^p, t_1(0) = t_1^0, v(\mu) \in C^p, v(0) = v_0$ .*

Доказываются сформулированные утверждения путем применения теоремы о неявной функции к системе уравнений (10). Невырожденность матрицы Якоби в данном случае гарантируется предположением 2.

Пусть задано натуральное число  $N, N < p$ . Поскольку  $v(\mu), t_1(\mu)$  принадлежат классу  $C^p$ , и  $v(0) = v_0, t_1(0) = t_1^0$ , то имеют место асимптотические равенства  $v(\mu) = v^{(N)}(\mu) + O(\mu^{N+1}), t_1(\mu) = t_1^{(N)}(\mu) + O(\mu^{N+1})$ , где

$$v^{(N)}(\mu) = v_0 + \sum_{k=1}^N \mu^k v_k, \quad t_1^{(N)}(\mu) = t_1^0 + \sum_{k=1}^N \mu^k t_{1k}$$

есть полиномы Тейлора  $N$ -й степени. Асимптотически субоптимальное управление  $N$ -го порядка в задаче (1), (2) представимо в виде (сравни с (9))

$$u^{(N)}(t, \mu) = P^{-1}(t)B^T(t)\psi(t, v^{(N)}(\mu), \mu), \quad t \in [t_0, t_1^{(N)}(\mu)]. \quad (11)$$

Для его построения нужно найти коэффициенты  $v_k, t_{1k}, k = 1, 2, \dots, N$ , полиномов (11), что можно сделать, применяя методику, предложенную в [5]. Следуя этой методике, нужно разложить левые части уравнений (10) по целым степеням  $\mu$  до порядка  $N$  включительно, применяя формализм Пуанкаре к начальной задаче (8), и приравнять коэффициенты разложения к нулю. Вычисления при этом сводятся к интегрированию систем линейных дифференциальных уравнений, а также к нахождению корней невырожденных линейных алгебраических систем.

Вектор-функция  $\psi(t, v^{(N)}(\mu), \mu), t \in [t_0, t_1^{(N)}(\mu)]$ , есть решение начальной задачи (8) с  $v = v^{(N)}(\mu)$ . Применяя классическую технику Пуанкаре к этой задаче, получаем асимптотическое представление  $\psi(t, v^{(N)}(\mu), \mu) = \psi^{(N)}(t, \mu) + O(\mu^{N+1}), t \in [t_0, t_1^{(N)}(\mu)]$ , где  $\psi^{(N)}(t, \mu) = \sum_{k=0}^N \mu^k \psi_k(t), t \in [t_0, t_1^{(N)}(\mu)]$ , а вектор-функции  $\psi_k(t), t \in [t_0, t_1^{(N)}(\mu)]$ , находятся в результате последовательного решения задач Коши для систем линейных дифференциальных уравнений. Управление

$$\bar{u}^{(N)}(t, \mu) = P^{-1}(t)B^T(t)\psi^{(N)}(t, \mu), \quad t \in [t_0, t_1^{(N)}(\mu)],$$

наряду с (11) является асимптотически субоптимальным управлением  $N$ -го порядка в задаче (1), (2). Поскольку  $\psi^{(0)}(t, \mu) = \psi^0(t)$ , то  $\bar{u}^{(0)}(t, \mu) = u^0(t), t \in T^0$ , т. е. решение базовой задачи является асимптотически субоптимальным управлением нулевого порядка в исходной задаче. Асимптотически субоптимальное управление первого порядка имеет вид

$$\bar{u}^{(1)}(t, \mu) = u^0(t) + \mu P^{-1}(t)B^T(t)\psi_1(t), \quad t \in [t_0, t_1^{(1)}(\mu)],$$

где  $\psi_1(t), t \in [t_0, t_1^{(1)}(\mu)]$ , есть результат решения задачи Коши для системы

$$\begin{aligned} \dot{x}_1 &= A(t)x_1 + B(t)P^{-1}(t)B^T(t)\psi_1 + f(x^0(t), t), \\ \dot{\psi}_1 &= Q(t)x_1 - A^T(t)\psi_1 - \frac{\partial h}{\partial x}(x^0(t), \psi^0(t), t) \end{aligned}$$

с начальными условиями  $x_1(t_0) = 0, \psi_1(t_0) = v_1$ , в которой  $h(x, \psi, t) = \psi^T f(x, t)$ .

Не исключено, что  $t_1^0 < t_1^{(1)}(\mu)$ . В этом случае следует понимать под  $x^0(t), \psi^0(t)$  решение начальной задачи (7), которое продолжимо на любой конечный промежуток времени, а  $u^0(t) = P^{-1}(t)B^T(t)\psi^0(t)$ .

**Заключение.** В сообщении предложены вычислительные процедуры построения асимптотических приближений к оптимальному управлению в рассмотренной задаче. При их использовании вычисления сводятся к решению задачи оптимизации переходного процесса в линейной системе, интегрированию систем линейных дифференциальных уравнений, а также к нахождению корней невырожденных линейных алгебраических систем.

### Список использованных источников

1. Математическая теория оптимальных процессов / Л. С. Понтрягин [и др.]. – М., 1983. – 392 с.
2. Красовский, Н. Н. Теория управления движением / Н. Н. Красовский. – М., 1968. – 476 с.
3. Мордухович, Б. Ш. Существование оптимальных управлений / Б. Ш. Мордухович // Соврем. пробл. матем. (Итоги науки и техн.). – М., 1976. – Т. 6. – С. 207–271.
4. Калинин, А. И. О проблеме синтеза оптимальных систем управления / А. И. Калинин // Журн. вычисл. математики и матем. физ. – 2018. – Т. 58, № 3. – С. 397–402. <https://doi.org/10.7868/S0044466918030079>
5. Калинин, А. И. Асимптотические методы оптимизации возмущенных динамических систем / А. И. Калинин. – Минск, 2000. – 183 с.

## References

1. Pontryagin L. S., Boltyanskii V. G., Gamkrelidze R. V., Mishchenko E. F. *The Mathematical Theory of Optimal Processes*. Moscow, New York, 1986. 392 p.
2. Krasovskii N. N. *Theory of Control of Motion*. Moscow, 1968. 476 p. (in Russian).
3. Mordukhovich B. Sh. Existence of Optimal Controls. *Sovremennye Problemy Matematiki. Itogi Nauki i Tekhniki* [Modern problems of mathematics. The results of science and technology]. Moscow, 1976, vol. 6, pp. 207–271 (in Russian).
4. Kalinin A. I. To the synthesis of optimal control systems. *Computational Mathematics and Mathematical Physics*, 2018, vol. 58, no. 3, pp. 378–383. <https://doi.org/10.1134/s0965542518030065>
5. Kalinin A. I. *Asymptotic Methods for Optimization of Disturbed Dynamical Systems*. Minsk, 2000. 183 p. (in Russian).

## Информация об авторах

*Калинин Анатолий Иосифович* – д-р физ.-мат. наук, профессор. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kalininai@bsu.by.

*Лавринович Леонид Иванович* – канд. физ.-мат. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lavrinovich@bsu.by.

## Information about the authors

*Kalinin Anatoliy I.* – D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kalininai@bsu.by.

*Lavrinovich Leonid I.* – Ph. D. (Physics and Mathematics), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lavrinovich@bsu.by.

**ФИЗИКА**  
**PHYSICS**УДК 537.9, 538.93  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-26-34>Поступило в редакцию 18.01.2022  
Received 18.01.2022**Ю. А. Федотова***Научно-исследовательский Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета,  
Минск, Республика Беларусь***ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЧЕРНОГО МЫШЬЯКА***(Представлено членом-корреспондентом Н. А. Поклонским)*

**Аннотация.** Исследована структура, а также зависимости электрического сопротивления  $R(T)$  от температуры поликристалла природного черного мышьяка (b-As). Образцы b-As содержали как фазу черного мышьяка и следы его окисла, так и фазу серого мышьяка и арсенолита ( $As_2O_3$ ). Поведение относительного магнетосопротивления  $MR(B)$  кристалла b-As при постоянной температуре описывалось соотношением  $MR(B) = bB^n + cB^m$ , где коэффициенты  $b$  и  $c$ , а также показатели степени  $n$  и  $m$  определялись механизмами формирования магнетосопротивления и зависели от температуры. При температурах ниже 10 К зависимость  $MR(B)$  показывает наличие конкуренции отрицательного (при  $b < 0$  и  $n \approx 0,5$ ) и положительного (при  $c > 0$  и  $m \approx 1$ ) вкладов. При температуре  $T > 10$  К наблюдался только ПМР эффект, для которого в диапазоне  $10 < T < 100$  К величины  $b > 0$ ,  $n \approx 1$  и  $c \rightarrow 0$ . При  $T > 100$  К величины  $b$ ,  $c > 0$ ,  $n \approx 1$  и  $1,30 \leq m \leq 1,47$ . Наблюдаемое поведение зависимостей  $MR(B)$  в широком диапазоне температур обусловлено сильной неоднородностью и неупорядоченностью структуры исследуемого кристалла черного мышьяка.

**Ключевые слова:** черный мышьяк, электротранспорт, магнетосопротивление

**Для цитирования.** Федотова, Ю. А. Электрические свойства черного мышьяка / Ю. А. Федотова // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 26–34. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-26-34>

**Julia A. Fedotova***Research Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus***ELECTRIC PROPERTIES OF BLACK ARSENIC***(Communicated by Corresponding Member Nikolay A. Poklonsky)*

**Abstract.** The structure, as well as the temperature and magnetic field dependences of the electrical resistance  $R(T, B)$  of the natural black arsenic (b-As) polycrystal was studied. It was shown that the polycrystalline b-As sample contains the b-As phase and also the traces of its oxide, as well as grey arsenic and arsenolite ( $As_2O_3$ ). The behavior of the relative magnetoresistance of the b-As crystal was described by the relation  $MR(B) = bB^n + cB^m$ , where the coefficients  $b$  and  $c$  and the exponents  $n$  and  $m$  were also affected by the mechanisms of magnetoresistance formation and temperature. At the temperatures below 10 K,  $MR(B)$  shows the presence of a competition between negative (with  $b < 0$  and  $n \approx 0.5$ ) and positive (with  $c > 0$  and  $m \approx 1$ ) contributions. Above 10 K, only the PMR effect was presented. For the PMR effect, at  $10 < T < 100$  K it is observed that the values of  $b > 0$ ,  $n \approx 1$  and  $c \rightarrow 0$ . Above 100 K, it is observed that the values of  $b$ ,  $c > 0$  and  $n \approx 1$  and  $1.30 < m < 1.47$ . The observed behavior of the  $R(T, B)$  dependences is associated with strong inhomogeneity and/or disorder of the investigated black arsenic crystal.

**Keywords:** black arsenic, carrier transport, magnetoresistance

**For citation.** Fedotova J. A. Electric properties of black arsenic. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 26–34 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-26-34>

**Введение.** Мышьяк принадлежит к группе VA таблицы Менделеева и привлекает внимание на протяжении уже десятков лет благодаря своим весьма нетривиальным свойствам и возможному применению для изготовления двумерных однослойных и многослойных структур для элек-

троники [1]. В отличие от элементов группы IVA, таких как углерод и кремний, каждый из которых имеет много аллотропных модификаций [2], аллотропов As намного меньше. При нормальном атмосферном давлении кристаллический мышьяк характеризуется электронной конфигурацией  $4s^24p^3$  и предпочитает кристаллизоваться в виде слоистых структур с низкой симметрией и координационным числом, равным трем [3; 4]. В твердом состоянии он существует в виде четырех аллотропных модификаций: ромбоэдрический серый мышьяк, ромбический черный мышьяк (b-As), различные формы желтого мышьяка и простой кубический мышьяк высокого давления [4–6]. Ромбоэдрический серый мышьяк, принадлежащий к структуре A7, является наиболее стабильной фазой мышьяка в условиях окружающей среды. Под давлением серый мышьяк претерпевает фазовый переход из фазы A7 в простой кубический металлический мышьяк с более высокой симметрией [6; 7]. Желтый мышьяк, состоящий из тетраэдрических молекул  $As_4$ , очень нестабилен и постепенно превращается в серый мышьяк даже при комнатной температуре. Слоистая кристаллическая фаза орторомбического черного мышьяка образует гофрированную сотовую структуру (рис. 1, *a*) и обладает очень высокой анизотропией в плоскости *ac*, как и черный фосфор [8]. Именно поэтому он представляет интерес своей способностью создания одно- или многослойных двумерных структур путем отщепления.

Расчеты показывают, что объемная фаза b-As представляет собой прямозонный полупроводник с шириной запрещенной зоны около 0,3 эВ [1; 9; 10]. Однако данных об электрических свойствах кристаллов черного мышьяка в литературе нет. В то же время известно, что в однослойном виде черный мышьяк становится непрямозонным полупроводником с шириной запрещенной зоны около 1,0 эВ [10; 11]. Кроме того, показано, что однослойный и многослойный b-As с небольшим числом слоев обладает более высокой подвижностью носителей заряда ( $\sim 10^3\text{--}10^4 \text{ см}^2\text{В}^{-1}\text{с}^{-1}$  [10]), что делает его потенциальным кандидатом для применения в электронных и оптоэлектронных устройствах [1; 10].

В данной работе исследована структура и температурные зависимости электрического сопротивления кристаллов природного b-As в широкой области температур и магнитных полей.

**Материалы и методы исследования.** Фазовый состав и кристаллическая структура исходного кристалла b-As изучались методом рентгеноструктурного анализа (РСА) при комнатной температуре на автоматизированном рентгеновском дифрактометре ДРОН-3М с использованием  $\text{Cu-K}_\alpha$ -излучения. Для отсеечения  $\text{K}_\beta$ -компоненты рентгеновского пучка применялся графитовый монохроматор. Шаг угла сканирования пучка составлял 0,03 градуса, время экспозиции – не ме-

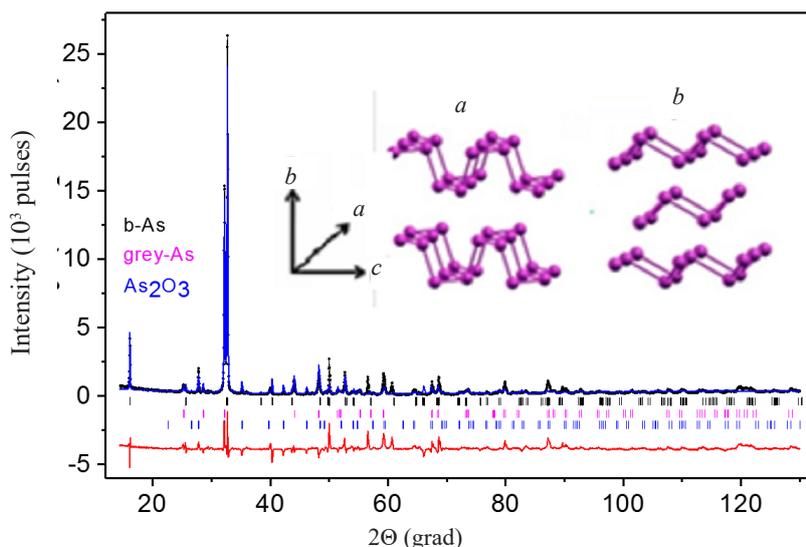


Рис. 1. Экспериментальные дифрактограммы натурального кристалла черного мышьяка. Вставка: схематическое изображение кристаллической структуры черного (*a*) и серого (*b*) мышьяка [10]

Fig. 1. Experimental XRD patterns of natural black arsenic crystals. The inset shows image of crystalline structure of black (*a*) and grey (*b*) arsenic [10]

нее 3 с. Фиксация данных измерений производилась автоматически. Определение угловых положений максимумов дифракционных пиков, определение типа симметрии и расчет параметров элементарной ячейки проводились по методу Ритвельда путем разложения рентгеновского спектра на сумму интегральных интенсивностей с применением программного пакета FullProf Suite [12].

Спектроскопия комбинационного рассеяния света (КРС) проводилась на приборе Nanofinder<sup>®</sup>30 при комнатной температуре. Мощность лазерного пучка с длиной волны 532 нм и диаметром около 0,7–1,0 мкм составляла 200, 600 и 1600 мВт при времени облучения 20–30 с. Лазерный луч фокусировался на поверхности образца с помощью объектива 50× (числовая апертура 0,8). Сканирование поверхности проводилось в 14 областях размерами 20 × 20 мкм, разнесенных друг от друга на расстояние не менее 1 мм. Для получения обратно рассеянного света использовалась дифракционная решетка 600 мм<sup>-1</sup>, что позволяло получить спектральное разрешение не хуже 3 см<sup>-1</sup>. Спектральная калибровка проводилась по линиям газоразрядной лампы, что обеспечивало точность не хуже 3 см<sup>-1</sup>. В качестве фотоприемника использовалась охлаждаемая кремниевая ПЗС-матрица.

На этих же образцах проведены стандартные измерения вольт-амперных характеристик (ВАХ) и электросопротивления  $R(T, B)$  в области температур  $2 < T < 300$  К и индукции магнитного поля  $0 \leq B < 9$  Тл. Измерения проводились на прямоугольных образцах, сколотых вдоль плоскости  $ac$ . При этом вектор  $B$  всегда был перпендикулярен этой плоскости, т. е. направлен вдоль оси  $b$ . Зависимости  $R(T)$  и  $R(B)$  определялись на бескриогенной измерительной системе компании Cryogenics Ltd (Великобритания) на базе рефрижератора замкнутого цикла. При измерениях ток через образец задавался и измерялся с помощью прибора Keithley 6430, который позволял определять электрическое сопротивление образцов в диапазоне от 100 мкОм до 10 ГОм с точностью не хуже 0,1 %. Температура образцов контролировалась термодиодами LakeShore, откалиброванными с точностью 0,0005 К и имеющими воспроизводимость 0,001 К. Стабилизация и измерение температуры осуществлялись с помощью контроллера LakeShore 331. Точность измерения удельного сопротивления была не хуже 5 %, что определялось в основном неточностью измерения геометрических размеров образцов, ширины потенциальных электрических контактов и расстояний между ними.

Температурные зависимости ВАХ и сопротивления  $R(T)$ , а также магнетосопротивление  $R(B)$  измерялись с помощью четырех электрических зондов с линейным расположением на расстоянии около 0,5 мм. Контакты были изготовлены с помощью серебряной пасты на основе эпоксидной смолы и отожжены в колбе с газообразным водородом низкого давления при 353 К в течение 15 мин. Для проверки качества контактов на всех образцах проводилось предварительное измерение ВАХ.

**Результаты и их обсуждение.** Пример дифрактограммы кристалла b-As, представленный на рис. 1, указывает на его поликристалличность. Как следует из обработки спектра с помощью программы FullProf на основе метода Ритвельда, в спектре фиксируются не только линии черного мышьяка, но также и линии серого мышьяка и арсенолита ( $As_2O_3$ ). Из процедуры подгонки также были получены оценочные значения вкладов черного и серого мышьяка, а также арсенолита ( $As_2O_3$ ): b-As – 51,16 %; серый As – 34,9 %;  $As_2O_3$  – 15,8 %.

Характерные спектры КРС разных участков исходного образца природного кристалла b-As подтверждают результаты РСА (рис. 2). Как видно, спектры содержат линии, характерные не только для чистого черного мышьяка (рис. 2, *a*), но и для оксида черного фосфора (рис. 2, *b*), серого мышьяка (рис. 2, *c*) и  $As_2O_3$  (вставка к рис. 2, *a*). В целом, эксперименты показали, что основная часть площади поверхности образца (более 80 % сканированных точек) соответствует чистому черному мышьяку.

Как показано на вставках к рис. 3, *a* и 3, *b*, при температурах 3–300 К экспериментальные ВАХ были линейными в диапазоне токов 0–20 мА, что указывает на омический характер электрических контактов к образцу. Температурные зависимости электросопротивления  $R(T)$  на рис. 3 построены по данным измерений ВАХ (кривые 1) и магнетосопротивления  $R(B)$  в нулевом магнитном поле (кривые 2). Как видно из рисунка, форма обеих кривых  $R(T)$  практически

совпадает. При этом температурный ход кривых оказался близким к экспоненциальному, т. е. характеризуется отрицательным температурным коэффициентом сопротивления ( $dR / dT < 0$ ). Последнее означает, что исследуемый кристалл скорее всего является полупроводником, на что также указывает близкий к линейному характер аррениусовой зависимости в области комнатных температур на рис. 3, *b*. Однако наклон этого линейного участка кривой  $Lg(R) - (1 / T)$  дает слишком низкие ( $\ll kT$ ) значения энергии активации проводимости  $\Delta E \approx 0,83-1,21$  мэВ. Это, скорее всего, обусловлено сильной дефектностью исследуемого кристалла, которая приводит к появлению большого количества локализованных состояний в полупроводнике [13] либо к возникновению в нем крупномасштабного потенциального рельефа (КМПП) краев энергетических зон [14]. Наличие КМПП может следовать из неоднородности изучаемого кристалла, что описано в предыдущем разделе. Согласно [14], наличие КМПП приводит к сильному несопадению энергии активации проводимости  $\Delta E$  с шириной запрещенной зоны и (или) энергии активации примесей в полупроводнике. Это и подтверждается наблюдением на рис. 3, *b* так называемой скользящей (т. е. понижающейся при уменьшении температуры) энергии активации проводимости  $\Delta E(T)$ . Отметим, что аналогичное поведение наблюдалось нами ранее при исследовании электрических свойств кристаллов черного фосфора [15]. С другой стороны, выполнение условия сильной локализации, как следствия высокой концентрации дефектов, может приводить

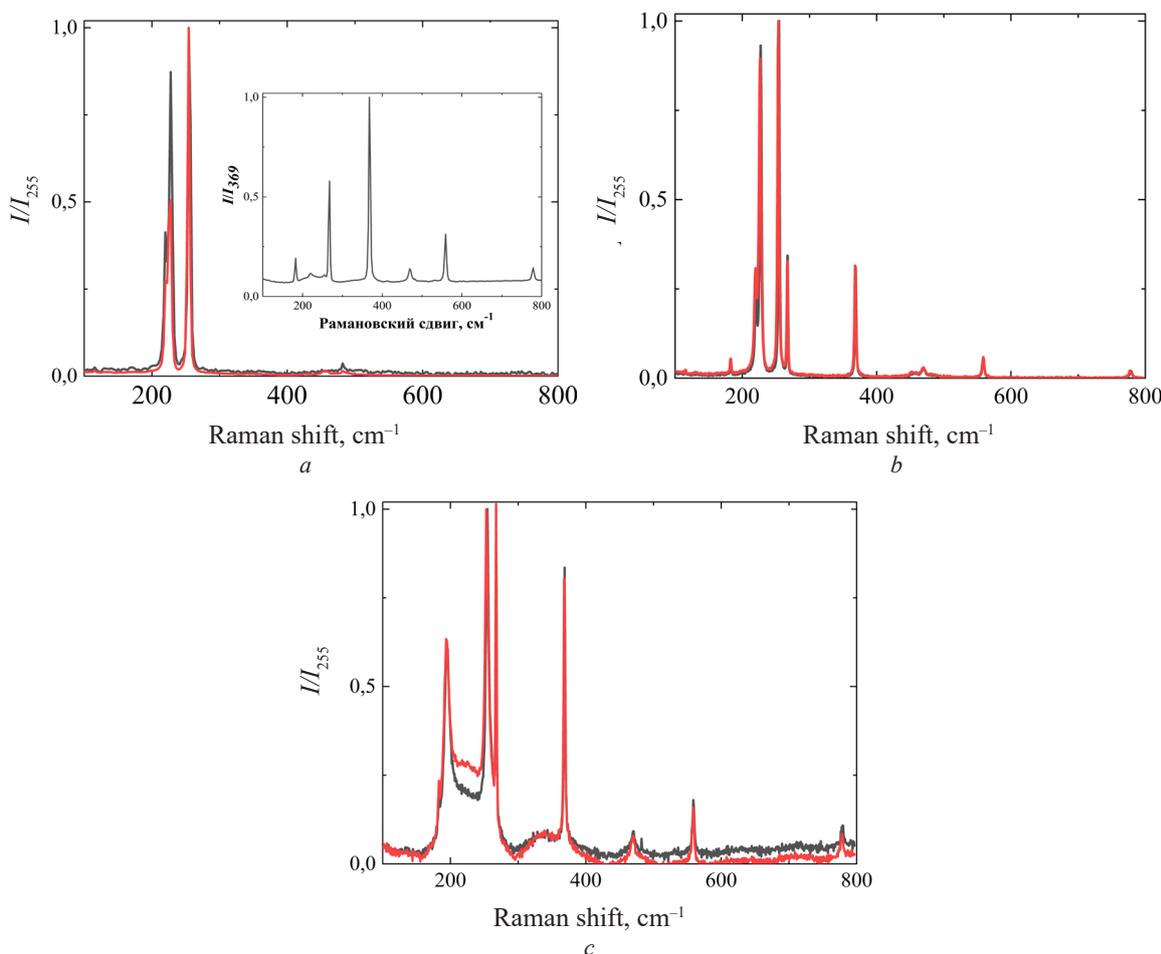


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния для разных участков кристалла натурального черного мышьяка при мощности лазера 200 мВт (черные линии) и 600 мВт (красные линии): (а) чистый b-As, (b) b-As с вкраплением оксида, (с) b-As с вкраплением серого мышьяка. На вставке изображен спектр арсенолита  $As_2O_3$

Fig. 2. Raman spectroscopy for various areas of natural black arsenic crystals at laser power of 200 mW (black lines) and 600 mW (red lines): (a) pure b-As, (b) b-As with oxide precipitations, (c) b-As with grey arsenic precipitations. The inset shows spectrum of arsenolite  $As_2O_3$

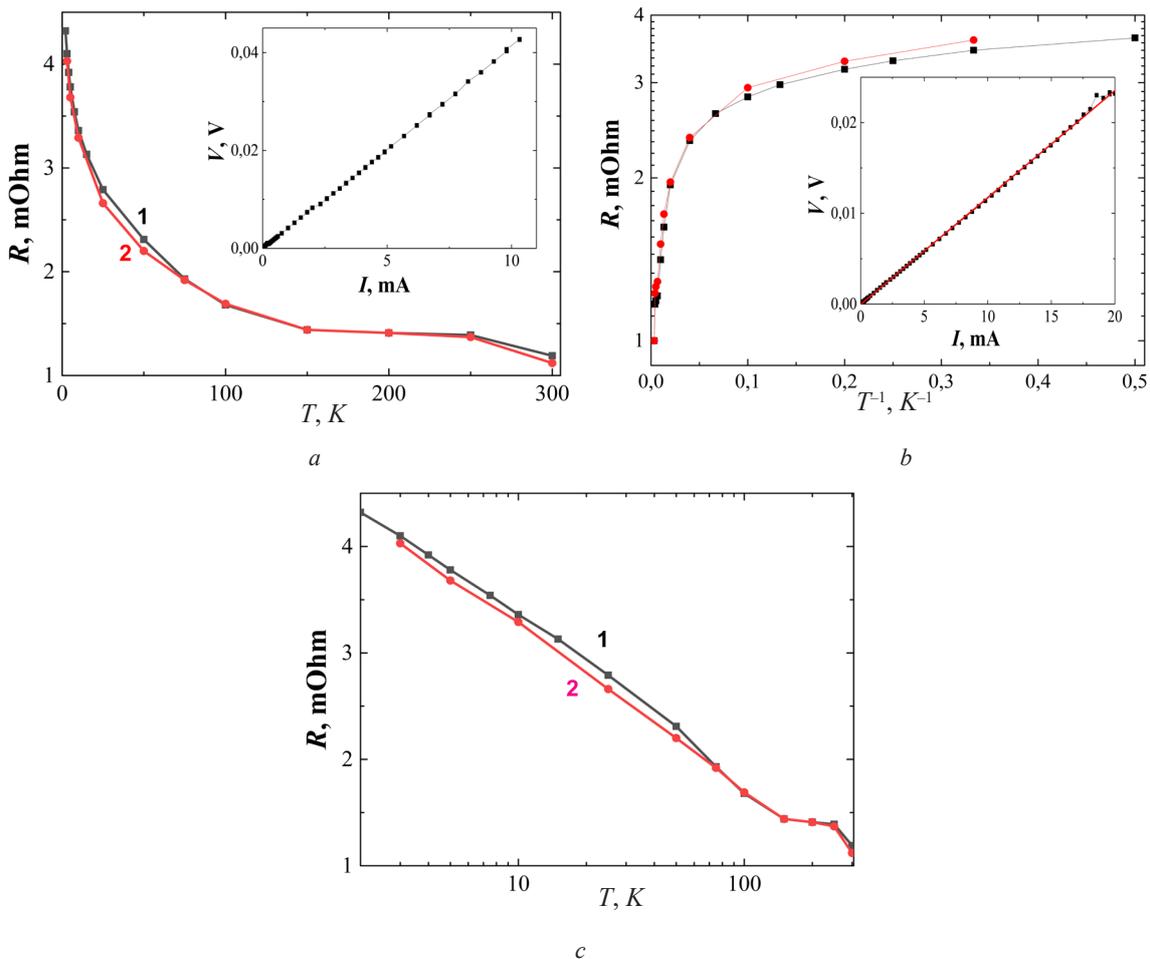


Рис. 3. Температурные зависимости сопротивления  $R(T)$  образца b-As, построенные по ВАХ ( $I$ ) и зависимостям  $R(B)$  в нулевом магнитном поле (2) в линейном (а), аррениусовом (b) и полулогарифмическом (с) масштабах. На вставках изображены ВАХ, измеренные при температурах  $T = 3$  К (а) и  $T = 300$  К (b)

Fig. 3. Temperature dependencies of  $R(T)$  for b-As samples, plotted from  $V$ - $I$  data ( $I$ ) and  $R(B)$  curves at zero magnetic field (2) in linear (a), Arrhenius (b) and semilogarithmic (c) scales. The insets show  $V$ - $I$  curves measured at temperatures  $T = 3$  K (a) and  $T = 300$  K (b)

к реализации прыжкового механизма проводимости с переменной длиной прыжков [13], который также может приводить к наблюдаемой нами скользящей энергии активации проводимости.

Учитывая слоистый характер структуры кристаллов b-As, можно ожидать также наличие у них вкладов в зависимость  $R(T)$  так называемых квантовых поправок к проводимости Друде, обусловленных сбоем фазы волновых функций электронов при их рассеянии, когда они движутся по самопересекающимся траекториям в условиях слабой локализации [16–18]. На возможность такого вклада при движении электронов внутри слоев, в частности, указывает близкий к линейному закону температурный ход электросопротивления в полулогарифмических координатах  $R - \lg(T)$  на рис. 3, с в области температур ниже 75 К [18], что характерно для двумерного или квази-двумерного электронного газа в кристаллах.

Для подтверждения или опровержения высказанных выше предположений о роли эффектов слабой и сильной локализации, а также влияния КМПП нами проведено дополнительно исследование магнеторезистивного эффекта в кристаллах b-As. На рис. 4 представлены экспериментальные зависимости относительного магнетосопротивления  $MR(B) = [R(B) - R(0)] / R(0)$  в кристалле b-As при различных температурах. Как следует из рис. 4, а и 4, b, при температурах 3 и 5 К магнеторезистивный эффект характеризуется двумя вкладами – отрицательным (ОМП) и положительным (ПМП). При данных температурах значение модуля  $MR(B)$  в области ОМП достигает максимума (почти 6 % при 3 К и около 3 % при 5 К) в магнитном поле  $B \approx 3$  Тл. При более высоких

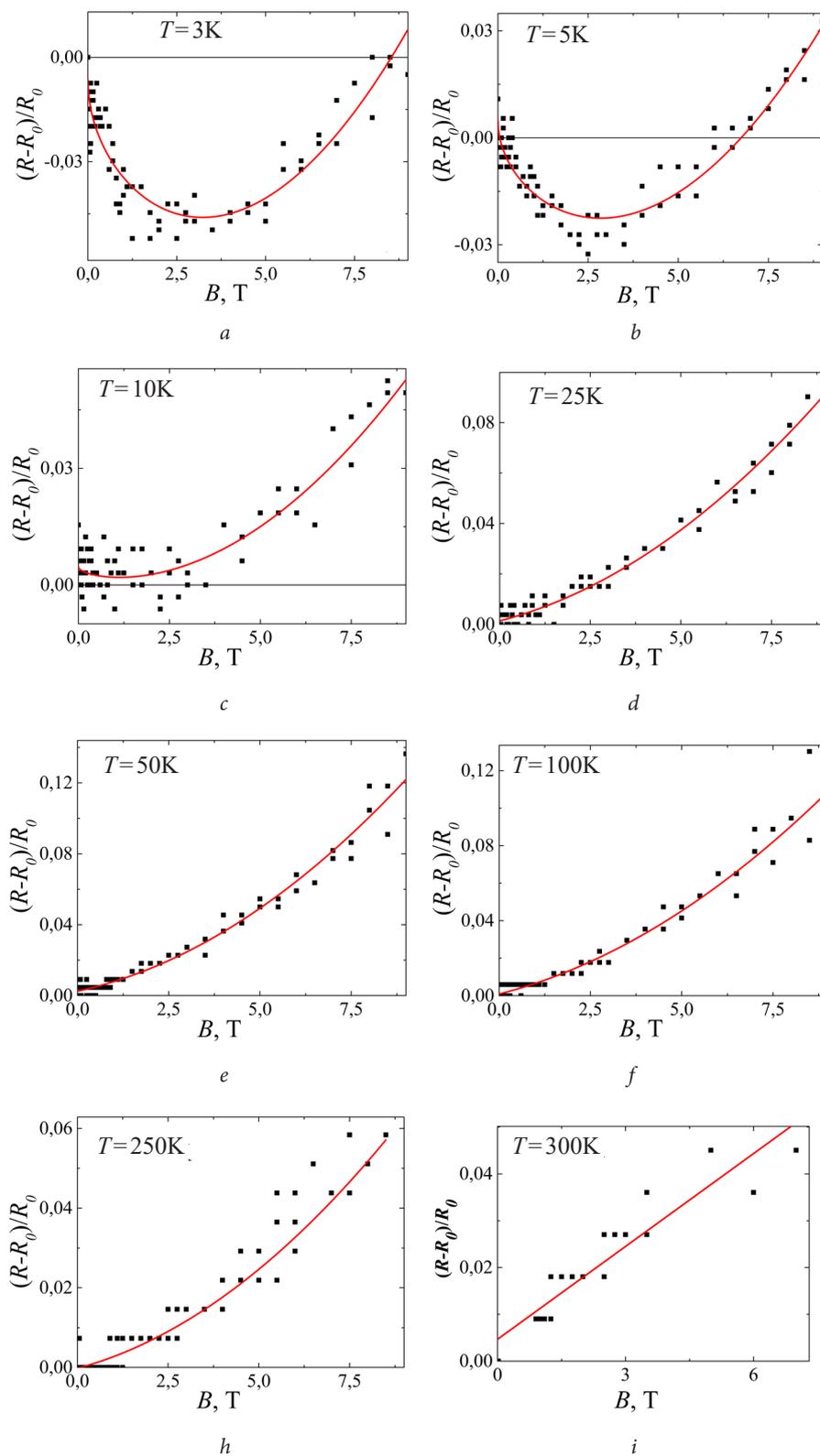


Рис. 4. Экспериментальные зависимости относительного магнетосопротивления  $MR$  от магнитного поля  $B$ , аппроксимированные соотношением (1) при  $b < 0$  для температур  $T = 3$  К (а), 5 К (б) и 10 К (с) и при  $b > 0$  для температур  $T = 25$  К (д), 50 К (е), 100 К (ф), 200 К (г), 250 К (з), 300 К (и) (сплошные линии)

Fig. 4. Experimental dependencies of relative magnetoresistance  $MR$  against magnetic field  $B$ , approximated with the expression (1) for  $b < 0$  for temperatures  $T = 3$  K (a), 5 K (b) and 10 K (c) and with  $b > 0$  for temperatures  $T = 25$  K (d), 50 K (e), 100 K (f), 200 K (g), 250 K (h), 300 K (i) (continuous lines)

полях начинает проявляться вклад ПМП – при  $B \approx 9$  Тл для  $T = 3$  К и при  $B \approx 8$  Тл для  $T = 5$  К. Как видно, полный переход от ОМП к ПМП происходит при температуре 10 К (рис. 4, *c*). Отметим также, что при температурах ниже комнатной зависимость  $MR(B)$  в области ПМП никогда не насыщается и становится линейной (рис. 4, *i*).

Величина  $MR$  в области ПМП растет с увеличением температуры выше 10 К, достигая при 100–150 К значения порядка 13 % для  $B = 9$  Тл. Выше 100 К наблюдается ослабление вклада ПМП, так что  $MR$  ( $B = 9$  Тл) уменьшается до 4 % при 300 К.

Для зависимостей  $MR(B)$  была проведена процедура фитирования на основе соотношения

$$MR(B) = bB^n + cB^m, \quad (1)$$

где  $b$  и  $c$  – коэффициенты, а показатели степени  $n$  и  $m$  определяются механизмами формирования магнеторезистивного эффекта. Фитирование зависимостей  $MR(B)$  с помощью соотношения (1) в области температур 3–5 К и полей  $B < 2$  Тл дало наилучшее согласование с экспериментом при значениях показателя степени  $n = 0,47–0,48$  при  $b < 0$  и  $c \rightarrow 0$  при любом значении показателя  $m$ . Близость показателя  $n$  к 0,5 формально соответствует вкладу квантовых поправок в проводимость Друде для 3-мерного случая [18], что однако физически невозможно, поскольку подавление этих поправок должно происходить в очень слабых магнитных полях ( $B \leq 100$  мТл). Таким образом, результаты фитирования свидетельствуют о том, что наблюдаемый характер низкотемпературной проводимости исследованного кристалла в области ОМП не может быть обусловлен влиянием квантовых поправок.

Фитирование экспериментальных зависимостей  $MR(B)$  на основе соотношения (1) при  $T \geq 10$  К, где ОМП вклад полностью отсутствует, также демонстрирует неплохое согласие с экспериментом. Однако в области ПМП при температурах ниже 100 К второй вклад в этом соотношении дает показатель  $n \approx 1$  при очень малых значениях коэффициента  $c$ . При более высоких температурах в ПМП эффект дают вклад оба члена в соотношении (1), так что величины  $b, c > 0$ , а  $n \approx 1$  и  $1,30 \leq m \leq 1,47$ . Наличие описываемого вторым членом в соотношении (1) линейного вклада в магнетосопротивление  $MR(B)$  с  $n$  примерно равным 1 при  $T < 100$  К, а также то, что при  $T > 100$  К показатель  $m$  всегда много меньше двух, подтверждает роль КМПР в переносе электронов в исследованном кристалле черного мышьяка вследствие его неоднородности. Однако для выявления причины наблюдения ОМП в достаточно высоких магнитных полях (вплоть до 3 Тл) при низких температурах требуются дополнительные эксперименты.

**Заключение.** Проведено комплексное исследование фазового состава, структуры и электрических свойств поликристалла природного черного мышьяка. Изучение фазового состава и кристаллической структуры природного кристалла b-As методами РСА и КРС показало, что образцы являются поликристаллическими, и в них присутствует не только основная фаза черного мышьяка, но также и следы его окисла, а также серого мышьяка и арсенолита ( $As_2O_3$ ). Исследование температурных зависимостей электрического сопротивления в диапазоне температур  $3 < T < 300$  К показало, что поведение зависимостей  $R(T)$  у кристалла b-As аналогично таковому для ранее изученных кристаллов черного фосфора. На основе измерений сопротивления  $R(B)$  в интервале значений магнитной индукции  $0 < B < 9$  Тл получены зависимости относительного магнетосопротивления  $MR(B)$  при температурах  $3 < T < 300$  К. При температурах  $T < 10$  К на зависимостях  $MR(B)$  проявляется конкуренция отрицательного и положительного вкладов в магнеторезистивный эффект. Преобладание ПМП эффекта с линейной зависимостью  $MR(B) \sim B$  обнаружено в диапазоне  $10 < T < 100$  К. Выше 100 К, кроме линейного, наблюдается дополнительный (степенной) вклад  $MR(B) \sim B^m$ , который не соответствует лоренцеву механизму магнетосопротивления, поскольку  $m$  существенно меньше 2 ( $1,30 \leq m \leq 1,47$ ). Наблюдаемое поведение зависимостей  $MR(B)$  указывает на сильную фазовую неоднородность и неупорядоченность исследуемого кристалла черного мышьяка, что коррелирует с результатами РСА и КРС.

**Благодарности.** Работа поддержана Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (договор № Ф20ПТИ-014). Автор выражает благодарность профессору Я. Чену, Пекинский технологический институт (Китай), за предоставление для исследований кристалла b-As.

**Acknowledgements.** The work is supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant no. Ф20ПТИ-014). Author is also grateful to Prof. Y. Chen from Beijing Institute of Technology (China) for the supplying of b-As crystals for research.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Thickness-Dependent Carrier Transport Characteristics of a New 2D Elemental Semiconductor: Black Arsenic / M. Z. Zhong [et al.] // *Adv. Funct. Mater.* – 2018. – Vol. 28, N 43. – Art. 1802581. <https://doi.org/10.1002/adfm.201802581>
2. Arsenic K4 crystal: A new stable direct-gap semiconductor allotrope / C. Wang [et al.] // *Solid State Communications.* – 2021. – Vol. 323. – Art. 114128. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2020.114128>
3. Atomically thin binary V–V compound semiconductor: a first-principles study / W. Y. Yu [et al.] // *J. Mater. Chem. C.* – 2016. – Vol. 4, N 27. – P. 6581–6587. <https://doi.org/10.1039/c6tc01505k>
4. Stöhr, H. Beiträge zur Kenntnis der Allotropie des Arsens / H. Stöhr // *Z. Anorg. Allg. Chem.* – 1939. – Vol. 242, N 2. – P. 138–144. <https://doi.org/10.1002/zaac.19392420204>
5. Seidl, M. The Chemistry of Yellow Arsenic / M. Seidl, G. Balazs, M. Scheer // *Chem. Rev.* – 2019. – Vol. 119, N 14. – P. 8406–8434. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00713>
6. Lattice dynamics and anomalous bonding in rhombohedral As: First-principles supercell method / S. Shang [et al.] // *Physical Review B.* – 2007. – Vol. 76, N 5. – Art. 052301. <https://doi.org/10.1103/physrevb.76.052301>
7. Silas, P. Density-functional investigation of the rhombohedral to simple-cubic phase transition of arsenic / P. Silas, J. R. Yates, P. D. Haynes // *Physical Review B.* – 2008. – Vol. 78, N 17. – Art. 174101. <https://doi.org/10.1103/physrevb.78.174101>
8. Quantum effect enhanced magnetism of C-doped phosphorene nanoribbons: first-principles calculations / X. L. Cai [et al.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2017. – Vol. 19, N 41. – P. 28354–28359. <https://doi.org/10.1039/c7cp05277d>
9. Structural and Electronic Properties of Layered Arsenic and Antimony Arsenide / L. Kou [et al.] // *J. Phys. Chem. C.* – 2015. – Vol. 119, N 12. – P. 6918–6922. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02096>
10. Manifestation of unexpected semiconducting properties in few-layer orthorhombic arsenene / Z. Zhang [et al.] // *Applied Physics Express.* – 2015. – Vol. 8, N 5. – Art. 055201. <https://doi.org/10.7567/apex.8.055201>
11. Kamal, C. Arsenene: Two-dimensional buckled and puckered honeycomb arsenic systems / C. Kamal, M. Ezawa // *Physical Review B.* – 2015. – Vol. 91, N 8. – Art. 085423. <https://doi.org/10.1103/physrevb.91.085423>
12. Roisnel, T. WinPLOTR: a Windows tool for powder diffraction pattern analysis / T. Roisnel, J. Rodríguez-Carvajal // *Mater. Sci. Forum.* – 2001. – Vol. 378–381. – P. 118–123. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.378-381.118>
13. Shklovskii, B. I. Electronic properties of doped semiconductors / B. I. Shklovskii, A. L. Efros. – Springer Series in Solid-State Sciences, 1984. – 390 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02403-4>
14. Shik, A. Y. Electronic Properties of Inhomogeneous Semiconductors / A. Y. Shik. – Electrocomponent Science Monographs, 1995. – 152 p.
15. Electric Properties of Black Phosphorus Single Crystals / A. K. Fedotov [et al.] // IX Intern. Scient. Conf. Actual Problems of Solid State Physics: Book of abstracts. – 2021. – Vol. 2. – P. 47–51.
16. Altshuler, B. L. Effects of electron-electron collisions with small energy transfers on quantum localization / B. L. Altshuler, A. G. Aronov, D. E. Khmel'nitsky // *Journal of Physics C: Solid State Physics.* – 1982. – Vol. 15. – Art. 7367. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/15/36/018>
17. Pudalov, V. M. Metallic conduction, apparent metal-insulator transition and related phenomena in two-dimensional electron liquid / V. M. Pudalov // *Proceedings of the International School of Physics “Enrico Fermi”.* – 2004. – Vol. 157. – P. 335–356. <https://doi.org/10.3254/978-1-61499-013-0-335>
18. Полянская, Т. А. Квантовые поправки к проводимости в полупроводниках с двумерным и трехмерным электронным газом / Т. А. Полянская, Ю. В. Шмарцев // *Физика и техника полупроводников.* – 1989. – Т. 23, № 1. – С. 3–32.

## References

1. Zhong M. Z., Xia Q. L., Pan L. F., Liu Y. Q., Chen Y. B., Deng H. X., Li J. B., Wei Z. M. Thickness-Dependent Carrier Transport Characteristics of a New 2D Elemental Semiconductor: Black Arsenic. *Advanced Functional Materials*, 2018, vol. 28, no. 43, art. 1802581. <https://doi.org/10.1002/adfm.201802581>
2. Wang C., Bai S., Zhao C., Yu W., Yang Y., Chen Y., Niu C.-Y. Arsenic K4 crystal: A new stable direct-gap semiconductor allotrope. *Solid State Communications*, 2021, vol. 323, art. 114128. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2020.114128>
3. Yu W. Y., Niu C. Y., Zhu Z. L., Wang X. F., Zhang W. B. Atomically thin binary V–V compound semiconductor: a first-principles study. *Journal of Materials Chemistry C*, 2016, vol. 4, no. 27, p. 6581–6587. <https://doi.org/10.1039/c6tc01505k>
4. Stöhr H. Beiträge zur Kenntnis der Allotropie des Arsens. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 1939, vol. 242, no. 2, pp. 138–144 (in German). <https://doi.org/10.1002/zaac.19392420204>
5. Seidl M., Balazs G., Scheer M. The Chemistry of Yellow Arsenic. *Chemical Reviews*, 2019, vol. 119, no. 14, pp. 8406–8434. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00713>
6. Shang S., Wang Y., Zhang H., Liu Z.-K. Lattice dynamics and anomalous bonding in rhombohedral As: First-principles supercell method. *Physical Review B*, 2007, vol. 76, no. 5, art. 052301. <https://doi.org/10.1103/physrevb.76.052301>
7. Silas P., Yates J. R., Haynes P. D. Density-functional investigation of the rhombohedral to simple-cubic phase transition of arsenic. *Physical Review B*, 2008, vol. 78, no. 17, art. 174101. <https://doi.org/10.1103/physrevb.78.174101>
8. Cai X. L., Niu C. Y., He Y. Y., Wang J. J., Zhu Z. L., Zhang L. W., Jia Y. Quantum effect enhanced magnetism of C-doped phosphorene nanoribbons: first-principles calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, vol. 19, no. 41, pp. 28354–28359. <https://doi.org/10.1039/c7cp05277d>

11. Kamal C., Ezawa M., Arsenene: Two-dimensional buckled and puckered honeycomb arsenic systems. *Physical Review B*, 2015, vol. 91, no. 8, art. 085423. <https://doi.org/10.1103/physrevb.91.085423>
9. Kou L., Ma Y., Tan X., Frauenheim T., Du A., Smith S. Structural and Electronic Properties of Layered Arsenic and Antimony Arsenide. *Journal of Physical Chemistry C*, 2015, vol. 119, no. 12, pp. 6918–6922. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02096>
10. Zhang Z., Xie J., Yang D., Wang Y., Si M., Xue D. Manifestation of unexpected semiconducting properties in few-layer orthorhombic arsenene. *Applied Physics Express*, 2015, vol. 8, no. 5, art. 055201. <https://doi.org/10.7567/apex.8.055201>
12. Roisnel T., Rodríguez-Carvajal J. WinPLOTR: a Windows tool for powder diffraction pattern analysis. *Materials Science Forum*, 2001, vol. 378–381, pp. 118–123. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.378-381.118>
13. Shklovskii B. I., Efros A. L. *Electronic properties of doped semiconductors*. Springer Series in Solid-State Sciences, 1984. 390 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-02403-4>
14. Shik A. Y. *Electronic Properties of Inhomogeneous Semiconductors*. Electrocomponent Science Monographs, 1995. 152 p.
15. Fedotov A. K., Kharchanka A., Fedotova J., Slabuhov V., Bushinski M., Svito I. Electric Properties of Black Phosphorus Single Crystals. *IX International Scientific Conference of Actual Problems of Solid State Physics: Book of abstracts*, 2021, vol. 2, pp. 47–51.
16. Altshuler B. L., Aronov A. G., Khmel'nitsky D. E. Effects of electron-electron collisions with small energy transfers on quantum localization. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 1982, vol. 15, art. 7367. <https://doi.org/10.1088/0022-3719/15/36/018>
17. Pudalov V. M. Metallic conduction, apparent metal-insulator transition and related phenomena in two-dimensional electron liquid. *Proceedings of the International School of Physics "Enrico Fermi"*, 2004, vol. 157, pp. 335–356. <https://doi.org/10.3254/978-1-61499-013-0-335>
18. Polyanskaya T. A., Shmartsev Yu. V. Quantum corrections to the conductivity in semiconductors with 2D and 3D electron gas. *Fizika i Tekhnika Poluprovodnikov = Semiconductors*, 1989, vol. 23, no. 1, pp. 3–32 (in Russian).

### Информация об авторе

Федотова Юлия Александровна – д-р физ.-мат. наук, заместитель директора. Институт ядерных проблем БГУ (ул. Бобруйская, 11, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Julia@hep.by.

### Information about author

Fedotova Julia A. – D. Sc. (Physics and Mathematics), Deputy director. Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University (11, Bobruiskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Julia@hep.by.

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

**ХИМИЯ**  
**CHEMISTRY**

УДК 582.287.238:577.175.1  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-35-42>

Поступило в редакцию 16.08.2021  
Received 16.08.2021

**О. Н. Жук<sup>1</sup>, Д. А. Слиж<sup>1</sup>, Р. П. Литвиновская<sup>2</sup>, М. А. Томанова<sup>2</sup>,  
член-корреспондент В. Н. Жабинский<sup>2</sup>, академик В. А. Хрипач<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Полесский государственный университет, Пинск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА РАЗВИТИЕ МИЦЕЛИЯ  
БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS***

**Аннотация.** Проведенные эксперименты при погруженном культивировании вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) показали, что добавление в питательную среду brassinosteroidов и их производных в концентрации 0,05 мг/л значительно увеличивает биомассу мицелия. Установлено, что при использовании 24-эпи- и 28-гомокастастерона при выращивании вешенки в течение 9 суток колония мицелия развивалась только в глубине культуральной жидкости, а мицелий формировался в клубочки с плотной структурой. Добавление салицилатов 24-эпикастастерона и 6-дезоксо-24-эпикастастерона способствовало развитию обширной колонии мицелия как на поверхности, так и в глубине культуральной жидкости. Салицилаты оказывали влияние и на структуру мицелия – медузоподобный рыхлый мицелий наблюдали в колбах со средой, содержащей салицилаты 24-эпи- и 6-дезоксо-24-эпикастастерона. В работе впервые установлено наличие и проведено количественное определение содержания эндогенных brassinosteroidов ряда brassinoliда, 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолида в плодовом теле и мицелии гриба вешенки обыкновенной.

**Ключевые слова:** вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*), brassinosteroidы, салицилаты brassinosteroidов, иммуноферментный анализ

**Для цитирования.** Влияние brassinosteroidов на развитие мицелия базидиального гриба *Pleurotus ostreatus* / О. Н. Жук [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 35–42. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-35-42>

**Olga N. Zhuk<sup>1</sup>, Darya A. Slizh<sup>1</sup>, Raisa P. Litvinovskaya<sup>2</sup>, Margarita A. Tomanova<sup>2</sup>,  
Corresponding Member Vladimir N. Zhabinskii<sup>2</sup>, Academician Vladimir A. Khripach<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**INFLUENCE OF BRASSINOSTEROIDS ON THE DEVELOPMENT  
OF THE MYCELIA OF BASIDIAL MUSHROOM *PLEUROTUS OSTREATUS***

**Abstract.** Experiments on the effect of brassinosteroids and their salicylates on the mycelium biomass during submerged cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) were carried out. It was shown that their addition to the nutrient medium at a concentration of 0.05 mg/l significantly increases the biomass of the mycelium. It was found that, when exposed to 24-epi- and 28-homocastasterone for 9 days, the mycelium colony developed only in the depths of the culture liquid, and the mycelium was formed into glomeruli with a dense structure. The use of salicylates 24-epicastasterone and 6-deoxo-24-epicastasterone promoted the development of an extensive colony of mycelium both on the surface and in the depth of the culture liquid. Salicylates also influenced the structure of the mycelium – the jellyfish-like loose mycelium was observed in flasks with a medium containing 24-epi and 6-deoxo-24-epicastasterone salicylates. For the first time, the determination of the content of endogenous brassinosteroids in the fruiting body and mycelium of *P. ostreatus* was carried out.

**Keywords:** oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), brassinosteroids, salicylates of brassinosteroids, enzyme immunoassay

**For citation.** Zhuk O. N., Slizh D. A., Litvinovskaya R. P., Tomanova M. A., Zhabinskii V. N., Khripach V. A. Influence of brassinosteroids on the development of the mycelia of basidial mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 35–42 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-35-42>

**Введение.** Грибы являются богатым источником различных биологически активных веществ со специфическим химическим составом, не имеющим аналогов в растительном и животном мире. Их биологически активные вещества имеют широкий спектр эффектов, участвующих в регуляции метаболических путей человека – от блокировки их в центральной нервной системе (работают как яды) до улучшения обмена веществ, стимуляции ряда функциональных систем, в том числе иммунной, и выведения из организма радионуклидов, тяжелых металлов и токсинов [1]. Во всем мире усиленно ведутся поиск и испытание новых лекарственных препаратов из грибов. К настоящему времени уже получен ряд таких препаратов на основе глюканов, выделенных из плодовых тел грибов, к ним относятся: Шизофиллан, Лентинан, Крестин, Бифунгин, Леван-2 и мн. др. [2; 3]. Следует признать, что грибы как источник биологически активных веществ в нашей стране рассматриваются весьма осторожно, хотя их биологическое разнообразие достаточно велико. Поиск биологической активности соединений, выделенных из грибов, ведется в нескольких направлениях – антиканцерогенной и противоопухолевой, гипополипидемической, антибактериальной и противовирусной, иммуномодулирующей. Перспективны исследования грибных кардиотоников, веществ, успокаивающих нервную систему, витаминов, незаменимых аминокислот и пищевых волокон [4; 5].

Браassinостероиды (БС) известны как группа стероидных гормонов, которые оказывают комплексное воздействие на растения [6]. Их регуляторная роль проявляется в стимуляции процессов роста, интенсивности фотосинтеза, стрессовых реакций, изменениях белкового обмена, транспорта ионов и многих других аспектах обмена веществ. Информация о роли БС в физиологических и биохимических процессах грибов ограничена, а данные об эндогенном содержании их в грибах отсутствуют. В ряде исследований отмечен стимулирующий эффект при обработке грибов браassinостероидами. Так, в случае применения препарата Эпин (действующее вещество – 24-эпибразинолид) цикл выращивания сокращался на 10–12 % при увеличении урожайности на 70–80 %<sup>1</sup> [7], а рост мицелия вешенки на агаризованной, жидкой и зерновой средах ускорялся [8]. Сообщалось, что рост мицелия гриба *Psilocybe cubensis* происходит в 2–3 раза быстрее под влиянием синтетического аналога БС (22S,23S)-28-гомобразинолида по сравнению с необработанным контролем [9]. Обработка браassinостероидами также привела к более раннему появлению первых плодовых тел и увеличению сухой массы гриба.

Для массового производства препаратов или очищенных биологически активных веществ из грибов можно использовать как сбор плодовых тел в природе, так и биотехнологические методы выращивания. Сбор плодовых тел в природе ограничен несколькими факторами: коротким периодом развития, редким появлением или отсутствием гриба в естественных условиях, а также возможным ущербом, который может быть нанесен экосистеме процедурой удаления плодовых тел. Биотехнологическое производство удобно благодаря круглогодичному характеру и бережному отношению к окружающей среде. Питательная среда в ферментере легко контролируется, а ее состав может быть обогащен в строго дозированных количествах биологически активными веществами, в том числе теми, которые можно рассматривать как факторы роста. В связи с этим основной целью данной работы было получение новых знаний о количественном содержании эндогенных БС и их участии в жизненных процессах базидиомицетов, а также исследование возможности применения экзогенных БС при культивировании грибов. В работе также ставится задача изучения эффекта производных БС – конъюгатов с салициловой кислотой. Последнее интересно тем, что рядом авторов отмечено синергическое взаимодействие БС с гормонами растений (гиббереллины и ауксины) [10]. Кроме того, получены экспериментальные данные о пересечении сигнальных путей БС и салициловой кислоты, обусловленном тем, что в трансдукции

<sup>1</sup> Способ стимуляции роста шампиньонов и вешенок: пат. RU 2160000 / К. Л. Алексеева, Н. Н. Малеванная, В. А. Хрипач, В. Н. Жабинский. – Оpubл. 10.12.2000.

сигналов обоих фитогормонов задействован белок NPR1 [11]. Ранее нами осуществлен синтез салицилатов БС и показана их эффективность при выращивании растений в стрессовых условиях [12].

**Материалы и методы исследования.** Исследования выполнены на «диком» штамме вешенки обыкновенной (*P. ostreatus*), выделенном сотрудником кафедры биотехнологии Полесского государственного университета, доцентом Е. О. Юрченко из плодовых тел, растущих на культурном тополе (*Populus* sp.) [13].

*Поверхностное культивирование.* Для культивирования вешенки обыкновенной применялся картофельно-сахарозный агар (КСА), для приготовления которого использовали (г/л): картофель сорта Скарб – 100; пищевая сахароза (ГОСТ 33222–2015) – 10; агар-агар американский тип QP – 13; водопроводная вода – 1000. Стерилизация проводилась в автоклаве 40 мин при 112 °С (0,5 атм.).

При посеве *P. ostreatus* на плотную питательную среду фрагменты ковры маточного мицелия площадью 1,0 см<sup>2</sup> помещали в центр чашки Петри и выращивали в течение 14 суток в темноте при постоянной температуре 26 ± 1 °С. Рост и развитие мицелия ежедневно оценивали органолептически, на 7-е и 14-е сутки исследовали морфологию. Морфологические особенности мицелия *P. ostreatus* анализировали с помощью микроскопа Olympus CX41.

*Глубинное культивирование.* Посев инокулюма *P. ostreatus* осуществляли, помещая фрагменты ковры маточного мицелия площадью 1,0 см<sup>2</sup> на 100 мл стерильной питательной картофельно-сахарозной среды (КСС). *P. ostreatus* культивировали в течение 14 суток в темноте, при 26 ± 1 °С на качалке модели Wise Shake SHO и режиме 70 об/мин. Аэрация происходила за счет диффузии воздуха через ватно-марлевые пробки. Культивирование мицелия вешенки проводили в трех повторях.

*Наращение массы вешенки обыкновенной в глубинной культуре.* Для исследования нарастания массы мицелия вешенки обыкновенной в глубинной культуре в качестве питательной среды использовали КСС, помещая в нее фрагменты маточного мицелия в соотношении 1 см<sup>2</sup> мицелия на 100 мл питательной среды. Культивировали в течение 9 суток, снимая каждые сутки показатели нарастания культуры *P. ostreatus*.

*Количественное определение брассиностероидов методом иммуноферментного анализа.* Лиофилизацию образцов гриба из замороженного состояния проводили под вакуумом на приборе VirTis 6211 (США). Лиофилизованные образцы измельчали, брали навески (~1 г) и добавляли 8 мл буферного раствора 0,25 М Трис, тщательно перемешивали. Полученные смеси оставляли на 4–6 ч при комнатной температуре и далее определяли содержание брассиностероидов двухстадийным методом [14] с использованием разработанных в Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии иммуноферментных тест-систем по определению 24-эпи-, 24S-метил-, 28-гомобрассиностероидов.

*Изучение влияния брассиностероидов на культивирование гриба.* В качестве регуляторов роста изучали природные брассиностероиды и их конъюгаты с салициловой кислотой: 24-эпикастастерон (ЭК), 28-гомокастастерон (ГК), салицилат 24-эпикастастерона (салицилат ЭК), салицилат 6-дезоксо-24-эпикастастерона (салицилат 6-дезоксо-ЭК). Указанные соединения получены в Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси. Рабочий раствор готовили путем растворения 1 мг брассиностероида в 1 мл этанола и последующего его разбавления до 10 мл. В питательную среду вносили с помощью пипет-дозатора по 0,5 мл брассиностероида на 1 л среды. Концентрации брассиностероидов и их производных в культуральной жидкости составляли 0,05 мг/л.

*Культивирование гриба.* В процессе культивирования гриба осуществляли визуальную оценку наличия роста мицелия вешенки в каждой из питательных сред. По окончании культивирования анализировали макроморфологические особенности культур, влажную и сухую массу мицелия. Биомасса гриба из каждой повторности отделялась от среды, излишки культуральной жидкости удаляли при помощи фильтровальной бумаги. Мицелий собирали также со стенок колб. Для определения урожайности (по сухой массе) мицелий высушивали при температуре 35–37 °С до полной потери гибкости склеившейся гифальной массы и взвешивали.

**Результаты и их обсуждение.** Исследования проводили на диком штамме вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*). Во время культивирования гриба проводилась визуальная оценка наличия роста мицелия вешенки в каждой из питательных сред. В конце культивирования анализировали макроморфологические характеристики культур, влажную и сухую массу мицелия.

В поверхностной культуре мицелий *P. ostreatus* имел характерные для него морфологические особенности: бесцветные, септированные гифы с многочисленными одиночными пряжками. В погруженной культуре на питательной среде без внесения брассиностероидов вешенка формировала бледно окрашенные с короткими лучистыми выростами шарики мицелия диаметром от 2 до 25 мм (рисунок). Вначале развивались 1–2 крупных шарика, происходящих из инокулюма, позже появлялись вторичные мелкие. С удлинением сроков культивирования общая масса мицелия нарастала. Культуре был присущ ярко выраженный грибной аромат.



Рост мицелия *P. ostreatus* при поверхностном (a) и глубинном (b) культивировании  
Growth of *P. ostreatus* mycelium during surface (a) and deep (b) cultivation

Прирост массы за первые 2 сут по отношению к исходной составлял 2,7 раза, за 3 сут – 4,5 раза, за 4 сут – 10,3 раза, за 7 сут – 21,1 раза, за 8 сут – 27,8 раза, за 9 сут – 31,7 раза. Но скорость нарастания массы по отношению к предыдущим суткам увеличивалась только в первую неделю культивирования – максимальный показатель в наших условиях зарегистрирован на 4 сут – увеличение в 2,3 раза по отношению к 3 сут. В последующем скорость прироста снижалась (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Нарастание влажной массы вешенки обыкновенной в глубинной культуре

Table 1. The increase in the wet mass of oyster mushrooms in deep culture

Сутки <i>in vitro</i> Day <i>in vitro</i>	Влажная масса, г Wet mass, g	Прирост массы мицелия Mycelium mass gain	
		по отношению к исходной, кратность in relation to the original, multiplicity	по отношению к массе, зафиксированной в предыдущие сутки, кратность in relation to the mass recorded on the previous day, multiplicity
0	0,83 ± 0,10	–	–
2	2,21 ± 0,9	2,7	–
3	3,72 ± 0,27	4,5	1,68
4	8,54 ± 1,0	10,3	2,3
7	17,52 ± 1,3	21,1	2,05
8	23,06 ± 1,25	27,8	1,3
9	26,34 ± 2,00	31,7	1,1

Анализ кривой роста показал, что в периодической погруженной культуре в течение 9 суток наблюдений масса мицелия нарастала, что свидетельствовало о продолжении в данном временном отрезке экспоненциальной фазы роста *P. ostreatus*.

До настоящего времени нет данных по содержанию brassinosterоидов в грибах, в частности, в вешенке обыкновенной. Поскольку планировалось изучение влияния экзогенных БС на рост и развитие вешенки, мы поставили задачу определения содержания эндогенных БС в составе плодового тела и мицелия гриба. Методом иммуноферментного анализа показано наличие у базидиальных грибов основных групп brassinosterоидов. Так, в вешенке обыкновенной выявлено присутствие brassinosterоидов ряда 24-эпибрассинолида, брассинолида и 28-гомобрассинолида. Количественный состав brassinosterоидов представлен в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Содержание эндогенных brassinosterоидов тела природного гриба и 14-дневного мицелия вешенки обыкновенной, полученного в глубинной культуре, нг/г лиофильно высушенной массы

T a b l e 2. The content of endogenous brassinosterоids of the natural mushroom body and a 14-day mycelium of oyster mushroom obtained in deep culture, ng/g of freeze-dried mass

Образец Sample	Содержание brassinosterоидов Brassinosterоid content		
	24-эпиБС 24-epiBS	24S-метилБС 24S-methylBS	28-гомоБС 28-homoBS
Вешенка обыкновенная (плодовое тело)	93,38 ± 2,68	253,154 ± 15,04	136,09 ± 5,3
Вешенка обыкновенная (мицелий)	63,16 ± 3,99	7,75 ± 1,21	44,68 ± 2,31

П р и м е ч а н и е: 24-эпиБС – БС ряда 24-эпибрассинолида (24-эпибрассинолид, 24-эпикастастерон, 6-дезоксо-24-эпикастастерон); 24S-метилБС – БС ряда брассинолида (брассинолид, кастастерон, 6-дезоксокастастерон); 28-гомоБС – БС ряда 28-гомобрассинолида (28-гомобрассинолид, 28-гомокастастерон, 6-дезоксо-28-гомокастастерон).

N o t e: 24-epiBS – BS of the 24-epibrassinolide series (24-epibrassinolide, 24-epicastasterone, 6-deoxo-24-epicastasterone); 24S-methylBS – BS of the brassinolide series (brassinolide, castasterone, 6-deoxocastasterone); 28-homoBS – BS of the 28-homobrassinolide series (28-homobrassinolide, 28-homocastasterone, 6-deoxo-28-homocastasterone).

Из данных табл. 2 следует, что биосинтез brassinosterоидов имеет место в природном грибе, и это свойство продукции вторичных метаболитов сохраняется при глубинном культивировании. Несмотря на то что количественная составляющая их биосинтеза ниже в глубинной культуре, их содержание близко к таковому в растительных объектах [6]. Можно отметить, что если для плодового тела основной составляющей являются БС ряда брассинолида, то для мицелия более характерны БС группы 24-эпибрассинолида.

При культивировании *P. ostreatus* на питательной среде, содержащей brassinosterоиды, уже на 3-и сутки во всех вариантах эксперимента отмечали различия в развитии мицелия по сравнению с контролем, а также между группами brassinosterоидов. Различия в развитии мицелия имели качественный (тип мицелия, его структура, наличие лучистых выростов на клубочках, форма клубочков) и количественный характер (масса мицелия).

Клубочки мицелия *P. ostreatus*, выращенного на питательной среде с добавлением 24-эпикастастерона, имели округлую и продолговатую формы, лучистые отростки, длина которых была визуально больше чем в контроле. Цвет культуральной жидкости не изменялся, культура имела характерный грибной аромат.

При выращивании *P. ostreatus* в питательной среде с добавлением 28-гомокастастерона лучистые отростки наблюдали не у всех клубочков мицелия – крупные формировали выросты, мелкие были гладкими. Форма крупных клубочков во всех повторях была продолговатой, а мелких – округлой. На цвет культуральной жидкости данный brassinosterоид не оказал влияния, но усиливал грибной аромат.

Салицилат эпикастастерона, добавленный в питательную среду, обусловил развитие совершенно иного типа мицелия – на поверхности культуральной жидкости он представлял собой белые шерстисто-ватные колонии, диаметр которых за 3 дня культивирования достигал 5,5 см, в толще среды формировались медузоподобные образования.

При выращивании *P. ostreatus* в среде с добавлением салицилата 6-дезоксо-24-эпикастастерона мицелий вешенки развивался на поверхности и в толще культуральной жидкости. В толще

питательной среды наблюдали формирование медузоподобного образования. Часть мицелия вешенки была сформирована в клубочки, не имеющие лучистых выростов.

Результаты взвешивания влажной и сухой масс мицелия вешенки, культивируемого на питательной среде с применением всех исследуемых brassinosteroidов, представлены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Влияние brassinosteroidов на накопление биомассы 9-дневного мицелия *P. ostreatus*  
T a b l e 3. Effect of brassinosteroids on the accumulation of biomass of the 9-day *P. ostreatus* mycelium

Опыт Experience	Масса влажного мицелия, г Wet mycelium weight, g	Масса сухого мицелия, г Dry mycelium weight, g
Контроль	14,48 ± 0,07	0,8 ± 0,01
24-эпикастастерон (ЭК)	66,88 ± 0,07	3,8 ± 0,07
28-гомокастастерон (ГК)	68,80 ± 1,26	3,9 ± 0,08
Салицилат ЭК	74,96 ± 0,04	4,3 ± 0,09
Салицилат 6-дезоксо-ЭК	108,16 ± 0,06	6,2 ± 0,05

Из данных табл. 3 видно, что сухая масса мицелия гриба, выращенного с использованием 24-эпикастастерона, превышает значения контроля в 4,8 раз, 28-гомокастастерона – в 4,9 раза, салицилата 24-эпикастастерона – в 5,4 раза, салицилата 6-дезоксо-24-эпикастастерона – в 7,8 раза.

**Заклучение.** Таким образом, впервые показана эффективность применения фитогормонов 24-эпикастастерона и 28-гомокастастерона при выращивании вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*). Проведенные эксперименты показали, что добавление brassinosteroidов в концентрации 0,05 мг/л в питательную среду при погружном культивировании *P. ostreatus* значительно увеличивало биомассу мицелия. Методом иммуноферментного анализа проведено количественное определение содержания эндогенных brassinosteroidов ряда brassinoliда, 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолида в плодовом теле и мицелии гриба вешенки обыкновенной. Добавление салицилатов 24-эпикастастерона и 6-дезоксо-24-эпикастастерона в культуральную среду способствовало развитию обширной колонии мицелия вешенки как на поверхности, так и в глубине культуральной жидкости. При использовании 24-эпикастастерона и 28-гомокастастерона развивалась только глубинная культура гриба. Brassinosteroidы и их салицилаты также оказывали влияние на структуру мицелия в зависимости от используемого гормона. При использовании 24-эпи- и 28-гомокастастеронов мицелий формировался в клубочки, которые имели плотную структуру. Медузоподобный рыхлый мицелий наблюдали в колбах со средой, содержащей салицилаты 24-эпи- и 6-дезоксо-24-эпикастастерона.

#### Список использованных источников

1. Булах, Е. М. Грибы – источник жизненной силы / Е. М. Булах. – Владивосток, 2001. – 64 с.
2. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре: сб. науч. тр.: в 2 т. / под ред. С. П. Васера. – Киев, 2011. – Т. 1. – С. 5–6.
3. Чхенкели, В. А. Антимикробное действие дереворазрушающего гриба *Coriolus pubescens* (Shum. Fr.) Quel / В. А. Чхенкели, Т. И. Никифорова, Р. Г. Скворцова // Микология и фитопатология. – 1998. – Т. 32, № 1. – С. 69–71.
4. Краснопольская, Л. М. Грибы класса *Basidiomycetes* – источники лекарственных веществ / Л. М. Краснопольская // Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии: сб. науч. тр. – М., 1998. – С. 230–232.
5. Система скрининга экстрактов базидиальных грибов, обладающих противоопухолевой активностью / Л. М. Краснопольская [и др.] // Успехи медицинской микологии. – 2005. – Т. 5. – С. 192–195.
6. Khrpach, V. A. Brassinosteroids: A new class of plant hormones / V. A. Khrpach, V. N. Zhabinskii, A. E. De Groot. – San Diego, 1998. – 456 p.
7. Алексеева, К. Л. Применение эпина для стимуляции роста съедобного гриба вешенки обыкновенной / К. Л. Алексеева, В. В. Чурикова // Докл. Рос. акад. сельскохоз. наук. – 2004. – № 5. – С. 18–19.
8. Влияние эпибрассинолида на рост и развитие мицелия *Pleurotus ostreatus* / О. А. Евдокимова [и др.] // Микология и фитопатология. – 2002. – Т. 36, вып. 4. – С. 44–47.
9. Gartz, J. Growth-promoting effect of a brassinosteroidin mycelial cultures of the fungus *Psilocybe cubensis* / J. Gartz, G. Adam, H. M. Vorbrodt // Naturwissenschaften. – 1990. – Vol. 77, N 8. – P. 388–389. <https://doi.org/10.1007/bf01135741>
10. Bajguz, A. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses / A. Bajguz, S. Hayat // Plant Physiol. Biochem. – 2009. – Vol. 47, N 1. – P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>

11. Divi, U. K. Brassinosteroids Mediated Stress Tolerance in Arabidopsis Shown Interactions with Ascorbic Acid, Ethylene and Salicylic Acid Pathways / U. K. Divi, T. Rahman, P. Krishna // *BMC Plant Biology*. – 2010. – Vol. 10. – P. 151–164. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-151>
12. Синтез и стресс-протекторное действие на растения конъюгатов брассиностероидов с салициловой кислотой / Р. П. Литвиновская [и др.] // *Химия природн. соед.* – 2016. – № 3. – С. 394–398.
13. Особенности роста и развития культуры гриба вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) в присутствии ионов марганца (II) / О. Н. Жук [и др.] // *Вестн. Полесского гос. ун-та. Сер. природовед. наук.* – 2017. – № 2. – С. 43–50.
14. A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants / A. G. Pradko [et al.] // *Steroids*. – 2015. – Vol. 97. – P. 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.022>

## References

1. Bulach E. M. *Mushrooms are a source of vitality*. Vladivostok, 2001. 64 p. (in Russian).
2. Vasser S. P., ed. *Biological properties of medicinal macromycetes in culture: collection of scientific papers in 2 volumes. Vol. 1*. Kiev, 2011, pp. 5–6 (in Russian).
3. Chkhenkeli V. A., Nikiforova T. I., Skvortsova R. G. Antimicrobial action of the wood-destroying fungus *Coriolus pubescens* (Shum. Fr.) Quel]. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*, 1998, vol. 32, no. 1, pp. 69–71. (in Russian).
4. Krasnopol'skaya L. M. Mushrooms of the class Basidiomycetes – sources of medicinal substances. *Sovremennyye problemy mikologii, al'gologii i fitopatologii: Sbornik nauchnykh trudov* [Modern problems of mycology, algology and phytopathology: collection of scientific papers]. Moscow, 1998, pp. 230–232 (in Russian).
5. Krasnopol'skaya L. M., Belitsky I. V., Avtonomova A. V. Screening system for extracts of basidiomycetes with antitumor activity. *Uspekhi meditsinskoj mikologii = Advances in medical mycology*, 2005, vol. 5, pp. 192–195 (in Russian).
6. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., De Groot A. E. *Brassinosteroids: A new class of plant hormones*. San Diego, 1998. 456 p.
7. Alekseeva K. L., Churikova V. V. Using epin for growth stimulation of oyster mushroom. *Doklady Rossijskoi akademii sel'skokhozyaistvennykh nauk = Reports of the Russian Academy of Agricultural Sciences*, 2004, no. 5, pp. 18–19 (in Russian).
8. Evdokimova O. A., Pol'skikh S. V., Aksenovskaya V. E., Usacheva R. V. Influence of epibrassinolide on the growth and development of *Pleurotus ostreatus* mycelium. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*, 2002, vol. 36, no. 4, pp. 44–47 (in Russian).
9. Gartz J., Adam G., Vorbrodt H. M. Growth-promoting effect of a brassinosteroid in mycelial cultures of the fungus *Psilocybe cubensis*. *Naturwissenschaften*, 1990, vol. 77, no. 8, pp. 388–389. <https://doi.org/10.1007/bf01135741>
10. Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009, vol. 47, no. 1, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
11. Divi U. K., Rahman T., Krishna P. Brassinosteroids Mediated Stress Tolerance in Arabidopsis Shown Interactions with Abscisic Acid, Ethylene and Salicylic Acid Pathways. *BMC Plant Biology*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 151–164. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-151>
12. Litvinovskaya R. P., Vayner A. A., Zhylitskaya H. A., Kolupaev Yu. E., Savachka A. P., Khripach V. A. Synthesis and stress-protective action on plants of brassinosteroid conjugates with salicylic acid. *Chemistry of Natural Compounds*, 2016, vol. 52, no. 3, pp. 452–457. <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1671-y>
13. Zhuk O. N., Bokova O. A., Sakovich V. V., Nikandrov V. N. Distinguishing feature of growth and development of (*Pleurotus ostreatus*) mushroom in the presence of manganese ions (II). *Vestnik Polesskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya prirodovedcheskikh nauk = Bulletin of Polessky State University. Series of Natural Sciences*, 2017, no. 2, pp. 43–50 (in Russian).
14. Pradko A. G., Litvinovskaya R. P., Sauchuk A. L., Drach S. V., Baranovsky A. V., Zhabinskii V. N., Mirantsova T. V., Khripach V. A. A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants. *Steroids*, 2015, vol. 97, pp. 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.022>

## Информация об авторах

Жук Ольга Николаевна – канд. биол. наук, доцент. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, Пинск, Республика Беларусь). E-mail: nadulich@mail.ru.

Слиж Дарья Александровна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Полесский государственный университет (ул. Днепровской флотилии, 23, 225710, Пинск, Республика Беларусь). E-mail: d-grushevskaya@mail.ru.

Литвиновская Раиса Павловна – д-р хим. наук, гл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: litvin@iboch.by.

## Information about the authors

Zhuk Olga N. – Ph. D. (Biology), Associate Professor. Polessky State University (23, Dneprovskoy Flotilii Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: nadulich@mail.ru.

Slizh Darya A. – Postgraduate Student, Junior Researcher. Polessky State University (23, Dneprovskoy Flotilii Str., 225710, Pinsk, Republic of Belarus). E-mail: d-grushevskaya@mail.ru.

Litvinovskaya Raisa P. – D. Sc. (Chemistry), Chief Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: litvin@iboch.by.

*Томанова Маргарита Алексеевна* – научн. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: margo.e.com@mail.ru.

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

*Хрипач Владимир Александрович* – академик, д-р хим. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: khripach@iboch.by.

*Tomanova Margarita A.* – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: margo.e.com@mail.ru.

*Zhabinskii Vladimir N.* – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Chief Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vz@iboch.by.

*Khripach Vladimir A.* – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: khripach@iboch.by.

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

УДК 577.112.854:535.34:535.372:543.51:547-386  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>

Поступило в редакцию 08.11.2021  
Received 08.11.2021

Д. А. Семенов, О. С. Куприенко, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов

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

## НЕКОТОРЫЕ МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА ИЗ МОЛОКА ТРАНСГЕННЫХ КОЗ

*(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)*

**Аннотация.** Методами спектрофотометрии, флуоресцентной спектроскопии и масс-спектрометрии показано, что человеческий рекомбинантный лактоферрин (рчЛФ), выделенный из молока трансгенных коз, способен связывать ионы железа и европия. Получены апо-форма рчЛФ, а также комплексы этого белка с  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , в которых степень насыщения рчЛФ металлом соответственно составила 76 и 22 %. Предложен способ регистрации общего или высвободившегося лантанида в системе, содержащей комплекс рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$ , при кислом или нейтральном значении рН и высоких или низких концентрациях хелатирующих агентов по интенсивности времязрешенной флуоресценции.

**Ключевые слова:** рекомбинантный лактоферрин человека, связывание ионов железа и европия

**Для цитирования.** Некоторые металлсвязывающие свойства рекомбинантного лактоферрина человека из молока трансгенных коз / Д. А. Семенов [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 43–54. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>

Dmitry A. Semenov, Olga S. Kuprienko, Irina I. Vashkevich, Oleg V. Sviridov

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

## SOME METAL BINDING PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN FROM THE MILK OF TRANSGENIC GOATS

*(Communicated by Corresponding Member Sergey A. Usanov)*

**Abstract.** In this research, the ability of pure recombinant human lactoferrin (rhLF), originated from the milk of transgenic goats, to bind ferric and europium ions has been shown by the methods of spectrophotometry, fluorescent spectroscopy, and inductively coupled plasma mass spectrometry. The apo-form of rhLF and its complexes with  $\text{Fe}^{3+}$  or  $\text{Eu}^{3+}$  saturated in 76 or 22 %, respectively, were obtained. A method for detection of total or released (“free”) lanthanide at acidic or neutral pH and high or low concentrations of chelating agents by time-resolved fluorescence was proposed.

**Keywords:** recombinant human lactoferrin, ferric and europium ions binding

**For citation.** Semenov D. A., Kuprienko O. S., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. Some metal binding properties of recombinant human lactoferrin from the milk of transgenic goats. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 43–54 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-43-54>

**Введение.** К настоящему времени, благодаря многочисленным ранним исследованиям и успехам современной металлопротеомики [1], установлены структуры, определены функции и дана стройная классификация удивительного многообразия металлсвязывающих белков в природе. Катионы металлов, связанные белками, играют одну из трех ролей – структурную, регуляторную или ферментативную – или совмещают две роли. Особую важность для развития большинства организмов имеют ионы железа, участвующие в процессах, от которых зависит жизнь – дыхание, синтез ДНК, фиксация азота и фотосинтез. Поэтому живые организмы выработали эффективные механизмы хранения, транспорта и использования этого металла, многие из которых основаны на образовании комплексов с белками, в частности с трансферрином и его аналогами, включая овотрансферрин, меланотрансферрин и лактоферрин (ЛФ) [2]. Как типичный представитель семейства трансферринов ЛФ способен с очень высоким сродством ( $K_a \sim 10^{22} \text{ M}^{-1}$ ) связывать  $\text{Fe}^{3+}$  и взаимодействовать, хотя и с меньшей аффинностью, с катионами других «металлов жизни», а также с небioгенными металлами, такими как  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и трехзарядными катионами лантанидов [2; 3].

Поскольку в отличие от трансферрина ЛФ встречается в основном в секретируемых физиологических жидкостях, то активный транспорт железа для него не характерен, но он находится в первой линии защиты хозяина, предупреждая рост микроорганизмов и подавляя образование свободных радикалов путем регуляции уровня  $\text{Fe}^{3+}$  в этих средах, а также благодаря множеству других доказанных полезных функций [4].

Для природного человеческого ЛФ, имеющего молекулярную массу 82400 Да, известна последовательность 703 аминокислотных остатков в единственной полипептидной цепи [5], свернутой в две гомологичные доли, N- и C-концевую (остатки соответственно 1–338 и 339–703), каждая из которых состоит из двух доменов с металлсвязывающим центром в углублении между ними [3]. Кластер положительно заряженных аминокислот сконцентрирован на N-конце макромолекулы, а аспарагины в положениях 137, 478 (и потенциально 623) образуют N-гликозидные связи с олигосахаридами. Являясь щелочным белком (изоэлектрическая точка находится при pH 8,7), ЛФ способен взаимодействовать с анионными биополимерами, например, ДНК, гепарином, гликозаминогликанами, липополисахаридами, а также с биоструктурами клеточной поверхности [6].

Одна макромолекула ЛФ способна обратимо связывать два иона  $\text{Fe}^{3+}$ , по одному в C- и N-долях. Уникальной характеристикой металл-белкового комплексообразования с участием ЛФ и других трансферринов является синергизм связывания  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{CO}_3^{2-}$ , причем анион связывается первым и затем за счет своих неподеленных электронных пар двух атомов кислорода занимает две позиции в координационной сфере центрального иона, а на остальных четырех располагаются электронодонорные группировки, включающие феноляты двух остатков тирозина, имидазол одного гистидила и карбоксильный кислород одного аспарагина белка. Эти остатки организованы в искаженный октаэдр. Сопровождаемое синергетическим эффектом включение аниона и катиона в активный центр индуцирует конформационные изменения ЛФ и переход белка в закрытую компактную конформацию, при этом взаимодействие фрагментов C- и N-долей третичной структуры ЛФ повышает устойчивость  $\text{Fe}^{3+}$  в связывающем центре к диссоциирующему действию ионов  $\text{H}^+$  вплоть до pH 3 [3; 7]. Таким образом, третичные структуры апо- (свободный от металла) и холо-форм (насыщенный металлом) ЛФ различаются, но, скорее всего, не настолько, чтобы изменить такой параметр, как иммунореактивность белка.

Несложная методика выделения и очистки ЛФ традиционными хроматографическими приемами из молока человека и животных совершенствовалась благодаря целому ряду работ, и у исследователей не было проблем в получении сотен миллиграммов гомогенного белка для научных экспериментов. По мере обнаружения все новых функциональных свойств и физиологических эффектов ЛФ, необходимых или полезных для здоровья человека, росло потребление этого уникального белка пищевой промышленностью и фармацевтической индустрией, и очищенный ЛФ из коровьего молока и продукция на его основе стали производиться в крупнотоннажном масштабе. По понятным причинам выделение ЛФ из молока человека объективно не может выйти на индустриальный уровень, хотя такой продукт имеет более высокую терапевтическую эффективность и намного лучше совместим с организмом человека при его потреблении [4].

Важным для науки и перспективным для промышленности решением стало развитие усилиями ученых Беларуси и России методов и биотехнологий получения рекомбинантного человеческого лактоферрина (рчЛФ), идентичного природному ЛФ человека, в молоке трансгенных коз и выделения функционально активного белка в гомогенном виде [8; 9]. Эти достижения заложили основу для организации производства чистого рчЛФ и содержащих этот белок препаратов, а также для проведения их доклинических исследований и клинических испытаний. В нашей стране впервые разработаны иммуноаналитические системы для количественного определения биологически активного рчЛФ в сырье, пищевой продукции и фармацевтических препаратах [10] и освоен серийный выпуск соответствующего иммуноферментного набора реагентов.

Поскольку терапевтическая действенность ЛФ во многом зависит от способности белка связывать и высвобождать ионы железа и, возможно, других металлов, необходимо всесторонне изучить металлсвязывающие свойства конечного продукта опытно-промышленного процесса очистки рчЛФ в Беларуси. Поэтому мы поставили цель охарактеризовать металлсвязывающие

центры рчЛФ, выбрав для этого ионы  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ , проявляющие соответственно очень высокую и умеренную аффинности к белкам семейства трансферринов. Кроме того, комплекс рчЛФ с лантанид-ионом мог бы служить в качестве биоспецифически меченного белка, не поврежденного химической модификацией, для последующих исследований функциональной активности рчЛФ по связыванию с биополимерами и клетками.

**Материалы и методы исследования.** *Соединения, препараты, приборы.* Высокоочищенный (~98 %) рчЛФ выделен из молока трансгенных коз-продуцентов в Институте микробиологии НАН Беларуси. В нашей работе во всех экспериментах использовали деионизированную воду, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF фирмы Sartorius (Германия). Применяли  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , трилон Б, а также другие соли, кислоты и основания, доступные от поставщиков химреактивов в Республике Беларусь, тринатриевую соль нитрилотриуксусной кислоты (НТА), ксиленоловый оранжевый, о-фенантролин фирмы Alfa Aesar (США), гуанидин гидрохлорид (ГГХ), трис- $\text{HCl}$ , лимонную кислоту и цитрат натрия компании Sigma-Aldrich (США). Использовали разборные 96-луночные микропланшеты, полученные от фирмы Хема (Россия). Колонка PD-10 (Сефадекс G-25) для обессоливания растворов биополимеров приобретена у фирмы GE Healthcare (США).

Концентрацию  $\text{Eu}^{3+}$  в растворе  $\text{EuCl}_3$  определяли методом прямого комплексонометрического титрования с использованием трилона Б и ксиленолового оранжевого в качестве индикатора. Концентрацию  $\text{Fe}^{3+}$  в растворе  $\text{FeCl}_3$  определяли фотометрически по интенсивности окрашивания комплекса двухвалентного железа с о-фенантролином.

Для регистрации спектров поглощения использовали прибор Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Швейцария), спектров флуоресценции – спектрофлуориметр СОЛАР СМ 2204 (Солар, Беларусь), интенсивности флуоресценции  $\text{Eu}^{3+}$  при 613 нм – планшетный флуориметр Delfia 1234 (Wallac Oy, Финляндия). Концентрацию  $\text{Eu}^{3+}$  в белковых растворах измеряли методом масс-спектрометрии с ионизацией в индуктивно-связанной плазме (ИСП-МС) с помощью масс-спектрометра Agilent 7500сх фирмы Agilent Technologies (США).

*Получение апо-формы рчЛФ.* Эксперимент проводили по методике, описанной в [11], с некоторыми изменениями. 160 мг рчЛФ растворяли в 3,5 мл 0,15 М  $\text{NaCl}$  и диализовали в течение 18 ч при 6 °С против 1 л 0,1 М цитратного буферного раствора, рН 3,5, в присутствии 2,5 мМ трилона Б для связывания высвободившихся ионов  $\text{Fe}^{3+}$  с регулярной сменой буфера каждые 6 ч. Потом диализовали раствор белка в течение 18 ч при 6 °С против деионизированной воды. После фильтрования получили бесцветный прозрачный раствор апо-рчЛФ.

*Приготовление комплекса рчЛФ– $\text{Fe}^{3+}$ .* Следуя ранее описанной методике [11], в течение 18 ч при 6 °С проводили диализ 1,0 мл 35 мг/мл раствора апо-рчЛФ против 1 л 0,05 М трис- $\text{HCl}$  буферного раствора, рН 7,4, содержащего  $\text{FeCl}_3$ , НТА, 0,15 М  $\text{NaCl}$ , 0,005 М  $\text{NaHCO}_3$ . Соблюдали мольное соотношение  $\text{Fe}^{3+}$ –белок–НТА 4 : 1 : 4. Затем проводили диализ в течение 18 ч при 6 °С против 1 л 0,05 М трис- $\text{HCl}$  буферного раствора, рН 7,4, содержащего 0,15 М  $\text{NaCl}$  и НТА (соотношение белок–НТА 1 : 1) с двукратной сменой. Далее последовательно диализовали в течение 18 ч при 6 °С против деионизированной воды и 0,15 М  $\text{NaCl}$ . В результате центрифугирования получили прозрачный окрашенный в красный цвет раствор рчЛФ– $\text{Fe}^{3+}$ .

*Получение комплекса рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$ .* В течение 18 ч при 6 °С проводили диализ 1,0 мл 35 мг/мл раствора апо-рчЛФ против 1 л 0,05 М трис- $\text{HCl}$  буферного раствора, рН 7,4, содержащего  $\text{EuCl}_3$ , НТА, 0,15 М  $\text{NaCl}$ , 0,005 М  $\text{NaHCO}_3$ . Соблюдали мольное соотношение  $\text{Eu}^{3+}$ –белок–НТА 4 : 1 : 1. Затем проводили диализ в течение 18 ч при 6 °С против 1 л 0,05 М трис- $\text{HCl}$  буферного раствора, рН 7,4, содержащего 0,15 М  $\text{NaCl}$  и НТА (соотношение белок–НТА 1 : 1) с двукратной сменой. После этого последовательно диализовали в течение 18 ч при 6 °С против деионизированной воды и 0,15 М  $\text{NaCl}$ . В результате центрифугирования получили прозрачный бесцветный раствор рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$ . Альтернативно, получение комплекса рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  проводили простым смешиванием всех реагентов в описанных выше условиях с последующей очисткой от низкомолекулярных примесей гель-фильтрацией с помощью колонки PD-10, уравновешенной 0,05 М натрий-фосфатным буферным раствором (НФБ), рН 7,4, содержащим 0,15 М  $\text{NaCl}$ .

*Измерения абсорбции.* 100 мг рчЛФ растворили в 3,0 мл 0,05 М НФБ (рН 7,4). Далее разбавляли данный раствор белка в 10 раз НФБ, рН 7,4, или 6 М раствором ГГХ в воде. Спектры поглощения регистрировали в диапазоне длин волн 250–310 нм в кювете с длиной оптического пути 0,2 см, а в диапазоне 430–500 нм – в кювете 1,0 см. Концентрацию белка в разбавленном растворе определяли по закону Бугера–Ламберта–Бера, используя молярный коэффициент экстинкции, который рассчитали методом Эдельхока [12]

$$C (\text{рчЛФ}) = \frac{A_{280} (6 \text{ М ГГХ})}{\varepsilon_{280} (6 \text{ М ГГХ})l}, \quad (1)$$

где  $C$  (рчЛФ) – концентрация раствора рчЛФ, М;  $A_{280}$  (6 М ГГХ) – оптическая плотность раствора рчЛФ в 6 М ГГХ при 280 нм;  $l$  – длина оптического пути, см;  $\varepsilon_{280}$  (6 М ГГХ) – теоретически рассчитанный коэффициент экстинкции раствора рчЛФ в 6 М ГГХ при 280 нм,  $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

Расчет  $\varepsilon_{280}$  (6 М ГГХ) проводили по следующей формуле, исходя из поглощения света хромофорами белка при 280 нм [12]:

$$\varepsilon_{280} (6 \text{ М ГГХ}) = n_{\text{Трп}} \cdot 5690 + n_{\text{Тыр}} \cdot 1280 + n_{\text{Сис}} \cdot 120, \quad (2)$$

где  $n_{\text{Трп}}$ ,  $n_{\text{Тыр}}$  и  $n_{\text{Сис}}$  – числа остатков триптофана, тирозина и цистеина в молекуле белка, найденные в открытой базе данных последовательностей белков UniProt; цифры соответствуют молярным коэффициентам экстинкции остатков аминокислот при 280 нм.

Согласно уравнению (2) коэффициент экстинкции рчЛФ при 280 нм в 6 М ГГХ равен

$$\varepsilon_{280} (6 \text{ М ГГХ}) = 10 \cdot 5690 + 21 \cdot 1280 + 16 \cdot 120 = 85700 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}.$$

Коэффициент экстинкции рчЛФ при 280 нм в НФБ рассчитывали на основании оптической плотности раствора в таком буфере по следующей формуле:

$$\varepsilon_{280} (\text{НФБ}) = \frac{A_{280} (\text{НФБ})}{C (\text{рчЛФ})l},$$

где  $\varepsilon_{280}$  (НФБ) – коэффициент экстинкции раствора рчЛФ в НФБ при 280 нм,  $\text{М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;  $A_{280}$  (НФБ) – оптическая плотность раствора рчЛФ в НФБ при 280 нм;  $C$  (рчЛФ) – концентрация раствора белка, определенная по формуле (1), М.

По описанной выше методике были определены коэффициенты экстинкции для каждого препарата рчЛФ в диапазоне длин волн от 250 до 500 нм.

Дифференциальные спектры снимали для растворов рчЛФ с концентрацией 0,8 мг/мл с добавлением двух- и десятикратных молярных избытков  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$  относительно раствора исходного препарата рчЛФ с такой же концентрацией.

*Масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой.* 1 мг лиофилизированного препарата рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  растворяли в 10 мл концентрированной  $\text{HNO}_3$  и минерализовали с применением системы микроволнового разложения при мощности 1000 Вт с выдержкой в течение 20 мин при 213–230 °С. Методика анализа основана на распылении полученного раствора в плазму индуктивно связанного разряда, где происходит процесс возбуждения и ионизации атомов, разделении ионов квадрупольным масс-анализатором по отношению массы к заряду и определении содержания элементов путем сравнения измеренных интенсивностей масс-спектров элементов пробы со значениями интенсивностей, полученными при построении калибровочного графика. Изотоп  $^{153}\text{Eu}$  использовался для количественной оценки содержания европия в образце.

*Флуоресцентная спектроскопия.* Спектры флуоресценции 0,8 мг/мл раствора рчЛФ и его комплексов с двух- и десятикратными молярными избытками  $\text{Fe}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$  регистрировали в кювете с длиной оптического пути 1 см при 22 °С. Возбуждали флуоресценцию светом с длиной волны 280 нм. Регистрацию излучения проводили в диапазоне 300–650 нм.

Содержание  $\text{Eu}^{3+}$  рассчитывали по интенсивности флуоресценции рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  в диссоциативно-усиливающем растворе, сравнивая полученные значения с флуоресценцией растворов с известной концентрацией  $\text{Eu}^{3+}$ .

По результатам 8 независимых определений с использованием концентраций рчЛФ–Eu<sup>3+</sup> от 0,4 до 4,1 нМ в модифицированном усиливающем растворе с нейтральным значением рН определяли концентрацию иона лантанида, высвободившегося из активного центра белка, путем сравнения интенсивностей времяразрешенной флуоресценции растворов с исследуемыми и известными концентрациями Eu<sup>3+</sup>. По графику в координатах Скэтчарда определена константа диссоциации комплекса рчЛФ–Eu<sup>3+</sup>.

**Результаты и их обсуждение.** Важной, если не решающей, характеристикой чистого рчЛФ как конечного продукта опытно-промышленного процесса выделения и очистки из молока трансгенных коз-продуцентов является способность данного белка связывать и высвобождать ионы металлов, что лежит в основе функциональной активности природного ЛФ. Для характеристики обратимого связывания двух металлов высокого и среднего сродства к рчЛФ, Fe<sup>3+</sup> и Eu<sup>3+</sup>, мы использовали несколько физико-химических методов – спектрофотометрию, ИСП-МС и два варианта флуоресцентной спектроскопии, определили содержание ионов металлов в различных препаратах рчЛФ, изучили спектральные эффекты комплексообразования и поведение комплекса рчЛФ–Eu<sup>3+</sup> в хелатно-детергентном растворе. Далее переходим к представлению и обсуждению полученных результатов.

**Абсорбционные эффекты комплексообразования.** Исходный лиофилизированный препарат чистого рчЛФ после растворения давал типичный белковый спектр в ближней ультрафиолетовой области, а бледно-розовая окраска белкового порошка обусловлена слабым поглощением его раствора с максимумом при 465 нм (рис. 1). Известно, что для всех представителей семейства трансферринов, в том числе и для ЛФ, поглощение света при 280 и 465 нм существенно зависит от степени насыщения белка железом, причем эта зависимость имеет нелинейный характер [11]. Действительно, за счет потери связанного Fe<sup>3+</sup> в 6 М ГГХ денатурированный рчЛФ поглощал при 280 нм менее интенсивно, чем интактный рчЛФ в 0,05 М НФБ (рН 7,4) при равных концентрациях белка в обоих растворах, а полоса в видимой области спектра исчезала. Измеренное спектральное соотношение  $A_{280} / A_{465} = 129$  соответствовало степени насыщения рчЛФ железом, равной 11 %, рассчитанной по известной формуле [11]. Таким образом, взятый нами в исследование рчЛФ содержал меньше железа, чем изученные ранее подобные препараты с заполнением 50 % [8] или 90 % ( $A_{280} / A_{465} = 25,8$ ) [13] активных центров, и в этом отношении он в большей степени соответствовал ЛФ из грудного молока человека с содержанием холо-формы в диапазоне 3–25 % [8; 13].

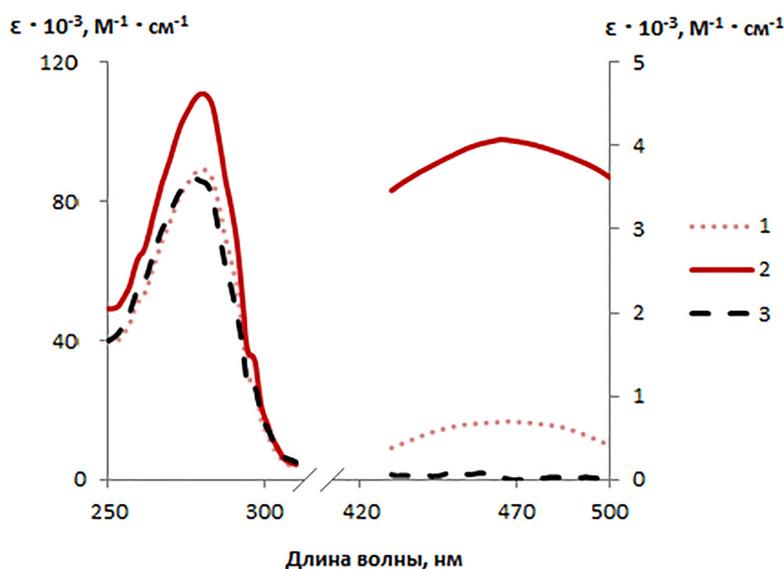


Рис. 1. Абсорбционные спектры рчЛФ: 1 – исходный препарат и 2 – холо-Fe<sup>3+</sup>-форма в 0,05 М НФБ (рН 7,4); 3 – исходный препарат в 6 М ГГХ

Fig. 1. Absorption spectra of rhLF: 1 – initial preparation and 2 – holo-Fe<sup>3+</sup>-form in 0.05 M phosphate buffered saline (рН 7.4); 3 – initial preparation in 6 M guanidine hydrochloride

Найденное экспериментально-расчетным путем значение молярного коэффициента экстинкции при pH 7,4 и длине волны 280 нм раствора исходного  $\text{Fe}^{3+}$ -содержащего препарата рчЛФ оказалось равным  $89203 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , а «весовой» коэффициент абсорбции при этой длине волны составил  $1,12 \text{ л/г} \cdot \text{см}^{-1}$ . Установленный коэффициент экстинкции мы применяли для определения концентрации рчЛФ со степенью насыщения железом не выше 20–25 %, как указано в [11].

Визуальный и спектрофотометрический контроли применялись и при получении апо-формы белка диализом исходного рчЛФ сначала против цитратного буфера с pH 3,5, а затем против деионизированной воды, как рекомендуется в [11]. В этих условиях исследуемый белок оказался способным высвобождать металл из активных центров и давать бесцветный раствор с измеренным абсорбционным отношением  $A_{280} / A_{465} \sim 580$  и остаточной степенью насыщения менее 2 %. В лиофилизированном виде апо-форма имела вид белого порошка.

В ходе приготовления комплекса рчЛФ– $\text{Fe}^{3+}$  ионы железа поступали через полупроницаемую мембрану в раствор апо-рчЛФ в присутствии  $\text{HCO}_3^-$  и 4-кратных избытков ионов металла и НТА по отношению к белку, в результате чего наблюдалось появление и усиление интенсивности окраски в белковой части диализной системы. После последующего диализа против воды получен окрашенный в красный цвет раствор холо- $\text{Fe}^{3+}$ –рчЛФ, имеющий  $A_{280} / A_{465} = 27,2$  (рис. 1). В литературе сообщается, что  $A_{280} / A_{465} = 22$  для ЛФ коровы соответствует степени насыщения железом 100 %, а абсорбционное отношение 27,2 должно указывать на степень насыщения около 76 % в холо- $\text{Fe}^{3+}$ –рчЛФ [11]. В наших экспериментах применение хелатирующего агента в диализной системе, препятствующего неспецифическому связыванию железа и образованию его гидроксидов, а также выпадение белкового осадка, лишь частично растворявшегося затем в деионизированной воде в ходе диализа, могли обусловить получение «неполной» холо-формы рчЛФ.

Итак, в обсуждаемых экспериментах показано, что рчЛФ способен обратимо связывать  $\text{Fe}^{3+}$  по типичному для трансферринов механизму, который включает взаимодействие ферри-иона с фенолят-ионом остатка тирозина в активном центре, перенос заряда в образовавшемся комплексе и появление отдельной полосы поглощения в видимом спектре. Эта полоса исчезает вместе с разрушением комплекса рчЛФ– $\text{Fe}^{3+}$  в денатурирующих белок условиях.

Думается, что 100 %-ная степень насыщения рчЛФ ионами  $\text{Fe}^{3+}$  может быть легко достигнута путем прямого смешивания компонентов и изменения их соотношения и содержания вспомогательных реагентов, что было бы полезным для практического применения препаратов на основе рчЛФ. Кстати, в таких экспериментах можно будет проверить, обладает ли рчЛФ не описанным для других трансферринов свойством природного ЛФ. Эта особенность состоит в способности образовывать в присутствии примерно 70-кратных мольных избытков  $\text{Fe}^{3+}$  и анионов  $\text{HCO}_3^-$  стабильную надмолекулярную структуру, которая состоит из 15–16 полипептидных цепей ЛФ, формирующих «поверхностные» комплексонаты  $\text{Fe}^{3+}$  с участием множества белковых карбоксильных и аминогрупп, а также бикарбонат-анионов. С определенной долей условности можно сказать, что связывание железа на поверхности раздела формирует четвертичную структуру ЛФ. Такой структурированный железом супрамолекулярный ассоциат в практическом плане может оказаться полезным антианемическим продуктом [14].

В наших первых экспериментах способность рчЛФ связывать ион редкоземельного металла, как и в случае комплексообразования белком ионов  $\text{Fe}^{3+}$ , проверялась диализом апо-формы против раствора с нейтральным pH, содержащего ионы  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{HCO}_3^-$ , а также НТА. Альтернативный способ, использованный нами, состоял в простом смешивании растворов рчЛФ и  $\text{Eu}^{3+}$  в присутствии хелатирующего агента с последующей очисткой гель-хроматографией. В обоих случаях окрашивание раствора не происходило, и прямая спектрофотометрия не показывала изменений абсорбции, но факт комплексообразования в полученных смесях был установлен с помощью ИСП-МС, флуоресцентной спектроскопии и дифференциальной спектрофотометрии.

Метод дифференциальной спектрофотометрии достаточно часто применяется для характеристики белкового связывания ионов металлов, как описано в литературе для некоторых систем лантанид–трансферрин [15; 16]. Изменения конформации белка, в том числе индуцируемые лантанидами, могут менять окружение боковых цепей некоторых ароматических остатков, например, тирозинов, или вызывать более глубокие возмущения в электронных процессах из-за пря-

мого вовлечения таких остатков в комплексообразование, дающее характерные сигналы при 238 и 290 нм (рис. 2). В любом случае интенсивность возникающих сигналов невелика, и, как правило, они регистрируются только в дифференциальном режиме измерений абсорбции.

*Масс-спектрометрический анализ комплекса рчЛФ–Eu<sup>3+</sup>*. ИСП-МС является стандартизированным высокочувствительным и точным инструментальным методом определения содержания химических элементов в биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках. Этот метод достаточно часто применяется в металлопротеомике, он оказался полезным при изучении механизма взаимодействия между Ag<sup>+</sup> и ЛФ с образованием нанок комплексов, обладающих мощным антимикробным действием, а в комбинации с гель-фильтрационной хроматографией использовался для идентификации металлсвязывающих белков в грудном молоке человека [17].

Мы впервые применили ИСП-МС для изучения комплекса металла с рчЛФ. В выполненном эксперименте найдено 819,2 нг (5,4 нмоль) Eu в 1,0 мг (12,5 нмоль) взятого в анализ холо-*Eu<sup>3+</sup>*–рчЛФ. Это соотношение соответствует 22 % насыщения рчЛФ в расчете на 2 металлсвязывающих сайта в молекуле белка. В планируемых экспериментах по ИСП-МС предполагается найти зависимость степени насыщения рчЛФ металлом от величины нагрузки *Eu<sup>3+</sup>* и *Fe<sup>3+</sup>* на белок без посторонних хелатирующих агентов в среде.

*Флуоресцентная спектроскопия процессов связывания ионов металлов с рчЛФ*. Известно, что взаимодействие ионов металлов с белками семейства трансферринов приводит к тушению собственной флуоресценции белка за счет конформационных перестроек в полипептидной глобуле и изменения микроокружений остатков триптофана и тирозина [15; 16; 18]. Способные к люминесценции ионы лантанидов часто применяются для зондирования структуры металлсвязывающих белков в качестве «идеальных» меток [19], так как биоспецифически внедряясь в активный центр, они практически не изменяют природную структуру макромолекулы в отличие от химического конъюгирования.

В наших экспериментах добавление к исходному препарату рчЛФ двукратного молярного избытка *Fe<sup>3+</sup>* приводило к уменьшению на 14 % интенсивности флуоресценции с максимумом при 315 нм, возбуждаемой при 280 нм. В случае такого же молярного избытка *Eu<sup>3+</sup>* по отношению к рчЛФ наблюдалось тушение белковой флуоресценции на 6 %. А десятикратный молярный избыток *Eu<sup>3+</sup>* снижал интенсивность излучения ароматических флуорофоров на 22 % за счет образования металл-белкового комплекса и протекания процесса межмолекулярного переноса энергии от белкового триптофанила к связанному иону лантанида. При этом, как и в случае других описанных в литературе комплексов белков, в видимой области спектра не возникала индуцированная люминесценция лантанида, в энергетических уровнях которого выполненный пере-

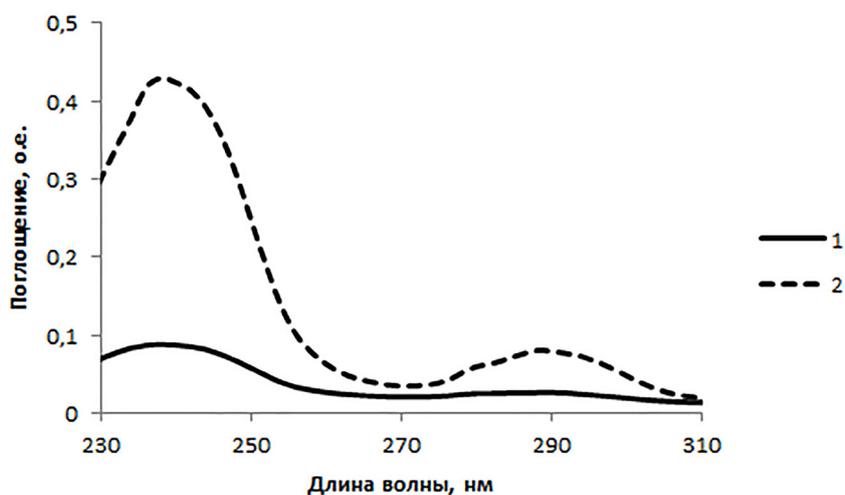


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения растворов рчЛФ в присутствии 2-кратного (1) и 10-кратного (2) молярных избытков *Eu<sup>3+</sup>* при pH 7,4. Концентрация рчЛФ равна  $10^{-5}$  М

Fig. 2. Difference absorption spectra after the addition of 2-fold (1) or 10-fold (2) molar excesses of *Eu<sup>3+</sup>* to an aqueous solution of rhLF at pH 7.4. rhLF concentration is  $10^{-5}$  M

ход  ${}^7F_0 \rightarrow {}^5D_0$  не сопровождался эмиссионным процессом  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$  из-за безызлучательного рассеивания поглощенной энергии. Возможное объяснение этому различию состоит в том, что энергетический уровень донора намного ближе к энергетическому уровню  $Tb^{3+}$ , чем энергетическому уровню  $Eu^{3+}$  [15; 16; 19]. В связи с этим интересно будет проверить возможность эффекта индуцированной рЧЛФ флуоресценции другого лантанида,  $Tb^{3+}$ , расположение электронных энергетических уровней которого благоприятствует выполнению излучательного перехода  ${}^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ .

Тем не менее, нам удалось найти способ использования  $Eu^{3+}$  в качестве способной к флуоресценции метки рЧЛФ. Флуоресцентные свойства  $Eu^{3+}$  приобретал при помещении комплекса рЧЛФ– $Eu^{3+}$  в диссоциативно-усиливающий раствор, традиционно используемый в лантанидном иммунофлуориметрическом анализе для целей медицинской диагностики [20]. Приготовленный нами раствор содержал в высоких концентрациях хелатирующий агент 2-нафтоилтрифтороацетон (НФА), амфифильный хелатирующий реагент три-*n*-октилфосфин оксид (ТОФО), поверхностно-активное вещество тритон X-100 и имел pH 3,2. Мы нашли, что при этом значении pH в течение 10 мин  $Eu^{3+}$  полностью переходит из комплекса рЧЛФ– $Eu^{3+}$  в раствор и взаимодействует с его низкомолекулярными компонентами. НФА образует органический комплекс с  $Eu^{3+}$ , поглощающий свет при 340 нм, ТОФО, благодаря наличию атома кислорода и трех углеводородных цепочек, насыщает координационную сферу иона металла и защищает его от воздействия воды. Тритон X-100 участвует в образовании мицеллы и вытесняет из нее тушащие флуоресценцию молекулы воды. Интенсивность флуоресценции раствора с максимумом при 613 нм оставалась постоянной в течение часа. Этот параметр применяли как альтернативный метод определения степени насыщения рЧЛФ ионами  $Eu^{3+}$ , используя построенный строго линейный график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации  $Eu^{3+}$  в диссоциативно-усиливающем растворе при pH 3,2 (рис. 3). Рассчитаны количество иона лантанида в рЧЛФ– $Eu^{3+}$  и степень насыщения белка этим ионом, равная 24 %, что хорошо согласуется с данными ИСП-МС.

Кроме того, нами разработана система реагентов для прямой флуориметрической детекции  $Eu^{3+}$ , высвобождающегося из комплекса с рЧЛФ, без разделения связанного с белком (*B*) и свободного (*U*) иона лантанида. В состав детектирующего раствора с нейтральным pH входят в подобранных концентрациях базовые компоненты диссоциативно-усиливающего раствора: НФА, ТОФО и тритон X-100 (рис. 4). При облучении белково-хелатной системы, связывающей  $Eu^{3+}$ , коротким импульсом света с длиной волны 340 нм комплекс рЧЛФ– $Eu^{3+}$  остается флуоресцентно инертным, тогда как  $Eu^{3+}$ , высвободившийся в результате естественной или индуцированной диссоциации комплекса и находящийся в составе мицеллы, переходит в возбужденное состояние и дает долгоживущую флуоресценцию с максимумом при 613 нм. Интенсивность флуоресценции, измеренная с задержкой во времени, пропорциональна концентрации иона лантанида

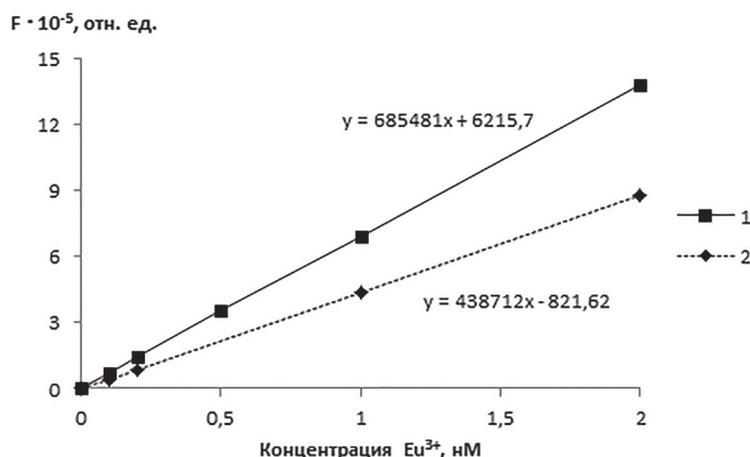


Рис. 3. Калибровочные графики флуоресценции  $Eu^{3+}$  в различных средах: 1 – стандартный диссоциативно-усиливающий раствор, pH 3,2; 2 – модифицированный усиливающий раствор, pH 7,2

Fig. 3. Calibration plots of  $Eu^{3+}$  fluorescence in different media: 1 – standard dissociation-enhancement solution, pH 3.2; 2 – modified enhancement solution, pH 7.2

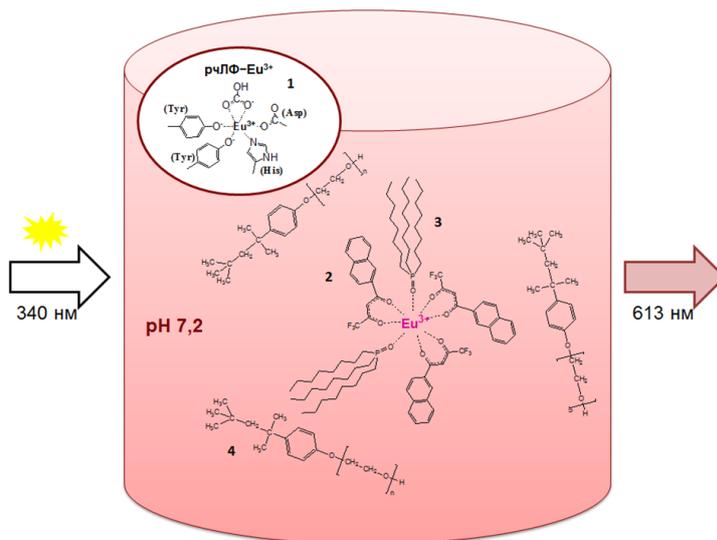


Рис. 4. Схематическое изображение  $\text{Eu}^{3+}$ -связывающей системы, включающей рчЛФ (показан активный центр, 1) и усиливающие флуоресценцию  $\text{Eu}^{3+}$  компоненты: 2 – НФА; 3 – ТОФО; 4 – тритон X-100

Fig. 4. Schematic representation of  $\text{Eu}^{3+}$ -binding system comprising rhLF (active center is depicted, 1) and  $\text{Eu}^{3+}$  fluorescence enhancement components: 2 – 2-naphthoyltrifluoroacetone; 3 – tri-n-octylphosphine oxide; 4 – triton X-100

и определяется по калибровочному графику (рис. 3), составляя примерно 60 % от интенсивности излучения такого же количества  $\text{Eu}^{3+}$  в стандартном диссоциативно-усиливающем растворе с высокими концентрациями ингредиентов и pH 3,2.

В эксперименте после внесения в систему рчЛФ, насыщенного  $\text{Eu}^{3+}$  на 22 %, в концентрации  $4,1 \cdot 10^{-9}$  М (т. е. общий  $\text{Eu}^{3+}$  в системе – 1,80 нМ) и выдерживания при комнатной температуре в течение 1 ч флуориметрия показала содержание свободного от белка иона лантанида 0,56 нМ и соответственно концентрационное соотношение белковосвязанного и свободного ( $B / U$ )  $\text{Eu}^{3+}$ , равное 2,2. Таким образом, добавляя комплекс рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  в различных концентрациях (от  $0,4 \cdot 10^{-9}$  М до  $4,1 \cdot 10^{-9}$  М) в систему прямой флуориметрической детекции при фиксированной температуре и значении pH, можно определить степень диссоциации рчЛФ– $\text{Eu}^{3+}$  от его концентрации и по графику Скэтчарда в координатах  $B / U$  от  $B$  рассчитать константу диссоциации комплекса в выбранных условиях, которая оказалась равной  $(1,51 \pm 0,17) \cdot 10^{-9}$  М. Найденная величина достаточно близка к значению константы диссоциации  $8,3 \cdot 10^{-10}$  М, определенной для комплекса овотрансферрина с  $\text{Tb}^{3+}$  [21]. Полученную таким способом константу  $K_d$  нельзя назвать истинно равновесной, так как низкомолекулярный хелатирующий агент в системе с определенным аффинитетом удерживает «свободный»  $\text{Eu}^{3+}$ . Однако и в других принятых методах определения константы связывания белок–металл, например, ультрафильтрации, диссоциация комплекса не является обратимой. Планируется апробировать разработанную систему в экспериментах по образованию и диссоциации комплексов рчЛФ с рядом физиологически важных металлов в различных условиях среды.

**Закключение.** Получаемый в Беларуси из молока трансгенных коз высокочистый биотехнологический продукт рчЛФ содержит 154 мкг железа на 1 г белка (220 ммоль  $\text{Fe}^{3+}$  на 1 моль белка, 11 % полного насыщения двух связывающих сайтов). При снижении pH раствора до 3,5 исходный рчЛФ обратимо теряет железо до степени насыщения менее 2 %, и образовавшийся апо-рчЛФ способен связывать  $\text{Fe}^{3+}$  или редкоземельный металл  $\text{Eu}^{3+}$  с мольными показателями насыщения соответственно 76 и 22 %. В результате взаимодействия рчЛФ с  $\text{Fe}^{3+}$  в спектре поглощения при 465 нм возникает полоса комплекса с переносом заряда между остатками тирозинов в активном центре и ионом металла, которая и служит индикатором содержания  $\text{Fe}^{3+}$  в белке. Мольная доля лантанида в холо- $\text{Eu}^{3+}$ –рчЛФ определяется методом ИСП-МС или с хорошим соответствием данным масс-спектрометрии измеряется после высвобождения  $\text{Eu}^{3+}$  из белкового комплекса по его времяразрешенной флуоресценции в стандартном диссоциативно-усиливаю-

щем растворе при pH 3,2. Использование модифицированной хелатно-детергентной системы микеллирования иона лантанида с нейтральным значением pH 7,2, которая не вызывает диссоциацию комплекса рчЛФ–Eu<sup>3+</sup>, позволяет проводить прямое определение концентрации свободного Eu<sup>3+</sup>, находящегося в равновесии с комплексом. Это дает возможность рассчитывать  $K_d$  и может быть полезно при исследовании других металлсвязывающих свойств. Кроме того, рчЛФ, «биологически» меченный Eu<sup>3+</sup> по активному центру, обладает структурой, не поврежденной химической модификацией, имеет высокий потенциал иммуноаналитического применения и может использоваться как белковый зонд с интенсивной долгоживущей флуоресценцией в исследованиях свойств ЛФ человека и при изучении его взаимодействий с биополимерами и клетками. Представленные первые результаты исследований связывания двух различных по свойствам металлов с рчЛФ позволяют обоснованно планировать дальнейшие эксперименты по установлению физико-химических и биологических свойств комплексов рчЛФ с различными металлами с использованием методов дифференциальной спектрофотометрии, времяразрешенной флуориметрии, ИСП-МС и иммуноанализа.

### Список использованных источников

1. Proteomic analysis of contaminants in recombinant membrane hemeproteins expressed in *E. coli* and isolated by metal affinity chromatography / A. V. Yantsevich [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2017. – Vol. 53, N 2. – P. 173–186. <https://doi.org/10.1134/s000368381702017x>
2. Пермяков, Е. А. Металлсвязывающие белки: структура, свойства, функции / Е. А. Пермяков. – М., 2012. – 544 с.
3. Baker, H. M. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release / H. M. Baker, E. N. Baker // *BioMetals*. – 2004. – Vol. 17, N 3. – P. 209–216. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000027694.40260.70>
4. Борзенкова, Н. В. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) / Н. В. Борзенкова, Н. Г. Балабушевич, Н. И. Ларионова // *Биофармацевт. журн.* – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 3–19.
5. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins / M.-H. Metz-Boutigue [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1984. – Vol. 145, N 3. – P. 659–676. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08607.x>
6. Baker, E. N. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin / E. N. Baker, H. M. Baker // *Biochimie*. – 2009. – Vol. 91, N 1. – P. 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.006>
7. Ward, P. P. Cooperative interactions between the amino- and carboxyl-terminal lobes contribute to the unique iron-binding stability of lactoferrin / P. P. Ward, X. Zhou, O. M. Conneely // *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*. – 1996. – Vol. 271, N 22. – P. 12790–12794. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12790>
8. Production of human lactoferrin in animal milk / I. L. Goldman [et al.] // *Biochemistry and Cell Biology*. – 2012. – Vol. 90, N 3. – P. 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
9. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-производителей и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 72–81.
10. Семенов, Д. А. Новые иммуноаналитические системы на основе рекомбинантного лактоферрина человека / Д. А. Семенов, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 290–302. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>
11. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations / G. Majka [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 405, N 15. – P. 5191–5200. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6943-9>
12. Edelhoch, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins / H. Edelhoch // *Biochemistry*. – 1967. – Vol. 6, N 7. – P. 1948–1954. <https://doi.org/10.1021/bi00859a010>
13. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice / J. H. Nuijens [et al.] // *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*. – 1997. – Vol. 272, N 13. – P. 8802–8807. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8802>
14. Studies of the structure of multiferric ion-bound lactoferrin: a new antianemic edible material / F. Hu [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2008. – Vol. 18, N 10–11. – P. 1051–1056. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.003>
15. Luk, C. K. Study of the nature of the metal-binding sites and estimate of the distance between the metal-binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions as fluorescent probes / C. K. Luk // *Biochemistry*. – 1971. – Vol. 10, N 15. – P. 2838–2843. <https://doi.org/10.1021/bi00791a006>
16. Abdollahi, S. Application of circularly polarized luminescence spectroscopy to Tb(III) and Eu(III) complexes of transferrins / S. Abdollahi, W. R. Harris, J. P. Riehl // *Journal of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 100, N 5. – P. 1950–1956. <https://doi.org/10.1021/jp952044d>
17. Interactions of whey proteins with metal ions / A. Rodzik [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, N 6. – Art. 2156. <https://doi.org/10.3390/ijms21062156>
18. Lehrer, S. S. Fluorescence and absorption studies of the binding of copper and iron to transferrin / S. S. Lehrer // *Journal of Biological Chemistry*. – 1969. – Vol. 244, N 13. – P. 3613–3617. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83413-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83413-5)

19. Horrocks, W. D. Lanthanide ion luminescence probes of the structure of biological macromolecules / W. D. Horrocks, D. R. Sudnick // *Accounts of Chemical Research*. – 1981. – Vol. 14, N 12. – P. 384–392. <https://doi.org/10.1021/ar00072a004>
20. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays / I. Hemmilä [et al.] // *Analytical Biochemistry*. – 1984. – Vol. 137, N 2. – P. 335–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90095-2)
21. Yang, B. Binding constants for terbium (III) with chicken apoovotransferrin / B. Yang, Y. Li // *Chemical Research in Chinese Universities*. – 2001. – Vol. 17, N 1. – P. 6–13.

## References

1. Yantsevich A. V., Dzichenka Ya. V., Ivanchik A. V., Shapiro M. A., Trawkina M., Shkel T. V., Gilep A. A., Sergeev G. V., Usanov S. A. Proteomic analysis of contaminants in recombinant membrane hemeproteins expressed in *E. coli* and isolated by metal affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2017, vol. 53, no. 2, pp. 173–186. <https://doi.org/10.1134/s000368381702017x>
2. Permyakov E. A. *Metal binding proteins: structure, properties, functions*. Moscow, 2012. 544 p. (in Russian).
3. Baker H. M., Baker E. N. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals*, 2004, vol. 17, no. 3, pp. 209–216. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000027694.40260.70>
4. Borzenkova N. V., Balabushevich N. G., Larionova N. I. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations (review). *Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical Journal*, 2010, vol. 2, no. 3, pp. 3–19 (in Russian).
5. Metz-Boutigue M.-H., Jollès J., Mazurier J., Schoentgen F., Legrand D., Spik G., Montreuil J., Jollès P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *European Journal of Biochemistry*, 1984, vol. 145, no. 3, pp. 659–676. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08607.x>
6. Baker E. N., Baker H. M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, 2009, vol. 91, no. 1, pp. 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.006>
7. Ward P. P., Zhou X., Conneely O. M. Cooperative interactions between the amino- and carboxyl-terminal lobes contribute to the unique iron-binding stability of lactoferrin. *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*, 1996, vol. 271, no. 22, pp. 12790–12794. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12790>
8. Goldman I. L., Georgieva S. G., Gurskiy Ya. G., Krasnov A. N., Deykin A. V., Popov A. N., Ermolkevich T. G., Budzevich A. I., Chernousov A. D., Sadchikova E. R. Production of human lactoferrin in animal milk. *Biochemistry and Cell Biology*, 2012, vol. 90, no. 3, pp. 513–519. <https://doi.org/10.1139/o11-088>
9. Lukashevich V. S., Budzevich A. I., Semak I. V., Kuznetsova V. N., Malyushkova E. V., Pyzh A. E., Novakovskaya S. A., Rudnichenko J. A., Popkov N. A., Ivashkevich O. A., Zalutsky I. V. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat-producers and its physiological effects. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72–81 (in Russian).
10. Semenov D. A., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. New immunoassay systems based on recombinant human lactoferrin. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 3, pp. 290–302 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-3-290-302>
11. Majka G., Śpiewak K., Kurpiewska K., Heczko P., Stochel G., Strus M., Brindell M. A high-throughput method for the quantification of iron saturation in lactoferrin preparations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, vol. 405, no. 15, pp. 5191–5200. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6943-9>
12. Edelhoch H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*, 1967, vol. 6, no. 7, pp. 1948–1954. <https://doi.org/10.1021/bi00859a010>
13. Nuijens J. H., van Berkel P. H. C., Geerts M. E. J., Hartevelt P. P., de Boer H. A., van Veen H. A., Pieper F. R. Characterization of recombinant human lactoferrin secreted in milk of transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry. Protein Chemistry and Structure*, 1997, vol. 272, no. 13, pp. 8802–8807. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.13.8802>
14. Hu F., Pan F., Sawano Y., Makino T., Kakehi Y., Komiyama M., Kawakami H., Tanokura M. Studies of the structure of multiferric ion-bound lactoferrin: a new antianemic edible material. *International Dairy Journal*, 2008, vol. 18, no. 10–11, pp. 1051–1056. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.003>
15. Luk C. K. Study of the nature of the metal-binding sites and estimate of the distance between the metal-binding sites in transferrin using trivalent lanthanide ions as fluorescent probes. *Biochemistry*, 1971, vol. 10, no. 15, pp. 2838–2843. <https://doi.org/10.1021/bi00791a006>
16. Abdollahi S., Harris W. R., Riehl J. P. Application of circularly polarized luminescence spectroscopy to Tb(III) and Eu(III) complexes of transferrins. *Journal of Physical Chemistry*, 1996, vol. 100, no. 5, pp. 1950–1956. <https://doi.org/10.1021/jp952044d>
17. Rodzik A., Pomastowski P., Sagandykova G. N., Buszewski B. Interactions of whey proteins with metal ions. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, vol. 21, no. 6, art. 2156. <https://doi.org/10.3390/ijms21062156>
18. Lehrer S. S. Fluorescence and absorption studies of the binding of copper and iron to transferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 1969, vol. 244, no. 13, pp. 3613–3617. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83413-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83413-5)
19. Horrocks W. D., Sudnick D. R. Lanthanide ion luminescence probes of the structure of biological macromolecules. *Accounts of Chemical Research*, 1981, vol. 14, no. 12, pp. 384–392. <https://doi.org/10.1021/ar00072a004>
20. Hemmilä I., Dakubu S., Mukkala V.-M., Siitari H., Lövgren T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Analytical Biochemistry*, 1984, vol. 137, no. 2, pp. 335–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90095-2)
21. Yang B., Li Y. Binding constants for terbium (III) with chicken apoovotransferrin. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2001, vol. 17, no. 1, pp. 6–13.

**Информация об авторах**

*Семенов Дмитрий Александрович* – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dsemenov@iboch.by.

*Куприенко Ольга Сергеевна* – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kuprienko@iboch.by.

*Вашкевич Ирина Игнатьевна* – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.by.

*Свиридов Олег Васильевич* – д-р хим. наук, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.by.

**Information about the authors**

*Semenov Dmitry A.* – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dsemenov@iboch.by.

*Kuprienko Olga S.* – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kuprienko@iboch.by.

*Vashkevich Irina I.* – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vashkevich@iboch.by.

*Sviridov Oleg V.* – D. Sc. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by.

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

**БИОЛОГИЯ**  
**BIOLOGY**

УДК 579.25  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-55-64>

Поступило в редакцию 27.10.2021  
Received 27.10.2021

**Н. И. Наумович, А. Э. Охремчук, Л. Н. Валентович, З. М. Алещенкова,  
И. Н. Ананьева, Г. В. Сафронова**

*Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО  
ШТАММА *PRIESTIA MEGATERIUM* БИМ В-1314Д**

*(Представлено академиком А. Г. Лобанком)*

**Аннотация.** *Priestia megaterium* БИМ В-1314Д – галотолерантный штамм, способный расти на средах с содержанием хлорида натрия до 15 % и стимулировать рост растений в условиях засоления. В результате анализа полной нуклеотидной последовательности бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д установлено, что геном штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д представлен одной кольцевой хромосомой и девятью плазмидами. Последовательность генома депонирована в ГенБанк НЦБИ под номерами CP058262–CP058271. Геном штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д имеет размер 5 984 922 пары оснований со средним содержанием ГЦ-пар 37,7 % и содержит 6 187 открытых рамок считывания, из них 5 978 аннотированы как кодирующие белки, 92 – как псевдогены, 154 – как гены тРНК, 8 – как гены нкРНК и 47 – как гены рРНК. В геноме идентифицированы гены, вероятно ответственные за синтез и транспорт осмолитов бетаина и пролина, транспорт ионов калия, что, предположительно, и обеспечивает адаптацию штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д к осмотическому стрессу. Определены генетические локусы, продукты которых могут участвовать в синтезе фитогормонов и полиаминов, которые, возможно, и обуславливают ростостимулирующую способность изучаемого штамма. В геноме идентифицированы кластеры генов, предположительно детерминирующие синтез вторичных метаболитов, белков холодового и теплового шока, определена локализация генов, связанных с устойчивостью к окислительному стрессу. Данные анализа генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д представляют ценную информацию для дальнейшего изучения возможности применения штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д для стимуляции роста растений в условиях засоления.

**Ключевые слова:** *Priestia*, фитогормоны, галотолерантность, осмолиты, ростостимуляция

**Для цитирования.** Молекулярно-генетическая характеристика галотолерантного штамма *Priestia megaterium* БИМ В-1314Д / Н. И. Наумович [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 55–64. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-55-64>

**Nadezhda I. Naumovich, Artur E. Akhremchuk, Leonid N. Valentovich, Zinaida M. Aleschenkova,  
Irina N. Ananyeva, Galina V. Safronova**

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

**MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION  
OF HALOTOLERANT STRAIN *PRIESTIA MEGATERIUM* BIM B-1314D**

*(Communicated by Academician Anatoly G. Lobanok)*

**Abstract.** *Priestia megaterium* BIM B-1314D is a halotolerant strain able to adapt to osmotic stress. The analysis of a full nucleotide sequence of bacterium *P. megaterium* BIM B-1314D has revealed that the genome of the studied strain is represented by one circular chromosome and nine plasmids, deposited in the database of GenBank NCBI under the registration number CP058262–CP058271. The size of the bacterial genome constitutes 5 984 922 base pairs with an average GC content of 37.7 %. The genome contains 6 187 genes where 5 978 were annotated as protein-encoding, 92 – as pseudogenes, 154 – as tRNA genes, 8 – as ncRNA, 47 – as rRNA. The genes responsible for synthesis and transport of betaine and proline osmolytes and transport of potassium ions ensuring the adaptation of strain *P. megaterium* BIM B-1314D to osmotic stress were local-

ized in the genome. Gene loci were defined encoding production of metabolites involved in the synthesis of phytohormones and polyamines accounting for the growth-promoting microbial ability. Gene clusters determining the synthesis of secondary metabolites, cold and heat shock proteins were revealed in the genome. The genome analysis of strain *P. megaterium* BIM B-1314D provides the valuable data on the bacterial culture for stimulation of the plant growth in the salinized conditions.

**Keywords:** *Priestia*, phytohormones, halotolerance, osmolytes, growth stimulation

**For citation.** Naumovich N. I., Akhremchuk A. E., Valentovich L. N., Aleschenkova Z. M., Ananyeva I. N., Safronova G. V. Molecular-genetic characterization of halotolerant strain *Priestia megaterium* BIM B-1314D. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 55–64 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-55-64>

**Введение.** Техногенное засоление почвы вследствие использования в качестве противогололедного реагента галита (технического хлористого натрия) на дорогах в зимний период существенно изменяет содержание и соотношение в почве макро- и микроэлементов, что негативно сказывается на жизнедеятельности растений [1].

Минимизировать негативное влияние хлорида натрия на растения способны азотфиксирующие и фосфатсольбилизирующие бактерии, устойчивые к осмотическому стрессу. Такие солеустойчивые микроорганизмы способны увеличивать обеспеченность растений азотом и фосфором, положительно влиять на регуляцию защитных механизмов растений, активировать антиоксидантные ферменты растений, а также синтезировать фитогормоны и осмопротекторы [2; 3].

Особый интерес представляют широко распространенные в почве галотолерантные бактерии *Priestia megaterium* (ранее *Bacillus megaterium*), характеризующиеся способностью колонизировать различные ткани растений и синтезировать биоактивные соединения. Ранее нами был выделен штамм *P. megaterium* БИМ В-1314Д, способный расти на средах с содержанием хлорида натрия до 15 %, а также стимулировать рост растений в условиях засоления, что делает его перспективным для применения в технологии биоремедиации засоленных почв<sup>1</sup>. Однако полностью оценить биотехнологический потенциал штамма возможно только при анализе его наследственной информации. На сегодняшний момент в ГенБанке Национального центра биотехнологической информации США (НЦБИ) имеются 24 полные нуклеотидные последовательности геномов бактерий вида *Priestia megaterium* и большое количество близких к ним представителей рода *Bacillus*, что свидетельствует о большом научном интересе к этой группе бактерий.

Цель работы – молекулярно-генетическая характеристика генома галотолерантного штамма *Priestia megaterium* БИМ В-1314Д.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлся штамм *P. megaterium* БИМ В-1314Д, выделенный из образца дерново-подзолистой почвы, отобранного в районе Старобинского месторождения калийных солей на территории ОАО «Беларуськалий». Бактерии выращивали на полноценной жидкой среде LB [4]. Выделение геномной ДНК осуществляли, используя набор реактивов «Bacteria DNA Preparation Kit» (PP-206S, Jena Bioscience) согласно прилагаемой инструкции. Для приготовления библиотек ДНК использовался набор реактивов «Nextera XT DNA Library Preparation Kit» (FC-131-1024, Illumina) для последующего секвенирования по методу Иллюмины или набор «Ligation Sequencing Kit» (SQK-LSK109, Oxford Nanopore Technologies) для последующего секвенирования с помощью нанопор. Высокопроизводительное определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе МайСек (MiSeq, Illumina), используя комплект реактивов «MiSeq Reagent Kit v2» (MS-102-2003, Illumina), а также с помощью нанопорового секвенатора МинИон (MinION Mk1B, Oxford Nanopore Technologies) с проточной ячейкой R9.4.1. Для сортировки полученных нанопоровых прочтений использовали программу Varapost v.2020-06-12 [DOI: 10.1109/TCBB.2020.3009780]. Сборку генома осуществляли с помощью программ SPAdes v.3.14.1 [DOI: 10.1002/cpbi.102] и Flye v.2.7.1-b1590 [DOI: 10.1038/s41587-019-0072-8].

Аннотацию генома проводили с помощью веб-сервисов RAST 2.0 (<https://rast.nmpdr.org/>) и PGAP (конвейер аннотации прокариотического генома НЦБИ) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>1</sup> Штамм галотолерантных бактерий *Bacillus aryabhattai* для стимуляции роста растений в условиях засоления: пат. BY 23256 / З. М. Алещенкова, И. Н. Ананьева, Н. И. Наумович, Г. В. Сафронова, К. И. Евенкова-Чернецова. – Оpubл. 30.10.2020.

genome/annotation\_prok/). Сравнение полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с доступными последовательностями из баз данных НЦБИ проводили с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Поиск наиболее схожих геномов и расчет средней нуклеотидной идентичности (СНИ) проводили с помощью веб-сервера JSpeciesWS (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>). Поиск профаговых последовательностей осуществляли с помощью веб-сервиса PHASTER (<https://phaster.ca/>). Выявления последовательностей мобильных генетических элементов и систем рестрикции-модификации осуществляли при помощи веб-сервиса ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>) и базы данных REBASE (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>). Аннотацию и анализ кластеров генов биосинтеза вторичных метаболитов осуществляли при помощи веб-сервиса antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>).

**Результаты и их обсуждение.** В результате секвенирования и биоинформатической обработки прочтений нами была получена полногеномная нуклеотидная последовательность штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, которую затем депонировали в базу данных ГенБанка под номерами CP058262–CP058271. Генетический аппарат исследуемой бактерии *P. megaterium* БИМ В-1314Д представлен кольцевой хромосомой и девятью кольцевыми плазмидами. В результате автоматической аннотации генома было определено или предсказано несколько генетических параметров, представленных в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Характеристики генома бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д, определенные или предсказанные в результате автоматической аннотации

Table 1. Characteristics of *P. megaterium* BIM B-1314D bacterial genome deciphered or predicted upon automatic annotation

Репликон Replicon	ГЦ-состав, % GC, %	Размер, п. н. Size, b. p.	Количество Quantity					
			Генов Genes	БКП CDS	Псевдогенов Pseudo genes	тРНК tRNA	нкРНК ncRNA	рРНК rRNA
Хромосома	38,2	5 187 082	5,375	5 141	68	118	8	40
pBM-Cp-1-1	34,2	173 887	163	152	9	2	–	–
pBM-Cp-1-2	34,3	143 624	154	147	7	–	–	–
pBM-Cp-1-3	33,8	125 581	102	101	1	–	–	–
pBM-Cp-1-4	34,8	110 362	137	115	2	16	–	4
pBM-Cp-1-5	34,8	107 188	111	109	2	–	–	–
pBM-Cp-1-6	35,2	71 521	71	69	2	–	–	–
pBM-Cp-1-7	36,3	51 244	62	40	1	18	–	3
pBM-Cp-1-8	34,3	9 432	10	10	–	–	–	–
pBM-Cp-1-9	33,5	5 001	5	5	–	–	–	–
Итого:	37,7	5 984 922	6 187	5 978	92	154	8	47

П р и м е ч а н и е: БКП – белоккодирующие последовательности; тРНК, нкРНК, рРНК – соответственно транспортные, некодирующие и рибосомные рибонуклеиновые кислоты.

Note: CDS – protein coding sequences; tRNA, ncRNA, rRNA – transport, non-coding and ribosomal ribonucleic acids, respectively.

Нуклеотидная последовательность генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д наиболее схожа с геномами штаммов *P. megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581 (CP035094), *P. megaterium* BMS (GCF\_000746935), *P. megaterium* NCTC10342 (GCA\_900445485) со значением СНИ 95,75 %, а для штамма *P. megaterium* QM B1551 (CP001983) – 98,23 %. А по данным сравнения геномных последовательностей, собранных в базе данных «Геном» НЦБИ, хромосома бактерий штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д наиболее схожа (95 % симметричной идентичности) с хромосомой бактерий штамма *P. megaterium* AFS008968, которые были выделены из почвы в штате Айова в апреле 2014 г. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosample/SAMN07597351>).

Анализ общей структуры генома штамма БИМ В-1314Д в сравнении с изученными близкородственными штаммами вида *Priestia megaterium* позволил установить особенности организации генома, характерные для исследуемого штамма (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Сравнительная характеристика генома бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д с близкородственными штаммами вида *P. megaterium*T a b l e 2. Characteristics of *P. megaterium* BIM В-1314D bacterial genome with closely related strains of species *P. megaterium*

Характеристика Characteristic	Штамм Strain			
	<i>P. megaterium</i> БИМ В-1314Д	<i>P. megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581 (CP035094)	<i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983)	<i>P. megaterium</i> NCT-2 (GCF_000334885)
ГЦ-состав	37,7 %	37,8 %	37,9 %	37,8 %
Размер, п. н.	5 984 922	5 746 548	5 523 192	5 883 957
Количество генов	6 187	5 961	5 694	6 063
Количество БКП	5 978	5 790	5 512	5 860
Количество псевдогенов	92	106	94	175
Количество тРНК	154	122	137	142
Количество нкРНК	8	8	8	8
Количество рРНК	47	41	37	53
Количество плазмид	9	6	7	10

П р и м е ч а н и е: БКП – белоккодирующие последовательности; тРНК, нкРНК, рРНК – соответственно транспортные, некодирующие и рибосомные рибонуклеиновые кислоты.

N o t e: CDS – protein coding sequences; tRNA, ncRNA, rRNA – transport, non-coding and ribosomal ribonucleic acids, respectively.

Сравнительный анализ организации геномов штаммов, представленных в табл. 2, свидетельствует, что размеры генома бактерий штаммов *P. megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581 и *P. megaterium* QM B1551 меньше по размеру анализируемого штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д. Генетический аппарат всех анализируемых штаммов представлен не только хромосомой, но и плазмидами. Максимальное количество плазмид (10) содержится у штамма *P. megaterium* NCT-2, однако размер всего генома не превышает размер исследуемого штамма БИМ В-1314Д, который содержит 9 кольцевых плазмид. Для большинства бактерий вида *P. megaterium* характерно большое количество генов, кодирующих тРНК. Их количество варьирует от 122 у штамма *P. megaterium* NBRC 15308 = ATCC 14581 до 142 у штамма *P. megaterium* NCT-2. Следует отметить, что наибольшее количество тРНК (154 гена) содержится у анализируемого штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, что может свидетельствовать о высоком уровне синтеза белков и активных процессах метаболизма.

Анализ генетического аппарата штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д позволил выявить два инсерционных элемента, относящихся к семейству IS6 и IS200/IS605. Инсерционный элемент семейства IS6, располагающийся на плазмиде рВМ-Ср-1-1 (HW576\_26940), и IS-элемент семейства IS200/IS605 (HW576\_18510), локализованный в хромосоме штамма БИМ В-1314Д, представлены одной копией. Также в геноме штамма БИМ В-1314Д были обнаружены шесть неполных предполагаемых профаговых последовательностей, которые схожи с геномами фагов Clostr\_phiCTP1\_NC\_014457, Synech\_S\_SKS1\_NC\_020851, Prochl\_P\_TIM68\_NC\_028955, Bacill\_G\_NC\_023719, Staphy\_SpaA1\_NC\_018277. Краткая характеристика профагов представлена в табл. 3.

Т а б л и ц а 3. Характеристика профагов бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314ДT a b l e 3. Characteristic of prophages bacteria *P. megaterium* BIM В-1314D

Название профага Phage name	Геном фага Phage genome	Локализация в геноме Location in the genome	Локус Locus
Clostr_phiCTP1_NC_014457	Неполный	Хромосома	HW576_00085–HW576_00125
Synech_S_SKS1_NC_020851	Неполный	Хромосома	HW576_01420–HW576_01455
Prochl_P_TIM68_NC_028955	Неполный	Хромосома	HW576_09195–HW576_09230
Bacill_G_NC_023719	Неполный	Хромосома	HW576_11450–HW576_11480, HW576_24740–HW576_24790
Staphy_SpaA1_NC_018277	Неполный	Плазмида рВМ-Ср-1-6	HW576_30505–HW576_30540

Таким образом, отсутствие в генетическом аппарате бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д большого количества мобильных генетических элементов свидетельствует о наличии специализированных систем защиты, препятствующих проникновению и репликации фагов. В геноме бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д были выявлены гены, кодирующие эндонуклеазы рестрикции тип II, расположенные на хромосоме (HW576\_14160–HW576\_14170 и HW576\_18350–HW576\_18360) и на плазмиде рВМ-Ср-1-4 (HW576\_29160–HW576\_29170).

В результате сортировки аннотированных генов по функциональным группам установлено, что наибольшее из определенных веб-сервисом RAST количество генов, вероятно, ответственно за метаболизм аминокислот (452 гена), углеводов (336 генов), белков (259 генов), синтез кофакторов и витаминов (177 генов).

Анализ генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д выявил генетические детерминанты, продукты которых, по литературным данным, участвуют в синтезе различных соединений, и, предположительно, обеспечивают выживание клеток данного штамма, а также стимуляцию роста растений в условиях засоления. Наиболее важные и подробно описанные гены представлены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Генетические детерминанты штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, предположительно обеспечивающие его выживание и стимуляцию роста растений в условиях засоления

Table 4. Genetic determinants of strain *P. megaterium* BIM B-1314D probably responsible its survival and stimulation of plant growth in the salinized conditions

Название гена Gene name	Локус Locus	Локализация в геноме Location in the genome	Функциональная роль Functional role	Степень сходства нуклеотидных последовательностей, % The degree of nucleotide similarity sequences, %
<i>Синтез вторичных метаболитов</i>				
<i>aepX</i>	HW576_04095	Хромосома	Синтез фосфомицина	99,8 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
–	HW576_07310	Хромосома	Синтез алкилрезорцина	100 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
–	HW576_11150	Хромосома	Синтез мерсацидина	99,8 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
–	HW576_11370– HW576_11390	Хромосома	Синтез пенинодина	99,3 % с <i>P. megaterium</i> S188 (CP049296)
–	HW576_20735– HW576_20755	Хромосома	Синтез сидерофора петробактина	99,6 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
–	HW576_03430	Хромосома	Синтез каротиноидов	99,8 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
–	HW576_26985– HW576_26995	Плазмида рВМ-Ср-1-1	Синтез пенибациллина	99,7 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>Осмотический стресс</i>				
<i>kdpFABC</i>	HW576_15600– HW576_15585	Хромосома	Транспорт ионов K <sup>+</sup>	99,7 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>ktrB</i>	HW576_19945			
<i>trkHA</i>	HW576_06745– HW576_06230			
<i>gbsB</i>	HW576_25980	Хромосома	Биосинтез бетаина	99,7 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>betB</i>	HW576_25975			
<i>opuABC</i>	HW576_07740– HW576_07750	Хромосома	Транспорт бетаина, пролина и др.	99,8 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983),
<i>proA</i>	HW576_11875 HW576_26635	Хромосома	Биосинтез пролина	97,0 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>proB</i>	HW576_26640, HW576_11870			97,0 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983)
<i>proC</i>	HW576_10310– HW576_22495	Хромосома	Биосинтез пролина	97,0 % с <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>putP</i>	HW576_09375	Хромосома	Транспорт пролина	99,9 % с <i>P. megaterium</i> JX285 (CP058262)
<i>proP</i>	HW576_17455			

Окончание табл. 4

Название гена Gene name	Локус Locus	Локализация в геноме Location in the genome	Функциональная роль Functional role	Степень сходства нуклеотидных последовательностей, % The degree of nucleotide similarity sequences, %
<i>Температурный стресс</i>				
–	HW576_29090, HW576_29260	Плазмида pBM-Cp-1-4	Устойчивость к холодовому шоку	100 % с <i>P. megaterium</i> NBRC 15308 = ATCC 14581 (CP035094), <i>P. megaterium</i> STB1 (CP025700), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
	HW576_29830, HW576_29845	Плазмида pBM-Cp-1-5		
	HW576_08610– HW576_08625	Хромосома		
	HW576_09030			
<i>dnaJ</i>	HW576_23245	Хромосома	Устойчивость к тепловому шоку	99,9–100 % с <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041066)
<i>dnaK</i>	HW576_23250			
<i>groES</i>	HW576_01325			
<i>groEL</i>	HW576_01330			
<i>hsp20</i>	HW576_10330			
<i>hslO</i>	HW576_00460			
<i>htpG</i>	HW576_12560			
<i>Окислительный стресс</i>				
<i>sod1</i>	HW576_10940	Хромосома	Устойчивость к супероксидным анион-радикалам	99,6–100 % с <i>P. megaterium</i> KNU10 (CP041519), <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>sod2</i>	HW576_14120			
<i>katA</i>	HW576_08845– HW576_26650	Хромосома	Разложение перекиси водорода	
<i>ohrB</i>	HW576_11810	Хромосома	Разложение органических гидропероксидов	
<i>tpx</i>	HW576_24405			
<i>gpx</i>	HW576_10170			
<i>bcp</i>	HW576_02135			
–	HW576_26465			
<i>Синтез индол-3-уксусной кислоты (ИУК)</i>				
–	HW576_25170	Хромосома	Превращение триптофана в промежуточное соединение ИУК	96,9–100 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699), <i>P. megaterium</i> QM B1551 (CP001983)
–	HW576_06610			
–	HW576_20635– HW576_22510			
<i>hisC</i>	HW576_09395	Хромосома	Превращение индолил-3-пирувата в индолил-3-ацетальдегид	95,7 % с <i>P. megaterium</i> JX285 (CP058262), <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
–	HW576_05785	Хромосома	Превращение индолил-3-ацетальдегида в ИУК	100 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699)
<i>pus</i>	HW576_06895			
–	HW576_01950			
–	HW576_10965	Хромосома	Превращение индолил-3-ацетамида в ИУК	99,3 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>ami</i>	HW576_01845	Хромосома	Превращение индолил-3-ацетамида в ИУК	
<i>Биосинтез полиаминов</i>				
<i>speG</i>	HW576_08745	Хромосома	Синтез Nацетилспермидина	99,8 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699)
<i>speA</i>	HW576_00240	Хромосома	Биосинтез путресцина	100 % с <i>P. megaterium</i> Ni2-3 (CP031776)
<i>speB</i>	HW576_04515	Хромосома		
<i>speD</i>	HW576_24220	Хромосома	Биосинтез спермидина	100 % с <i>P. megaterium</i> 5-3 (CP047699), <i>P. megaterium</i> KNU01 (CP041519)
<i>speE</i>	HW576_04075			

В геноме исследуемого штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д были выявлены кластеры генов, детерминирующих синтез вторичных метаболитов и антибиотиков, которые могут проявлять антагонистическую активность. По представленным в табл. 4 данным, в хромосоме и на плазмиде pBM-Cp-1-1 располагаются гены, продукты которых участвуют в синтезе вторичных метаболитов и антибиотиков, таких как фосфомицин, алкилрезорцин, мерсацидин, пенинодин, пенибацillin, а также локализован кластер генов, ответственный за синтез сидерофора петробактина и каротиноида.

В нуклеотидной последовательности генома штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д установлены генетические детерминанты, продукты которых участвуют в синтезе различных соединений, которые могут быть ответственны за устойчивость штамма к абиотическим стрессам, таким как осмотический, тепловой и окислительный.

В хромосоме исследуемого штамма был выявлен *kdp*-оперон, ответственный за синтез высокоаффинной транспортной системы типа KdpFABC, которая регулирует поступление ионов калия в клетку. По литературным данным известно, что система KdpFABC состоит из четырех белков: АТФазы (KdpB), шаперона АТФазы (KdpC), транспортного белка (KdpA) и вспомогательного мембранного белка (KdpF). Также были обнаружены гены, кодирующие компоненты транспортной системы типа TrkАН и транспортер калия KtrВ. Наличие большого количества генов, ответственных за образование калиевых каналов, позволит предположить, что при увеличении осмотического давления в окружающей среде, бактерии первоначально поглощают большое количество  $K^+$ , чтобы компенсировать отток воды из клетки [5].

В хромосоме штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д были выявлены кластеры генов, ответственных за синтез осмолитов, таких как глицин, бетаин и пролин. Вероятно, что биосинтез бетаина в клетках бактерий исследуемого штамма осуществляется при помощи ферментов алкогольдегидрогеназы III типа (GbsB) и бетаинальдегиддегидрогеназы (BetB), которые осуществляют двухступенчатое окисление холина. Анализ показал и наличие генов, продукты которых участвуют в синтезе компонентов транспортных систем, обеспечивающих перенос глицина, бетаина и его предшественника холина из окружающей среды. Можно предсказать, что транспорт осуществляется с помощью системы типа OpuABC, которая состоит из трех компонентов: OpuAA – АТФ-связывающий белок, OpuAB – интегральный мембранный белок пермеазы и OpuAC – глицин-бетаин-связывающий белок [6; 7].

В геноме штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д локализованы гены *proB*, *proA*, *proC*, вероятно кодирующие ферменты глутамат-5-киназу,  $\gamma$ -глутамилфосфатредуктазу, пирролин-5-карбоксилатредуктазу (соответственно), которые участвуют в синтезе пролина из глутамата. Наличие полного кластера генов, продукты которых могут быть ответственны за синтез пролина предполагает, что у исследуемого штамма возможно функционирует *proBA*-зависимый путь синтеза пролина. В хромосоме бактерий выявлены гены, вероятно ответственные за транспорт пролина из окружающей среды. Ген *putP* кодирует симпортер пролина/натрия, а ген *proP* – транспортер пролина/бетаина. По литературным данным, высокую специфичность и сродство к пролину имеет симпортер пролина/натрия (PutP), в то время как транспортер пролина/бетаина (ProP) способен переносить не только пролин, но и другие осмопротекторы [8; 9].

Как видно из табл. 4, в составе хромосомы штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д обнаружены гены, кодирующие белки-шапероны холодового шока, которые участвуют в стабилизации ДНК и РНК и влияют на эффективность транскрипции и трансляции в условиях холодового шока. Также у исследуемого штамма были идентифицированы гены *dnaJ*, *dnaK*, *groES*, *groEL*, *hsp20*, *hslO* и *htpG*, ответственные за кодирование шаперонов, обеспечивающих устойчивость к тепловому шоку [10].

В составе хромосомы штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д локализованы гены, продукты которых могут участвовать в ответных реакциях на окислительный стресс. Это гены *sod1* и *sod2*, которые кодируют супероксиддисмутазы семейства Cu-Zn и Fe-Mn, гены *katE*, две копии генов *ohrB*, кодирующих каталазу и белки устойчивости к органическому гидропероксиду (соответственно). Также удалось аннотировать гены, синтезирующие тиольную (*tpx*), гем-зависимую пероксидазу, глутатионпероксидазу (*gpx*) и тиоредоксин-зависимую тиолпероксидазу (*bcp*) [11]. Таким образом, наличие большого количества генов устойчивости к окислительному стрессу обеспечивает клеткам потенциальную способность к адаптации к активным формам кислорода (перекиси водорода и органических гидропероксидов).

Эффективным способом повышения стрессоустойчивости растений является инокуляция микроорганизмами, стимулирующими рост растений в условиях осмотического стресса. Многие бактерии-фитостимуляторы способны синтезировать фитогормоны, которые являются ключевыми регуляторами роста и развития растений. Клетки штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д имеют

неполные триптофан-зависимые пути синтеза индол-3-уксусной кислоты (ИУК), такие как индолил-3-ацетамидный и индол-3-пируватный путь. На хромосоме бактерий штамма БИМ В-1314Д локализованы гены, кодирующие аминотрансферазы, пируватоксидазы, пируваткарбоксилазу (*pus*), декарбоксилазу фенольной кислоты, которые участвуют в превращении индолил-3-пирувата в индолил-3-ацетальдегид и две копии гена, участвующие в синтезе альдегиддегидрогеназы, катализирующие превращение индолил-3-ацетальдегида в ИУК. Наличие генетических детерминант, описанных выше в геноме штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д, свидетельствует о том, что штамм способен синтезировать ИУК по индолил-3-пируватному пути [11; 12].

Анализ *in silico* хромосомы штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д показал наличие гена *ami*, кодирующего синтез фермента амидазы, участвующего в превращении индолил-3-ацетамида в ИУК. Полученные данные свидетельствуют, что бактерии *P. megaterium* БИМ В-1314Д также способны синтезировать ИУК и по индолил-3-ацетоамидному пути. Выявленные генетические детерминанты, кодирующие образование ферментов, участвующих в превращении триптофана, индолил-3-пирувата и индолил-3-ацетамида в ИУК, являются высоко консервативными и присутствуют в геномах многих представителей вида *P. megaterium*, что дает основание предположить их функциональную активность в клетках исследуемого штамма. Вместе с тем гены *patB* и *iaaM*, кодирующие синтез ферментов триптофан-трансаминазы и триптофан-2-монооксигеназы, которые превращают триптофан в индолил-3-пируват и индолил-3-ацетамид, в геноме не обнаружены. Таким образом, по результатам генетического анализа можно предположить, что клетки штамма БИМ В-1314Д могут синтезировать ИУК из промежуточных соединений [11; 12].

Полиамины путресцин и спермидин играют важную роль в способности бактерий *Bacillus* и *Priestia* стимулировать рост растений, что значительно повышает их устойчивость к засухе, холоду, засолению за счет усиления антиоксидантной ферментативной активности и усиления экспрессии генов, ответственных за стрессоустойчивость [13]. В хромосоме *P. megaterium* БИМ В-1314Д локализованы несколько генов, продукты которых участвуют в метаболизме и транспорте полиаминов: ген *speA*, кодирующий синтез аргининдекарбоксилазы, и ген *speB*, кодирующий синтез агматиназы, которые участвуют в продукции путресцина. Присутствует несколько копий гена *speD* и *speE*, кодирующих образование S-аденозилметионинкарбоксилазы и спермидинсинтазы, участвующих в биосинтезе спермидина [13]. Потенциальная способность штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д продуцировать полиамины может играть важную роль в стимуляции роста растений в условиях абиотического стресса.

**Заключение.** В результате проведенного секвенирования и анализа генома бактерий *P. megaterium* БИМ В-1314Д определена особенность его организации: выявлены гены, предположительно ответственные за устойчивость к абиотическим факторам (осмотический, температурный, окислительный стрессы, устойчивость к тяжелым металлам), и гены, обеспечивающие стимуляцию роста растений (биосинтез фитогормонов и полиаминов). Полученные данные свидетельствуют о генетическом потенциале штамма *P. megaterium* БИМ В-1314Д к адаптации при неблагоприятных воздействиях окружающей среды и перспективности его применения для минимизации негативного влияния засоления на растения.

#### Список использованных источников

1. Кошелева, Н. Е. Засоление и осолонцевание городских почв из-за применения противогололедных реагентов (на примере западного административного округа Москвы) / Н. Е. Кошелева, Н. Ю. Кузьминская, Е. В. Терская // Инженерные изыскания. – 2017. – № 6–7. – С. 64–77.
2. Gunde-Cimerman, N. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations / N. Gunde-Cimerman, A. Plemenitas, A. Oren // FEMS Microbiology Reviews. – 2018. – Vol. 42, N 3. – P. 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
3. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses / M. Grover [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 27, N 5. – P. 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук / под ред. А. А. Баева, К. Г. Скрыбина. – М., 1984. – 479 с.
5. KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity / G. Holtmann [et al.] // Journal of Bacteriology. – 2003. – Vol. 185, N 4. – P. 1289–1298. <https://doi.org/10.1128/jb.185.4.1289-1298.2003>

6. Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine – responsive GbsR repressor / G. Nau-Wagner [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2012. – Vol. 194, N 10. – P. 2703–2714. <https://doi.org/10.1128/jb.06642-11>
7. Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools / T. Hoffmann [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2013. – Vol. 195, N 3. – P. 510–522. <https://doi.org/10.1128/jb.01505-12>
8. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity / J. Brill [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – Vol. 193, N 19. – P. 5335–5346. <https://doi.org/10.1128/jb.05490-11>
9. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest / F. X. Nascimentoa [et al.] // *Biotechnology Reports*. – 2020. – Vol. 25. – Art. e00406. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>
10. Heinemann, U. Cold-Shock Domains – Abundance, Structure, Properties, and Nucleic-Acid Binding / U. Heinemann, Y. Roske // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, N 2. – Art. 190. <https://doi.org/10.3390/cancers13020190>
11. Genomic Analysis of *Bacillus megaterium* NCT-2 Reveals Its Genetic Basis for the Bioremediation of Secondary Salinization Soil / B. Wang [et al.] // *International Journal of Genomics*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/4109186>
12. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 / J. Shao [et al.] // *Microbial Cell Factories*. – 2015. – Vol. 14. – Art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0323-4>
13. Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance / C. Zhou [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17, N 6. – Art. 976. <https://doi.org/10.3390/ijms17060976>

## References

1. Kosheleva N. E., Kuzminskaya N. Yu., Terskaya E. V. Salinization and solonetzization of urban soils due to the use of deicing agents (by the example of the Western administrative district of Moscow). *Inzhenernyye izyskaniya* [Engineering survey], 2017, no. 6–7, pp. 64–77 (in Russian).
2. Gunde-Cimerman N., Plemenitas A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, vol. 42, no. 3, pp. 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
3. Grover M., Ali Sk. Z., Sandhya V., Rasul A., Venkateswarlu B. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, vol. 27, no. 5, pp. 1231–1240. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0572-7>
4. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook G. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 2230 p.
5. Holtmann G., Bakker E. P., Uozumi N., Bremer E. KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *Journal of Bacteriology*, 2003, vol. 185, no. 4, pp. 1289–1298. <https://doi.org/10.1128/jb.185.4.1289-1298.2003>
6. Nau-Wagner G., Opper D., Rolbetzki A., Boch J., Kempf B., Hoffmann T., Bremer E. Genetic control of osmoadaptive glycine betaine synthesis in *Bacillus subtilis* through the choline-sensing and glycine betaine – responsive GbsR repressor. *Journal of Bacteriology*, 2012, vol. 194, no. 10, pp. 2703–2714. <https://doi.org/10.1128/jb.06642-11>
7. Hoffmann T., Wensing A., Brosius M., Steil L., Völker U., Bremer E. Osmotic control of *opuA* expression in *Bacillus subtilis* and its modulation in response to intracellular glycine betaine and proline pools. *Journal of Bacteriology*, 2013, vol. 195, no. 3, pp. 510–522. <https://doi.org/10.1128/jb.01505-12>
8. Brill J., Hoffmann T., Bleisteiner M., Bremer E. Osmotically controlled synthesis of the compatible solute proline is critical for cellular defense of *Bacillus subtilis* against high osmolarity. *Journal of Bacteriology*, 2011, vol. 193, no. 19, pp. 5335–5346. <https://doi.org/10.1128/jb.05490-11>
9. Nascimentoa F. X., Hernándezb A. G., Glick B. R., Rossi M. J. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 25, art. e00406. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00406>
10. Heinemann U., Roske Y. Cold-Shock Domains – Abundance, Structure, Properties, and Nucleic-Acid Binding. *Cancers*, 2021, vol. 13, no. 2, art. 190. <https://doi.org/10.3390/cancers13020190>
11. Wang B., Zhang D., Chu S., Zhi Y., Liu X., Zhou P. Genomic Analysis of *Bacillus megaterium* NCT-2 Reveals its Genetic Basis for the Bioremediation of Secondary Salinization Soil. *International Journal of Genomics*, 2020, vol. 2020, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/4109186>
12. Shao J., Li Sh., Zhang N., Cui X., Zhou X., Zhang G., Shen Q., Zhang R. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microbial Cell Factories*, 2015, vol. 14, art. 130. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0323-4>
13. Zhou C., Ma Z., Zhu L., Xiao X., Xie Y., Zhu J., Wang J. Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 6, art. 976. <https://doi.org/10.3390/ijms17060976>

**Информация об авторах**

*Наумович Надежда Ивановна* – мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [naumovichnadezda@yandex.ru](mailto:naumovichnadezda@yandex.ru).

*Охремчук Артур Эдуардович* – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [okhrem4ukartur@gmail.com](mailto:okhrem4ukartur@gmail.com).

*Валентович Леонид Николаевич* – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [valentovich@mbio.bas-net.by](mailto:valentovich@mbio.bas-net.by).

*Алесченкова Зинаида Михайловна* – д-р биол. наук, гл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [z\\_aleschenkova@tut.by](mailto:z_aleschenkova@tut.by).

*Ананьева Ирина Николаевна* – канд. биол. наук, доцент, заведующая лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ananeva@mbio.bas-net.by](mailto:ananeva@mbio.bas-net.by).

*Сафронова Галина Владимировна* – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [hsafronava@mail.ru](mailto:hsafronava@mail.ru).

**Information about the authors**

*Naumovich Nadezhda I.* – Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [naumovichnadezda@yandex.ru](mailto:naumovichnadezda@yandex.ru).

*Akhremchuk Artur E.* – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [okhrem4ukartur@gmail.com](mailto:okhrem4ukartur@gmail.com).

*Valentovich Leonid N.* – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [valentovich@mbio.bas-net.by](mailto:valentovich@mbio.bas-net.by).

*Aleschenkova Zinaida M.* – D. Sc. (Biology), Chief Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [z\\_aleschenkova@tut.by](mailto:z_aleschenkova@tut.by).

*Ananyeva Irina N.* – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [ananeva@mbio.bas-net.by](mailto:ananeva@mbio.bas-net.by).

*Safronova Galina V.* – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [hsafronava@mail.ru](mailto:hsafronava@mail.ru).

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

**МЕДИЦИНА**  
**MEDICINE**

УДК 576.5:630\*813.2:582.29  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-65-75>

Поступило в редакцию 29.09.2021  
Received 29.09.2021

**М. В. Матвеев<sup>1</sup>, О. М. Храмченкова<sup>2</sup>, И. А. Чешик<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь*  
<sup>2</sup>*Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины, Гомель, Республика Беларусь*

**ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И ФОТОМОДИФИЦИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ  
ИЗ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЛИШАЙНИКОВ ЮГО-ВОСТОКА БЕЛАРУСИ**

*(Представлено членом-корреспондентом Н. С. Сердюченко)*

**Аннотация.** Анализировали фотомодифицирующий и цитотоксический профиль, полученный для 35 экстрактов, выделенных из пяти видов распространенных лишайников юго-востока Беларуси. По результатам исследования, экстракты были разделены на токсичные и нетоксичные в отношении кератиноцитов человека (НАСаТ). Была выявлена зависимость количественных показателей токсичности экстрактов от вида лишайника, в меньшей степени, от условий экстрагирования. Выявлены экстракты, снижающие токсическое действие ультрафиолета на клетки кожи и обладающие фотосенсибилизационными свойствами. Выделена группа экстрактов, проявивших свойства модификаторов облучения, снижая или увеличивая чувствительность клеток человека, в зависимости от используемой концентрации. Статистический анализ факторов, связанных с модификацией экстрактами эффектов облучения, показал наибольшее влияние на данный показатель применяемых для экстрагирования растворителей. Большинство экстрактов демонстрирует фотозащитные и фотосенсибилизационные эффекты в диапазоне концентраций экстрактов от 2,5 до 5 мкг/мл. Увеличение концентрации до 10 мкг/мл в среднем усиливает их фотосенсибилизационные свойства. Методами вариационной статистики подтверждены значимые концентрационно-зависимые изменения фотомодифицирующих свойств ряда экстрактов.

**Ключевые слова:** экстракты из лишайников, культуры кератиноцитов (НАСаТ), ультрафиолет, полунгибирующая доза ( $ID_{50}$ ), полунгибирующая концентрация ( $IC_{50}$ ), фотомодификация, факторы, множественная регрессия

**Для цитирования.** Матвеев, М. В. Цитотоксические и фотомодифицирующие свойства экстрактов из распространенных лишайников юго-востока Беларуси / М. В. Матвеев, О. М. Храмченкова, И. А. Чешик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 65–75. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-65-75>

**M. V. Matveyenkau<sup>1</sup>, V. M. Khramchankova<sup>2</sup>, I. A. Cheshik<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus*  
<sup>2</sup>*Francisk Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus*

**CYTOTOXIC AND PHOTOMODIFYING PROPERTIES OF EXTRACTS  
FROM THE DISTRIBUTED LICHENS OF THE SOUTH-EAST OF BELARUS**

*(Communicated by Corresponding Member Nikolay S. Serdyuchenko)*

**Abstract.** The photomodifying and cytotoxic profile obtained for thirty-five extracts isolated from five species of distributed lichens in the South-East of Belarus was analyzed. According to the research results, the extracts were classified as toxic and non-toxic to human keratinocytes (HACaT). The dependence of the quantitative toxicity indicators of extracts on the lichen species, to a lesser extent, on the extraction conditions was revealed. Extracts that reduce the toxic effect of ultraviolet radiation on skin cells and possess photosensitizing properties were revealed. A group of the extracts that revealed the properties of a radiation modifier was identified. The statistical analysis of the factors associated with the modification of the radiation effects by extracts showed the greatest influence on this indicator of the solvents used for extraction. Most of the extracts

show both the photoprotective and photosensitizing effects in the extract concentration range from 2.5 to 5 µg/ml. Increasing the concentration to 10 µg/ml, on average, enhances their photosensitizing properties. The statistical analysis confirmed the significant concentration-dependent changes in the photomodifying properties of a number of extracts.

**Keywords:** lichen extracts, keratinocyte culture (HACaT), ultraviolet, median lethal dose (ID<sub>50</sub>), median lethal concentration (IC<sub>50</sub>), photomodification, factors, multiple regression

**For citation.** Matveyenkau M. V., Khramchankova V. M., Cheshik I. A. Cytotoxic and photomodifying properties of extracts from the distributed lichens of the South-East of Belarus. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 65–75 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-65-75>

**Введение.** Поиск и разработка новых солнцезащитных соединений является актуальной и не разрешенной задачей. Существует ряд исследованных и запатентованных субстанций, способствующих снижению повреждающего кожу действия ультрафиолета [1]. Существующие по данной тематике работы дают представления о свойствах фотозащитных веществ, которые могут обуславливаться изменением экзогенных воздействий на клетки: снижение поглощенной дозы, снабжение клеток веществами с антиоксидантными свойствами; а также модуляцией эндогенных: изменение активности провоспалительных и прооксидантных ферментов, экспрессия про- и антиапоптотических генов и т. д. [2–4]. В настоящее время привлекательными представляются соединения и их комплексы, извлеченные из живых организмов различных таксономических групп, приспособленных к условиям повышенной инсоляции. Данные соединения демонстрируют способность комплексно изменять токсическое действие ультрафиолета одновременно ингибируя экзо- и эндогенные факторы [5].

К ряду таких фоторезистентных организмов относятся и лишайники [6; 7]. Существуют исследования, показавшие способность извлеченных из лишайников веществ снижать непосредственно дозы ультрафиолета и проявлять биологически активные эффекты в отношении клеток человека (антиоксидантные, антиапоптотические, противовоспалительные и т. д.) [8–10]. Однако имея достаточный научный задел для обозначения данных эффектов, до сих пор нельзя с уверенностью сказать об исчерпывающей изученности всех аспектов возможного биотехнологического применения лишайниковой биомассы. Слабо представлена информация о собственных цитотоксических свойствах лишайниковых веществ в отношении эпидермальных клеток человека, позволяющая выделить субтоксичные дозировки экстрактов. Отсутствует информация о влиянии на их фотомодифицирующие свойства: условий экстрагирования, доз ультрафиолета, концентрационно-зависимых эффектов и, наконец, видовой и эколого-географической принадлежности лишайника. Все это ставит ряд актуальных проблем, решению которых может помочь широкий скрининг цитотоксических и фотомодифицирующих характеристик лишайниковых веществ и их комплексов.

Цель работы – оценка влияния экспериментальных факторов на цитотоксические и фотомодифицирующие характеристики различных фракций веществ, выделенных из пяти распространенных видов лишайников юго-востока Беларуси – *Cladonia arbuscula*, *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria*, *Xanthoria parietina* – в отношении кератиноцитов человека HACaT.

**Материалы и методы исследования.** *Получение экстрактов лишайников.* Биомассу лишайников отбирали на типичных для каждого вида субстратах, сушили до воздушно-сухого состояния, измельчали, экстрагировали метанолом и ацетоном в аппарате Сокслета. Растворитель удаляли, экстракты высушивали до порошкообразного состояния, после чего использовали для исследований.

*Подготовка стабильных клеточных линий.* Использовали эпителиальные клетки человека линии HACaT (кератиноциты). Культуры клеток были получены в НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных Белорусского государственного университета. Режим культивирования стандартный: 37°C, 90 % влажности воздуха с 5 %-ным содержанием CO<sub>2</sub>, коэффициент субкультивирования 1/5. Состав среды: DMEM/F-12, 11039 GIBCO; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мкг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин-В; 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (HiClone Inc).

**Инкубация клеток с экстрактами.** Культуры кератиноцитов преинкубировали в 96-луночных планшетах до достижения ими фазы экспоненциального роста. Затем вносили в лунки планшета раствор экстракта, серийно разведенный в питательной среде, в диапазоне концентраций 200–0,78 (мкг/мл). По прошествии 48 ч оценивали жизнеспособность клеток по методу, описанному ниже. Подробно схема инкубации описана в [11].

Для определения модификации фототоксических эффектов после периода преинкубации в планшете культуры кератиноцитов пошагово экспонировали в каждом ряду лунок планшета заданное время на поверхности стеклянного УФ-фильтра системы гель-документации Chemidoc (Bio-Rad), предварительно добавив в питательную среду растворы экстрактов лишайников в концентрациях 2,5; 5,0 и 10,0 мкг/мл. Использовали параметры и схему облучения, описанные в [12]. Жизнеспособность клеточных популяций кератиноцитов в эксперименте устанавливали с помощью МТТ-теста, определяющего метаболическую активность клеток – тест на скорость восстановления 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ, М5655, Sigma) [13].

Для статистической проверки гипотез о различии действия отдельных экстрактов сравнивали параметры экспериментальных кривых выживаемости клеток сопоставлением вложенных регрессионных моделей методом F-теста. Для оценки связи экспериментальных факторов и исследуемых свойств экстрактов использовали метод множественной регрессии, с кодировкой категориальных независимых переменных. Анализ результатов исследования производили с помощью программных продуктов GraphPad Prism (Version 8.01) и Microsoft Excel.

**Результаты и их обсуждение.** Сравнивали цитотоксическое действие семи различных экстрактов, полученных из талломов пяти видов лишайников. Для этого определяли динамику воздействия градиента их концентраций на жизнеспособность клеточных популяций кератиноцитов. В качестве аналитической величины использовали концентрацию экстрактов, ингибирующую 50 % жизнеспособности клеток ( $IC_{50}$ ), являющуюся количественным выражением их общетоксического потенциала. Для выявления диапазона и характера изучаемого эффекта определяли концентрации, снижающие жизнеспособность клеток на 10 и 90 % ( $IC_{10}$  и  $IC_{90}$ , табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Различные аналитические величины цитотоксического эффекта экстрактов из лишайников в отношении клеточных линий, оцененные с помощью МТТ-теста после 48 ч инкубации

Table 1. Different values of the cytotoxic effect of lichen extracts on cell lines, assessed by the MTT test after 48 hours of incubation

Экстракт Extract	$IC_{50}$ , мкг/мл	$IC_{10}$ , мкг/мл	$IC_{90}$ , мкг/мл	
<i>Cladonia arbuscula</i>	ацетон	11,16 ± 1,11	<1,00	17,52
	бензол	27,04 ± 3,61	<1,00	>200
	гексан	27,75 ± 2,39	15,40	50,02
	метанол	79,3 ± 10,57	15,80	>200
	хлороформ	20,71 ± 1,76	4,86	71,22
	этанол	12,12 ± 1,08	<1,00	18,21
	этилацетат	32,56 ± 2,15	16,37	59,55
<i>Evernia prunastri</i>	ацетон	20,20 ± 0,93	8,26	38,23
	бензол	52,32 ± 5,70	13,96	>200
	гексан	52,41 ± 3,23	28,44	86,57
	метанол	116,60 ± 12,22	45,8	>200
	хлороформ	52,75 ± 4,87	22,06	>200
	этанол	113,10 ± 6,40	41,68	192,90
	этилацетат	68,97 ± 8,19	41,13	>200
<i>Hypogimnia physodes</i>	ацетон	19,7 ± 4,52	18,32	21,15
	бензол	37,06 ± 4,20	<1,00	102
	гексан	32,72 ± 2,18	22,53	47,26
	метанол	73,1 ± 5,42	26,2	>200
	хлороформ	27,65 ± 2,43	12,85	59,27
	этанол	19,6 ± 7,2	18,05	20,90
	этилацетат	33,98 ± 2,11	14,59	80,40

Окончание табл. 1

Экстракт Extract	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	IC <sub>10</sub> , мкг/мл	IC <sub>90</sub> , мкг/мл	
<i>Ramalina pollinaria</i>	ацетон	66,90 ± 5,43	30,39	145,4
	бензол	36,19 ± 2,85	<1,00	79,57
	гексан	48,61 ± 4,05	27,67	85,37
	метанол	106,30 ± 13,24	60,80	188,40
	хлороформ	52,88 ± 6,93	20,35	>200
	этанол	63,10 ± 9,13	21,76	237,8
	этилацетат	76,35 ± 4,70	38,18	172
<i>Xanthoria parietina</i>	ацетон	152,00 ± 18,23	33,75	>200
	бензол	136,4 ± 33,03	10,28	>200
	гексан	>200	4,378	>200
	метанол	>200	2,28	>200
	хлороформ	28,29 ± 5,33	3,70	>200
	этанол	161,30 ± 41,30	7,09	>200
	этилацетат	41,72 ± 6,20	9,66	>200

Сравнение IC<sub>50</sub> экстрактов с критериальным значением (IC<sub>50</sub> < 30 мкг/мл), рекомендованным Национальным институтом рака США (NCI) [14], позволило разделить экстракты на токсичные и нетоксичные. Таким образом, у вида *Cladonia arbuscula* цитотоксичные следующие экстракты: ацетоновый, бензольный, гексановый, хлороформный, этанольный. У вида *Hypogimnia physodes*: ацетоновый, хлороформный, этанольный. У вида *Evernia prunastri* лишь ацетоновый экстракт, в свою очередь у *Xanthoria parietina* – только хлороформный. Экстракты, извлеченные из вида *Ramalina pollinaria*, не проявили себя как достаточно токсические субстанции при всех исследуемых условиях экстрагирования.

Оценку факторов, обуславливающих цитотоксический профиль изучаемых экстрактов, проводили с помощью множественной регрессии характеристики общетоксического потенциала (IC<sub>50</sub>) от двух экспериментальных факторов: «вид лишайника» и «экстрагент». По показателю коэффициента множественной регрессии фактор «вид лишайника» обладал наибольшим влиянием на изменение цитотоксичности экстрактов и обуславливал 50,3 % ( $R^2 = 0,503$ ;  $p = 0,0002$ ) вариации показателя (рис. 1). По показателям бета-коэффициентов вид *Cladonia arbuscula* обуславливает наибольшую цитотоксичность экстрактов ( $\beta = -35,65$  мкг/мл;  $p = 0,0108$ ), экстракты вида *Hypogimnia physodes* в среднем чуть менее цитотоксичны ( $\beta = -30,91$  мкг/мл;  $p = 0,0251$ ).

В свою очередь вид *Xanthoria parietina* обуславливает снижение цитотоксичности экстрактов в среднем увеличивая полуингибирующую концентрацию ( $\beta = 65,65$  мкг/мл;  $p = 0,0001$ ). Вид *Evernia prunastri* не вносит значительных изменений в анализируемый показатель ( $\beta = 2,31$  мкг/мл;  $p = 0,8612$ ). Влияние фактора «экстрагент» в целом невелико и статистически не значимо ( $R^2 = 0,21$ ;  $p = 0,3148$ ). Достаточно сильным влиянием на вариацию признака обладает только метанол, в среднем снижая цитотоксичность экстрактов ( $\beta = 49,32$  мкг/мл;  $p = 0,0259$ ).

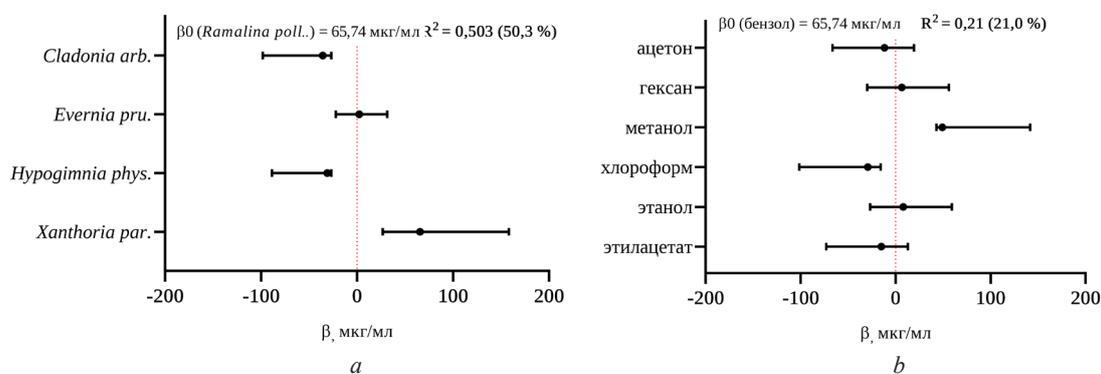


Рис. 1. Влияние различных экспериментальных факторов на цитотоксические свойства экстрактов

Fig. 1. Influence of various experimental factors on the cytotoxic properties of extracts

Можно сделать вывод о преобладающем влиянии фактора видовой принадлежности лишайника на цитотоксические свойства извлеченных из него веществ. Использование лишайников вида *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* в среднем увеличивает цитотоксичность полученных экстрактов и приближает значение их полуингибирующих концентраций к токсичным по принятому критерию ( $IC_{50} < 30$  мкг/мл). Применение видов *Evernia prunastri* и *Ramalina pollinaria* позволяет получить экстракты со средним уровнем цитотоксичности. Извлечения из вида *Xanthoria parietina* в среднем на 65,65 мкг/мл менее активны в сравнении с полученными из других видов. Учитывая общую неоднозначность влияния используемых растворителей на анализируемый показатель, достаточно значимым можно признать лишь снижение цитотоксической активности веществ, извлеченных с помощью метанола.

Попарное сравнение силы и характера цитотоксичности отдельных экстрактов, обусловленных видовой принадлежностью взятого для их получения лишайника, выявило определенные типы различий. Так можно выделить экстракты, схожие по общетоксическому потенциалу (параметр  $IC_{50}$  при  $p = 0,0638–0,9882$ ), но имеющие различные биологические эффекты и/или характер их взаимодействия (параметр: коэффициент угла наклона кривой при  $p = 0,0001–0,0477$ ): *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* – бензольные, метанольные, этилацетатные; *Cladonia arbusucla* и *Ramalina pollinaria* – бензольные; *Cladonia arbusucla* и *Xanthoria parietina* – хлороформные, этилацетатные; *Evernia prunastri* и *Hypogimnia physodes* – ацетоновые, бензольные; *Evernia prunastri* и *Xanthoria parietina* – этанольные. Также можно отметить противоположную группу экстрактов, имеющих значительно различающийся общетоксический потенциал ( $p = 0,0001–0,0477$ ), но при этом обладающие схожим характером действия ( $p = 0,0517–0,9825$ ): *Cladonia arbusucla* и *Evernia prunastri* – ацетоновые, гексановые, хлороформные; *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* – этанольные; *Cladonia arbusucla* и *Ramalina pollinaria* – все кроме ацетоновых и бензольных; *Cladonia arbusucla* и *Xanthoria parietina* – хлороформные, этилацетатные; *Evernia prunastri* и *Hypogimnia physodes* – ацетоновые, бензольные; *Evernia prunastri* и *Xanthoria parietina* – этанольные; *Hypogimnia physodes* и *Xanthoria parietina* – хлороформные. Данные соображения подтверждаются также соотношением изучаемых аналитических параметров кривой выживаемости клеток ( $IC_{10}$ ,  $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$ ).

Попарная проверка гипотезы о различиях цитотоксичности отдельных экстрактов внутри вида выявила наличие значимых различий в цитотоксическом потенциале (при  $p = 0,0001–0,0365$ ) экстрактов вида *Evernia prunastri*, полученных на растворителях разной химической природы, в то время как у экстрактов из вида *Ramalina pollinaria* – схожей ( $p = 0,0001–0,0262$ ). Экстракты из *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* проявили различное цитотоксическое действие в случае извлечения веществ схожими растворителями (хлороформ и гексан, метанол и этанол и т. д.,  $p = 0,0001–0,0489$ ), так и в случае с экстрагентами различной природы (бензол и этанол, метанол и хлороформ и т. д. при  $p = 0,0001–0,0195$ ). Различие в действии экстрактов из вида *Xanthoria parietina* обусловлены ярко выраженной цитотоксичностью хлороформных и этилацетатных экстрактов относительно других, полученных из данного вида лишайника ( $p = 0,0001$ ).

Для сравнения фотомодифицирующих свойств экстрактов строили кривые динамики жизнеспособности кератиноцитов в условиях наращивания доз ультрафиолета. Далее определяли аналитическую величину: дозу половинного ингибирования жизнеспособности клеток ( $ID_{50}$ ). Отношение полулетальных доз излучения для клеток (фактор изменения цитотоксичности, ФИЦ) служило количественной мерой эффектов фотомодификации:

$$\text{ФИЦ} = \frac{ID_{50}(\text{опыт})}{ID_{50}(\text{контроль})},$$

где  $ID_{50}$  (опыт) – величина полулетальной дозы облучения кератиноцитов при добавлении в питательную среду экстрактов лишайников;  $ID_{50}$  (контроль) – то же без добавления экстрактов лишайников. Концентрации экстрактов в питательной среде – 2,5, 5 и 10 мкг/мл – были выбраны по критерию отсутствия выраженных токсических свойств для большинства экстрактов. На основании статистического анализа полученных величин экстракты были разделены на фотопротекторные и фотосенсибилизирующие (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Величины модификации цитотоксического действия ультрафиолета экстрактами из лишайников в отношении эпидермальных клеток человека HAcAT

T a b l e 2. Values of modification of the cytotoxic effect of ultraviolet radiation by lichen extracts on human epidermal cells HAcAT

Экстракт Extract		ID <sub>50</sub> , мДж/см <sup>2</sup> ФИЦ		
		2,5 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл
<i>Cladonia arbuscula</i>	ацетон	<b>5,83 ± 0,31</b>	3,87 ± 0,88	<b>1,11 ± 1,00</b>
		<b>1,53</b>	1,02	<b>0,29</b>
	бензол	<b>2,12 ± 0,19</b>	<b>1,51 ± 0,17</b>	<b>0,58 ± 0,08</b>
		<b>0,56</b>	<b>0,40</b>	<b>0,15</b>
	гексан	<b>0,01 &lt;</b>	<b>0,01 &lt;</b>	<b>0,01 &lt;</b>
		<b>0,01 &lt;</b>	<b>0,01 &lt;</b>	<b>0,01 &lt;</b>
	метанол	5,40 ± 0,51	5,44 ± 0,70	5,06 ± 0,65
1,42		1,43	1,33	
хлороформ	<b>2,10 ± 0,18</b>	<b>0,25 ± 0,07</b>	<b>0,01 &lt;</b>	
	<b>0,55</b>	<b>0,06</b>	<b>0,01 &lt;</b>	
этанол	<b>5,69 ± 0,19</b>	<b>5,38 ± 0,61</b>	4,14 ± 0,41	
	<b>1,50</b>	<b>1,41</b>	1,09	
этилацетат	<b>0,15 ± 0,07</b>	<b>0,01 &lt;</b>	<b>0,01 &lt;</b>	
	<b>0,04</b>	<b>0,01 &lt;</b>	<b>0,01 &lt;</b>	
<i>Evernia prunastri</i>	ацетон	<b>2,94 ± 0,09</b>	<b>2,99 ± 0,12</b>	<b>2,81 ± 0,12</b>
		<b>0,77</b>	<b>0,79</b>	<b>0,74</b>
	бензол	4,20 ± 0,45	3,05 ± 0,63	<b>0,40 ± 0,12</b>
		1,11	0,80	<b>0,11</b>
	гексан	<b>5,93 ± 0,61</b>	4,86 ± 0,75	<b>0,18 ± 0,07</b>
		<b>1,56</b>	1,28	<b>0,05</b>
	метанол	<b>6,70 ± 0,33</b>	<b>7,03 ± 0,54</b>	<b>7,62 ± 0,58</b>
<b>1,76</b>		<b>1,85</b>	<b>2,01</b>	
хлороформ	3,69 ± 0,70	<b>2,37 ± 0,42</b>	<b>0,22 ± 0,11</b>	
	0,97	<b>0,62</b>	<b>0,06</b>	
этанол	2,70 ± 0,20	2,90 ± 0,16	2,41 ± 0,13	
	0,71	0,76	0,63	
этилацетат	4,20 ± 0,65	2,92 ± 0,60	<b>1,08 ± 0,20</b>	
	1,10	0,77	<b>0,29</b>	
<i>Hypogimnia physodes</i>	ацетон	<b>2,27 ± 0,12</b>	<b>2,49 ± 0,10</b>	<b>2,76 ± 0,11</b>
		<b>0,67</b>	<b>0,72</b>	<b>0,73</b>
	бензол	<b>6,88 ± 0,60</b>	4,74 ± 0,86	<b>0,31 ± 0,17</b>
		<b>1,61</b>	1,25	<b>0,08</b>
	гексан	<b>5,34 ± 0,70</b>	4,23 ± 0,46	<b>0,14 ± 0,07</b>
		<b>1,41</b>	1,11	<b>0,04</b>
	метанол	<b>7,69 ± 0,45</b>	<b>7,23 ± 0,55</b>	5,68 ± 0,60
<b>2,02</b>		<b>1,90</b>	1,49	
хлороформ	3,58 ± 0,55	<b>2,81 ± 0,59</b>	<b>0,41 ± 0,12</b>	
	0,94	<b>0,74</b>	<b>0,11</b>	
этанол	<b>2,57 ± 0,19</b>	<b>2,47 ± 0,15</b>	<b>2,51 ± 0,10</b>	
	<b>0,68</b>	<b>0,65</b>	<b>0,66</b>	
этилацетат	4,23 ± 0,44	3,37 ± 0,61	<b>0,82 ± 0,20</b>	
	1,11	0,89	<b>0,22</b>	
<i>Ramalina pollinaria</i>	ацетон	<b>4,80 ± 0,37</b>	<b>5,23 ± 0,26</b>	<b>4,72 ± 0,36</b>
		<b>1,26</b>	<b>1,38</b>	<b>1,24</b>
	бензол	6,30 ± 0,67	4,57 ± 0,76	<b>0,29 ± 0,20</b>
		1,66	1,20	<b>0,08</b>
	гексан	<b>5,28 ± 0,82</b>	<b>2,95 ± 0,63</b>	<b>0,11 ± 0,06</b>
		<b>1,39</b>	<b>0,78</b>	<b>0,03</b>
	метанол	<b>7,55 ± 0,29</b>	<b>8,04 ± 0,70</b>	<b>9,74 ± 1,00</b>
<b>1,99</b>		<b>2,12</b>	<b>2,62</b>	
хлороформ	<b>5,69 ± 0,62</b>	4,76 ± 0,70	<b>0,67 ± 0,22</b>	
	<b>1,50</b>	1,25	<b>0,18</b>	
этанол	<b>6,28 ± 0,37</b>	<b>6,80 ± 0,61</b>	<b>6,76 ± 0,48</b>	
	<b>1,65</b>	<b>1,79</b>	<b>1,78</b>	
этилацетат	4,51 ± 0,54	4,93 ± 0,60	2,24 ± 0,22	
	1,19	1,30	0,59	

Окончание табл. 2

Экстракт Extract		ID <sub>50</sub> , мДж/см <sup>2</sup> ФИЦ		
		2,5 мкг/мл	5 мкг/мл	10 мкг/мл
<i>Xanthoria parietina</i>	ацетон	<b>2,24 ± 0,23</b> <b>0,59</b>	<b>1,59 ± 0,25</b> <b>0,42</b>	<b>1,23 ± 0,21</b> <b>0,32</b>
	бензол	<b>0,30 ± 0,06</b> <b>0,06</b>	<b>0,24 ± 0,10</b> <b>0,08</b>	<b>0,29 ± 0,06</b> <b>0,06</b>
	гексан	<b>1,29 ± 0,24</b> <b>0,34</b>	<b>0,35 ± 0,09</b> <b>0,09</b>	<b>0,18 ± 0,06</b> <b>0,05</b>
	метанол	<b>5,13 ± 0,60</b> <b>1,35</b>	<b>5,09 ± 0,29</b> <b>1,34</b>	3,88 ± 0,57 1,02
	хлороформ	<b>0,89 ± 0,18</b> <b>0,23</b>	<b>1,11 ± 0,24</b> <b>0,29</b>	<b>0,73 ± 0,19</b> <b>0,19</b>
	этанол	2,98 ± 0,33 0,78	<b>2,29 ± 0,30</b> <b>0,60</b>	<b>2,33 ± 0,16</b> <b>0,61</b>
	этилацетат	<b>0,48 ± 0,09</b> <b>0,13</b>	<b>0,51 ± 0,13</b> <b>0,13</b>	<b>0,34 ± 0,15</b> <b>0,09</b>

Примечание. Жирным шрифтом отмечено достоверное отличие полулетальной дозы от контрольной (ID<sub>50</sub> = 3,77 ± 0,47 мДж/см<sup>2</sup>) при  $p = 0,05$ .

Note. Bold type shows a significant difference of a semi-lethal dose from a control one (ID<sub>50</sub> = 3.77 ± 0.47 mJ/cm<sup>2</sup>) at  $p = 0.05$ .

К экстрактам, обладающим фотопротекторным действием, можно отнести: этанольные из *Cladonia arbuscula* и *Ramalina pollinaria*; ацетоновый из *Ramalina pollinaria*, а также метанольные из *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Стоит отметить фотопротекторный эффект метанольного экстракта из *Cladonia arbuscula* в концентрации 5 мкг/мл, уровень значимости которого близок к взятому статистическому критерию ( $p = 0,0565$ ). Перечисленные экстракты способны снижать токсическое действие ультрафиолета в 1,34–2,62 раза. Максимальные фотозащитные свойства проявил метанольный экстракт из *Ramalina pollinaria* в концентрации 10 мкг/мл, минимальные – метанольный из *Xanthoria parietina* в той же концентрации.

Выраженными эффектами сенсibilизации цитотоксического действия ультрафиолета обладали следующие экстракты: бензольный, гексановый, хлороформный и этилацетатный из *Cladonia arbuscula*; ацетоновый, бензольный, хлороформный и этилацетатный из *Evernia prunastri*; ацетоновый, хлороформный, этанольный и этилацетатный из *Hypogimnia physodes*; а также все экстракты из *Xanthoria parietina* кроме метанольного. Количественно данная способность проявилась в увеличении токсического потенциала облучения в 1,35–27,01 раз. Максимальный эффект данной группы проявился у этилацетатного экстракта из *Cladonia arbuscula* в концентрации 2,5 мкг/мл, минимальный – у хлороформного из *Hypogimnia physodes* в той же концентрации. Отдельно в данной группе стоит выделить хлороформный и этилацетатный экстракты из *Cladonia arbuscula* в концентрации 5–10 мкг/мл, а также гексановый того же вида во всех концентрационных точках, как способные полностью подавлять жизнеспособность кератиноцитов при воздействии самых малых субтоксичных доз излучения.

Выделена группа модификаторов облучения – экстрактов, способных проявлять как фотопротекторные, так и фотосенсibilизационные свойства в зависимости от их концентрации в питательной среде. К данной группе относятся экстракты из *Cladonia arbuscula* (ацетон), *Evernia prunastri* (гексан), *Hypogimnia physodes* (бензол, гексан), *Ramalina pollinaria* (хлороформ). Количественные эффекты модификации имеют определенную концентрационную зависимость. Добавление экстрактов в концентрации 2,5 мкг/мл снижает токсическое действие излучения в 1,50–1,61 раз. Увеличение концентрации в два раза снижает выживаемость кератиноцитов в условиях облучения до контрольного уровня. Дальнейшее увеличение экстракта в питательной среде приводит к выраженным эффектам сенсibilизации, увеличивая чувствительность кератиноцитов к ультрафиолету в 6,56–26,39 раз.

Выбор растворителя оказал наибольшее влияние на фотомодификационные свойства экстрактов, обуславливая 40,4 % ( $R^2 = 0,404$ ;  $p = 0,0001$ ) вариации полулетальной дозы ультрафиолета. Внесение в питательную среду веществ, извлеченных метанолом, в среднем увеличивает полулетальную дозу ультрафиолета для клеток по сравнению с контрольной на 2,70 мДж/см<sup>2</sup> ( $p = 0,0005$ ). В свою очередь, использование таких растворителей, как гексан, хлороформ и этилацетат достоверно снижает равноэффективную дозу на 1,7–1,8 мДж/см<sup>2</sup>. Меньшим влиянием на фотомодификационные свойства экстрактов обладает видовая принадлежность лишайника и используемая концентрация, обуславливая 21,9 и 11,4 % вариации полулетальной дозы соответственно ( $R^2 = 0,219$  и  $0,114$ ;  $p = 0,0001$  и  $0,0036$ ). Использование экстрактов из лишайника *Xanthoria parietina* увеличивает чувствительность клеток к излучению в среднем на 2,19 мДж/см<sup>2</sup> ( $p = 0,0074$ ).

Увеличение концентрации большинства экстрактов в питательной среде до 10 мкг/мл также увеличивает сенсбилизационные свойства экстрактов на 1,74 мДж/см<sup>2</sup> ( $p = 0,030$ ).

Выявлен ряд тенденций изменения фотомодификационных свойств отдельных экстрактов (рис. 2). У этанольных экстрактов из *Cladonia arbuscula* и *Ramalina pollinaria*, метанольных из *Hypogimnia physodes* и *Ramalina pollinaria* подтверждено достоверное увеличение защитного эффекта с ростом концентрации ( $p = 0,0003$ – $0,0405$ ). Увеличение фотосенсбилизационной активности, увеличивающейся с ростом концентрации в питательной среде ( $p = 0,0001$ – $0,0458$ ), подтверждено у экстрактов из *Cladonia arbuscula* (бензольный и хлороформный), *Evernia prunastri* (бензольный, хлороформный и этилацетатный), *Hypogimnia physodes* (хлороформный и этилацетатный), *Xanthoria parietina* (гексановый). У всех экстрактов из вышеупомянутой группы модификаторов изменение с ростом концентрации эффектов фотопротекции на сенсбилизацию является достоверным ( $p = 0,0001$ – $0,0364$ ).

Таким образом, оценен ряд факторов, обуславливающих способность экстрактов изменять эффекты облучения клеток в сторону фотопротекции и/или сенсбилизации. С одной стороны,

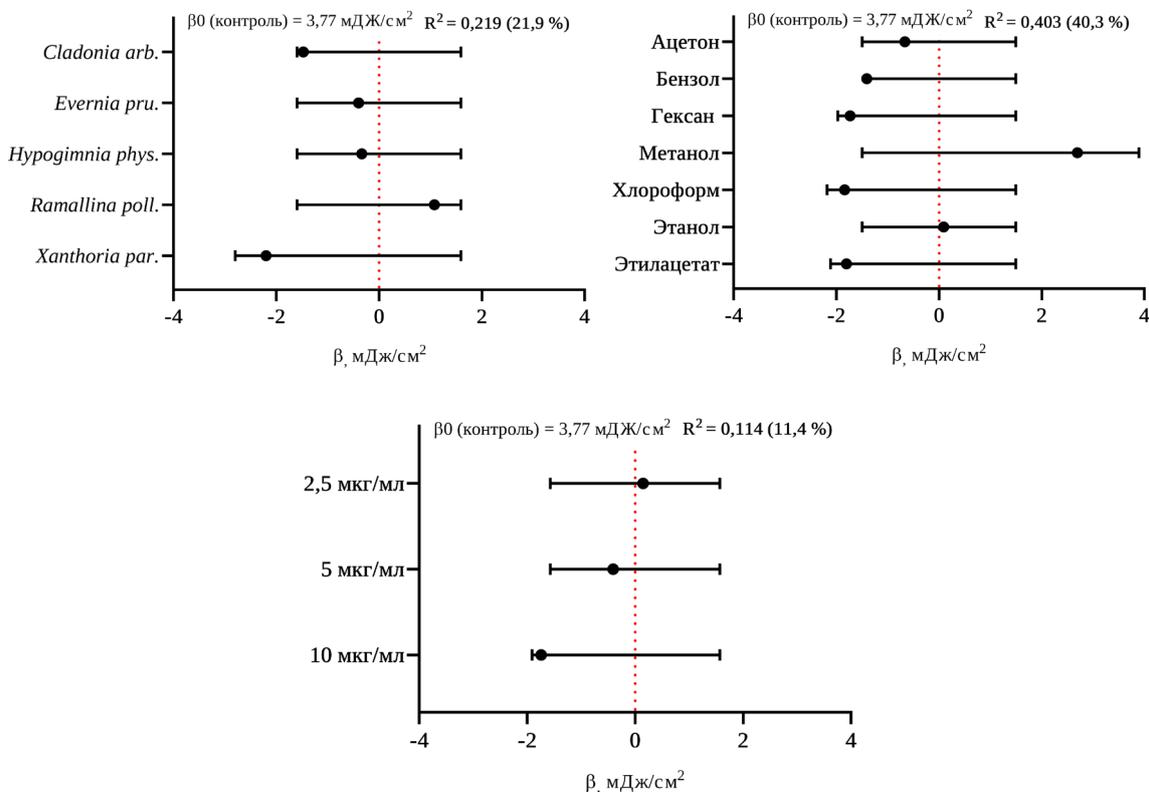


Рис. 2. Влияние различных экспериментальных факторов на фотомодификационные свойства экстрактов

Fig. 2. Influence of various experimental factors on the photomodification properties of extracts

это является обоснованием практического применения ряда извлечений в качестве компонентов солнцезащитного состава для получения управляемого эффекта модификации воздействия ультрафиолета на клетки. С другой стороны, полученный перечень фотомодифицирующих характеристик наглядно демонстрирует возможность получения отдельных веществ у ряда экстрактов, обладающих как защитными, так и сенсibiliзирующими свойствами, и указывает на минимально необходимый концентрационный диапазон данного поиска.

**Заключение.** Выявлен ряд экстрактов, характеризующихся отсутствием выраженных цитотоксических эффектов на эпидермальные клетки человека: метанольный и этилацетатный из *Cladonia arbusucla*; бензольный, гексановый, метанольный, этилацетатный из *Hypogimnia physodes*; бензольный, гексановый, метанольный, хлороформный, этанольный и этилацетатный из *Evernia prunastri*; ацетоновый, бензольный, гексановый, метанольный, этанольный и этилацетатный из *Xanthoria parietina*; а также все экстракты из вида *Ramalina pollinaria*. Остальные экстракты охарактеризованы как токсичные по выбранному критерию. Наибольшим влиянием на цитотоксические свойства извлеченных из лишайника веществ обладает фактор видовой принадлежности, обуславливая 50,3 % вариации данного признака. Экстракты из видов *Cladonia arbusucla* и *Hypogimnia physodes* в среднем более токсичны, в то время как извлечения из вида *Xanthoria parietina* менее токсичны. Влияние используемого набора растворителей на цитотоксичность экстрактов в целом невелико и статистически не значимо. Исключением является экстракция метанолом, которая снижает цитотоксические свойства полученных субстанций.

Выявлено ослабление токсических эффектов воздействия ультрафиолета на кератиноциты в 1,34–2,62 раза при их культивировании с экстрактами: этанольным из *Cladonia arbusucla*, этанольным и ацетоновым из *Ramalina pollinaria*, а также с метанольными из видов *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*, *Ramalina pollinaria* и *Xanthoria parietina*. Ряд экстрактов – ацетоновый из *Cladonia arbusucla*, гексановый из *Evernia prunastri*, бензольный и гексановый из *Hypogimnia physodes*, хлороформный из *Ramalina pollinaria* – показали себя в роли модификаторов облучения, изменяя свои свойства с фотопротекторных на сенсibiliзационные, по мере увеличения их концентрации в питательной среде, увеличивая и снижая цитотоксичность ультрафиолета до 26,39 и 1,50 раз соответственно. Обнаружены фотосенсibiliзационные эффекты, способные увеличивать токсическое действие ультрафиолета в 1,35–27,01 раз у следующих экстрактов: бензольные и хлороформные из *Cladonia arbusucla*, *Evernia prunastri*, *Hypogimnia physodes*; бензольные и этилацетатные из *Evernia prunastri* и *Cladonia arbusucla*; гексановый из *Cladonia arbusucla*; этанольный из *Hypogimnia physodes*; а также все экстракты из *Xanthoria parietina*, кроме метанольного.

Наибольшим влиянием на фотомодификационные свойства экстрактов обладает фактор выбора экстрагента, обуславливая 40,4 % вариации данной характеристики. Вещества, извлеченные метанолом, проявляют в среднем фотопротекторные свойства, увеличивая полулетальную для клеток дозу на 2,70 мДж. Растворители – гексан, хлороформ и этилацетат – в среднем обуславливают фотосенсibiliзационные эффекты, снижая полулетальную дозу облучения на 1,7–1,8 мДж. Анализ экспериментальных факторов «вид» и «концентрация» позволяет сделать вывод о смещении модификации облучения большинством экстрактов из *Xanthoria parietina* в сторону сенсibiliзации, а также проявлении аналогичных свойств при увеличении концентрации до 10 мкг/мл у всех экстрактов.

#### Список использованных источников

1. Parker, F. R. Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration: Authority and Responsibility / F. R. Parker // FDA Administrative Enforcement Manual. – Boca Raton, 2005. – Ch. 1. – P. 21–60. <https://doi.org/10.1201/9781420037838-6>
2. Serpone, N. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products / N. Serpone, D. Dondi, A. Albini // Inorganica Chimica Acta. – 2007. – Vol. 360, N 3. – P. 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
3. Bureš, F. Fundamental aspects of property tuning in push–pull molecules / F. Bureš // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4, N 102. – P. 58826–58851. <https://doi.org/10.1039/c4ra11264d>
4. Yeager, D. G. What's New in Photoprotection: A Review of New Concepts and Controversies / D. G. Yeager, H. W. Lim // Dermatologic Clinics. – 2019. – Vol. 37, N 2. – P. 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.det.2018.11.003>

5. Takshak, S. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress / S. Takshak, S. B. Agrawal // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2019. – Vol. 193. – P. 51–88. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>
6. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats / L. Nybakken [et al.] // *Oecologia*. – 2004. – Vol. 140, N 2. – P. 211–216. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1583-6>
7. UV-induction of sun-screening pigments in lichens / K. A. Solhaug [et al.] // *New Phytologist*. – 2003. – Vol. 158, N 1. – P. 91–100. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00708.x>
8. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review / M. Radice [et al.] // *Fitoterapia*. – 2016. – Vol. 114. – P. 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>
9. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens / F. Rancan [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology*. – 2002. – Vol. 68, N 2–3. – P. 133–139. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(02\)00362-7](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(02)00362-7)
10. Ranković, B. Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential / B. Ranković. – New York, 2015. – 202 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8>
11. Храменкова, О. М. Цитотоксическая активность экстрактов из четырех видов лишайников в отношении культур опухолевых клеток / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология*. – 2018. – № 2. – С. 88–98.
12. Храменкова, О. М. Фотозащитная активность экстрактов из пяти видов лишайников в отношении кератиноцитов человека (HaCAT) / О. М. Храменкова, М. В. Матвеевков // *Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология*. – 2018. – № 4. – С. 52–62.
13. Van Meerloo, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay / J. Van Meerloo, G. J. L. Kaspers, J. Cloos // *Cancer cell culture*. – Totowa, 2011. – Ch. 20. – P. 237–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
14. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species / T. Mitrović [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2011. – Vol. 12, N 8. – P. 5428–5448. <https://doi.org/10.3390/ijms12085428>

## References

1. Parker F. R. Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration: Authority and Responsibility. *FDA Administrative Enforcement Manual*. Boca Raton, 2005, ch. 1, pp. 21–60. <https://doi.org/10.1201/9781420037838-6>
2. Serpone N., Dondi D., Albini A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and sun care products. *Inorganica Chimica Acta*, 2007, vol. 360, no. 3, pp. 794–802. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2005.12.057>
3. Bureš F. Fundamental aspects of property tuning in push–pull molecules. *RSC Advances*, 2014, vol. 4, no. 102, pp. 58826–58851. <https://doi.org/10.1039/c4ra11264d>
4. Yeager D. G., Lim H. W. What's New in Photoprotection: A Review of New Concepts and Controversies. *Dermatologic Clinics*, 2019, vol. 37, no. 2, pp. 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.det.2018.11.003>
5. Takshak S., Agrawal S. B. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, vol. 193, pp. 51–88. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.02.002>
6. Nybakken L., Solhaug K. A., Bilger W., Gauslaa Y. The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats. *Oecologia*, 2004, vol. 140, no. 2, pp. 211–216. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1583-6>
7. Solhaug K. A., Gauslaa Y., Nybakken L., Bilger W. UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New Phytologist*, 2003, vol. 158, no. 1, pp. 91–100. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00708.x>
8. Radice M., Manfredini S., Ziosi P., Dissette V., Buso P., Fallacara A., Vertuani S. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia*, 2016, vol. 114, pp. 144–162. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.09.003>
9. Rancan F., Rosan S., Boehm K., Fernández E., Hidalgo M. E., Quihot W., Quihot W., Rubio C., Boehm F., Piazena H., Oltmanns U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002, vol. 68, no. 2–3, pp. 133–139. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(02\)00362-7](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(02)00362-7)
10. Ranković B. *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*. New York, 2015. 202 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8>
11. Храменкова О. М., Матвеевков М. В. Cytotoxic activity of extracts from the four lichen species against human cancer cells lines. *Zhurnal belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya = Journal of the Belarusian State University. Ecology*, 2018, no. 2, pp. 88–98 (in Russian).
12. Храменкова О. М., Матвеевков М. В. Photoprotective activity of extracts from the five lichen species against human keratinocyte (HaCAT). *Zhurnal belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekologiya = Journal of the Belarusian State University. Ecology*, 2018, no. 4, pp. 52–62 (in Russian).
13. Van Meerloo J., Kaspers G. J. L., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture*. Totowa, 2011, ch. 20, pp. 237–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
14. Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V., Tošić S., Stanković M., Radojević I., Stefanović O., Čomić L., Đačić D., Čurčić M., Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, vol. 12, no. 8, pp. 5428–5448. <https://doi.org/10.3390/ijms12085428>

**Информация об авторах**

*Матвеевков Матвей Владимирович* – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: matvey.matveenkov@mail.ru.

*Храмченкова Ольга Михайловна* – канд. биол. наук, доцент. Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины (ул. Советская, 104, 246019, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: hramchen-kova@gsu.by.

*Чешик Игорь Анатольевич* – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: igor.cheshik@gmail.com.

**Information about the authors**

*Matveyenkau Matsvei V.* – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: matvey.matveenkov@mail.ru.

*Khramchankova Volga M.* – Ph. D. (Biology), Associate Professor. Francisk Skorina Gomel State University (104, Sovetskaya Str., 246019, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: hramchenkova@gsu.by.

*Cheshik Ihar A.* – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Director. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: igor.cheshik@gmail.com.

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 616-099:616.36-002:577.152.353:612.441:616.89-008.441.13-092.9  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-76-82>Поступило в редакцию 20.01.2022  
Received 20.01.2022

**В. В. Лобанова<sup>1</sup>, член-корреспондент Ф. И. Висмонт<sup>1</sup>,  
член-корреспондент С. В. Губкин<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

### **ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ И КЛЕТОК КУПФЕРА В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И ФОРМИРОВАНИИ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ**

**Аннотация.** Современная медицина стоит перед проблемой неуклонного роста алкогольной патологии. А как известно, заболеваемость и смертность при регулярном употреблении алкогольных напитков связана с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека и, в первую очередь, печень. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении аргиназы печени и клеток Купфера в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии. Целью исследования было выяснение значимости активности аргиназы печени и клеток Купфера в процессах детоксикации и формировании тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации различной тяжести. В опытах на крысах с использованием современных физиологических, биохимических методов исследования и фармакологического подхода было установлено, что активность аргиназы печени и клеток Купфера определяют выраженность процессов детоксикации и формирование тиреоидного статуса при хронической алкогольной интоксикации. Направленность и выраженность изменений активности аргиназы и детоксикационной функции печени при хронической алкоголизации зависит от тяжести хронической алкогольной интоксикации. Под влиянием ежедневного интрагастрального введения в течение 60 дней 30 %-ного водного раствора этанола (3,5 г 92 %-ного этанола на кг массы тела) у животных угнетается активность аргиназы и детоксикационной функции печени, а введение 10 %-ного водного раствора этанола (1,0 г 92 %-ного этанола на кг массы тела) в течение двух месяцев приводит к повышению активности аргиназы печени и процессов детоксикации. Депрессия клеток Купфера  $GdCl_3$ , как и действие в организме ингибитора NO-синтазы метилового эфира  $N^G$ -нитро-L-аргинина ослабляет, а ингибитора аргиназы  $N^o$ -гидрокси-нор-L-аргинина способствует развитию характерных изменений в процессах детоксикации и уровня трийодтиронина в плазме крови при хронической алкогольной интоксикации, вызываемой интрагастральным введением этанола в дозе 3,5 г/кг в течение 60 дней.

**Ключевые слова:** хроническая этаноловая интоксикация, детоксикация, аргиназа печени, клетки Купфера, монооксид азота, тиреоидный статус

**Для цитирования.** Лобанова, В. В. Значимость активности аргиназы печени и клеток Купфера в процессах детоксикации и формировании тиреоидного статуса у крыс при хронической алкогольной интоксикации различной тяжести / В. В. Лобанова, Ф. И. Висмонт, С. В. Губкин // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 76–82. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-76-82>

**Valeria V. Lobanova<sup>1</sup>, Corresponding Member Frantishek I. Vismont<sup>1</sup>,  
Corresponding Member Sergey V. Gubkin<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

### **SIGNIFICANCE OF THE ACTIVITY OF LIVER ARGINASE AND KUPFFER CELLS IN THE DETOXIFICATION PROCESSES AND THE THYROID STATUS FORMATION IN RATS UNDER ALCOHOLIC INTOXICATION OF DIFFERENT SEVERITY**

**Abstract.** Modern medicine faces the problem of a steady growth of alcoholic pathology. As you know, morbidity and mortality with a regular consumption of alcoholic beverages is associated with the toxic effects of ethanol on the most important human organs and, first of all, on the liver. To date, a sufficient number of facts are accumulated, indicating the importance

of liver arginase and Kupffer cells in vital processes in health and disease. The aim of the study was to elucidate the significance of the activity of liver arginase and Kupffer cells in the detoxification processes and the thyroid status formation in rats with chronic ethanol intoxication of different severity. In rat experiments using modern physiological, biochemical research methods and a pharmacological approach, it was found that liver arginase and Kupffer cells participate in changes in the liver detoxification function and the thyroid status formation induced by chronic ethanol intoxication. The activity of liver arginase and Kupffer cells determines the severity of detoxification processes and the thyroid status formation in chronic alcohol intoxication. The direction and severity of changes in the arginase activity and the liver detoxification function during chronic alcoholism depends on the severity of chronic alcohol intoxication. Under the influence of daily intragastric administration for 60 days, a 30 % aqueous solution of ethanol (3.5 g 92 % ethanol per kg of body weight) in animals inhibited the activity of liver arginase and the detoxification function, but the introduction of a 10 % aqueous solution of ethanol (1.0 g 92 % ethanol per kg of body weight) within 2 months leads to an increase in the activity of liver arginase and detoxification processes. Kupffer cells depression by  $GdCl_3$  as the action in the body of the NO-synthase inhibitor methyl ester  $N^G$ -nitro-L-arginine weakens and the arginase inhibitor  $N^G$ -hydroxy-nor-L-arginine contributes to the development of characteristic changes in the processes of detoxification and triiodothyronine level in plasma during chronic alcohol intoxication caused by intragastric introduction of ethanol at a dose of 3.5 g/kg for 60 days.

**Keywords:** chronic ethanol intoxication, detoxification, liver arginase, Kupffer cells, nitrogen monoxide, thyroid status

**For citation.** Lobanova V. V., Vismont F. I., Gubkin S. V. Significance of the activity of liver arginase and Kupffer cells in the detoxification processes and the thyroid status formation in rats under alcoholic intoxication of different severity. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 76–82 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-76-82>

**Введение.** Современная медицина стоит перед проблемой неуклонного роста алкогольной патологии, приводящей к сокращению продолжительности жизни и отрицательно сказывающейся на состоянии здоровья.

Как известно, заболеваемость и смертность при регулярном потреблении алкогольных напитков связана с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека и в первую очередь, печень [1].

К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении клеток Купфера (КК) и аргиназы печени в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии [2–4]. Известно, что печень играет значимую роль в процессах детоксикации и метаболизме гормонов щитовидной железы [5; 6]. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина для NO-синтазы [7; 8], были основания полагать, что ее активность будет сказываться на синтезе монооксида азота (NO), который играет важную роль в процессах жизнедеятельности, механизмах детоксикации в частности [9]. Однако исследования с целью выяснения значимости аргиназы печени и КК в процессах детоксикации у крыс при хронической алкоголизации различной тяжести не проводились.

Цель исследования: выяснить значимость активности аргиназы печени и КК в процессах детоксикации и формировании тиреоидного статуса у крыс в условиях алкогольной интоксикации различной тяжести.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние хронической этаноловой интоксикации различной тяжести на температуру тела, процессы детоксикации и формирование тиреоидного статуса у крыс.
2. Определить уровень нитратов/нитритов в плазме крови у экспериментальных животных в условиях хронической этаноловой интоксикации различной тяжести.
3. Выяснить особенности процессов детоксикации и формирования тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации различной тяжести в условиях угнетения активности аргиназы печени.
4. Выяснить особенности процессов детоксикации и формирования тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации различной тяжести в условиях угнетения активности L-аргинин-NO системы.

**Материалы и методы исследования.** Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 180–220 г.

Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводили на животных путем интрагастрального введения этанола. Одна группа животных получала ежедневно интрагастрально

10 %-ный, а другая 30 %-ный водный раствор этанола (из расчета 1,0 г и 3,5 г 92 %-ного этанола на кг массы тела животного соответственно) в течение 60 дней. Селективную депрессию КК вызывали у животных внутрибрюшинным введением раствора гадолиния хлорида ( $GdCl_3$ ) в дозе 10 мг/кг [10]. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически [11]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов ( $NO_3^-/NO_2^-$ ) [12].

О детоксикационной функции печени, процессах детоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), степени токсичности крови (СТК) и содержанию в плазме крови «средних молекул» (СМ). ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутрибрюшинно) оценивали по времени нахождения животных в положении на боку. Определение содержания в крови СМ проводили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиным и соавт.<sup>1</sup>, СТК – способом, предложенным О. А. Радьковой и соавт.<sup>2</sup>. О тяжести повреждения печени судили по активности в плазме крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови проводили колориметрически динитрофенилгидразиновым методом [13].

С целью выяснения значимости аргиназы печени и монооксида азота (NO) в процессах детоксикации и формирования тиреоидного статуса использовали ингибитор аргиназы N<sup>o</sup>-гидрокси-нор-L-аргинин (nor-NOHA) фирмы BACHEM (Германия) и неселективный ингибитор NO-синтазы – метиловый эфир N<sup>o</sup>-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). Nor-NOHA в дозе 10,0 мг/кг вводили крысам внутрибрюшинно ежедневно в течение четырех недель. L-NAME (25,0 мг/кг) также вводили однократно крысам – внутрибрюшинно, за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 дней.

Уровень в плазме крови трийодтиронина ( $T_3$ ) и тетраiodтиронина ( $T_4$ ) определяли радиоиммунным методом с помощью тест-наборов ХОП ИБОХ НАН Республики Беларусь. Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1. Декапитацию производили через один час после последнего введения этанола (опыт) или физиологического раствора (контроль).

Все эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными. Полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной биологической статистики с помощью критерия Стьюдента. Все данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ( $\bar{X} \pm Sx$ ). Достоверность результатов учитывали при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** В опытах на крысах выявлено, что ежедневное интрагастральное введение животным 30 %-ного водного раствора этанола (3,5 г 92 %-ного этанола на кг массы тела) в течение 60 дней приводит к угнетению детоксикационной функции печени, что проявлялось повышением СТК на 57,8 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ), уровня СМ в плазме крови на 38,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ) и увеличением ПНС на 23,8 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 12$ ). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС в контрольной группе животных (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение двух месяцев,  $n = 10$ ) составили соответственно  $0,69 \pm 0,012$  г/л,  $1,3 \pm 0,11$  ед. и  $27,8 \pm 3,22$  мин. Активность аргиназы печени в этих условиях снижалась на 54,7 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и составляла  $2,5 \pm 0,27$  мкмоль мочевины/г сырой ткани·ч. Активность АлАТ и АсАТ, важнейших показателей тяжести поражения печени, в крови у алкоголизованных животных, по сравнению с соответствующим контролем, повышалась на 488,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и 196,3 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и составляла  $2,71 \pm 0,13$  и  $1,77 \pm 0,16$  мккат/л соответственно. Ректальная температура снижалась (через 60 дней от начала эксперимента) на  $1,1 \pm 0,14$  °С ( $p < 0,05$ ,  $n = 20$ ). Интрагастральное введение этанола через 60 дней алкоголизации приводило у крыс ( $n = 8$ ) к повышению в плазме крови

<sup>1</sup>Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях: а. с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50 / В. М. Моин, В. В. Николайчик, В. В. Кирковский. – № 4323421/28-14; заяв. 02.11.87; опубл. 07.11.89 // Открытия. Изобретения. – 1989. – № 41. – С. 415.

<sup>2</sup>Способ определения токсичности биологических жидкостей: а. с. 1146570 СССР, МКИ б 01 № 1/28 / О. А. Радькова, Г. А. Бояринов, И. Н. Балишина. – № 3458007/28-13; заяв. 18.06.84; опубл. 23.03.85 // Открытия. Изобретения. – 1985. – № 41. – С. 415.

уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  (конечных продуктов деградации NO) на 79,1 % ( $p < 0,01$ ), который составлял  $11,02 \pm 1,34$  мкМоль/л.

Установлено, что в результате длительного (60 дней) ежедневного интрагастрального введения раствора этанола в дозе 3,5 г/кг у животных имеет место снижение в плазме крови уровня  $T_3$  на 62,6 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ), в то время как концентрация  $T_4$  достоверно не изменялась по сравнению с контролем (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение 60 дней). Содержание  $T_3$  и  $T_4$  в плазме крови животных контрольной группы ( $n = 7$ ) составило  $3,7 \pm 0,71$  и  $73,1 \pm 11,44$  нМоль/л соответственно.

Хроническая алкоголизация животных этанолом в дозе 1,0 г/кг массы тела в течение 60 дней приводила к повышению активности аргиназы и детоксикационной функции печени и не сопровождалась достоверными изменениями температуры тела и уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови. При этом СТК понижалась на 27,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ ), уровень СМ в плазме крови на 19,7 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ ), а ПНС на 20,8 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ). Активность аргиназы печени в этих условиях повышалась на 30,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и составляла  $6,0 \pm 0,51$  мкМоль мочевины/г сырой ткани·ч. Активность АлАТ и АсАТ в крови у алкоголизированных животных, по сравнению с соответствующим контролем, достоверно не изменялась, хотя имела тенденцию к повышению.

Обнаружено, что в условиях депрессии аргиназы печени, вызванной ежедневным внутрибрюшинным введением в течение двух месяцев крысам ( $n = 10$ ) ингибитора аргиназы  $\text{N}^\omega$ -гидроксинор-L-аргинина (nor-NOHA) фирмы BACHEM (Германия) в дозе 10 мг/кг, действие этанола (в дозе 3,5 г/кг массы тела) сопровождается более значимым угнетением процессов детоксикации и более выраженным повышением уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме. У таких алкоголизированных животных в условиях угнетения аргиназы печени nor-NOHA значения основных показателей печеночной детоксикации (СМ в плазме крови, степень ее токсичности, ПНС) были выше по сравнению с контрольными (физраствор внутрибрюшинно один раз в день в течение 60 дней и этанол интрагастрально ежедневно в течение двух месяцев) на 29,3 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ), 21,6 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и 34,7 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) соответственно.

Выявлено, что действие в организме у крыс ( $n = 9$ ) ингибитора NO-синтазы метилового эфира  $\text{N}^\omega$ -нитро-L-аргинина фирмы ACROS ORGANICS (США) (ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 60 дней) в дозе 25 мг/кг ослабляет токсическое действие этанола (в дозе 3,5 г/кг массы тела) на печень. Действие этанола в указанной дозе у крыс в условиях предварительной инъекции (за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 сут) L-NAME, по сравнению с контрольной группой животных (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация), сопровождалось менее выраженными изменениями процессов детоксикации, а также менее значимым повышением уровня АлАТ, АсАТ и  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови. ПНС, уровень СМ в плазме крови и СТК у опытных крыс ( $n = 9$ ), подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы были ниже на 24,6 % ( $p < 0,05$ ), 31,8 % ( $p < 0,05$ ) и 29,2 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови у крыс, подвергшихся хронической алкоголизации, в условиях угнетения в организме животных NO-синтазы по сравнению с животными контрольной группы были ниже соответственно на 37,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ) и 48,8 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ), а содержание  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  – на 59,3 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ).

Установлено, что угнетение КК  $\text{GdCl}_3$  ослабляет развитие характерных изменений активности аргиназы, детоксикационной функции печени, а также температуры тела на действие этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела. Так, температура тела у крыс, которым предварительно, за 12 ч до интрагастрального введения этанола, внутрибрюшинно вводили 1,0 мл физраствора (1 раз в неделю в течение 60 дней) по сравнению с контрольными животными (введение физраствора интрагастрально и внутрибрюшинно) понижалась на 1,0 °С ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ), а в опыте, у животных, которым до алкоголизации предварительно внутрибрюшинно вводили  $\text{GdCl}_3$  (10 мг/кг), снижалась на 0,5 °С ( $p < 0,05$ ,  $n = 20$ ). Выявлено, что у алкоголизированных животных в условиях депрессии КК значения основных показателей печеночной детоксикации (уровень – СМ в плазме

крови, степень ее токсичности), были меньше по сравнению с контрольными (физраствор внутривнутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 дней и этанол интрагастрально ежедневно в течение 2 месяцев) на 25,2 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ ) и 28,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ ) соответственно. ПНС у крыс в этих условиях уменьшалась по сравнению контролем на 27,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n = 9$ ). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс ( $n = 7$ ) в контроле (этанол интрагастрально ежедневно и физраствор внутривнутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 дней) составило  $1,13 \pm 0,029$  г/л,  $2,8 \pm 0,32$  ед. и  $35,4 \pm 3,68$  мин соответственно. Обнаружено, что действие этанола в организме животных, получавших  $GdCl_3$ , сопровождается не только менее значительным снижением температуры тела и угнетением детоксикации, но и не столь значимым снижением уровня  $T_3$  в плазме крови. Так, концентрация  $T_3$  и  $T_4$  в плазме крови у крыс с хронической алкогольной интоксикацией (внутрибрюшинное введение физраствора один раз в неделю в течение 60 дней и интрагастральное введение 30 %-ного раствора этанола в течение 60 дней) составляла  $0,6 \pm 0,14$  нМоль/л ( $n = 8$ ) и  $50,7 \pm 5,86$  нМоль/л ( $n = 8$ ), а у животных, которым за 12 ч до введения этанола 1 раз в неделю в течение 8 недель внутривнутрибрюшинно вводился водный раствор  $GdCl_3$ , составляла  $1,2 \pm 0,13$  нМоль/л ( $n = 9$ ) и  $51,3 \pm 4,18$  нМоль/л ( $n = 9$ ).

Опыты показали, что хроническая алкогольная интоксикация у крыс ( $n = 7$ ), которым предварительно, за 12 ч до интрагастрального введения этанола, вводили один раз в неделю в течение 60 дней внутривнутрибрюшинно ингибитор КК  $GdCl_3$  (10 мг/кг), сопровождается менее значимым (на 23,2 % по отношению к контрольной группе животных, получивших физраствор внутривнутрибрюшинно один раз в день в течение 60 дней и этанол интрагастрально ежедневно в течение двух месяцев) повышением уровня  $NO_3^-/NO_2^-$  в плазме крови. Уровень  $NO_3^-/NO_2^-$  в плазме крови составлял  $8,46 \pm 0,91$  мкМоль/л.

**Заключение.** На основании результатов исследований можно заключить, что в изменениях детоксикационной функции печени и формировании тиреоидного статуса у крыс, индуцированных хронической интоксикацией этанолом, участвует аргиназа печени и клетки Купфера. Направленность и выраженность изменений уровня трийодтиронина в плазме крови, активности аргиназы и детоксикационной функции печени при хронической алкоголизации зависит от тяжести хронической алкогольной интоксикации. Под влиянием ежедневного интрагастрального введения в течение 60 дней этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела у животных снижается уровень трийодтиронина в плазме крови, угнетается активность аргиназы и детоксикационной функции печени, а введение этанола в дозе 1,0 г/кг массы тела в течение двух месяцев приводит к повышению уровня трийодтиронина в плазме крови, активности аргиназы печени и процессов детоксикации. Депрессия клеток Купфера  $GdCl_3$ , как и действие в организме блокатора NO-синтазы метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина ослабляет, а ингибитора аргиназы N<sup>o</sup>-гидрокси-нор-L-аргинина способствует развитию характерных изменений в процессах детоксикации и уровня трийодтиронина в плазме крови при хронической алкогольной интоксикации, вызываемой интрагастральным введением 30 %-ного водного раствора этанола из расчета 3,5 г 92 %-ного этанола на кг массы тела в течение 60 дней. Данные исследований дают основания полагать, что активность аргиназы печени и клеток Купфера имеет значение в патогенезе хронической алкогольной интоксикации.

### Список использованных источников

1. Буко, В. У. Метаболические последствия алкогольной интоксикации / В. У. Буко, О. Я. Лукивская, А. М. Хоха. – Минск, 2005. – 207 с.
2. Mendez, J. D. Spermene increases arginase activity in the liver after carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Long-Evans rats / J. D. Mendez, R. De Haro Hernández, V. A. Conejo // Biomed. Pharmacother. – 2006. – Vol. 60, N 2. – P. 82–85. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.09.003>
3. Висмонт, А. Ф. Роль аргиназы печени в процессах детоксикации и ее участие в механизмах регуляции температуры тела при бактериальной эндотоксинемии / А. Ф. Висмонт, Л. М. Лобанок // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2011. – Т. 55, № 2. – С. 83–87.

4. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени / Д. Н. Маянский // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1985. – Т. 29, № 4. – С. 80–86.
5. Kelly, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones / G. S. Kelly // *Altern. Med. Rev.* – 2000. – Vol. 5, N 4. – P. 306–333.
6. Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat / G. Tapiv [et al.] // *Free Radic. Res.* – 1997. – Vol. 26, N 3. – P. 267–279. <https://doi.org/10.3109/10715769709097805>
7. Hallemeesch, M. M. Reduced arginine availability and nitric oxide production / M. M. Hallemeesch, W. H. Lamers, N. E. Deutz // *Clin. Nutr.* – 2002. – Vol. 21, N 4. – P. 273–279. <https://doi.org/10.1054/clnu.2002.0571>
8. Lorzynski, G. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle / G. Lorzynski, C. V. Suschek, V. Kolb-Bachofen // *Nitric Oxide.* – 2006. – Vol. 14, N 4. – P. 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.11.009>
9. Тэйлор, Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции: обзор / Б. С. Тэйлор, Л. Х. Аларсон, Т. Р. Биллиар // *Биохимия.* – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 905–923.
10. Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats / B. Volmar [et al.] // *Shock.* – 1996. – Vol. 6, N 6. – P. 434–441. <https://doi.org/10.1097/00024382-199612000-00008>
11. Geyer, J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // *Anal. Biochem.* – 1971. – Vol. 39, N 2. – P. 412–417. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90431-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90431-3)
12. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // *Clin. Chem.* – 1995. – Vol. 41, N 6. – P. 892–896. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.6.892>
13. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – 2-е изд., перераб. и доп. – М., 2004. – 911 с.

## References

1. Buko V. U., Lukivskaya O. Ya., Chocha A. M. *Metabolic effects of alcohol intoxication*. Minsk, 2005. 208 p. (in Russian).
2. Mendez J. D., De Haro Hernández R., Conejo V. A. Spermine increases arginase activity in the liver after carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Long-Evans rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2006, vol. 60, no. 2, pp. 82–85. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.09.003>
3. Vismont A. F., Lobanok L. M. Role of liver arginase in detoxication processes and its participation in body temperature regulation during endotoxemia. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2011, vol. 55, no. 2, pp. 83–87 (in Russian).
4. Mayanskiy D. N. Kupffer cells and liver pathology. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy*, 1985, vol. 29, no. 4, pp. 80–86 (in Russian).
5. Greg Kelly N. D. Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones: A Review. *Alternativ Medical Review*, 2000, vol. 5, no. 4, pp. 306–333.
6. Tapiv G., Pepper I., Smok G., Videla L. A. Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Radical Research*, 1997, vol. 26, no. 3, pp. 267–279. <https://doi.org/10.3109/10715769709097805>
7. Hallemeesch M. M., Lamers W. H., Deutz N. E. Reduced arginine availability and nitric oxide production. *Clinical Nutrition*, 2002, vol. 21, no. 4, pp. 273–279. <https://doi.org/10.1054/clnu.2002.0571>
8. Lorzynski G., Suschek C. V., Kolb-Bachofen V. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle. *Nitric Oxide*, 2006, vol. 14, no. 4, pp. 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2005.11.009>
9. Taylor B. S., Alarcon L. H., Billiar T. R. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and functions. *Biochemistry*, 1998, vol. 63, no. 7, pp. 766–781.
10. Volmar B., Rüttinger D., Wanner G. A., Leiderer R., Menger M. D. Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock*, 1996, vol. 6, no. 6, pp. 434–441. <https://doi.org/10.1097/00024382-199612000-00008>
11. Geyer J. W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 1971, vol. 39, no. 2, pp. 412–417. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90431-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90431-3)
12. Moshage H., Kok B., Huizenga J. R., Jansen P. L. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clinical Chemistry*, 1995, vol. 41, no. 6, pp. 892–896. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.6.892>
13. Kamyshnikov V. S. *Handbook of Clinical Biochemical Research and Laboratory Diagnostics*, 2nd ed., revised and supplemented. Moscow, 2004. 911 p. (in Russian).

**Информация об авторах**

*Лобанова Валерия Валерьевна* – ассистент кафедры. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by.

*Висмонт Франтишек Иванович* – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, Минск, Республика Беларусь). E-mail: patfiz@bsmu.by.

*Губкин Сергей Владимирович* – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, директор. Институт физиологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 28, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Goubkin@yandex.ru.

**Information about the authors**

*Lobanova Valeria V.* – Assistant of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by.

*Vismont Frantisek I.* – Corresponding Member, D. Sc. (Medicine), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: patfiz@bsmu.by.

*Gubkin Sergey V.* – Corresponding Member, D. Sc. (Medicine), Professor, Director. Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus (28, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Goubkin@yandex.ru.

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

**НАУКИ О ЗЕМЛЕ**  
**EARTH SCIENCES**

UDC 622.273.18.026-027.236 (476) (045)  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-83-90>

Received 03.11.2021  
Поступило в редакцию 03.11.2021

**Academician Sergei A. Chizhik<sup>1</sup>, Michael A. Zhuravkov<sup>2</sup>, Andrey B. Petrovskiy<sup>3</sup>,  
Academician Viktor Ya. Prushak<sup>4</sup>, Dmitry A. Puzanov<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>3</sup>*JSC "Belaruskali", Soligorsk, Republic of Belarus*

<sup>4</sup>*Soligorsk Institute of Resources Saving Problems with Pilot Production, Soligorsk, Republic of Belarus*

<sup>5</sup>*Institute of Mining, Soligorsk, Republic of Belarus*

**CALCULATION OF THE EFFECTIVE MECHANICAL CHARACTERISTICS  
OF THE UNDERMINED ROCK MASS**

**Abstract.** An approach has been developed to construct functional expressions for calculating the effective mechanical characteristics of the undermined rock massif during its repeated mining, taking into account the disturbance of the different-type massif continuity and the time passed after the undermining. The approach was developed as applied to the conditions of the Starobin potash salt deposit. It is based on introducing special correction factors into the expressions for mechanical characteristics of the massif. At the same time, the state of the undermined massif area is considered in the continuum model approximation. It is shown that one of the most important factors to be considered when constructing the functional dependence for mechanical characteristics of the undermined layered massif is to take into account the mutual slippage of layers and their lamination related to it, because the strength characteristics such as bonding strength and internal friction coefficient mainly change when the massif is undermined. The algorithm for calculating the mechanical properties of the undermined massif proposes the use of correction factors that take into account the heterogeneity of the rock massif; lamination and slippage of the contacting layers; changes in the properties of the undermined massif with variation of the depth of repeated mining; changes in the properties resulting from the technological disturbance of the massif initial equilibrium state (primary undermining, time passed since the primary undermining).

**Keywords:** layered rock massif, mechanical characteristics, functional dependence, correction factors

**For citation.** Chizhik S. A., Zhuravkov M. A., Petrovskiy A. B., Prushak V. Ya., Puzanov D. A. Calculation of the effective mechanical characteristics of the undermined rock mass. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 83–90. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-83-90>

**Академик С. А. Чижик<sup>1</sup>, М. А. Журавков<sup>2</sup>, А. Б. Петровский<sup>3</sup>,  
академик В. Я. Прушак<sup>4</sup>, Д. А. Пузанов<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>*Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

<sup>3</sup>*ОАО «Беларуськалий», Солигорск, Республика Беларусь*

<sup>4</sup>*Солигорский институт проблем ресурсосбережения с Опытным производством, Солигорск, Республика Беларусь*

<sup>5</sup>*Институт горного дела, Солигорск, Республика Беларусь*

**РАСЧЕТ ЭФФЕКТИВНЫХ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК  
ПОДРАБОТАННОГО МАССИВА ГОРНЫХ ПОРОД**

**Аннотация.** Разработан подход к построению функциональных выражений для расчета эффективных механических характеристик подработанного массива горных пород при его повторной подработке с учетом нарушений сплошности массива различного характера и времени, прошедшего после подработки. В основу подхода положено

введение специальных поправочных множителей в выражения для механических характеристик массива. При этом состояние подработанной области массива рассматривается в приближении моделей сплошных сред. Показано, что одним из важнейших факторов, который требуется учитывать при построении функциональной зависимости для механических характеристик подработанного слоистого массива, является учет взаимного проскальзывания слоев и связанного с ним их отслоения, так как при подработке массива главным образом изменяются такие прочностные характеристики, как сцепление и коэффициент внутреннего трения. Алгоритм расчета механических характеристик подработанного массива предлагает использование поправочных множителей, учитывающих неоднородность массива горных пород; расслоение и проскальзывание контактирующих слоев; изменения свойств подработанного массива при изменении глубины повторной отработки, изменение свойств в результате технологического нарушения естественного равновесного состояния массива (первичная подработка, время, прошедшее со времени первичной подработки).

**Ключевые слова:** слоистый массив горных пород, механические характеристики, функциональные зависимости, поправочные множители

**Для цитирования.** Расчет эффективных механических характеристик подработанного массива горных пород / С. А. Чижик [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 83–90. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-83-90>

**Introduction.** Due to the depletion of raw material reserves in old mine fields of the Starobin deposit, it was decided to re-mine some areas, previously mined out using different technological schemes, leaving significant reserves of minerals in pillars and in the underworked sylvinitic layer. In order to assess the technological possibility, safety and economic feasibility of supplementary mining the ore from specific panels, it is necessary to carry out geomechanical modelling of the mining situation in the areas proposed for additional mining, to identify the degree of damage to the salt massif, which, in turn, is impossible without taking into account changes in the mechanical characteristics of the mined rock massif due to disturbances in the continuity of the massif of different nature and time after the mining. Some approaches to solve the problem of calculating the effective mechanical characteristics of the undermined rock massif were considered in the works of some foreign and domestic scientists, for example, [1–3]. However, a complete methodological approach to solve the problem has not been developed. Development of such an approach, taking into account the mining and geological features of the Starobin potash salt deposit, was the purpose of the proposed research.

**Results and discussion.** The most widespread approach to take into account the influence of the undermined massif on its mechanical characteristics is the introduction of special correction factors into the expressions for the mechanical characteristics of the massif [3]. Proceeding from this approach, the functional expressions for mechanical characteristics of the disturbed structurally heterogeneous massif in general case can be written in the following form:

$$Z(x) = \prod_{i=1}^k Z_i(x), \quad (1)$$

where  $Z(x)$  is any mechanical characteristics of the massif;  $Z_i(x)$  are factors describing and/or defining the properties, structure and behavior of the massif (disturbance by mining).

The areas to be re-mined are characterized by well-developed, though closed, slip lines and fracture systems. During initial mining, fracturing is evident and, in case of large deformations, the rock mass displacements along the slip lines. After termination of the mining and transfer of deformation processes from the active stage to the attenuation period, over time the slip lines and fracture surfaces are “healed”. In case of repeated mining, the continuity of the massif is firstly damaged by the already existing fracture systems and developed slip lines.

But in general, the state of the undermined massif area can be considered in the continuum model approximation after a rather long period of time following its undermining.

This fact is important when building models for an undermined rock massif. If there is no global bonds destruction between the layers after underworking, and if we examine the undermined massif after a sufficiently long time period, there are in principle no significant qualitative differences in the deformation of such a disturbed massif, examined in the continuum approach, from an “ordinary” rock massif without undermining.

Qualitative differences from the “normal” state of the massif occur when the shear resistance of the interlayer boundaries in the massif remains sufficiently small, or becomes so during re-deformation of the massif, because the layers can slip largely in relation to each other.

Therefore, the important strength characteristics for undermined massif of bedded deposit with a layered structure are bonding strength ( $C$ ) and coefficient of internal friction ( $\text{tg } \varphi$ ). These characteristics change mainly by the massif undermining.

Let us consider possible approaches for determining the values of  $\varphi$  and  $C$  in the undermined massif. We should note that as the two variables are unknown, it is necessary to know the results of at least two different experiments in order to determine them.

*First approach.* When considering the long-term strength of rock massifs, the Coulomb–More limit criterion ( $\tau_n = \text{tg } \varphi \sigma_n + C$ ) needs to be transformed taking into account temporal processes. The following expression is proposed in [4]:

$$f(\sigma_n) = \text{tg } \varphi_t \sigma_n + C_t.$$

Here  $C_t$  and  $\text{tg } \varphi_t$  accordingly are bonding strength and coefficient of internal friction under long-term loading.

In the absence of experimental data on the long-term strength, it can be assumed [4]:

$$\varphi_t = \varphi; \quad C_t = (0,12 \div 0,42)\sigma_{\text{press}} \approx 0,25\sigma_{\text{press}}. \quad (2)$$

Here  $\varphi$  and  $\sigma_{\text{press}}$  are the friction angle and the uniaxial compressive strength under short-term loading, respectively.

Therefore, in the absence of reliable experimental data, in the first approximation the values (2) can be taken as input parameters for the bonding strength and the angle of internal friction of the undermined massif.

*Second approach.* To determine the values of bonding strength  $C'$  and the angle of internal friction  $\varphi'$  in the undermined massif (taking into account the presence of a developed, at the initial undermining stage, slip line system), one can use the dependence proposed in [5]:

$$C' = \frac{\sigma_n \text{tg}(K \lg \sigma_{\text{press}} / \sigma_n)}{1 - \text{tg}(K \lg \sigma_{\text{press}} / \sigma_n) \text{tg } \varphi},$$

$$\text{tg } \varphi' = \frac{\text{tg } \varphi}{1 - \text{tg}(K \lg \sigma_{\text{press}} / \sigma_n) \text{tg } \varphi},$$

where  $\sigma_n$  is effective normal stress, MPa;  $\sigma_{\text{press}}$  is uniaxial compressive strength of rocks in the sample, MPa;  $K$  is coefficient characterizing rock contact along sliding lines (numerically equal to the average roughness slope angle);  $C$  and  $C'$  are rock bonding strength values in the sample and in the massif respectively, MPa;  $\varphi$  and  $\varphi'$  are rock internal friction angle values in the sample and in the massif respectively, degree.

*Third approach.* If the tensile strength  $\sigma_{\text{ext}}$  and compressive strength  $\sigma_{\text{press}}$  of the undermined massif are known (i. e. performed tensile and compressive experiments respectively), then the corresponding formulas can be used:

$$\sin \varphi = \frac{\sigma_{\text{press}} - \sigma_{\text{ext}}}{\sigma_{\text{press}} + \sigma_{\text{ext}}}; \quad C = \frac{\sigma_{\text{press}}(1 - \sin \varphi)}{2 \cos \varphi}. \quad (3)$$

For undermined massifs the experiments for uniaxial compression and compression with lateral pressure under the scheme when  $\sigma_1 > \sigma_2 = \sigma_3$  are important. If in this case the values of breaking stresses are  $\sigma_1 = \sigma_1^*$ ;  $\sigma_2 = \sigma_3 = \sigma_3^*$  (thus the values  $\sigma_1^*$  and  $\sigma_3^*$  are compressive), the modified conditions (3) take a form:

$$\sin \varphi = \frac{\sigma_1^* - \sigma_{\text{press}} - \sigma_3^*}{\sigma_1^* + \sigma_{\text{press}} - \sigma_3^*}; \quad C = \frac{\sigma_{\text{press}}(1 - \sin \varphi)}{2 \cos \varphi}.$$

It should be noted that other limit properties of rocks can also be derived from these ratios.

For example, the ultimate tensile strength and ultimate shear strength  $\tau = \tau_0$  are calculated using the following expressions:

$$\sigma_{\text{ext}} = \frac{\sigma_{\text{press}} - \sigma_3^*}{\sigma_1^* - \sigma_{\text{press}}}; \quad \tau_0 = \frac{\sigma_{\text{press}} \sigma_3^*}{\sigma_1^* - \sigma_{\text{press}} + \sigma_3^*}.$$

In the case of pure shear in the absence of normal stresses ( $\sigma_1 = -\sigma_3 = \tau$ ) the ultimate shear strength  $\tau = \tau_0$  is:

$$\tau_0 = C \cos \varphi \frac{\sigma_{\text{press}} - \sigma_{\text{ext}}}{\sigma_{\text{press}} + \sigma_{\text{ext}}}.$$

If the tensile strength of the interlayer boundaries is weak, the slippage between the layers can also be added to the layers lamination. In places where the load gradients on the layers are significant, bending deformation of the layers may become significant with slippage.

Thus, one of the important factors that must be taken into account when constructing the functional dependence for the mechanical characteristics of the undermined laminated massif in the continuum approximation is the consideration of mutual slippage of the layers and their associated delamination.

Let us develop expressions for the module of deformation of the undermined massif, taking into account the disturbances of different types. Mutual slip and delamination zones can be accounted for by the method proposed in [3]. If we assume that along the boundaries  $i = k_1, k_2, \dots, k_n$  of interlayer contacts in some intervals delamination with finite opening takes place, and along the boundaries  $i = p_1, p_2, \dots, p_m$  mutual slip of layers takes place. Using  $R$ -function theory [6] we develop the following equations:

$$\omega_{\text{ots}} = \sum_{j=1}^N \Lambda_{\alpha} \omega_{kj}; \quad \omega_{pr} = \sum_{j=1}^M \Lambda_{\alpha} \omega_{pj}, \quad (4)$$

where  $\Lambda_{\alpha}$  is symbol of  $R$ -conjunctions,  $\omega_i = f(x) = 0$  is the equation of the boundary area between  $i$  and  $(i + 1)$  layers in the chosen coordinate system, within which slippage or delamination takes place.

In order to take into account, the mutual slippage of layers and presence of delamination, based on (4), the next factors are introduced into expressions for mechanical properties of the massif [3]:

$$E_{\perp} = E_{\perp}^{\infty} \sin(\omega_{\text{ots}}^*), \quad E_{\parallel} = E_{\parallel}^{\infty} \sin(\omega_{pr}^*). \quad (5)$$

Here  $E_{\perp}$  and  $E_{\parallel}$  are respectively the strain module of the massif in the direction perpendicular to the bedding and along the bedding, and  $\omega^* = \omega \Lambda_{\alpha} \varepsilon$ , where, in turn,  $\alpha$  is close to one, and  $\varepsilon$  is close to the number  $\pi / 2$ . By introducing in (5) the function  $\omega^*$  we achieve such behavior of  $\sin(\omega^*)$ , when approaching to a zone disturbed in the sense defined in this context  $\sin(\omega^*) \rightarrow 0$ , and when moving away from it  $\sin(\omega^*) \rightarrow 1$ . Thus, by definition

$$\omega \Lambda_{\alpha} \varepsilon = \frac{1}{1 + \alpha} \left[ \omega + \varepsilon - \sqrt{\omega^2 + \varepsilon^2 - 2\alpha\omega\varepsilon} \right]. \quad (6)$$

With  $\alpha$  close to one, according to (6), the operation  $\omega \Lambda_{\alpha} \varepsilon$  can be approximated by the expression

$$\omega \Lambda_{\alpha} \varepsilon \xrightarrow{\alpha \rightarrow 1} \frac{1}{2} [\omega + \varepsilon - |\omega - \varepsilon|] \equiv \min(\omega, \varepsilon).$$

Now it is obvious that for an finite  $\varepsilon$  and  $\alpha$  close to 1, we have

$$\text{at } \omega \rightarrow 0 \quad \omega \Lambda_{\alpha} = \min(\omega, \varepsilon) = \omega \rightarrow 0; \quad \text{at } \omega \rightarrow W \quad \omega \Lambda_{\alpha} = \min(\omega, \varepsilon) = \varepsilon, \quad W \gg \varepsilon, \quad W, \varepsilon > 0. \quad (7)$$

Based on (7), it is not difficult to formulate a final conclusion.

Let us investigate the expression (5). Considering the boundary between the layers with a delamination with significant opening we obtain that

$$\omega_{ots}^* = 0; \sin(\omega_{ots}^*) = 0; E_{\perp} = 0,$$

and when considering the boundary between mutually slipping layers (without bonding strength)

$$\omega_{pr}^* = 0; \sin(\omega_{pr}^*) = 0; E_{\parallel} = 0,$$

These boundary areas are “special” surfaces and require individual consideration (e. g. by introducing special additional boundary conditions). In the case of moving away from “special” surfaces, the functions like (5) monotonously approach their values in the undisturbed massif; it is easy to show that the rate of functions’ increase up to the natural values depends on the disturbance degree of the massif, on the number of “special” zones, and it is such, that the change of values  $E_{\perp}$  and  $E_{\parallel}$  from zero to  $E_{\perp}^{\infty}$  and  $E_{\parallel}^{\infty}$  is realized in the  $\delta$ -neighborhood of the “special” zones. Thus, the introduction of factors of the form (5) is also justified from the physical point of view.

The most commonly used approach to determine the strain module  $E$  of the undermined massif is its representation in terms of the module of elasticity of the undisturbed massif  $E_0$ . Thus, for example, a possible expression for the strain module of the undermined massif could be as follows [7]:

$$E = E_0 / (1 + \eta), \quad (8)$$

where  $\eta$  is the coefficient of the massif disturbance.

Then, the equation describing the deformation of such a massif, derived from Hooke’s law equation, is

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} = \frac{\sigma}{E_0} (1 + \eta).$$

The module of elasticity  $E_0$  of the massif before undermining is considered to be known. The coefficient  $\eta$  is uncertain. The value of the coefficient  $\eta$  can be determined, for example, on the basis of the phenomenological approach, so that the experimental and calculated strain diagrams correspond to each other as much as possible. Such an approach requires in-situ testing, which is not always possible. Scientific and technical literature proposed various approaches for constructing the  $\eta$  coefficient.

Considered one of the possible algorithms for accounting the technological disturbance of the undermined massif by constructing a special expression for the disturbance coefficient  $\eta$ . This algorithm is based on the method proposed in [3].

It is clear that the recovery of the mechanical characteristics of the deeper areas of the disturbed massif occurs more rapidly over time than for the areas located not so deep. This effect can be accounted for by the introduction of an appropriate “depth factor”  $\eta(x_3)$ , which depends on the depth of mining operations together with the post-mining time factor.

The expression for  $\eta(x_3)$  is as follows:

$$\eta(x_3) = 1 - \exp(-\zeta x_3). \quad (9)$$

In formula (9) the variable  $x_3$  is the depth of mining and  $\zeta$  is the coefficient. As a result of processing the experimental data for the conditions of the Starobin potash salt deposit, it is obtained that the coefficient  $\zeta$  can be taken as equal to  $\zeta = (3 \div 5)10^{-4}$ .

In [3], the coefficient of disturbance of mechanical properties of the undermined massif  $\eta(t)$ , taking into account the time interval after the start of mining, was introduced. The expression for this coefficient is obtained by introducing the hypothesis that the law of change of mechanical properties of the undermined massif in time corresponds to the law of change of massif points displacements inside the subsidence trough.

For example, for the potash mines of the Starobin deposit, field studies have shown that the function  $\eta(t)$  using certain mining systems can be represented as

$$\eta(t) = 1.1285 - 0.401/(t + 0.2) + 3.365 \cdot 10^{-2} / (t + 0.2)^2, \quad t \geq 0. \quad (10)$$

In (10), the time is defined in years.

The technological heterogeneity of the massif due to the disturbance of its continuity caused by the excavation can be accounted for in the way described, for example, in [8]. In order to take into account the character of strength and deformation parameters distribution in the area of technological impact, the dependence in the form of generalized hyperbola should be used, i. e.

$$E(r) = E_0[1 - aR^n / r^n], \quad (11)$$

where  $E_0$  is the value of the elasticity module outside the area of technological impact;  $a$  and  $n$  are approximation parameters of the distribution curve of deformation characteristics within the area of technological impact;  $r$  is current coordinate;  $R$  is equivalent (reduced) radius of the working.

The parameters  $a$  and  $n$  can be determined by processing the field data or by carrying out the modelling studies. It is clear that these parameters depend on the strength characteristics of the rock strata at the mining site and the linear dimensions of the working.

Thus, the expression for the deformation module of the undermined rock mass in the influence area of the mined-out space with regard to (9), (10) and (11) can be presented in the following form:

$$E(x, t) = \langle E_0(x) \rangle [1 - aR^n / r^n] \eta(x_3) \eta(t). \quad (12)$$

Here  $\langle E_0 \rangle$  is an effective strain module of the massif, taking into account its structural features (inclusions, lamination, etc.).

Let us describe the general scheme for constructing expression (12) when there is a system of workings with different spatial configurations in a massif.

Let us consider a continuous inhomogeneous weighted half-space with effective characteristics  $\langle E_0(x) \rangle$ ,  $\langle v_0(x) \rangle$  at time  $t_0$ , taken as a starting point. At time  $t = t_1$  the excavation 1 is made in massif, whose contour geometry in the chosen coordinate system is described by the equation  $\omega_1(x) = 0$ . Let us modify the parameters  $a$  and  $n$  in dependence (11) as follows:

$$n = n_1 \omega_1^*(x); \quad a = a_1^{(1 - \omega_1^*(x))}. \quad (13)$$

Here  $\omega_1^*(x) = \omega_1(x) \Lambda_\alpha \varepsilon$  is a cutoff function of the boundary equation  $\omega_1(x) = 0$ , where in turn  $\alpha$  and  $\varepsilon$  are constant numbers sufficiently close to one. Note that  $\omega_1(x) \geq 0, \forall x$ .

A cut-off operation  $\omega_1(x)$  with the indicated values of the parameters  $\alpha$  and  $\varepsilon$  makes it possible to achieve such a behavior of the value  $(1 - \omega_1^*(x))$ , that when moving away from the region of technological influence  $(1 - \omega_1^*(x)) \rightarrow 0$ ; when approaching it  $(1 - \omega_1^*(x)) \rightarrow 1$  (the reasoning on this subject is similar to that carried out when formula (13) is received). The characteristics  $a_1$  and  $n_1$  are determined from *in situ* observations.

The function  $\eta(t)$  is also represented as

$$\eta(t) = \eta(t)^{(1 - \omega_1^*(x))}. \quad (14)$$

By introducing operations (13) and (14), we achieve automatic, monotonous and continuous checking the location of the given some point  $x$  in the technical influence area of the mining.

As a result, the expression for  $E(x, t)$  has the following structure:

$$E(x, t) = \langle E_0(x) \rangle \left[ 1 - a^{(1 - \omega_1^*(x))} (R_1 / r_1)^{n_1 \omega_1^*(x)} \right] \eta(t)^{(1 - \omega_1^*(x))}, \quad t \geq t_1,$$

where  $r_1 = \|x - x_1\|$  is the distance from the formal centre of the excavation 1  $x_1$  to the point  $x$  under consideration. If at some time  $t_2$  ( $t_2$  is in general different from  $t_1$ ) a new excavation 2 is made in the

massif, the geometry of the contour of which is described in the chosen coordinate system by the equation  $\omega_2(x) = 0$ , then the procedure of the function  $E(x, t)$  building is repeated. As a consequence, it can be written:

$$E(x, t) = \langle E_0(x) \rangle \left[ 1 - a_1^{(1-\omega_1^*)} (R_1 / r_1)^{n_1 \omega_1^*} \right] \left[ 1 - a_1^{(1-\omega_2^*)} (R_2 / r_2)^{n_1 \omega_2^*} \right] \times \\ \times \eta(t + t_2 - t_1)^{(1-\omega_1^*)} \eta(t)^{(1-\omega_1^*)}, t \geq t_2. \quad (15)$$

Here  $r_2 = \|x - x_2\|$  is the distance from the formal centre of the excavation 2  $x_2$  to the point  $x$  under consideration. Summarizing the formula (15) to the case of the  $m^{\text{th}}$  number of workings, we obtain

$$E(x, t) = \langle E_0(x) \rangle \prod_{j=1}^m \left[ 1 - a_1^{(1-\omega_j^*)} (R_j / r_j)^{n_1 \omega_j^*} \right] \eta(t + t_m - t_j)^{(1-\omega_j^*)}, t \geq t_m. \quad (16)$$

**Conclusion.** Developed an approach to the construction of functional expressions for calculating the effective mechanical characteristics of the undermined rock massif during its repeated mining, taking into account the disturbance of the massif continuity of various types and the time passed after the undermining.

The approach was developed as applied to the conditions of Starobin potash salt deposit. It is based on introduction of special correction factors into expressions for mechanical characteristics of the massif. At the same time, the state of the undermined massif area is considered in the continuum model approximation. It is shown, that one of the most important factors to be considered when constructing the functional dependence for mechanical characteristics of the undermined layered massif is to take into account mutual slippage of layers and their delamination related to it, because the strength characteristics such as bonding strength and internal friction coefficient mainly change when the massif is undermined. The algorithm for calculating the mechanical properties of the undermined massif proposes the use of correction factors that take into account the heterogeneity of the rock massif; delamination and slippage of the contacting layers; changes in the properties of the undermined massif with changes in the depth of repeated mining, changes in properties resulting from technological disturbance of the natural equilibrium state of the massif. Thus, to calculate the module of elasticity, the general functional expression (1) can be represented as

$$Z(x, t) = Z_1(x)Z_2(x)Z_3(x)Z_4(x, t),$$

where  $Z_1(x)$  is an effective module of elasticity taking into account the heterogeneity of the rock massif;  $Z_2(x)$  is based on formulas (5) and takes into account delamination and slippage of contacting layers;  $Z_3(x)$  is introduced to determine changes in the properties of the undermined massif with changes in the depth of repeated working and is determined on the basis of formulas (8), (9);  $Z_4(x, t)$  is based on formula (16) and determines the change in elastic module as a result of the technological disturbance of the natural equilibrium state of the massif (primary undermining, time passed since the primary undermining).

## References

1. Asanov V. A., Pankov I. L., Evseev A. V., Lobanov C. Yu., Lomakin I. S. Experimental and theoretical research of long term stability of load-carrying elements of the room-and-pillar system of potash beds. *Vestnik Permskogo federal'nogo issledovatel'skogo tsentra* [Bulletin of the Perm Scientific Centre], 2017, no. 1, pp. 8–14 (in Russian).
2. Baryakh A. A., Lobanov S. Yu., Lomakin I. S. Analysis of time-to-time variation of load on interchamber pillars in mines of the Upper Kama Potash Salt Deposit. *Journal of Mining Science*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 696–706. <https://doi.org/10.1134/s1062739115040064>
3. Zhuravkov M. A., Martynenko M. D. *Theoretical bases of deformation mechanics of block and bedded salt rocks*. Minsk, 1995. 254 p. (in Russian).
4. Kartashov Y. M., Matveev B. V., Mikheev G. V., Fadeev A. B. *Strength and deformability of rocks*. Moscow, 1973. 269 p. (in Russian).
5. Barton N., Choubey V. The shear strength of rock joints in theory and practice. *Rock Mechanics*, 1977, vol. 10, no. 1–2, pp. 1–54. <https://doi.org/10.1007/bf01261801>
6. Rvachev V. L. *The theory of R-functions and some of its applications*. Kiev, 1982. 552 p. (in Russian).
7. Ruppeneit K. V. *Deformability of fractured rock massifs*. Moscow, 1975. 223 p. (in Russian).
8. Baklashov I. V. *Deformation and failure of rock massifs*. Moscow, 1988. 271 p. (in Russian).

**Information about the authors**

*Chizhik Sergei A.* – Academician, D. Sc. (Engineering), Professor, First Deputy Chairman. Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chizhik\_sa@tut.by.

*Zhuravkov Michael A.* – D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Head of the Department. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). zhuravkov@bsu.by.

*Petrovskiy Andrey B.* – Deputy Chief Engineer. Belaruskali (5, Korzh Str., 223710, Soligorsk, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: belaruskali.office@kali.by.

*Prushak Viktor Ya.* – Academician, D. Sc. (Engineering), Professor, Technical Director. Soligorsk Institute of Resource Saving Problems with Pilot Production (Kozlov Str., 69, 223710, Soligorsk, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: ipr@sipr.by.

*Puzanov Dmitry A.* – Researcher. Institute of Mining (69, Kozlov Str., 223710, Soligorsk, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: sigd@list.ru.

**Информация об авторах**

*Чижик Сергей Антонович* – академик, д-р техн. наук, профессор, первый заместитель Председателя Президиума. Национальная академия наук Беларуси (пр. Независимости, 66, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chizhik\_sa@tut.by.

*Журавков Михаил Анатольевич* – д-р физ.-мат. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zhuravkov@bsu.by.

*Петровский Андрей Борисович* – заместитель главного инженера. ОАО «Беларуськалий» (ул. Коржа, 5, 223710, Солигорск, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: belaruskali.office@kali.by.

*Прушак Виктор Яковлевич* – академик, д-р техн. наук, профессор, технический директор. Солигорский институт проблем ресурсосбережения с Опытным производством (ул. Козлова, 69, 223710, Солигорск, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: ipr@sipr.by.

*Пузанов Дмитрий Александрович* – научный сотрудник. Институт горного дела (ул. Козлова, 69, 223710, Солигорск, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: sigd@list.ru.

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

УДК 616.006:[004.67+004.93]  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-91-103>

Поступило в редакцию 09.12.2021  
Received 09.12.2021

С. Л. Романов<sup>1</sup>, А. Н. Червань<sup>2</sup>, Е. М. Коробова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Унитарное предприятие «Геоинформационные системы» Национальной академии наук Беларуси,  
Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Институт геохимии и аналитической химии им В. И. Вернадского Российской академии наук,  
Москва, Российская Федерация

## ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ГОМЕЛЬСКОЙ И МОГИЛЕВСКОЙ ОБЛАСТЕЙ БЕЛАРУСИ

(Представлено академиком В. Ф. Логиновым)

**Аннотация.** Рассматриваются результаты картографического анализа материалов белорусского канцер-регистра и исследуется картина наблюдаемой эпидемиологической обстановки применительно к онкологической заболеваемости (ОЗ) разных локализаций, свойственной разным половозрастным группам сельского населения. В ходе работ были впервые построены карты, характеризующие специфику пространственной неоднородности распространения ОЗ на территории Гомельской и Могилевской областей Беларуси. В результате были выявлены аномальные зоны, представляющие собой группы компактно расположенных населенных пунктов, для которых уровень ОЗ (в том числе и ОЗ разных локализаций, наблюдаемых как у мужчин, так и у женщин) различается в 4 и более раза. Наблюдаемые различия риска возникновения ОЗ были оценены как статистически значимые и на этом основании сделано заключение о том, что выявленные аномальные зоны, во всяком случае на территории Беларуси, отличаются не только высокой пространственной контрастностью, но и закономерной пространственной организацией, что подтверждает гипотезу о наличии связи риска возникновения ОЗ с параметрами внешней среды и, в свою очередь, позволяет сделать обоснованное заключение об эндемической природе рака как спровоцированного «человеческого» заболевания. Предлагается гипотеза, что обнаруженные зоны как положительной, так и отрицательной аномальности должны обладать существенными эколого-геохимическими различиями и делается заключение о необходимости признания их объектами первоочередного контроля, поскольку население, проживающее в зонах повышенного риска, несомненно нуждается в первоочередном обследовании и профилактике.

**Ключевые слова:** онкологические заболевания, риск, пространственная неоднородность, ГИС-технология, картографическая оценка, профилактика

**Для цитирования.** Романов, С. Л. Особенности пространственного распространения онкологических заболеваний на территории Гомельской и Могилевской областей Беларуси / С. Л. Романов, А. Н. Червань, Е. М. Коробова // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 91–103. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-91-103>

Sergey L. Romanov<sup>1</sup>, Aliaksandr N. Chervan<sup>2</sup>, Elena M. Korobova<sup>3</sup>

<sup>1</sup>“Geoinformation systems” of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation

## SPATIAL FEATURES OF THE RISK OF ONCOLOGICAL DISEASES IN THE TERRITORY OF THE GOMEL AND MOGILEV REGIONS OF BELARUS

(Communicated by Academician Vladimir F. Loginov)

**Abstract.** The article presents the results of the cartographic analysis of the Belarusian Cancer Registry data, including the spatial features of morbidity due to cancer in different sex and age groups of the rural population. The maps, characterizing the features of the spatial heterogeneity of the oncological diseases (OD) in the Gomel and Mogilev regions of Belarus, were built for the first time. The performed mapping revealed the anomalous zones, representing the groups of compactly located rural settlements, for which the OD level (including OD of different localizations observed in both men and women) differs by a factor of 4 or more. The assessed differences in the OD risk are statistically significant. On this basis, we infer that

the anomalous zones in the territory of Belarus, in any case, demonstrate both a high spatial contrast of OD manifestation and regular spatial organization. These confirm the hypothesis about a relationship between the OD risk and the environmental parameters and, in turn, allow a reasonable conclusion about the endemic nature of cancer as a provoked “human disease”. We consider that the detected zones of positive and negative anomalies must have significant ecological and geochemical differences. Therefore, they should be recognized as the objects of priority control since the population living in the high-risk areas undoubtedly needs priority screening and applying the corresponding preventive measures.

**Keywords:** cancer, risk, spatial heterogeneity, GIS technology, cartographic assessment, prophylaxy

**For citation.** Romanov S. L., Chervan A. N., Korobova E. M. Spatial features of the risk of oncological diseases in the territory of the Gomel and Mogilev regions of Belarus. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 91–103 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-91-103>

**Введение.** На сегодняшний день онкологические заболевания (ОЗ) являются второй после заболеваний сердечно-сосудистой системы причиной смертности в мире, при этом число заболевших продолжает повсеместно и неуклонно расти. Так, по данным ВОЗ, в 2020 г. в мире было выявлено 19,3 млн больных и зафиксировано 10 млн летальных исходов. Характерно, что ОЗ прогрессируют главным образом в странах с высоким уровнем дохода, где от проблем с сердцем умирает около 20 % населения, в то время как от рака – более 50 % [1].

Проблема минимизации уровня ОЗ имеет длительную историю и постоянно находится в центре внимания медицинских специалистов всего мира не только из-за ее социальной значимости, но и вследствие того, что, несмотря на все предпринимаемые усилия, кардинально решить проблему не удастся. Значительные успехи достигнуты в области лечения, но не профилактики подавляющего большинства известных видов ОЗ, где основным препятствием является отсутствие значимого продвижения в области выявления причин, вызывающих эти заболевания и, соответственно, отсутствие точной информации об этиопатогенетических факторах, достоверно ответственных за возникновение и частоту встречаемости злокачественных новообразований среди отдельных контингентов населения. Однако отсутствие успехов не означает отсутствия объективных предпосылок к решению проблемы, важнейшей из которых является, с одной стороны, «человеческая природа» заболевания, а, с другой – пространственная неоднородность ее встречаемости, отмечаемая для практически всех существующих форм ОЗ.

Феномен пространственной неоднородности в распространении ОЗ был обнаружен достаточно давно (Hutt, 1975; Besancenot, 1975 и др.). Современные данные, например, сведения GCO (Global Cancer Observatory) показывают, что по состоянию на 2019 год уровень общей заболеваемости в Австралии был в 5,3 раза выше, чем в Индии или Саудовской Аравии, а на территории бывшего СССР заболеваемость в Латвии в 3,5 раза превосходила аналогичный показатель для Таджикистана. Сходная неоднородность имеет место и на территории современной Российской Федерации, для которой частота выявления случаев ОЗ в Дагестане и Ямало-Ненецком АО в 4–5 раз ниже, чем, например, в Архангельской или Ивановской областях. Не составляет исключения и территория США, где применительно к отдельным административным округам общая частота встречаемости ОЗ различается в 6 и более раз.

Характерно, что аналогичная пространственная неоднородность существует и применительно к ОЗ разных локализаций. Например, на территории Российской Федерации рак щитовидной железы (РЩЖ) в Краснодарском крае или на Алтае встречается в 3 раза реже, чем в Калмыкии или в Башкортостане, а в США даже отдельные штаты различаются по величине этого показателя в 1,7 раза [2]. При этом следует отметить, что во всех этих случаях речь идет исключительно о крупных территориальных выделах, представляющих собой произвольно выделенные административные единицы, что связано, в первую очередь, с принятыми в медицине нормативами статистической отчетности.

**Теоретический подход.** Подобное перечисление, которое можно продолжать применительно ко всем крупным территориям, свидетельствует о том, что наблюдаемая пространственная неоднородность представляет собой бесспорный факт, который должен иметь объяснение в виде причины или комплекса причин, провоцирующих как рост, так и снижение величины данного показателя. Решение данной проблемы представляется чрезвычайно важным, поскольку оно может решающим образом способствовать выяснению факторов, так или иначе определяющих уровень риска возникновения ОЗ, по крайней мере наиболее значимых локализаций.

Существуют две гипотезы, в соответствии с которыми такого рода неоднородность может существовать в принципе. Это:

1. Наличие качественно разнородных групп оседло проживающего населения, которое, в силу генетически закреплённой специфики, обладает разной восприимчивостью к воздействию определенного набора канцерогенных факторов. (Причина внутренняя – *эндогенная*.)

2. Наличие специфических природно-территориальных особенностей, способных провоцировать возникновение ОЗ у всех категорий проживающего населения. (Причина внешняя – *экзогенная*.)

Обе гипотезы не являются целиком взаимоисключающими, хотя бы потому, что сопоставляемые расово-этнические группы часто проживают на территориях, имеющих собственную экологическую специфику, а также потому, что наблюдаемая в настоящее время в мире весьма интенсивная миграция представителей самых различных групп населения способна осложнять (не меняя коренным образом!) традиционно сложившуюся эпидемиологическую обстановку.

Приведенные аргументы показывают, что вторая гипотеза является приоритетной, тогда как гипотеза о разном уровне восприимчивости всего компактно проживающего населения непосредственно опровергается не только сведениями медицинской статистики, которая до сих пор не располагает достоверными данными о наличии значимой положительной связи между хотя бы расовой принадлежностью и общей частотой встречаемости ОЗ, но и наличием значительного числа опровергающих примеров, которые, с одной стороны, показывают наличие крупных различий уровня встречаемости ОЗ на территориях с этнически однородным составом населения, а с другой – наличие как одинаково высокого, так и одинаково низкого уровня заболеваемости в регионах с предельно смешанным расово-этническим составом населения [3]. Убедительным примером здесь выступает территория США, где пространственные различия наблюдаемых уровней заболеваемости отмечаются в условиях предельно неоднородного состава населения.

В силу приведенных аргументов, а также, следуя закону формальной логики, в соответствии с которым третьего не дано, наиболее перспективной следует признать гипотезу о том, что указанная пространственная неоднородность является следствием постоянного воздействия одной или нескольких внешних причин на условно однородную выборку оседло проживающего населения. Отсюда следует, что если проверяемая гипотеза будет убедительно доказана, это будет означать наличие безусловной связи между экологическими особенностями (свойствами) территориальных выделов и уровнем ОЗ, наблюдаемым в пределах данной территории, что само по себе несомненно станет важнейшим шагом по направлению к решению проблемы выявления провоцирующих причин, а соответственно, и поиску путей минимизации существующего уровня ОЗ.

**Методы картирования уровня заболеваемости.** Особенностью современного состояния изученности решаемой проблемы является тот факт, что практически все работы, связанные с картографическим представлением наблюдаемой или наблюдавшейся заболеваемости носят констатирующий характер, т. е. результат сводится к фиксации на карте определенных различий, наблюдаемых применительно к сопоставляемым объектам. Кроме того, картированию всегда подвергались исключительно те регионы, для которых имелась репрезентативная статистическая база, из-за чего при анализе редких явлений территориальным объектом изучения постоянно выступал достаточно крупный элемент административно-хозяйственного деления: город, район, область или целая страна. При этом случаи, когда в качестве провоцирующего фактора рассматривались качественные особенности территорий единичны.

Относительное исключение составляют зоны техногенного загрязнения, применительно к которым получено значительное количество данных, подтверждающих не столько пространственную приуроченность уровня ОЗ определенных локализаций к той или иной территории, сколько связь наблюдаемого числа заболевших с интенсивностью воздействия и спецификой миграции того или иного канцерогена.

На сегодняшний день в литературе описан ряд значительно различающихся гипотез о вирусной, канцерогенной, наследственно-генетической и прочей природе рака, однако фундаментальных исследований в области анализа связи ОЗ с состоянием окружающей среды, а тем более ре-

зультатов, позволяющих однозначно подтвердить или опровергнуть выше предложенную гипотезу, не существует. На сегодняшний день удалось выявить безусловную связь рака легкого с числом курящего населения [3], рака кожи с интенсивностью ультрафиолетового излучения [4], а также подтвердить связь уровня РЦЖ с интенсивностью так называемого йодного удара [5], последовавшего в результате выпадения радиоактивного  $^{131}\text{I}$  в зоне аварии на ЧАЭС 1986 г. [6].

В этих условиях первым шагом проверки предлагаемой гипотезы должно было стать решение задачи детального картирования пространственной неоднородности ОЗ разных локализаций, для чего предварительно требовалось решить более общую задачу картографического представления территорий (пространственных выделов), достоверно различающихся по уровню наблюдаемой заболеваемости любой природы и применительно к любой категории заболевших.

**Материалы.** Значительным шагом в направлении решения названной проблемы явилось проведение работ, связанных с созданием синтетических карт риска возникновения РЦЖ, связанного с последствиями радиационного воздействия, имевшего место на трансграничных территориях России и Беларуси в результате катастрофы на ЧАЭС 1986 г. [5]. Поскольку предварительные исследования показали наличие прямой связи уровня заболеваемости РЦЖ не только с мощностью «йодного удара», последовавшего в результате накопления щитовидной железой значительных количеств радиоизотопа  $^{131}\text{I}$ , но и величиной наблюдаемого природного йододефицита [7], процедура построения синтетической карты риска, обусловленного сочетанным воздействием обоих названных факторов, была сведена к положительному оверлейному наложению двух картографических поверхностей. Несмотря на то что данная работа потребовала проведения большого комплекса предварительных мероприятий, связанных с векторизацией и цифровым представлением как карт радиационного воздействия, так и почвенных карт Беларуси, на основе которых затем была создана карта природной обеспеченности йодом, она была успешно завершена и на цифровую карту обеспеченности почвы стабильным йодом был наложен слой, количественно характеризующий интенсивность «йодного удара». После этого для каждого из контуров, образованных в результате взаимного пересечения названных цифровых слоев, была определена комплексная индексная характеристика, отражающая специфику его общего экологического состояния применительно к обоим воздействующим параметрам и, в соответствии с параллельно создаваемой легендой, было осуществлено последовательное объединение контуров, соответствующих каждому из балльных уровней (суммарного) сочетанного риска.

Анализ полученных результатов показал не только наличие положительной связи полученных уровней риска с наблюдаемой заболеваемостью [8; 9], но и продемонстрировал универсальный характер созданного методического подхода, с помощью которого можно было анализировать риск возникновения практически любого эндемического заболевания, обусловленного любым комплексом природных или социально-техногенных причин, имеющих пространственное распространение.

Поскольку полученные таким образом карты риска нуждались в последующей верификации, для этого требовалось сопоставление полученного уровня риска с реально наблюдаемым уровнем заболеваемости, что так же требовало построения соответствующих карт.

В данном случае верификация выполнялась на базе материалов белорусского канцер-регистра, для которого на протяжении 1978–2019 гг. были точно зафиксированы данные по 17 видам ОЗ, полученные с учетом пола, возраста и мест проживания всех заболевших на территории Могилевской и Гомельской областей Беларуси.

И хотя данная работа также потребовала проведения значительных усилий, связанных с координатной привязкой каждого из указанных в регистре населенных пунктов (НП), уточнения параметров переименования, ведомственного переподчинения и создания полного списка НП, существующих и существовавших на протяжении всего исследуемого периода, она была успешно завершена, что позволило уже на первом этапе получить важные результаты, достоверно характеризующие специфику пространственного распределения ОЗ на территории всей юго-восточной Беларуси.

**Подходы к решению.** Естественно, что корректное построение карты, характеризующей наблюдаемый уровень ОЗ, требовало соблюдения ряда непреложных условий, начиная от оценки

уровня статистической достаточности используемой выборки и заканчивая внесением коррективных поправок для точной характеристики возрастных и демографических особенностей каждого рассматриваемого НП. Поскольку использованный способ представления предполагал переход от точечного (одномерного) представления информации к изолинейно-двумерному, это делало заведомо невозможным использование абсолютных показателей заболеваемости, для чего выборку требовалось дополнить информацией не только об актуальном количестве проживающих в каждом НП мужчин и женщин, но и о количестве населения, актуально присутствовавшего в нем на протяжении последних 43 лет.

Поскольку сложившаяся эпидемиологическая ситуация в данном случае рассматривалась в рамках гипотезы о наличии внешних факторов, провоцирующих или значимо влияющих на конфигурацию зон с разным уровнем ОЗ, на первоначальном этапе было принято решение об анализе выборки исключительно сельского населения, как наиболее тесно связанного со средой обитания путем регулярного потребления местных продуктов питания, воды и дозы внутреннего и внешнего облучения.

Исходя из всех названных выше условий, средствами специально созданного программного обеспечения была сформирована выборка, содержащая исключительно информацию по НП, для которых общее количество проживавших должно было соответствовать уровню статистической достаточности, т. е. если средний по Беларуси уровень ОЗ населения составляет 3,5 %, то для того чтобы вычисленная для каждого НП величина относительного показателя заболеваемости заведомо не определялась числом проживавших, среднестатистическое число заболевших (математическое ожидание) должно было превышать 7 человек, откуда следует, что статистически достаточную выборку должны составлять исключительно НП с числом проживавших большим, чем 200. Но поскольку общее число ОЗ, зафиксированных в каждом сельском НП, было дифференцировано в соответствии с единым критерием различия, сформированного с учетом пола, возраста и локализации, в качестве статистического критерия было выбрано большее значение, соответствующее 250 проживающим, что в соответствии с правилами расчета статистической репрезентативности должно обеспечивать мощность критерия на уровне 99 % доверительной вероятности [10].

Одновременно, для устранения влияния плотности проживающего населения на конфигурацию создаваемых картографических поверхностей и в соответствии с общепринятыми методическими требованиями, уровень заболеваемости в каждом отобранном НП был нормирован по числу заболевших на 100 000 чел., а количество выделяемых интерполированных поверхностей было принято равным десяти с автоматическим определением границ методом квантиля.

Полученная таким образом выборка анализируемых случаев ОЗ представлена в таблице.

#### Анализируемые случаи онкологических заболеваний

##### Analyzed cases of oncological diseases

Территория Territory	Всего больных Total sick	Всего НП Total settlements	Сельские НП с населением более 250 Rural settlements with a population of over 250	Больных в сельских НП с населением более 250 Patients in rural areas with a population of more than 250
Могилевская область	129 352	2 284	973	41 035
Гомельская область	123 757	2 990	281	17 511

Представленные данные наглядно демонстрируют высокую статистическую обеспеченность анализируемой выборки, на базе которой картина пространственного распределения наблюдаемого уровня заболеваемости может быть воспроизведена с предельной детальностью, что в свою очередь позволяет провести и точный анализ выявленных структурных закономерностей.

**Создание методики и построение карт заболеваемости.** Непосредственная процедура картирования была осуществлена средствами специализированного картографического пакета ArcGIS 10.7, а картографический анализ наблюдаемых уровней ОЗ сопровождался поиском геостатистических пространственных закономерностей, который также осуществлялся в полуавтоматическом режиме как средствами специально созданного программного обеспечения, так и средствами специализированных ГИС.

Работы выполнялись поэтапно. На первом этапе в векторном формате было осуществлено создание точной цифровой топоосновы, представляющей собой единую картографическую поверхность, покрывающую всю территорию как Гомельской, так и Могилевской области Беларуси в масштабе 1 : 500 000. Указанный слой помимо административных границ содержал контуры всех существующих НП с атрибутивными данными не только об актуальном и ретроспективном числе жителей, но также необходимые характеристики числа зарегистрированных в них случаев заболевания, административной подчиненности, статусе и т. п.

На втором этапе была осуществлена необходимая статистическая обработка и систематизация имеющихся массивов информации, в ходе которых был осуществлен нормированный на 100 000 пересчет относительного уровня заболеваемости. При этом нормирование осуществлялось для каждой из 17 групп онкозаболеваний и принятых половозрастных групп.

Непосредственная процедура формирования изолинейных поверхностей осуществлялась методом обратно взвешенных расстояний в пределах локализованного поля нормированной частоты случаев ОЗ, а построение легенды предполагало наличие 10 классов, выделенных в каждом слое методом квантиля. При этом экспорт классифицированных классов и пространственное позиционирование отдельных НП осуществлялись с заведомо достаточной (30 м) точностью и в соответствии с действующим списком кодов СОАТО.

**Результаты и их обсуждение.** Рассмотрение каждого из относительно равномерно распределенных по территории НП, для которых был осуществлен расчет актуального уровня ОЗ, позволило с высокой точностью интерполировать и представить их совокупность в виде сплошной картографической поверхности, для которой каждое измерение представляло собой уже элемент трехмерного поля, обладающего определенной протяженностью и структурой. Полученный результат, отображенный на рис. 1, характеризует пространственную специфику общей онкологии-

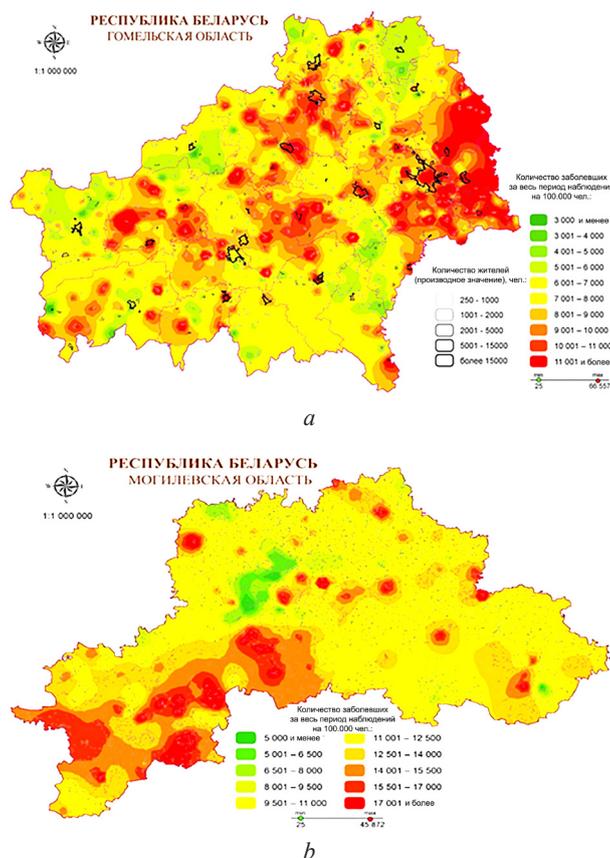


Рис. 1. Пространственная структура общей онкологической заболеваемости сельского населения Гомельской (а) и Могилевской (б) областей

Fig. 1. Spatial structure of the general cancer incidence of the rural population of the Gomel (a) and Mogilev (b) region

ческой заболеваемости населения Гомельской и Могилевской областей Беларуси. Анализ этих, впервые полученных, изображений позволяет сделать ряд чрезвычайно важных и далеко идущих выводов:

1. Уровень онкологической заболеваемости на территории обеих областей предельно неоднороден и способен изменяться в два и более раза, причем как в меньшую, так и в большую сторону, образуя таким образом специфическую структуру аномальных зон значительной площади.

2. Как положительные, так и отрицательные аномалии, характеризующиеся различным уровнем заболеваемости, на территории обеих областей представляют собой пространственные выделы моноцентрической структуры, включающие в подавляющем большинстве случаев группы компактно расположенных НП.

3. Пространственная конфигурация наблюдаемых зон аномальной заболеваемости не имеет выраженной связи с конфигурацией границ административных образований (районов), что косвенно свидетельствует о качественной однородности анализируемой статистической выборки.

Для того чтобы проверить гипотезу о пространственной приуроченности аномальных зон к определенным участкам территории, для обеих областей были построены карты общей заболеваемости отдельно для мужского и женского населения сельских НП. Полученный результат приведен на рис. 2.

Анализ полученных результатов и в данном случае позволил сделать ряд важных выводов:

1. Несмотря на наличие значительного числа не только физиологических, но также поведенческих и социально-психологических различий, что находит отражение в медицинской статистике (женщины болеют реже и имеют отличную от мужской структуру заболеваемости), выявленная конфигурация зон максимального и минимального риска оказалась практически идентичной для обеих групп населения.

2. Для территории обеих областей наблюдается однотипно закономерная упорядоченность зон рисков, фиксируемая как для положительных, так и для отрицательных аномалий.

3. Тот факт, что ряд выявленных пространственных аномалий расположен одновременно в разных областях и районах убедительно указывает на то, что выявленные различия не являются следствием разных подходов к диагностике, учету и представлению информации, которые могли иметь место на территориях с разной административной подчиненностью.

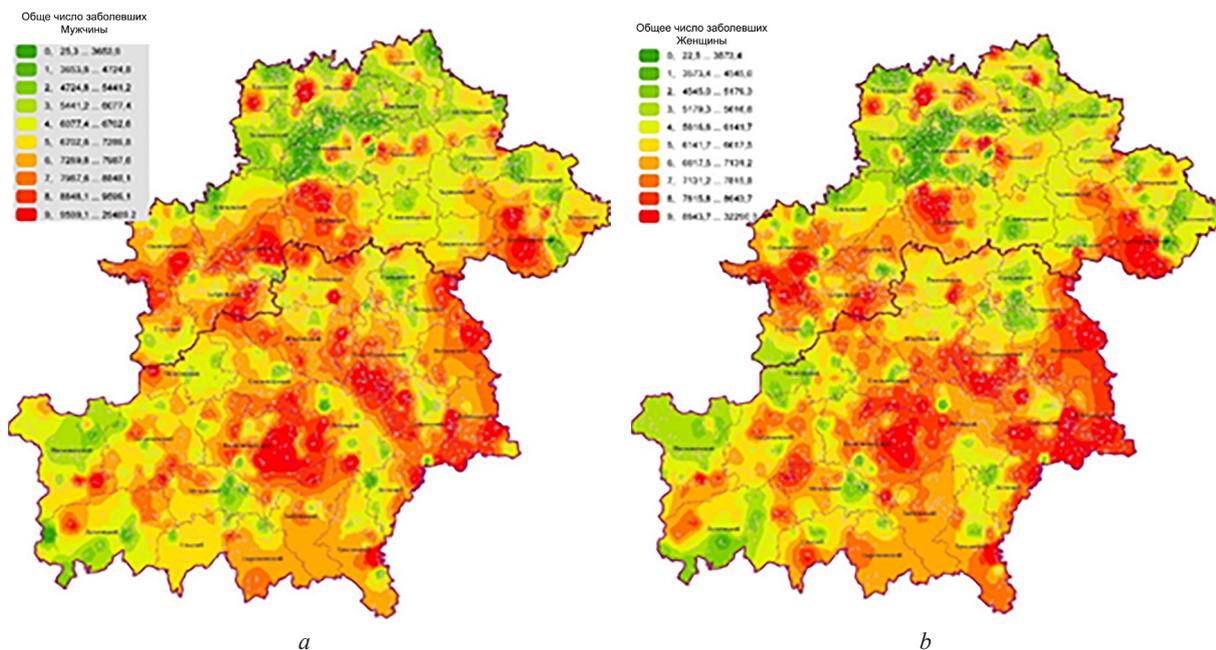


Рис. 2. Пространственная структура общей онкологической заболеваемости мужского (а) и женского (б) сельского населения Гомельской и Могилевской областей

Fig. 2. Spatial structure of the overall cancer incidence of male (a) and female (b) rural population of Gomel and Mogilev regions

4. Наличие определенных физико-географических различий между исследуемыми областями дает все основания полагать, что подобного рода неоднородность должна иметь место и на всей остальной территории Беларуси.

Полученный результат не только однозначно указывает на то, что территория Беларуси значительно различается в отношении риска возникновения ОЗ, чем не только убедительно подтверждает первоначально выдвинутую гипотезу о наличии комплекса внешних причин, способствующих значительному снижению или увеличению уровня общей заболеваемости, но и позволяет сделать более общее заключение об эндемической (экологически спровоцированной) природе во всяком случае большей части существующих ОЗ.

Для дополнительной проверки этой гипотезы на базе ранее полученной выборки сельского населения были построены карты заболеваемости, относящиеся уже к ОЗ определенных локализаций. Полученный результат представлен на рис. 3.

Как и в предыдущих случаях, проведенный анализ пространственной структуры полученных изображений позволил сделать однозначные заключения о том, что:

1. Исследуемая территория предельно неоднородна в отношении уровней риска возникновения ОЗ даже принципиально разных локализаций.

2. Взаимное расположение (пространственная структура взаимного размещения аномалий как максимального, так и минимального риска) практически одинакова для ОЗ обеих сопоставляемых локализаций, что опять же подтверждает первоначально выдвинутую гипотезу об экологической неоднородности исследуемой территории, что может являться главной причиной наблюдаемой дифференциации.

3. Пространственная структура зон риска для ОЗ обеих рассматриваемых локализаций не является оригинальной, но в целом повторяет конфигурацию зон риска, выявленных для выборки общей заболеваемости как женщин, так и мужчин.

4. На сопоставляемых картах имеет место очень незначительное количество исключений (несоответствий), при которых территориям с минимальным уровнем риска, например, для органов дыхания, соответствует зона максимального риска по органам пищеварения, что не отменяет общего правила, но представляет собой предмет особого интереса.

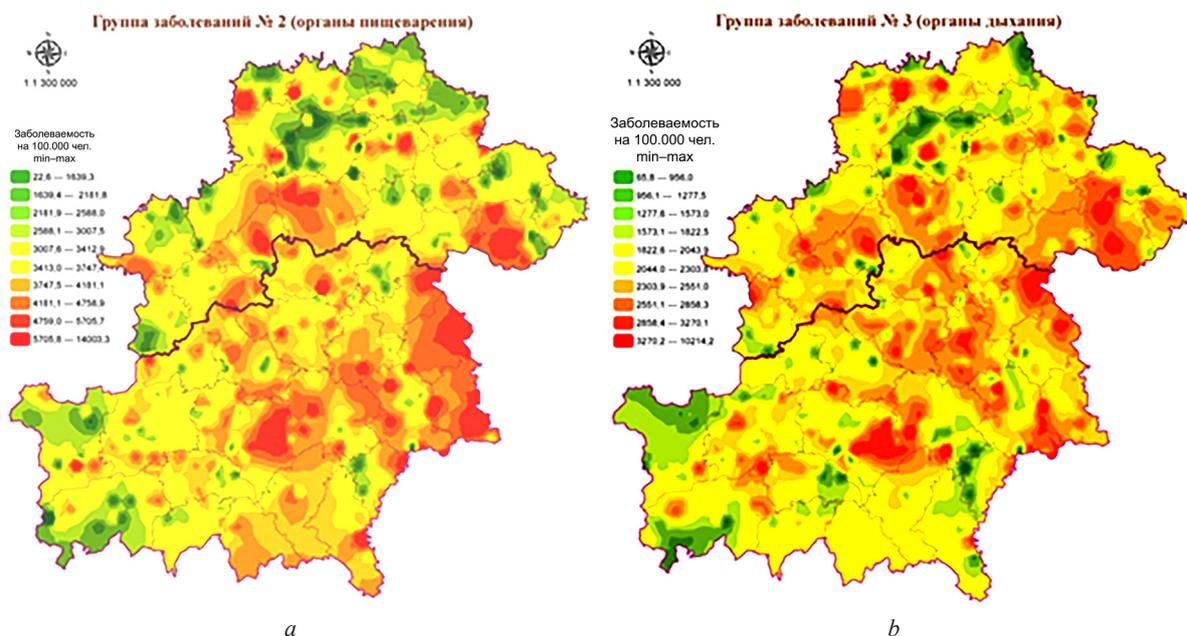


Рис. 3. Пространственная структура онкологической заболеваемости органов пищеварения (а) и органов дыхания (б) для сельского (мужского и женского) населения Гомельской и Могилевской областей

Fig. 3. Spatial structure of cancer incidence of the digestive system (a) and respiratory system (b) for the rural (male and female) population of the Gomel and Mogilev regions

Следует добавить, что определенное различие в конфигурации (не в местоположении!) как положительных, так и отрицательных зон риска объясняется специфическим набором градаций (десятичный квантиль), что упрощает сопоставление и позволяет стандартизировать легенды, однако, даже при небольшой разнице гистограммных параметров способно создавать весьма заметные различия в конфигурации изолиний.

В ходе дальнейшей работы по изучению пространственной структуры наблюдаемых уровней онкозаболеваемости были проанализированы ОЗ других локализаций (губы, глотки, молочной железы, мужских половых органов и др.), но поскольку частота встречаемости ОЗ разных локализаций резко различна, данный тип картирования требовал и изменения статистических параметров используемой выборки, поскольку в противном случае применительно к редким формам ОЗ, с одной стороны, могли возникать искажения, вызванные неравномерной плотностью проживающего населения, а, с другой стороны, резкое изменение количества рассматриваемых НП могло вызвать и значительное изменение параметров структуры, полученной по отношению к поверхностям, построенным на основе большего количества точек контроля.

В целом полученные результаты свидетельствуют о следующем:

1. Имеет место резкая пространственная дифференциация зон риска, свойственная практически всем проанализированным локализациям ОЗ.

2. Общая структура (взаимная конфигурация местоположений, зафиксированных для зон минимального и максимального риска) в целом аналогична для всех полученных карт, однако применительно к разным формам ОЗ такого рода пространственная корреляция проявляется в разной мере.

3. Несмотря на разную частоту встречаемости, на всех картах, как правило, наблюдается значительное сходство конфигурации структуры, зафиксированной для локализаций ОЗ мужского и женского населения, хотя сравнительный анализ показал, что применительно, например, к структуре распространения рака молочной железы и мужских половых органов эта связь выражена значительно хуже.

Еще одним весьма сложным аспектом работы явилась проверка качественных параметров используемых выборок, для чего было написано специальное программное обеспечение, позволяющее сопоставлять полученные списки актуально существующих, ликвидированных, переименованных, а также сменивших ведомственную принадлежность НП со списком НП, указанных в актуальном канцер-регистре. Смысл осуществляемой проверки состоял в последовательном установлении соответствия индивидуальных кодов СОАТО, присутствующих в сопоставляемых массивах. Полученный результат позволил не только выявить и скорректировать группу отселенных и ликвидированных НП, но и обнаружить значительное количество реально существующих НП, применительно к которым за всю историю наблюдений ни разу не было выявлено (записано в регистр) ни одного случая какого-либо ОЗ. Поскольку данный факт объективно мог явиться следствием относительной малочисленности населения в данных НП (0 становится статистически значимым параметром при количестве проживавших больше, чем 90 человек). Параметры выборки были соответствующим образом изменены, а результат, полученный применительно к статистически достаточному количеству заболевших мужчин и женщин, представлял собой списки НП, в которых случаи ОЗ либо вообще не были зафиксированы на протяжении всего срока контроля, либо число заболевших не превышало 2 человека на 250 проживающих в НП. Общее количество таких НП составило 39 для женского и 35 для мужского населения, при этом 22 НП из них оказались общими.

Анализ полученных изображений позволил сделать следующие выводы:

1. Общее количество НП с минимальным и нулевым количеством заболевших как мужчин, так и женщин значительно различается как в плане областей, так и в плане отдельных административных районов, что, несомненно, должно стать предметом детального изучения.

2. Практически все выделенные НП в подавляющем большинстве случаев не равномерно распределены по территории, а представляют собой компактные группировки, размер которых соответствует размерности выделенных пространственных аномалий.

3. НП с нулевым уровнем ОЗ повсеместно входят в состав группировок с минимальным числом заболевших, в связи с чем факт наличия больных, принимая во внимание численность анализируемого населения (больше 250 чел.), может рассматриваться как следствие постоянной миграции населения.

Несмотря на то что выявление причин обнаруженной пространственной неоднородности не являлось непосредственной целью данной работы, вопрос о наличии связи между наблюдаемым уровнем заболеваемости и таким очевидным фактором воздействия, как присутствующее на территории обеих областей радиационное загрязнение, несомненно, представлял первоочередной интерес. А поскольку имеющиеся программные средства позволяли анализировать не только пространственные, но и временные параметры ОЗ, была построена карта, характеризующая уровень общей заболеваемости мужского и женского сельского населения, зафиксированный по состоянию на январь 1986 г. Результат приведен на рис. 4.

Анализ полученных изображений показывает:

1. Радиационное загрязнение не является непосредственной (единственной) причиной наблюдаемой неоднородности риска возникновения ОЗ, поскольку и до аварии на ЧАЭС 1986 г. территории как Гомельской, так и Могилевской областей уже были в значительной мере пространственно дифференцированы по этому параметру.

2. Пространственная структура риска общей заболеваемости сельского населения, зафиксированная на уровне 1986 г., имеет значительные отличия от аналогичной структуры, выявленной по состоянию на январь 2019 г.

3. Общая конфигурация современных зон риска в целом не соответствует конфигурации последующего радиационного загрязнения, что дает основание полагать, что наблюдаемая структура заболеваемости в определенной мере представляет собой интерференционную картину суммарного воздействия обоих упомянутых факторов, что несомненно нуждается в последующей проверке.

Поскольку в распоряжении авторов имелся достаточный набор предельно надежных статистических и разномасштабных картографических материалов, выполненных на крупномасштабной топооснове, это не дает оснований сомневаться в достаточной точности и детальности полученных результатов. При этом все работы по построению картографических поверхностей были выполнены предельно корректно с соблюдением всех необходимых методических требований

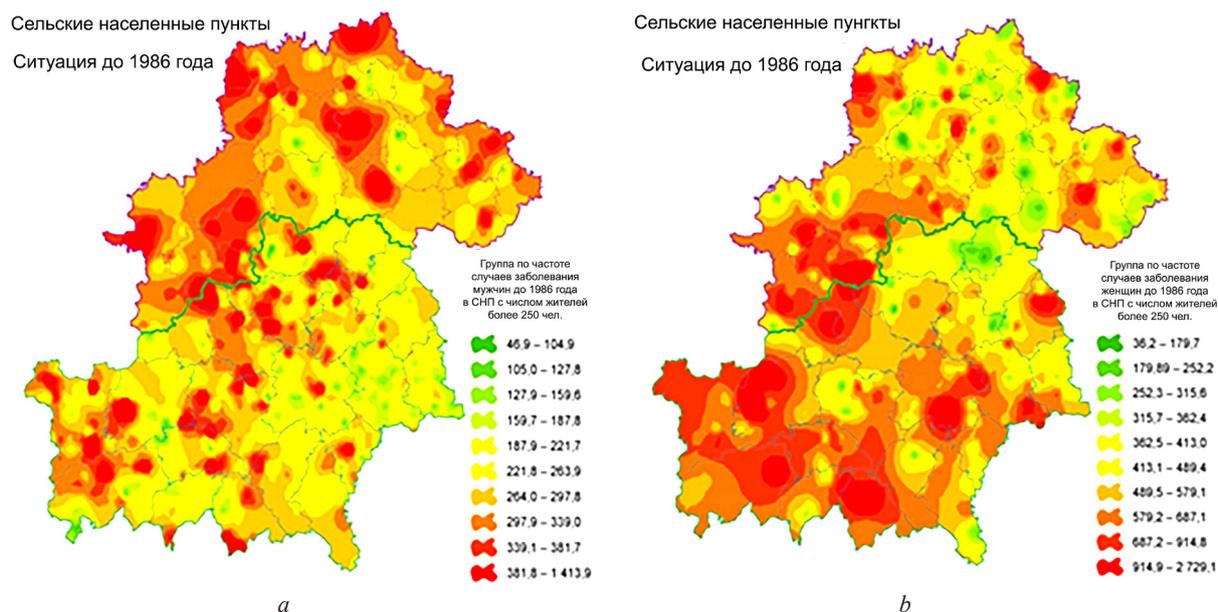


Рис. 4. Общий уровень ОЗ для сельского населения (*a* – мужчины, *b* – женщины), существовавший по состоянию на январь 1986 г.

Fig. 4. The general level of cancer incidence for the rural population (*a* – men, *b* – women) existing as of January 1986

к статистической обеспеченности и правилам ортотрансформации, а операции, связанные с оверлейным наложением, позиционированием и построением цифровых изолинейных поверхностей, осуществлялись в соответствии с общепринятой методикой и с использованием стандартно сертифицированных средств пакета ArcGIS 10.7.

Важным независимым доказательством физического существования площадных объектов, изолинейно воспроизведенных в виде сочетания «гладких» моноцентрических поверхностей, может служить форма частотных гистограмм, построенных применительно к выборке, характеризующей число заболевших во всех рассматриваемых НП.

Как показало специально проведенное исследование левосторонняя асимметрия частотных гистограмм является прямым следствием и индикатором наличия специфически упорядоченной и равномерно опробованной полицентрической структуры, в пределах которой площади центров аномалий всегда закономерно меньше площади их периферии. В рассматриваемом случае во всех выборках, характеризующих количество ОЗ в сельских НП, имеет место именно левосторонняя асимметрия частотных гистограмм, которая становится более выраженной по мере увеличения количества зафиксированных случаев ОЗ, что дает основание утверждать, что изолинейная картина, наблюдаемая на рис. 1–4, не является результатом ошибочной заданной прорисовки, но представляет собой относительно точное отображение физически существующего объекта, обладающего специфической, закономерно организованной структурой.

Все полученные результаты не содержат очевидных логических и смысловых противоречий, что дает основание утверждать, что сделанные на их основе выводы должным образом обоснованы и справедливы, а анализируемая нулевая гипотеза подтверждена на достаточно высоком уровне достоверности.

**Заключение.** Совокупность вышеприведенных результатов позволяет сделать ряд важных заключений относительно не только специфики пространственного распределения, но и генезиса ОЗ, имеющих место на территории Беларуси:

риск возникновения, во всяком случае подавляющего большинства фиксируемых ОЗ, резко дифференцирован в пространстве, в результате чего на территории Беларуси имеют место аномальные зоны значительной протяженности, длительное, оседлое проживание в пределах которых способно в разы как увеличивать, так и снижать уровень риска возникновения ОЗ;

при равенстве всех прочих социально-экономических условий для не имеющей значимых демографических различий популяции сельского населения юго-востока Беларуси наблюдаемая картина пространственной неоднородности риска возникновения ОЗ может являться только следствием экологической, а скорее эколого-геохимической неоднородности территории (включая радиационное загрязнение местности);

как минимум для сельской части населения Беларуси ОЗ большинства локализаций являются эндемическими, т. е. представляют собой прямое следствие пространственной приуроченности к территориям, обладающим определенным набором экологических параметров, способных в значительной мере провоцировать возникновение заболеваний у наиболее уязвимых категорий населения.

В силу того, что рассматриваемый объект обладает значительной площадью и значительным природным разнообразием, он, равно как анализируемая популяция населения, несомненно репрезентативен по отношению и ко всей территории Беларуси, и, как минимум, к территории всей восточной Европы, включая Европейскую Россию.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что имеющиеся данные канцер-регистра репрезентативны для проведения комплексного геоинформационного (геостатистического) анализа, позволяющего получить ответы на многие вопросы, закономерно возникающие при рассмотрении вышеприведенных картографических изображений. В частности, наличие цифровых картографических поверхностей, позволяющих с достаточной точностью воспроизводить характер природно-техногенной и ландшафтно-геохимической неоднородности, дает возможность определить дальнейшее направление работ по изучению пространственных особенностей распространения ОЗ. Это, во-первых, определение факторов или комплекса факторов, присущих локальным территориям с аномально высоким и низким уровнем ОЗ и, соответственно, способ-

ных провоцировать объективно существующую неоднородность возникающего риска ОЗ отдельных локализаций; во-вторых, анализ пространственно-временной динамики основных параметров заболеваемости для всех половозрастных групп как сельского, так и городского населения; в-третьих, выявление наиболее уязвимых (восприимчивых к влиянию внешних условий) категорий населения; в-четвертых, разработка проекта создания эффективной системы профилактических мероприятий, способных существенно снизить предполагаемые различия и, соответственно, уровень наблюдаемой ОЗ, во всяком случае, на территории Беларуси.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований и Российского фонда фундаментальных исследований (проект X20P-386).

**Acknowledgements.** The work was sponsored by the Belarusian Republican Foundation of Fundamental Research and Russian Foundation for Basic Research (project no. X20P-386).

### Список использованных источников

1. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study / G. R. Dagenais [et al.] // *Lancet*. – 2020. – Vol. 395, N 10226. – P. 785–794. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32007-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32007-0)
2. Elevated Bladder Cancer in Northern New England: The Role of Drinking Water and Arsenic / D. Baris [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2016. – Vol. 108, N 9. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw099>
3. Cancer and Obesity: Global burden of cancer attributable to excess weight / M. Arnold [et al.]. – Lyon, France, 2015 [Electronic resource]. – Mode of access: <http://gco.iarc.fr/obesity>. – Date of access: 14.11.2021.
4. Sun and UV facts and evidence // *Cancer Research UK* (24 March 2015) [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer/sun-uv-and-cancer>. – Date of access: 09.11.2021.
5. Risk of thyroid cancer after exposure to <sup>131</sup>I in childhood / E. Cardis [et al.] // *Journal of the National Cancer Institute*. – 2005. – Vol. 97, N 10. – P. 724–732. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji129>
6. Израэль, Ю. А. Радиоактивное загрязнение природных сред в результате аварии на Чернобыльской атомной станции / Ю. А. Израэль. – М., 2006. – 28 с.
7. Korobova, E. Endemic diseases of geochemical origin and methodological approaches toward their prevention and elimination / E. Korobova, S. Romanov, A. Silenok // *Environmental Geochemistry and Health*. – 2020. – Vol. 42, N 8. – P. 2595–2608. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00442-z>
8. Методические принципы построения карты йододефицита на территории Беларуси / С. Л. Романова [и др.] // *Вестн. Фонда фундам. исслед.* – 2017. – № 3. – С. 118–135.
9. Коробова, Е. М. Комплексная оценка эколого-геохимического состояния техногенно трансформированных территорий / Е. М. Коробова // *Геохимия*. – 2017. – № 10. – С. 863–874. <https://doi.org/10.7868/S0016752517100065>
10. Power and Sample Size Calculators [Electronic resource]. – Mode of access: <http://powerandsamplesize.com/Calculators/Compare-2-Means/2-Sample-1-Sided>. – Date of access: 09.11.2021.

### References

1. Dagenais G. R., Leong D. P., Rangarajan S., Lanan F., Lopez-Jaramillo P., Gupta R., Diaz R., Avezum A., Oliveira G. B. F., Wielgosz A., Parambath S. R., Mony P., Alhabib K. F., Temizhan A., Ismail N., Chifamba J., Yeates K., Khatib R., Rahman O., Zatonska K., Kazmi K., Wei L., Zhu J., Rosengren A., Vijayakumar K., Kaur M., Mohan V., Yusufali A. H., Kelishadi R., Teo K. K., Joseph P., Yusuf S. Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10226, pp. 785–794. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32007-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32007-0)
2. Baris D., Baris D., Waddell R., Freeman L. E. B., Schwenn M., Colt J. S., Ayotte J. D., Ward M. H., Nuckols J., Schned A., Jackson B., Clerkin C., Rothman N., Moore L. E., Taylor A., Robinson G., Hosain G. M. M., Armenti K. R., McCoy R., Samanic C., Hoover R. N., Fraumeni J. F., Johnson A., Karagas M. R., Silverman D. T. Elevated Bladder Cancer in Northern New England: The Role of Drinking Water and Arsenic. *Journal of the National Cancer Institute*, 2016, vol. 108, no. 9. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw099>
3. Arnold M., Lam F., Ervik M., Soerjomataram I. *Cancer and Obesity: Global burden of cancer attributable to excess weight*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2015. Available at: <http://gco.iarc.fr/obesity> (accessed 14 November 2021).
4. Sun and UV facts and evidence. *Cancer Research UK* (24 March 2015). Available at: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/causes-of-cancer/sun-uv-and-cancer> (accessed 09 November 2021).
5. Cardis E., Kesminiene A., Ivanov V., Malakhova I., Shibata Y., Khrouch V., Drozdovitch V., Maceika E., Zvonova I., Vlassov O., Bouville A., Goulko G., Hoshi M., Abrosimov A., Anoshko J., Astakhova L., Chekin S., Demidchik E., Galanti R., Ito M., Korobova E., Lushnikov E., Maksioutov M., Masyakin V., Nerovnia A., Parshin V., Parshkov E., Piliptsevich N., Pinchera A., Polyakov S., Shabeka N., Suonio E., Tenet V., Tsyb A., Yamashita S., Williams D. Risk of thyroid cancer after exposure to <sup>131</sup>I in childhood. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, vol. 97, no. 10, pp. 724–732. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji129>

6. Izrael Yu. A. *Radioactive contamination of natural environments as a result of the accident at the Chernobyl nuclear power plant*. Moscow, 2006. 28 p. (in Russian).

7. Korobova E., Romanov S., Silenok A. Endemic diseases of geochemical origin and methodological approaches toward their prevention and elimination. *Environmental Geochemistry and Health*, 2020, vol. 42, no. 8, pp. 2595–2608. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00442-z>

8. Romanov S. A., Cherven A. N., Korobova E. M., Yablonskaya T. S. Methodical principles of construction the iodine map in the territory of Belarus. *Vestnik Fonda fundamental'nykh issledovaniy = Vestnik of the Foundation for Fundamental Research*, 2017, no. 3, pp. 118–135 (in Russian).

9. Korobova E. M. Combined assessment of the ecological and geochemical state of anthropogenically impacted areas. *Geochemistry International*, 2017, vol. 55, no. 10, pp. 861–871. <https://doi.org/10.1134/s0016702917100068>

10. *Power and Sample Size Calculators*. Available at: <http://powerandsamplesize.com/Calculators/Compare-2-Means/2-Sample-1-Sided> (accessed 09 November 2021).

### Информация об авторах

*Романов Сергей Львович* – канд. географ. наук, ст. науч. сотрудник. Геоинформационные системы (ул. Сурганова, 6, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [SRomanov@GIS.by](mailto:SRomanov@GIS.by).

*Червань Александр Николаевич* – канд. сельскохозяйственных наук, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 16, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [ChervanAlex@mail.ru](mailto:ChervanAlex@mail.ru).

*Коробова Елена Михайловна* – д-р геолого-минералог. наук, заведующий лабораторией. Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского РАН (ул. Косыгина, 19, 119334, Москва, Российская Федерация). E-mail: [korobova@geokhi.ru](mailto:korobova@geokhi.ru).

### Information about the authors

*Romanov Sergey L.* – Ph. D. (Geography), Senior Researcher. Geoinformation systems (6, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [SRomanov@GIS.by](mailto:SRomanov@GIS.by).

*Chervan Aliaksandr M.* – Ph. D. (Agrarian), Head of the Department. Belarusian State University (16, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [Chervan@bsu.by](mailto:Chervan@bsu.by).

*Korobova Elena M.* – D. Sc. (Geology and Mineralogy), Head of the Department. Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry V. I. Vernadsky (19, Kosygin Str., 119334, Moscow, Russian Federation). E-mail: [korobova@geokhi.ru](mailto:korobova@geokhi.ru).

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК [55+553.98](47-15)

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-104-108>

Поступило в редакцию 22.12.2021

Received 22.12.2021

**Член-корреспондент Р. Е. Айзберг, Я. Г. Грибик, академик Р. Г. Гарецкий***Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ТЕКТОНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗНОТИПНЫХ НЕФТЕГАЗОНОСНЫХ БАСЕЙНОВ ЗАПАДА ВОСТОЧНО-ЕВРОПЕЙСКОЙ ПЛАТФОРМЫ**

**Аннотация.** В неопротерозое и палеозое на западе Восточно-Европейской платформы (ВЕП) сформировались разнотипные осадочные бассейны, часть которых нефтегазоносные. Эти бассейны приурочены к двум типам региональных структур – рифтовому внутриконтинентальному и пассивно-окраинному. Их тектонические особенности определяли геологические условия нефтегазообразования и нефтегазоаккумуляции. Припятский палеорифтовый нефтегазоносный бассейн, являющийся замыкающим западным сегментом герцинского Припятско-Днепровско-Донецкого авлакогена, обладает наиболее крупными в этом регионе запасами углеводородного сырья и сложным строением. Высокая плотность блоковой и пликтивно-блоковой делимости нефтегазоносных комплексов связана с синрифтовыми разломами и соляной тектоникой. Нефтегазоносность осадочных бассейнов каледонской пассивной окраины запада ВЕП – Балтийского, Подляско-Брестского, Люблинского, Волыно-Подольского обусловлена протяженным ареалом нефтегазообразования в под- и близнадвиговых глубокопогруженных осадочных комплексах в зоне Тейссейра–Торнквиста. Он был основным источником миграции УВ-флюидов на восток в осадочные бассейны пассивной окраины ВЕП.

**Ключевые слова:** запад Восточно-Европейской платформы, нефтегазоносные бассейны, тектонические особенности, генерация и аккумуляция углеводородов

**Для цитирования.** Айзберг, Р. Е. Тектонические особенности разнотипных нефтегазоносных бассейнов запада Восточно-Европейской платформы / Р. Е. Айзберг, Я. Г. Грибик, Р. Г. Гарецкий // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 104–108. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-104-108>

**Corresponding Member Romma E. Aizberg, Yaroslav G. Gribik, Academician Radim G. Garetsky***Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***TECTONIC FEATURES OF DIFFERENT TYPES OF OIL AND GAS BEARING BASINS IN THE WEST OF THE EAST EUROPEAN PLATFORM**

**Abstract.** In the Neoproterozoic and Paleozoic, different-type sedimentary basins, some of which are oil-and-gas bearing, were formed in the western East European Platform (EEP). These basins are confined to two types of regional structures – rift intracontinental and passive-coastal. Their tectonic features determined the geological conditions of oil and gas formation and oil and gas accumulation. The Pripyat paleorift oil and gas bearing basin, which is the closing western segment of the Hercynian Pripyat-Dneprov-Donetsk avalacogenes, has the largest hydrocarbon reserves in the region and a complex structure. High density of block and plicate-block divisions of oil-and-gas bearing complexes is connected with syngenetic faults and salt tectonics. The oil-and-gas content of the sedimentary basins of the Caledonian passive margin of the West WEP – Baltica, Podlaska-Brest, Lublin, Volyn-Podolsk, is caused by the extended areal of the oil-and-gas formation in the sub- and near-thrust deep-submerged sedimentary complexes in the Teisser-Tornquist zone. It was the main source of hydrocarbon-fluid migration eastward into the sedimentary basins of the WEP passive margin.

**Keywords:** western East European platform, oil and gas bearing basins, tectonic features, generation and accumulation of hydrocarbons

**For citation.** Aizberg R. E., Gribik Ya. G., Garetsky R. G. Tectonic features of different types of oil and gas bearing basins in the west of the East European platform. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 104–108 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-104-108>

В платформенном чехле западной части Восточно-Европейской платформы (ВЕП) формирование древних осадочных бассейнов контролировалось разновозрастными и разнотипными прогибами, впадинами, синеклизой. В неопротерозое вследствие проявления в пределах ВЕП рифтогенных обстановок был образован протяженный Волыно-Оршанский прогиб, который северо-

ро-восточным (Оршанским) сегментом сочленялся с близким по возрасту Среднерусским авлакогеном. В это же время вдоль современного юго-западного края ВЕП (зоны Тейссейра–Торнквиста (ТТ)) формировался Галицийско-Белостокский рифт северо-западного простирания; он предшествовал здесь раскрытию моря Торнквиста. В позднем венде – раннем палеозое прилегающие к морю Торнквиста участки ВЕП были втянуты в погружение и образовалась пассивная окраина континента, включая Балтийско-Приднестровскую зону перикратонных опусканий. К ней принадлежат Балтийская синеклиза, Подляско-Брестская, Люблинская и Волыно-Подольская впадины, обособляемые сейчас по поверхности фундамента. Позднедевонско-среднекаменноугольный (герцинский) рифтогенез обусловил формирование Припятского прогиба, который является замыкающим фланговым сегментом протяженной рифтовой системы – Припятско-Днепровско-Донецкого авлакогена.

В платформенном чехле запада ВЕП промышленные запасы нефти выявлены в Припятском прогибе и Балтийской синеклизе; в Волыно-Подольской и Люблинской впадинах открыты месторождения газа. В Припятском палеорифтовом бассейне с 1964 г. установлено 90 месторождений нефти, накопленная добыча которой составила 138 млн т. В формировании нефтегазоносных региональных и зональных структур нижней части платформенного чехла Припятского прогиба ведущую роль играли разломы, которые развивались преимущественно в позднем девоне (главная фаза герцинского рифтогенеза). Они представлены сбросами со значительной сдвиговой составляющей. Синрифтовые разломы определили основную продольную структурную делимость Припятского нефтегазоносного бассейна (НГБ). Сочетание разноэтажной блоковой, пликративно-блоковой и пликративной делимости, соответственно, от подсолевых до верхнесоленосного комплексов осадочных пород отразилось сложными структурными формами нефтегазоносной части чехла. Особое значение имеет морфологическая «выраженность» разнопорядковых структур, их дифференцированное (ранговое) районирование по всей территории палеорифтового Припятского НГБ [1]. В его пределах обособлены основные структуры второго порядка – тектонические ступени. Они представляют собой протяженные линейные блоки с преимущественно моноклинальным региональным наклоном вкост простирания и ограничены высокоамплитудными разломами. В полном нередуцированном виде тектонические ступени включают структурные элементы третьего порядка – сбросо-блоковый уступ, гребень (высокую часть ступени), структурную террасу, подножие. Установлено, что оптимальные условия нефтегазоаккумуляции приурочены к сбросо-блоковым уступам краевых разломов, ограничивающих тектонические ступени, и к структурным гребням.

Высокая степень структурной делимости подсолевого и межсолевого комплексов платформенного чехла Припятского палеорифтового прогиба обусловила формирование трех ареалов нефтегазогенерации – совокупности очагов нефтегазообразования, приуроченных к определенной тектонической зоне и характерными общими для данной зоны, но отличительными для других зон условиями генерации углеводородов (УВ). Ареалы очагов нефтегазообразования обособлены в соответствии с различиями в типах структур второго и третьего рангов Северной, Центральной и Южной зон прогиба. На основе этих тектонических особенностей нефтегазоносного бассейна и с учетом данных о пространственном распределении скоплений УВ и геохимических показателей нефтегазоперспективных отложений обосновано совместно с В. Н. Бескопыльным выделение ареалов нефтегазогенерации: Северного подсолевого трехочагового и межсолевого двухочагового с доказанным нефтегазообразованием, Центрального подсолевого и межсолевого трехочагового с доказанным нефтегазообразованием в подсолевых комплексах и вероятным – в межсолевом, Южного подсолевого двухочагового и межсолевого одноочагового с возможным нефтегазообразованием в подсолевом комплексе и доказанным – в межсолевом. Почти все очаги нефтегазогенерации приурочены к структурным подножиям – глубокопогруженным участкам перспективных комплексов, примыкающим к высокоамплитудным краевым и ступенеобразующим разломам сбросового типа. Размещение залежей нефти определяется, в основном, синрифтовыми продольными разломами, контролирующими тектоническую позицию локальных поднятий.

Для основных нефтегазоносных комплексов девонского возраста характерно многообразие типов залежей, приуроченных в основном к блоковым, а также к пликвативным локальным структурам. Разноамплитудные разрывные нарушения определяли важнейшие составляющие процесса формирования залежей нефти в Припятском рифте: наличие ловушек, строение и пространственное соотношение очагов генерации УВ и зон аккумуляции, а также наличие (или отсутствие) путей миграции углеводородных флюидов, т. е. особенности заполнения ловушек нефтью. Высокая плотность блоковой делимости Припятского палеорифтового бассейна определила необходимость специального тектонического районирования для целей эффективного прогноза нефтегазоносности этого региона.

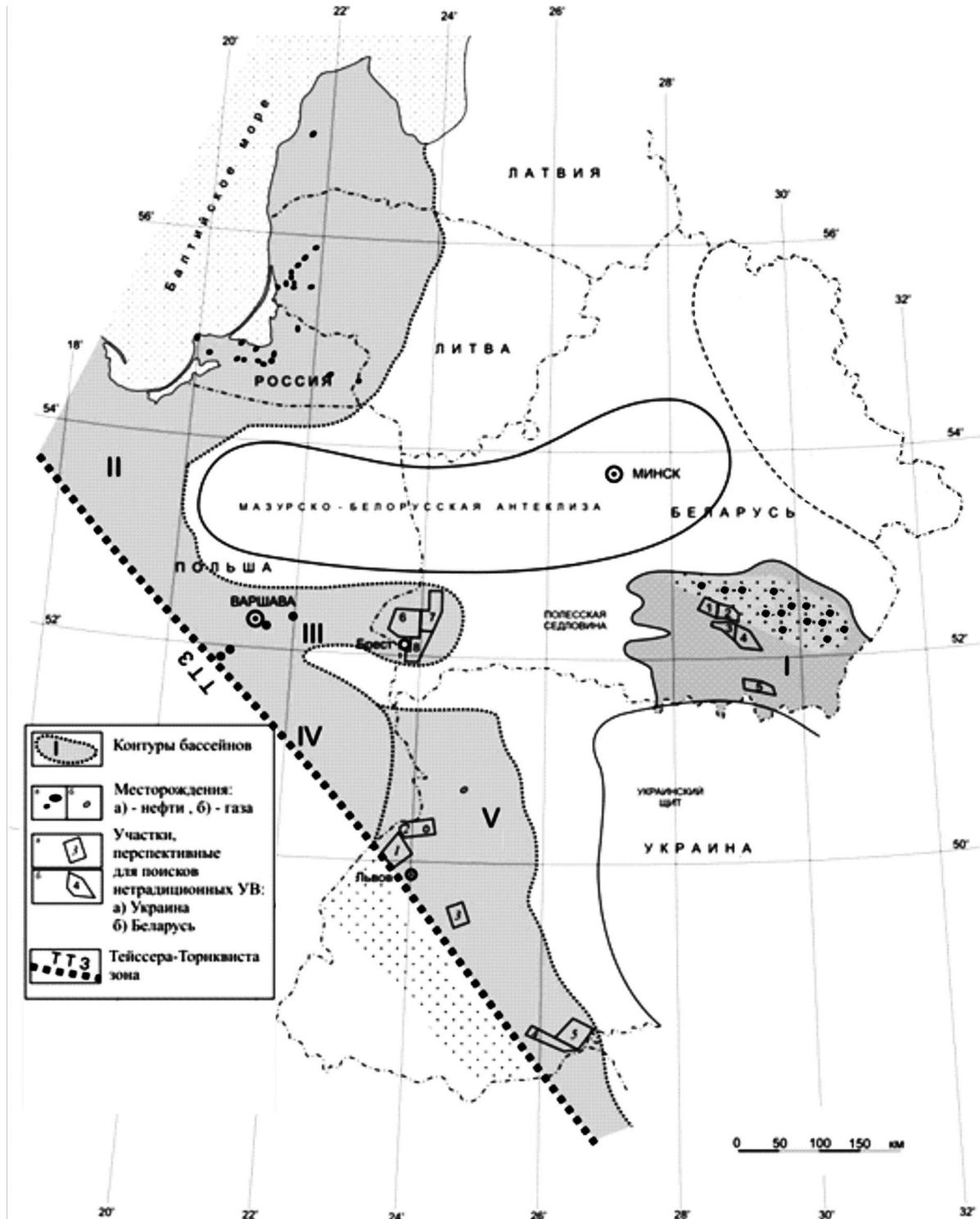
Нефтегазоносность осадочных бассейнов каледонской пассивной окраины юго-запада ВЕП связана с одновозрастным комплексом отложений нижнего палеозоя в Балтийской синеклизе, Подляско-Брестской, Люблинской и Волыно-Подольской впадинах (рисунок). Наиболее погруженные части этих региональных структур расположены под надвигами нижнепалеозойских складчатых каледонид, развитых вдоль зоны ТТ со стороны Среднеевропейской эпигерцинской плиты. При этом каждому из перечисленных бассейнов, контролируемых указанными структурами, свойственны индивидуальные геологические условия нефтегазонакопления и формирования залежей УВ.

Поднадвиговые отложения платформенного чехла, суммарная мощность которого в депоцентрах зоны ТТ достигает 8–9 км, оказались в оптимальных условиях нефтегазообразования за счет термодеструкции рассеянного органического вещества (РОВ) и термогидродинамической закрытости аллохтонных пластин. Сопоставляя эти представления с данными о нефтегазоносности древних осадочных бассейнов, сопредельных с протяженной полосой надвигов в зоне ТТ, можно сделать вывод, что все известные в Балтийской синеклизе, Подляско-Брестской, Люблинской и отчасти в Волыно-Подольской впадинах месторождения и локальные проявления углеводородов (в том числе из «сланцевых» отложений аспидной надформации ордовика и силура) связаны своим генезисом с высокотемпературной деструкцией РОВ осадочных пород вблизи и поднадвиговых частях аллохтонов на стыке ВЕП и Среднеевропейской плиты вследствие дренирования поднадвиговых зон разломами в конце каледонского этапа. Формирующиеся здесь углеводородные флюиды мигрировали на восток по платформенному склону. Фазовая дифференциация в местах экранирования обусловила возникновение нефтегазовых залежей в отложениях каледонского комплекса и девонских пород.

Исходя из литологических и фильтрационно-емкостных особенностей нижнепалеозойских отложений региона представляется весьма вероятным, что ордовикские и особенно силурийские толщи включают достаточно мощные пласты нефтегазоперспективных «сланцевых» полуколлекторов, которые формируют зоны (плеи) или локальные ловушки с глинисто-сланцевым (shale reservoirs) и плотными (tight reservoirs) карбонатными и кремнеземными резервуарами. С 2011 г. на польской территории этого региона на основе инновационных технологий осуществлялись нефтегазопроисследовательские работы по выявлению нетрадиционных скоплений «сланцевых» УВ. В скважинах Stoczek OU-1, Peclin OU-1 и Cyelow OPZ из нетрадиционных глинисто-сланцевых резервуаров (shale reservoirs) силурийского возраста получены притоки углеводородного газа дебитом 10300–14130 куб. футов/сутки [2].

В пределах Балтийской синеклизы в отложениях нижнего палеозоя установлено несколько десятков месторождений нефти на дне Балтийского моря и прибрежных районах Литвы, Калининградской области России, Латвии, при этом мощность платформенного чехла в восточных нефтегазоносных зонах региона не превышает 2–3 км. Залежи нефти преимущественно тектонически экранированные и залегают на относительно небольшой глубине от –1200 м до –2700 м [3].

Субширотная Подляско-Брестская впадина характеризуется резким погружением к западу; в под- и близнадвиговой части Подляско-Брестского суббассейна (Польша) мощность платформенного чехла достигает 8–9 км. В этом суббассейне не выявлены промышленные залежи УВ, но в глубоких поисковых скважинах установлены следы нефти в кембрийских породах (скв. Zembrak JG-1), газопроявления с большим содержанием метана (скв. Pluszcz JG-1), нефть с пузырьками газа (скв. Okunew JG-1). В Брестском суббассейне (Беларусь) в скважинах установлены признаки прояв-



Карта распределения нефтегазоносных бассейнов западной части Восточно-Европейской платформы. Бассейны: I – Припятский; II – Балтийский; III – Подляско-Брестский; IV – Люблинский; V – Вольно-Подольский. Участки, перспективные для поисков «сланцевых» УВ: Украина: 1 – Рава-Русский, 2 – Белзский, 3 – Восточнолещинский (Олесский), 4 – Давыдовский, 5 – Байраковский; Беларусь: 1 – Калиновский, 2 – Октябрьский, 3 – Комаровичский, 4 – Савичский, 5 – Ельский, 6 – Каменецкий, 7 – Шерешовский, 8 – Жабинковский

Map of the distribution of oil and gas bearing basins in the western part of the East European platform. Basins: I – Pripyat; II – Baltic; III – Podlaska-Brest; IV – Lublin; V – Volyn-Podolsk. Areas promising for “shale” HC prospecting: Ukraine: 1 – Rava-Russky, 2 – Belzsky, 3 – Vostochno-Leshchinsky (Olessky), 4 – Davydovsky, 5 – Bayrakovsky; Belarus: 1 – Kalinovsky, 2 – Oktyabrsky, 3 – Komarovichsky, 4 – Savichsky, 5 – Elsky, 6 – Kamenets, 7 – Shereeshovsky, 8 – Zhabinkovsky

ления УВ в виде «выпотов» нефти в керне и повышенных газопоказаний при газовом каротаже в ордовикских и силурийских отложениях. Авторы связывают все нефтепроявления с миграцией углеводородсодержащих флюидов из наиболее глубокопогруженных частей бассейна, включая поднадвиговую зону.

В пределах Люблинского и Волыно-Подольского НГБ основные перспективы нефтегазоносности связаны с кембрийскими, силурийскими и девонскими отложениями. В обоих бассейнах выявлены по два газовых месторождения в породах девонского возраста. Эти скопления углеводородов приурочены к приразломным антиклиналям. Волыно-Подольская впадина с мощностью осадочных пород 3–8 км и весьма высокой тепловой активностью является высокоперспективной структурой на газ и нефть. Однако реализация процессов эмиграции углеводородных флюидов из глубокопогруженных участков осложнена разломами, субпараллельными зоне ТТ, а также широким развитием аллохтонов альпийского орогенеза.

**Заключение.** В результате выполненных исследований установлено, что тектонические особенности разнотипных нефтегазоносных бассейнов запада Восточно-Европейской платформы проявились в различии геологических условий формирования ареалов нефтегазообразования и нефтегазонакопления. Высокая степень структурной делимости подсолевых и межсолевого комплексов Припятского палеорифтового НГБ обусловила формирование трех автономных ареалов нефтегазообразования и ближнюю миграцию углеводородов в блоковые и пликвативно-блоковые структуры зон нефтегазонакопления. Нефтегазоносность древних осадочных бассейнов каледонской пассивной окраины запада ВЕП связана, в основном, с единым протяженным ареалом генерации УВ в под- и близнадвиговых глубокопогруженных осадочных комплексах зоны Тейссейра–Торнквиста и дальней миграции углеводородных флюидов в направлении слабо дислоцированных положительных структур второго и третьего порядка Балтийского, Подляско-Брестского, Люблинского и Волыно-Подольского бассейнов.

#### Список использованных источников

1. Айзберг, Р. Е. Синрифтовая структура Припятского прогиба / Р. Е. Айзберг, В. Н. Бескопыльный, Я. Г. Грибик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 4. – С. 114–118.
2. Mineralogia ordowicko-sylurskich skał drobnoziarnistych z basenu bałtyckiego (północna Polska) / A. Gąsiński [i in.] // Międzynarodowa konferencja naukowo-techniczna: Nowoczesne technologie pozyskiwania węglowodorów w warunkach lądowych i morskich. – Kraków, 2012. – S. 407–412.
3. Балтийская синеклиза / К. А. Сакалаускас [и др.] // Геология и нефтегазоносность запада Восточно-Европейской платформы. – Минск, 1997. – С. 509–564.

#### References

1. Aizberg R. Ye., Beskopylny V. N., Gribik Ja. G. Synrift structure of the Pripyat trough. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2010, vol. 54, no. 4, pp. 114–118 (in Russian).
2. Gąsiński A., Poszytek A., Wolicka D., Poprawa P. Mineralogia ordowicko-sylurskich skał drobnoziarnistych z basenu bałtyckiego (północna Polska). *Międzynarodowa konferencja Naukowo-Techniczna: Nowoczesne technologie pozyskiwania węglowodorów w warunkach lądowych i morskich*. Kraków, 2012, s. 407–412 (in Polish).
3. Sakalauskas K. A., Zdanavichyute O. K., Kadunene E. F. et al. Baltic synecise. *Geologiya i neftegazonosnost' zapada Vostochno-Evropeiskoi platformy* [Geology and oil and gas content of the West of the East European platform]. Minsk, 1997, pp. 509–564 (in Russian).

#### Информация об авторах

*Айзберг Ромма Ефимович* – член-корреспондент, д-р геол.-минер. наук, гл. науч. сотрудник. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 10, 220076, Минск, Республика Беларусь). E-mail: info@nature-nas.by.

*Грибик Ярослав Гаврилович* – канд. геол.-минер. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 10, 220076, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslavgribik@tut.by.

*Гарецкий Радим Гаврилович* – академик, д-р геол.-минер. наук, гл. науч. сотрудник. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 10, 220076, Минск, Республика Беларусь). E-mail: info@nature-nas.by.

#### Information about the authors

*Aizberg Romma E.* – Corresponding Member, D. Sc. (Geology and Mineralogy), Chief Researcher. Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, F. Skoryna Str., 220076, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: info@nature-nas.by.

*Gribik Yaroslav G.* – Ph. D. (Geology and Mineralogy), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, F. Skoryna Str., 220076, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslavgribik@tut.by.

*Garetsky Radim G.* – Academician, D. Sc. (Geology and Mineralogy), Chief Researcher. Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, F. Skoryna Str., 220076, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: info@nature-nas.by.

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

**ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ**  
**TECHNICAL SCIENCES**

УДК 666.972  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-109-112>

Поступило в редакцию 02.11.2021  
Received 02.11.2021

**Академик С. А. Жданок<sup>1</sup>, С. Н. Леонович<sup>2</sup>, Е. Н. Полонина<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Передовые исследования и технологии, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Белорусский национальный технический университет, Минск, Республика Беларусь*

**СИНЕРГЕТИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ SiO<sub>2</sub>  
И УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА СВОЙСТВА БЕТОНА**

**Аннотация.** Продемонстрирован взаимоусиливающий эффект влияния сверхмалых доз наночастиц SiO<sub>2</sub> и многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ) в пределах 0,00004–0,000006 мас. % от массы цемента на структуру цементного камня и механические свойства бетона. Обнаружена корреляция увеличения механической прочности бетона на 56 % с изменениями в структуре цементного камня, при которых существенно возрастает доля кристаллов гидроалюмината кальция, гидросульфалюмината кальция и тоберморита типа 14А. Полученные результаты закладывают основы для разработки технологии промышленного производства комплексных добавок в бетоны с комбинацией наночастиц (МУНТ + SiO<sub>2</sub>), позволяющих улучшить механические и физические характеристики бетона и увеличить его долговечность.

**Ключевые слова:** комплексная добавка, наночастицы, бетон, прочность

**Для цитирования.** Жданок, С. А. Синергетическое влияние наночастиц SiO<sub>2</sub> и углеродных нанотрубок на свойства бетона / С. А. Жданок, С. Н. Леонович, Е. Н. Полонина // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 109–112. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-109-112>

**Academician Siarhei A. Zhdanok<sup>1</sup>, Sergey N. Leonovich<sup>2</sup>, Elena N. Polonina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Advanced Research and Technologies, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Belarusian National Technical University, Minsk, Republic of Belarus*

**SYNERGISTIC INFLUENCE OF SiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES  
AND CARBON NANOTUBES ON THE PROPERTIES OF CONCRETE**

**Abstract.** The mutually reinforcing effect of the influence of ultra-low doses of SiO<sub>2</sub> nanoparticles and multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) in the range of 0.00004–0.000006 wt. % of the mass of cement on the structure and mechanical properties of concrete was demonstrated. A correlation was found between an increase in the mechanical strength of concrete by 56 % with changes in the structure of the cement stone, at which the proportion of crystals of calcium hydroaluminate, calcium hydrosulfoaluminate and type 14A tobermorite increases significantly. The results obtained lay the foundations for the development of a technology for the industrial production of complex additives in concrete with a combination of nanoparticles (MWCNT + SiO<sub>2</sub>), which make it possible to improve the mechanical and physical characteristics of concrete and increase its durability.

**Keywords:** complex additive, nanoparticles, concrete, strength

**For citation.** Zhdanok S. A., Leonovich S. N., Polonina E. N. Synergistic influence of SiO<sub>2</sub> nanoparticles and carbon nanotubes on the properties of concrete. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 109–112 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-109-112>

**Введение.** Существенное влияние на прогресс в исследовании свойств бетонов в течение последних 20 лет оказала возможность управляемого и контролируемого воздействия на структуру геля гидросиликатов кальция (CSH-геля), заполняющего до 70 % и более объема цементного

бетона, состоящего в введении в его состав наночастиц (НЧ) разного химического состава с высокой удельной поверхностью (до  $1000 \text{ м}^2/\text{г}$ ) и высокой физико-химической активностью.

Наиболее интересными НЧ, вводимыми в состав бетонов вместе с водой затворения, являются нанокремнезем (НК) и МУНТ. Разработка технологий массового производства этих материалов и их ценовая доступность на рынке стимулировали прикладные исследования в области их практического применения для нужд строительной индустрии [1; 2].

**Материалы и методы исследования.** При проведении исследований влияния НЧ на свойства бетона применялись следующие компоненты: в качестве вяжущего – портландцемент ПЦ 500 Д0, мелкого заполнителя – природный песок, крупного заполнителя – щебень гранитный фракцией 5–20 мм; модифицирующие вещества – золь гидротермального нанокремнезема (NS) производства РФ (ТУ 2111-001-97849280–2014) и углеродный наноструктурированный материал (NC) МУНТ, производимый отечественной компанией «Передовые исследования и технологии» (ТУ ВУ 691460594.002–2016) [3]; а также суперпластификатор (СП) на основе поликарбоксилатного сополимера (SP) и вода затворения.

ПЭМ изображения используемых в экспериментах гидротермальных наночастиц  $\text{SiO}_2$  и МУНТ представлены на рис. 1.

Составы исследованных образцов бетона и цементного камня представлены в табл. 1 и 2.

Комплексная добавка, применяемая во всех экспериментах, готовилась следующим образом: в приготовленную водную дисперсию наночастиц МУНТ добавляли отмеренное количество золя гидротермального нанокремнезема и перемешивали в смесителе, снабженном высокооборотистой мешалкой, в течение 40 мин. Таким образом, наночастицы МУНТ и  $\text{SiO}_2$  равномерно

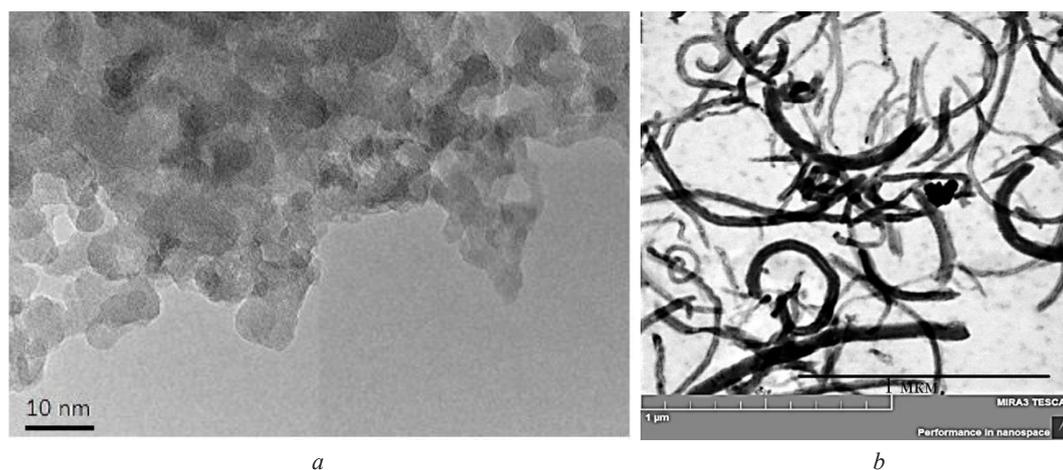


Рис. 1. ПЭМ-изображение: *a* – наночастиц  $\text{SiO}_2$ , полученное с помощью растрового электронного микроскопа Helios Nanolab 600I (FEI, США); *b* – частиц углеродного наноматериала в составе водной дисперсии

Fig. 1. SEM image: *a* –  $\text{SiO}_2$  nanoparticles obtained using the scanning electron microscope Helios Nanolab 600I (FEI, USA), *b* – carbon nanomaterial (VHM) particles as part of an aqueous dispersion

Т а б л и ц а 1. Состав исследованных бетонов

T a b l e 1. Composition of the studied concretes

Состав Compound	Состав сырьевой смеси, $\text{кг}/\text{м}^3$ The composition of the raw mix, $\text{kg}/\text{m}^3$			Вода/цемент Water/Cement	Массовая доля суперпластификатора к цементу, % Mass fraction of superplasticizer to cement, %	Массовая доля тв. углерода к цементу, % Mass fraction of solid carbon to cement, %	Массовая доля тв. $\text{SiO}_2$ к цементу, % Mass fraction of solid $\text{SiO}_2$ to cement, %
	Цемент Cement	Песок Sand	Щебень фр. 10–20 Crushed stone of fraction 10–20				
C1-RS	350	975	1040	0,4	–	–	–
C1-SP				0,26	0,4	–	–
C1-NS <sub>8</sub> SP <sub>50</sub>				0,2	0,4	–	0,000006
C1-NC <sub>50</sub> SP <sub>50</sub>				0,26	0,4	0,00004	–
C1-NC <sub>50</sub> NS <sub>8</sub> SP <sub>50</sub>				0,24	0,4	0,00004	0,000006

Т а б л и ц а 2. Состав исследованных образцов цементного камня

T a b l e 2. Composition of the studied cement stone samples

Состав Compound	Состав сырьевой смеси, кг/м <sup>3</sup> The composition of the raw mix, kg/m <sup>3</sup>	Вода/цемент Water/Cement	Массовая доля суперпластификатора к цементу, % Mass fraction of superplasticizer to cement, %	Массовая доля тв. углерода к цементу, % Mass fraction of solid carbon to cement, %	Массовая доля тв. SiO <sub>2</sub> к цементу, % Mass fraction of solid SiO <sub>2</sub> to cement, %
	Цемент Cement				
CM	1720	0,26	–	–	–
CM-SP <sub>50</sub>	1880	0,21	0,4	–	–
CM-NS <sub>8</sub> SP <sub>50</sub>		0,21	0,4	–	0,000006
CM-NC <sub>50</sub> SP <sub>50</sub>		0,21	0,4	0,00004	–
CM-NC <sub>50</sub> NS <sub>8</sub> SP <sub>50</sub>		0,21	0,4	0,00004	0,000006

распределялись в объеме дисперсии, а добавление в дисперсию небольшого количества СП придавало им седиментационную устойчивость.

**Влияние наночастиц на свойства конструкционного бетона.** Влияние комплексной добавки (C1-NC<sub>50</sub>NS<sub>8</sub>SP<sub>50</sub>) на бетонные смеси с осадкой конуса ОК = 1–4 см оценивалось путем измерения прочности бетона (рис. 2). Выявлено, что использование поликарбоксилатного суперпластификатора (C1-SP) приводит к повышению прочности на сжатие на 10 %, а при совместном использовании СП с гидротермальным нанокремнеземом (C1-NS<sub>8</sub>SP<sub>50</sub>) или с наночастицами МУНТ (C1-NC<sub>50</sub>SP<sub>50</sub>) повышению прочностных показателей, по отношению к бездобавочному бетону (C1-RS) на 28-е сутки составляет до 25 %. При использовании совместно всех компонентов добавки в проектном возрасте прочность возросла до 77 % по сравнению с бездобавочным составом.

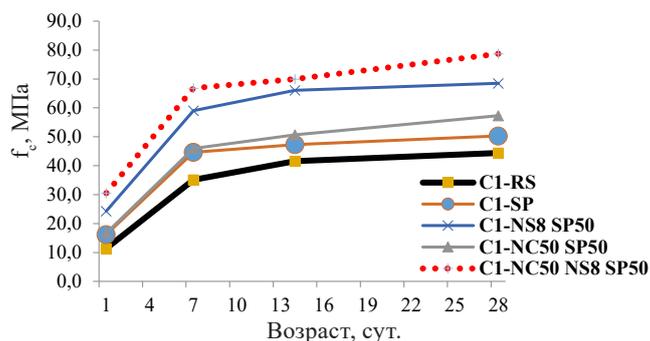


Рис. 2. Влияние комплексной добавки на прочность конструкционного бетона

Fig. 2. Influence of the complex additive on the strength of structural concrete

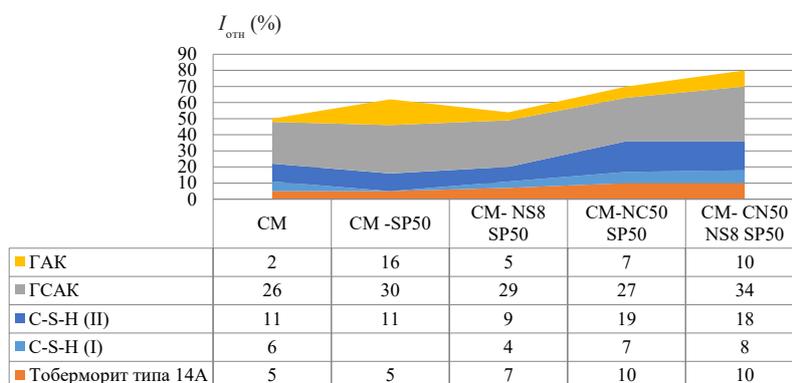


Рис. 3. Влияние различных добавок на относительную интенсивность дифракционных пиков для фаз ГАК (гидроалюминат кальция), ГСАК (гидросульфалюминат кальция), тоберморит типа 14А, C-S-H(II) и CSH(I) в возрасте 28 суток

Fig. 3. Influence of different additives on the relative intensity of diffraction peaks for the phases of calcium hydroaluminat, calcium hydrosulfoaluminat, type 14A tobermorite, C-S-H(II) and CSH(I) at an age of 28 days

**Влияние наночастиц на свойства цементного камня.** Как показали результаты исследования структуры цементного камня методом РФА, комплексная добавка способствует повышению доли низкоосновных гидросиликатов кальция CSH(I) и томберморитподобных структур с пониженными значениями отношения Ca/Si в составе фаз CSH-геля, а также повышению упорядоченности структуры наночастиц и фаз CSH-геля (рис. 3).

Повышение интенсивности пиков фаз с низким отношением Ca/Si и увеличение базельных расстояний согласуется с результатами ИК-спектроскопии [4], показавшими более высокую среднюю степень полимеризации кремнекислородных тетраэдров в образцах, модифицированных наночастицами, и, соответственно, более высокую упорядоченность структуры CSH-геля на разных стадиях созревания бетона.

**Закключение.** Продемонстрированное в настоящей работе синергетическое влияние частиц нанокремнезема и углеродных нанотрубок на структуру и механические свойства бетона является основой для разработки эффективных технологий модификации существующих и конструирования новых строительных материалов, обладающих повышенными эксплуатационными свойствами. Обнаруженный эффект влияния чрезвычайно малых доз, добавляемых в бетон наноразмерных частиц МУНТ и SiO<sub>2</sub>, в 1000–10000 раз меньших по сравнению с дозами традиционно вводимых добавок в строительные материалы, позволяет управлять выбором и ростом тех кристаллических структур в процессе гидратации цементных растворов, которые определяют физические и химические свойства бетонов и их долговечность

**Благодарности.** Авторы выражают глубокую благодарность профессору В. В. Потапову за поддержку.

**Acknowledgments.** Authors thanks to professor V. V. Potapov for assistance.

#### Список использованных источников

1. Nanomaterials and nanotechnology for high-performance cement composites / K. Sobolev [et al.] // Proceedings of ASI Session on «Nanotechnology Concrete: Recent Developments and Future Perspectives», 2006. – Vol. 7. – P. 117–120.
2. Sanchez, F. Nanotechnology in concrete – A review / F. Sanchez, K. Sobolev // Construction and Building Materials. – 2010. – Vol. 24, N 11. – P. 2060–2071. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014>
3. Модификация цементных бетонов добавками, содержащими наноразмерные материалы / С. А. Жданок [и др.] // Инженерно-физ. журн. – 2020. – Т. 93, № 3. – С. 669–673.
4. Жданок, С. А. Исследование методом ИК-спектроскопии степени активации углеродных наноматериалов для модифицирования конструкционного бетона / С. А. Жданок, Е. Н. Полонина, С. Н. Леонович // Строительные материалы. – 2020. – № 7. – С. 49–53. <https://doi.org/10.31659/0585-430X-2020-782-7-49-53>

#### References

1. Sobolev K., Flores I., Hermosillo R., Torres-Martinez L. M. Nanomaterials and nanotechnology for high-performance cement composites. *Proceedings of ASI Session on “Nanotechnology Concrete: Recent Developments and Future Perspectives”*, 2006, vol. 7, pp. 117–120.
2. Sanchez F., Sobolev K. Nanotechnology in concrete – A review. *Construction and Building Materials*, 2010, vol. 24, no. 11, pp. 2060–2071. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014>
3. Zhdanok S. A., Potapov V. V., Polonina E. N., Leonovich S. N. Modification of cement concrete by admixtures containing nanosized materials. *Journal of Engineering Physics and Thermophysics*, 2020, vol. 93, no. 3, pp. 648–652. <https://doi.org/10.1007/s10891-020-02163-y>
4. Zhdanok S. A., Polonina E. N., Leonovich S. N. IR-spectroscopy study of the degree of activation of carbon nanomaterials for modifying structural concrete. *Stroitel'nye Materialy = Construction Materials*, 2020, no. 7, pp. 49–53 (in Russian). <https://doi.org/10.31659/0585-430X-2020-782-7-49-53>

#### Информация об авторах

*Жданок Сергей Александрович* – академик, д-р физ.-мат. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Передовые исследования и технологии (ул. Совхозная, д. 1-16, 223058, Лесковка, Минский р-н, Республика Беларусь). E-mail: ceo@art-pte.com.

*Леонович Сергей Николаевич* – д-р техн. наук, профессор, декан. Белорусский национальный технический университет (пр. Независимости, 65, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sleonovich@mail.ru.

*Полонина Елена Николаевна* – ст. преподаватель. Белорусский национальный технический университет (пр. Независимости, 65, 220013, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grushevskay\_en@tut.by.

#### Information about the authors

*Zhdanok Siarhei A.* – Academician, D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Chief Researcher. Advanced Research and Technologies (1-16, Sovkhoznyaya Str., 223058, Leskovka village, Minsk district, Republic of Belarus). E-mail: ceo@art-pte.com.

*Leonovich Sergei N.* – D. Sc. (Engineering), Professor, Dean. Belarusian National Technical University (65, Nezavisimosti Ave., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sleonovich@mail.ru.

*Polonina Elena N.* – Senior Lecturer. Belarusian National Technical University (Nezavisimosti Ave., 65, 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grushevskay\_en@tut.by.

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

УДК 621.762  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-113-121>

Поступило в редакцию 22.09.2021  
Received 22.09.2021

**Академик А. Ф. Ильющенко, Т. Л. Талако, А. В. Лешок, А. И. Лецко, Т. И. Пинчук**

*Институт порошковой металлургии имени академика О. В. Романа, Минск, Республика Беларусь*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК УЛЬТРАДИСПЕРСНОГО ПОРОШКА СИСТЕМЫ NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> НА ТРИБОТЕХНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФРИКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ МЕДИ

**Аннотация.** Представлены результаты исследования влияния добавки ультрадисперсного композиционного порошка системы NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, полученного МАСВС, на триботехнические свойства фрикционного материала на основе оловянистой бронзы с 12 % олова. Показано, что добавка порошка в интервале 0,5–2,5 % позволила увеличить значение динамического коэффициента трения с 0,040 до 0,051. Введение 1,5 %-ного композиционного порошка снизило шероховатость поверхности контртела с 2,9 до 0,9 мкм. Изменение триботехнических свойств обусловлено структурными изменениями оловянистой бронзы, частиц добавки, поверхностного слоя фрикционного материала и контртела.

**Ключевые слова:** фрикционный материал, композиционный порошок, интерметаллид, ультрадисперсный порошок, коэффициент трения, износ

**Для цитирования.** Исследование влияния добавок ультрадисперсного порошка системы NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> на триботехнические свойства фрикционного материала на основе меди / А. Ф. Ильющенко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 113–121. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-113-121>

**Academician Aliaxander Ph. Ilyushchanka, Tatyana L. Talako, Andrey V. Leshok,  
Andrey I. Letsko, Tatyana I. Pinchuk**

*O. V. Roman Powder Metallurgy Institute, Minsk, Republic of Belarus*

## STUDY OF THE INFLUENCE OF ULTRA DISPERSE POWDER ADDITIVES OF THE NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> SYSTEM ON THE TRIBOTECHNICAL PROPERTIES OF THE FRICTIONAL MATERIAL BASED ON COPPER

**Abstract.** The results on the impact of additives on the ultra-fine composite powder system, obtained by MASVS on the tribotechnical properties of friction material based on tin bronze with 12 % of tin are presented. It is shown that the powder additive in the range of 0.5–2.5 % increased the dynamic friction coefficient from 0.040 to 0.051. The introduction of a 1.5 % composite powder reduced the surface roughness of the counter body from 2.9 to 0.9 μm. The change in the tribotechnical properties is due to the structural changes in tin bronze, the additive particles, the surface layer of the friction material and the counter body.

**Keywords:** friction material, composite powder, intermetallic compound, ultrafine powder, coefficient of friction, wear

**For citation.** Ilyushchanka A. Ph., Talako T. L., Leshok A. V., Letsko A. I., Pinchuk T. I. Study of the influence of ultra disperse powder additives of the NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> system on the tribotechnical properties of the frictional material based on copper. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 113–121 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-113-121>

**Введение.** Порошковая металлургия является универсальным процессом, позволяющим создавать композиционные материалы, используя порошки различной природы, химического состава. Одним из направлений порошковой металлургии является создание фрикционных материалов, предназначенных для передачи крутящего момента. Они широко используются в передающих и тормозных узлах и механизмах автотракторной техники, техники специального назначения, станках, машинах и механизмах [1–3]. Особое место занимает группа материалов на основе оловянистой бронзы, предназначенная для работы в условиях граничного и смешанного трения. Такие материалы, как правило, используются в гидромеханических коробках передач, маслоохлаждаемых тормозах и муфтах. К ним предъявляются следующие требования: обеспечение заданного, стабильного значения динамического коэффициента трения; высокая износостойкость; эффективная приработка; высокая теплопроводность [4]. Повышение заданных

свойств возможно за счет использования добавок в базовый состав фрикционного материала, содержание которых составляет 0,5–15,0 об. %. Такие добавки способны к взаимодействию с оловянистой бронзой, так и локализации в виде отдельных включений [5–8].

В работе в качестве добавки, повышающей триботехнические свойства, предложено использование порошка интерметаллида, свойства которого определяются правилом Юм–Розери, согласно которому, кристаллическая структура характеризуется определенной плотностью валентных электронов [9]. В промышленном использовании наибольшее распространение получили алюминиды никеля, железа и титана, характеризующиеся простотой и универсальностью способов получения, высокой технологичностью и относительной дешевизной [10; 11].

Интерметаллиды системы Ni–Al обладают совокупностью уникальных свойств, таких как повышенное значение ударной вязкости, жаростойкость, сопротивление окислению при повышенных температурах, и применяется в сложных условиях эксплуатации [12; 13]. Авторы работ [14; 15] отмечают, что интерметаллиды  $Ni_3Al$  и  $NiAl$ , имея плотность 7,3 и 5,9 г/см<sup>3</sup> соответственно, характеризуются высоким модулем упругости, что позволяет их использовать в изделиях конструкционного и триботехнического назначения.

В [16] отмечается, что алюминид никеля может использоваться как самостоятельное покрытие, характеризующееся высокой износостойкостью как при комнатной, так и при высокой температуре. Испытания на трение в воздушной среде при 20–850 °С показали, что он по способности сопротивляться износу превосходит жаропрочные никелевые сплавы и в 10 раз – наплавочный материал типа «Стеллит». Там же отмечается, что алюминид никеля имеет высокий коэффициент трения – 0,56 и 0,41 при 20 и 500 °С соответственно. Это может быть обусловлено высоким значением твердости. Микротвердость основной фазы алюминида никеля составляет 3200 МПа, тогда как дополнительное легирование Cr, Mo, W позволяет повысить это значение до 4600 МПа [17].

В [18] отмечается, что использование алюминида никеля взамен никеля позволило повысить износостойкость в 2,4 раза, делая вывод о возможности повышения стойкости к абразивному износу спеченного композита.

В [19] приведены результаты исследования влияния фаз интерметаллидов  $NiAl$  и  $Ni_3Al$  на триботехнические свойства. Показано, что износостойкость покрытий из  $NiAl$  в 5 раз выше, чем у покрытий  $Ni_3Al$ . Это объясняется формированием на поверхности трения  $NiAl$  сложных оксидных пленок, которые предотвращают адгезионное схватывание с материалом контртела.

Анализ литературных источников составов композиционных фрикционных материалов указал на отсутствие информации по использованию добавки порошка  $NiAl/Al_2O_3$  на триботехнические и эксплуатационные свойства.

Цель работы – исследование влияния добавки ультрадисперсного порошка системы  $NiAl/Al_2O_3$  на триботехнические свойства композиционного фрикционного материала на основе меди, предназначенного для работы в узлах трения со смазкой.

**Материалы и методы исследования.** В качестве базового состава использовался композиционный фрикционный материал на основе меди, легированный 12 % олова, содержащий 30 об. % углеродсодержащей добавки в виде графита элементного марки ГЭ-1. Шихту материала получали смешиванием порошков меди марки ПМС-1 со средним размером частиц 100 мкм, олова марки ПО-1 со средним размером частиц 10 мкм, графита элементного марки ГЭ-1 (ГОСТ 7478–75) со средним размером частиц 100 мкм.

Композиционный ультрадисперсный порошок системы  $NiAl/Al_2O_3$  (далее – интерметаллид) вводился в состав базового фрикционного материала в концентрации 0,5–2,5 % с шагом 0,5 %. Смешивание порошков производили в смесителе типа «пьяная» бочка, в течение 120 мин при наличии пластификатора в соотношении 1/100 пластификатора к массе исходных компонентов. В качестве пластификатора использовался раствор масла со спиртом в пропорции 50/1.

Порошок интерметаллида получен механоактивируемым синтезом моноалюминида никеля из элементов в присутствии дисперсных частиц оксида алюминия [20]. Согласно данным рентгенофазового анализа, порошок  $NiAl/Al_2O_3$  двухфазный (рис. 1) и характеризуется достаточно равномерным распределением оксидных включений размером 0,5–3 мкм в объеме материала. Микротвердость порошка составляет 3500–6500 МПа.

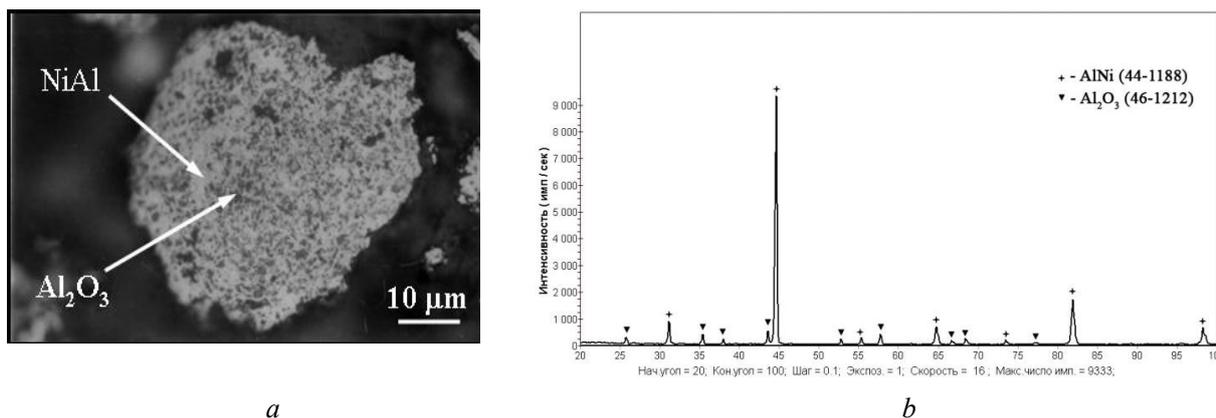


Рис. 1. Микроструктура (а) и рентгенограмма (b) СВС-порошка NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Fig. 1. Microstructure (a) and radiograph (b) of the SHS- powder of the NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> system

Полученный спек подвергали размолу в планетарной мельнице «Pulverisette 6» (Fritsch, Германия) в среде спирта при следующих параметрах: диаметр шаров 5 мм, соотношение массы шаров и порошка 20 : 1, скорость вращения ведущего вала импеллера 400 мин<sup>-1</sup>, время размола 30 мин. После измельчения частицы порошка NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> имеют средний размер 300–500 нм, при этом присутствуют отдельные частицы до 1 мкм, формируя агломераты осколочной формы размером 10–30 мкм (рис. 2) [20].

Образцы фрикционных дисков для испытаний изготавливали следующим образом: полученную шихту из исходных порошков наносили методом свободной насыпки на поверхность стальной основы с помощью специальной технологической оснастки, затем проводили предварительное спекание в среде диссоциированного аммиака при температуре 840 °С в течение 50 мин. Спеченную заготовку фрикционного диска подвергали пластической деформации (чеканке) пуансоном, имеющим на поверхности профиль в виде «сетки», для формирования на поверхности спеченного материала системы маслоотводящих каналов и пазов, а также получения пористости 12–18 %. Затем осуществляли окончательное спекание под давлением 0,1 МПа в среде диссоциированного аммиака, который содержит, %: Н<sub>2</sub> – 75, N<sub>2</sub> – 25 при температуре 840 °С в течение 3 ч.

Исследование триботехнических свойств фрикционного материала осуществляли на машине трения типа ИМ-58 по схеме «фрикционный диск–контртело» при следующих режимах: начальная скорость торможения – 10 м/с; удельная нагрузка – 4,0 МПа; момент инерции маховых масс –

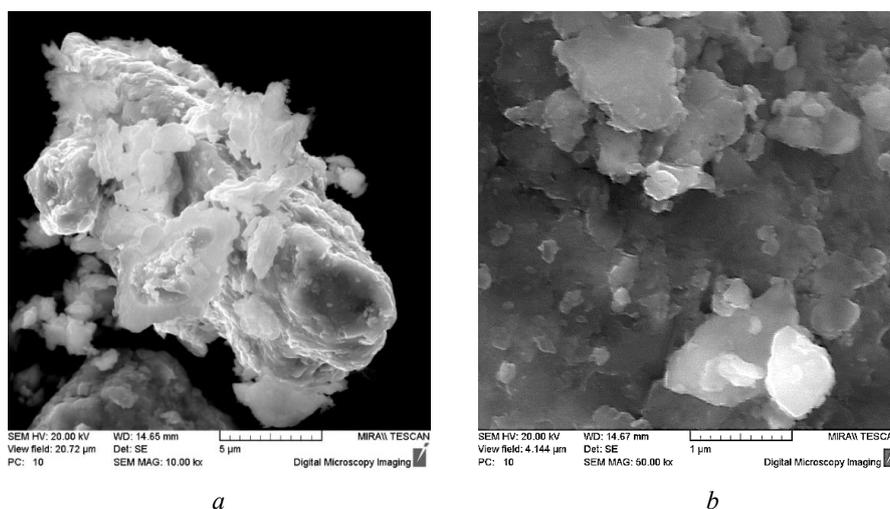


Рис. 2. Морфология поверхности частицы порошка NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> после измельчения

Fig. 2. Morphology of the surface of the particle of the powder of the NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> system

0,56 Н·м·с<sup>2</sup>; работа трения 27,5 кДж. В качестве контртела использовали диск из стали 65Г твердостью 260–320 НВ и шероховатостью рабочей поверхности Ra 0,7–0,8.

Исследование структуры осуществляли с помощью оптического микроскопа МЕФ-3 (Австрия). Морфологию поверхности трения фрикционного диска и его микроструктуру исследовали на сканирующем электронном микроскопе высокого разрешения MIRA (Чехия) с микрорентгено-спектральной приставкой «INCA 350» фирмы Oxford Instruments (Великобритания). Фазовый состав исследовали на рентгеновском дифрактометре Ultima IV (Rigaku) в  $\text{CuK}_\alpha$ -излучении при напряжении на рентгеновской трубке 40 кВ, анодном токе 40 мА. Для фазового анализа использовалась стандартная картотека PDF.

**Результаты и их обсуждение.** Триботехнические испытания фрикционного материала с добавками порошка системы  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  от 0,5–2,5 % показали рост значения динамического коэффициента трения (далее – коэффициент трения) с 0,040 до 0,051 (рис. 3, *a*). Одновременно с ростом коэффициента трения отмечается и рост износа фрикционного материала, так, при 0,5 % добавки износ составлял 4,2 мкм/км, тогда как при 2,5 % – 5,7 мкм/км.

Однозначного мнения о предельном значении величины износа фрикционного материала нет. Его значение определяется целевым назначением узла, условиями работы. Так, в [21] отмечается, что предельное значение износа фрикционного материала составляет 9 мкм. Оно рассчитано из условия, что за 1000 циклов включения фрикционного диска со средним диаметром 180 мм при 8 оборотах до полной остановки износ не должен превышать 40 мкм. Данное условие принято для тормозных узлов автотракторной техники отечественного производства. В технических условиях приведен перечень составов фрикционных материалов, для большинства из которых указано предельное значение износа не более 6 мкм/км<sup>1</sup>. По мнению авторов, данное значение величины износа применимо для ответственных узлов трения, работающих при постоянных знакопеременных нагрузках, обеспечении гарантийного периода эксплуатации не менее 15 тыс. моточасов. Таким образом, увеличение содержания добавки порошка системы  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  в составе фрикционного материала на основе меди более 2,0 % нецелесообразно, вызывая повышенный износ.

Как будет показано далее, изменения коэффициента трения и износа обусловлены совокупностью факторов, такими как структурные изменения оловянистой бронзы, частиц интерметаллида, изменением морфологии поверхностного слоя фрикционного материала.

Металлографические исследования показали, что после спекания структура базового состава фрикционного материала без добавки интерметаллида имеет средний размер зерна 10–15 мкм, отмечается наличие единичных зерен размером до 90 мкм (рис. 4, *a*).

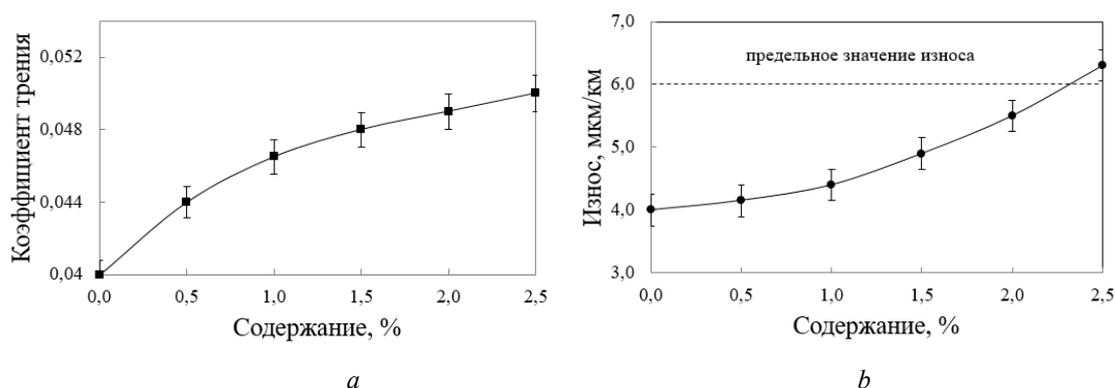


Рис. 3. Влияние содержания добавки порошка системы  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  в составе фрикционного материала на основе меди на значения коэффициента трения (*a*) и износа (*b*)

Fig. 3. Influence of the content of the additive of the powder of the  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  system as part of the copper-based friction material on the values of friction coefficient (*a*) and wear (*b*)

<sup>1</sup> Изделия фрикционные порошковые. Технические условия: ТУ ВУ 100219793.431–2015. Введ. 24.09.2015. Минск: Гос. науч. учр. «Ин-т порошк. метал. им. акад. О. В. Романа», Госстандарт, 2015. – 25 с.

При введении добавки порошка  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  происходит измельчение зерна бронзы. Так, при введении 1,5 мас. % добавки порошка интерметаллида средний размер зерна бронзы уменьшился до 3–5 мкм (рис. 4, *b*). Это может быть обусловлено тем, что равномерно распределенные включения добавки порошка интерметаллида препятствуют собирательной рекристаллизации при спекании, а также служат преградой для движения дислокаций. В [14; 15] отмечается, что равномерно распределенные частицы ультрадисперсных порошков блокируют рост зерна, позволяя тем самым повысить механические свойства. На рис. 4, *c* приведена морфология поверхности частицы сформированной бронзы с равномерно расположенными частицами интерметаллида. Сами частицы интерметаллида удерживаются на поверхности бронзы, имея локальные участки контакта размером 50–800 нм (рис. 4, *d*).

Результаты сканирующей электронной микроскопии высокого разрешения показали, что после спекания фрикционного материала по поверхности частицы  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  фиксируются структурные изменения. Данные изменения проявляются в формировании частиц осколочной формы белого цвета размером 50–150 нм (рис. 4, *d*). Рентгенофазовый анализ материала показал, что основные дифракционные пики соответствуют характерным пикам твердого раствора олова в меди, а также графита. Оставшиеся линии небольшой интенсивности могут принадлежать соединениям  $\text{AlCu}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{AlNi}$ ,  $\text{NiO}_{0,96}$ . С учетом небольшого содержания добавки интерметаллида в составе фрикционного материала (ниже предела чувствительности традиционного рентгенофазового анализа), заключение о структурных изменениях затруднено. Идентификация изменений требует привлечения методов исследований высокого разрешения. Однако можно сделать предположение, что присутствующий в среде диссоциированного аммиака кислород, а также кислород, формируемый при восстановлении медного порошка, создает условия для формирования и роста частиц оксида алюминия.

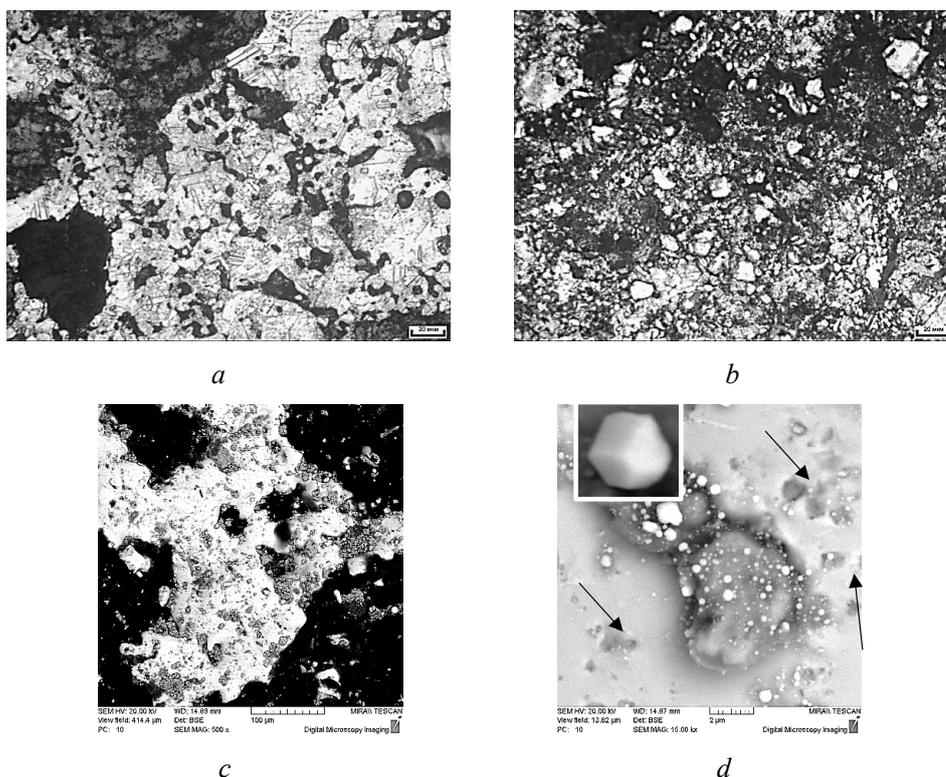


Рис. 4. Микроструктура (*a*, *b*) и морфология поверхности медной фазы фрикционного материала с частицами  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  (*c*, *d*): *a* – без добавки; *b* – с добавкой 1,5 % порошка  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ ; *c* – медная фаза с частицами  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$ ; *d* – частица  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$

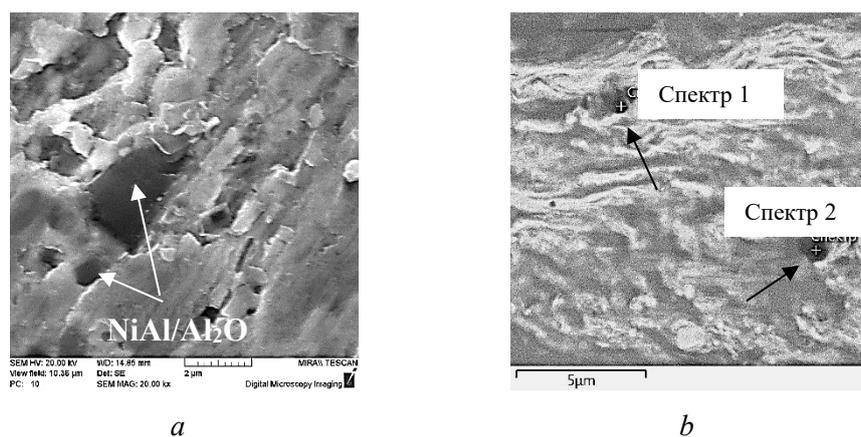
Fig. 4. Microstructure (*a*, *b*) and the morphology of the surface of the copper phase of the friction material with  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  particles (*c*, *d*): *a* – without additive; *b* – with an additive of a 1.5 % powder of the  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  system; *c* – copper phase with  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  particles; *d* –  $\text{NiAl}/\text{Al}_2\text{O}_3$  particle

Исследование морфологии поверхности трения фрикционного материала показало, что в нем присутствуют частицы интерметаллида, которые находятся как на поверхности, так и под слоем пластически деформированной оловянистой бронзы. Пластически деформированная бронза располагается в направлении трения и представляется как в виде единичных включений размером до 200 нм, так и протяженных участков, длиной до 10 мкм (рис. 5, *a*). Микрорентгеноспектральный анализ показал, что в данном слое присутствуют сера, фосфор и цинк, содержание которых не превышает 1,5 %. Данные элементы применяются в виде соединений в качестве добавок в масла, обеспечивая заданные свойства (противозадирные, противопитинговые, антиокислительные, противопенные).

Данные микрорентгеноспектрального анализа поверхности стального контртела показали присутствие внедренных частиц оксида алюминия, а также серы, фосфора и цинка (рис. 5, *b*), обнаруженных также на поверхности фрикционного материала.

Таким образом, на поверхности трения фрикционного материала, имеющего композиционную структуру с пластичной матрицей и твердыми включениями, формируется модифицированный слой, который и определяет триботехнические свойства пары трения, теплофизические свойства границы раздела, а также механизм износа. В [22; 23] отмечается, что для материалов антифрикционного назначения реализуется так называемый синергетический эффект, связанный с одновременным существованием в объеме поверхностного слоя трения твердых износостойких фаз и фаз со смазочными свойствами. Количественная оценка коэффициента трения и износа требует индивидуального знания трибологических характеристик твердых и смазочных фаз и величины градиентов концентраций твердых фаз. По мнению авторов, данный эффект может быть присущ и фрикционным материалам. Его описание требует более детального изучения, где необходимо учитывать особенности морфологических изменений порошков и структурообразования при спекании, формируемых контактных слоев фрикционного материала и контртела, энергетических эффектов.

Использование в составе фрикционного материала добавки порошка системы NiAl/Al<sub>2</sub>O приводит к снижению износа и шероховатости контртела. Так, после 1500 циклов испытаний при добавке в базовый состав 1,5 % интерметаллида шероховатость контртела (*Ra*) снизилась с 2,9 до 0,9 мкм (рис. 6). Эффект снижения шероховатости поверхности контртела установлен в [24], где в качестве добавки в состав фрикционного материала использовался порошок интерметаллида Ti–46Al–8Cr. Положительным эффектом использования добавки интерметаллида является фор-



Спектр	Al, %	P, %	S, %	Fe, %	Cu, %	Zn, %
1	21,0	2,6	1,2	72,3	0,2	2,7
2	29,4	1,1	0,6	67,7	0,3	0,9

Рис. 5. Морфология и результаты микрорентгеноспектрального анализа поверхности фрикционного материала (*a*) и контртела (*b*)

Fig. 5. Morphology and the results of the micro X-ray spectral analysis of the surface of friction material (*a*) and counter body (*b*)

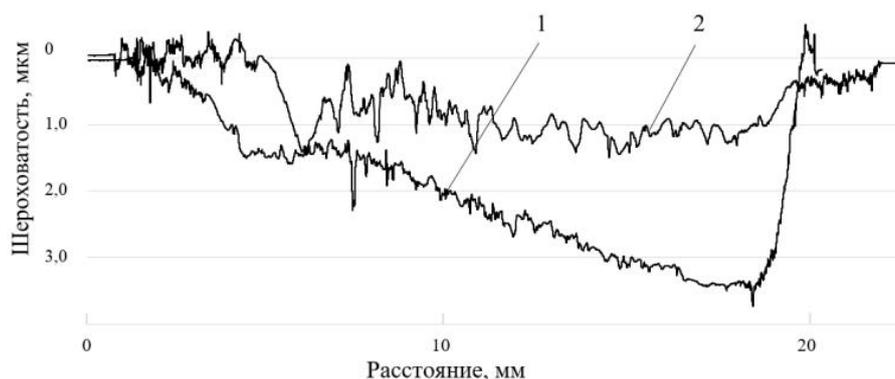


Рис. 6. Шероховатость поверхности контртела после 1500 циклов испытаний: 1 – базовый фрикционный материал; 2 – фрикционный материал с добавкой 1,5 % порошка системы NiAl/Al<sub>2</sub>O

Fig. 6. Roughness of the counter body surface after 1500 test cycles: 1 – base friction material; 2 – friction material with an additive of a 1.5 % powder of the NiAl/Al<sub>2</sub>O system

мирование равномерного износа поверхности контртела. Для базового состава фрикционного материала, не содержащего порошка интерметаллида, отмечается рост износа контртела от внутреннего диаметра к наружному (рис. 6, кривая 1). В случае использования 1,5 % NiAl/Al<sub>2</sub>O контртело изнашивается равномерно.

### Выводы

1. Введение добавки порошка системы NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в состав фрикционного материала на основе меди в интервале 0,5–2,5 % показало рост значения динамического коэффициента трения с 0,040 до 0,051, при этом износ составил от 4,2 до 5,7 мкм/км. Это может быть обусловлено совокупностью факторов, таких как структурные изменения оловянистой бронзы, частиц модифицирующего порошка интерметаллида, изменение морфологии поверхностного слоя фрикционного материала. Установлено, что на поверхности трения фрикционного материала и контртела формируется модифицированный слой, содержащий как частицы интерметаллида NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, так и производные компонентов в масле.

2. Добавка порошка NiAl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> приводит к уменьшению размера зерна формируемой при спекании оловянистой бронзы с 10–15 до 3–5 мкм, за счет изменения условий собирательной рекристаллизации. Установлено, что в процессе спекания фрикционного материала на поверхности порошка интерметаллида формируются частицы осколочной формы белого цвета размером 50–150 нм, предположительно оксида алюминия.

3. Добавление композиционного порошка на основе интерметаллида в состав фрикционного материала приводит к снижению шероховатости поверхности контртела. Так, после 1500 циклов испытаний при добавке в базовый состав 1,5 % интерметаллида шероховатость контртела снизилась с 2,9 до 0,9 мкм. Кроме того, добавка порошка обеспечивает равномерность износа поверхности контртела по всей площади трения.

### Список использованных источников

1. Влияние состава фрикционного материала на основе меди на его структуру и триботехнические свойства / А. В. Лешок [и др.] // Трение и износ. – 2019. – Т. 40, № 6. – С. 654–660.
2. Федорченко, И. М. Композиционные спеченные антифрикционные материалы / И. М. Федорченко, Л. И. Пугина. – Киев, 1980. – 404 с.
3. Ильющенко, А. Ф. Современные разработки в области порошковой металлургии для машиностроения / А. Ф. Ильющенко // Механика машин, механизмов и материалов. – 2012. – Т. 20–21, № 3–4. – С. 113–120.
4. Федорченко, И. М. Современные фрикционные материалы / И. М. Федорченко, В. М. Крячек, И. И. Панаиоти. – Киев, 1975. – 334 с.
5. Кипарисов, С. С. Порошковая металлургия / С. С. Кипарисов. – М., 1980. – 496 с.

6. Каблов, Е. Н. Стратегические направления развития материалов и технологий их переработки на период до 2030 года / Е. Н. Каблов // *Авиационные материалы и технологии*. – 2012. – № 5. – С. 7–17.
7. Структура и свойства интерметаллидных материалов с нанозональным упрочнением / Ю. Р. Колобова [и др.]. – М., 2008. – 328 с.
8. Интерметаллидный сплав – штамповый материал для изотермического деформирования / В. П. Бунтушкин [и др.] // *Авиационная промышленность*. – 1981. – № 9. – С. 48–49.
9. Применение микроструктурированных интерметаллидов в турбостроении. Часть I: Современное состояние и перспективы / А. В. Картавых [и др.] // *Материаловедение*. – 2012. – № 5. – С. 3–11.
10. Самодиффузия никеля по внутренним поверхностям раздела в жаропрочном сплаве на основе сложнолегированного интерметаллида Ni<sub>3</sub>Al / Е. Ю. Аристова [и др.] // *Металлы*. – 1996. – № 3. – С. 113–120.
11. Влияние структуры на механические свойства легированного интерметаллида Ni<sub>3</sub>Al / В. П. Бунтушкин [и др.] // *Металлы*. – 1995. – № 3. – С. 74–80.
12. Получение комплексно-легированных алюминидов никеля и лигатур сложного состава металлотермией оксидов металлов / В. В. Гостищев, С. Н. Химухин, Е. Д. Ким, Э. Х. Ри // *Цветные металлы*. – 2017. – № 10. – С. 79–84.
13. Основные принципы легирования интерметаллида Ni<sub>3</sub>Al при создании высокотемпературных сплавов / Е. Н. Каблов [и др.] // *Материаловедение*. – 1998. – № 7. – С. 13–16.
14. Каблов, Е. Н. Интерметаллиды на основе титана и никеля для изделий новой техники / Е. Н. Каблов, В. И. Лукин // *Автоматическая сварка*. – 2008. – № 11. – С. 76–82.
15. Высокотемпературный синтез интерметаллического соединения Ni<sub>3</sub>Al под давлением / В. Е. Овчаренко [и др.] // *Изв. высш. учебных заведений. Цветная металлургия*. – 2007. – № 4. – С. 63–69.
16. Итин, В. И. Высокотемпературный синтез интерметаллических соединений / В. И. Итин, Ю. С. Найбороденко. – Томск, 1989. – 214 с.
17. Получение сплавов на основе алюминидов никеля металлотермическим восстановлением оксидов / В. В. Гостищев [и др.] // *Вопр. материаловедения*. – 2013. – № 4 (76). – С. 30–34.
18. Шевцова, Л. И. Структура и механические свойства материалов на основе алюминидов никеля, полученных по технологии искрового плазменного спекания порошковых смесей / Л. И. Шевцова. – Новосибирск, 2015. – 200 с.
19. Влияние состава покрытий на основе интерметаллидов никеля на механизмы их изнашивания в условиях высокотемпературных трибоиспытаний / А. П. Уманский [и др.] // *Проблемы трибологии*. – 2012. – Т. 63, № 3. – С. 123–127.
20. Талако, Т. Л. Порошки, получаемые методом механоактивируемого самораспространяющегося высокотемпературного синтеза, для жаростойких, износостойких и радиопоглощающих газотермических покрытий / Т. Л. Талако. – Минск, 2015. – 398 с.
21. Триботехнические свойства порошкового фрикционного материала на основе меди с добавкой порошка железо-хромистого сплава / А. В. Лешок [и др.] // *Трение и износ*. – 2021. – Т. 42, № 1. – С. 5–12. <https://doi.org/10.32864/0202-4977-2021-42-2-128-135>
22. Щербаков, И. Н. Эффект синергизма антифрикционных и износостойких свойств в композиционных покрытиях с положительным градиентом концентрации твердой компоненты / И. Н. Щербаков, С. В. Попов, В. В. Иванов // *Международ. науч.-исслед. журн.* – 2014. – № 3 (22). – С. 21–22.
23. Иванов, В. В. Моделирование антифрикционных свойств однородных композиционных покрытий на поверхности стальных деталей узлов трения с учетом свойств твердой компоненты контртела / В. В. Иванов, И. Н. Щербаков // *Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Техн. науки*. – 2010. – № 6. – С. 79–82.
24. Триботехнические свойства спеченного фрикционного материала на основе меди с добавкой ультрадисперсного порошка алюминидов системы Ti–46Al–8Cr / А. Ф. Ильюшенко [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2021. – Т. 65, № 1. – С. 103–110. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-1-103-110>

## References

1. Leshok A. V., Dyachkova L. N., Ilyushchenko A. F., Rogovoy A. N., Alekseenko N. A. Influence of copper frictional material composition on structure and tribotechnical properties. *Journal of Friction and Wear*, 2019, vol. 40, no. 6, pp. 495–500. <https://doi.org/10.3103/s1068366619060151>
2. Fedorchenko I. M., Pugina L. I. *Composite sintered antifriction materials*. Kiev, 1980. 404 p. (in Russian).
3. Ilyushchenko A. F. Current developments in powder metallurgy for mechanical engineering. *Mekhanika mashin, mekhanizmov i materialov = Mechanics of Machines, Mechanisms and Materials*, 2012, vol. 20–21, no. 3–4, pp. 113–120 (in Russian).
4. Fedorchenko I. M., Kryachek V. M., Panaioti I. I. *Modern friction materials*. Kiev, 1975. 334 p. (in Russian).
5. Kiparisov S. S. *Powder metallurgy*. Moscow, 1980. 496 p. (in Russian).
6. Kablov E. N. Strategical areas of developing materials and their processing technologies for the period up to 2030. *Aviatsionnyye materialy i tekhnologii = Aviation Materials and Technologies*, 2012, no. 5, pp. 7–17 (in Russian).
7. Kolobov Yu. R., Kablov E. N., Kozlov E. V., Koneva N. A., Povarova K. B., Grabovetskaya G. P., Buntushkin V. P., Bazyleva O. A., Muboyadzhyan S. A., Budinovskii S. A. *Structure and properties of intermetallic materials with nanophase hardening*. Moscow, 2008. 328 p. (in Russian).
8. Buntushkin V. P., Kaplin Yu. I., Melimevker O. D., Melnikova M. N., Lyuminarskii A. A. Intermetallic alloy – die material for isothermal deformation. *Aviatsionnaya promyshlennost' [Aviation industry]*, 1981, no. 9, pp. 48–49 (in Russian).

9. Kartavykh A. V., Kaloshkin S. D., Cherdyn'tsev V. V., Gorshenkov M. V., Sviridova T. A., Borisova Yu. V., Senatov F. S., Maksimkin A. V. Use of microstructured intermetallides in turbine manufacture. Part I. Current state and prospects. *Materialovedenie = Materials Science*, 2012, no. 5, pp. 3–11 (in Russian).
10. Aristova E. Yu., Belova E. N., Bondarenko Yu. A., Buntushkin V. P., Ginzburg S. S., Kablov E. N., Nefedov V. G., Razumovski I. M. Self-diffusion of nickel over internal interface surfaces in a heat-resistant alloy based on hardly alloyed intermetallide Ni<sub>3</sub>Al. *Metally = Russian Metallurgy*, 1996, no. 3, pp. 113–120 (in Russian).
11. Buntushkin V. P., Bazyleva O. A., Povarova K. B., Kazanskaya N. K. Influence of structure on mechanical properties of Ni<sub>3</sub>Al alloyed intermetallide. *Metally = Russian Metallurgy*, 1995, no. 3, pp. 74–80 (in Russian).
12. Gostishchev V. V., Kim E. D., Ri E. Kh., Khimukhin S. N. Obtaining of complex-alloyed nickel aluminides and complex ligatures by metal oxides' metallothermy. *Tsvetnye metally [Non-ferrous metals]*, 2017, no. 10, pp. 79–84 (in Russian).
13. Kablov E. N., Buntushkin V. P., Morozova G. I., Bazyleva O. A. Main principles of alloying intermetallide Ni<sub>3</sub>Al in the creation of high-temperature alloys. *Materialovedenie = Materials Science*, 1998, no. 7, pp. 13–16 (in Russian).
14. Kablov E. N., Lukin V. I. Intermetallides based on titanium and nickel for products of new technology. *Avtomaticheskaya svarka = Automatic welding*, 2008, no. 11, pp. 76–82 (in Russian).
15. Ovcharenko V. E., Lapshin O. V., Boyangin E. N., Ramazanov I. S., Chudinov V. A. High-temperature synthesis of the Ni<sub>3</sub>Al intermetallic compound under pressure. *Russian Journal of Non-Ferrous Metals*, 2007, vol. 48, no. 4, pp. 297–302.
16. Itin V. I., Nayborodenko Yu. S. *High-Temperature Synthesis of Intermetallic Compounds*. Tomsk, 1989. 214 p. (in Russian).
17. Gostishchev V. V., Khimukhin S. N., Teslina M. A., Astapov I. A. Production of alloys based on nickel aluminides by metallothermic reduction of oxides. *Voprosy materialovedeniya = Materials Science Issues*, 2013, no. 4 (76), pp. 30–34 (in Russian).
18. Shevtsova L. I. *Structure and Mechanical Properties of Materials Based on Nickel Aluminide Obtained by the Technology of Spark Plasma Sintering of Powder Mixtures*. Novosibirsk, 2015. 200 p. (in Russian).
19. Umanskii A., Polyarus E., Kostenko A., Terent'ev A. The influence of nickel intermetallic coatings content on wear mechanisms in term of high-temperature friction. *Problems of Tribology*, 2012, vol. 65, no. 3, pp. 123–127 (in Russian).
20. Talako T. L. *Powders obtained by mechanically activated self-propagating high-temperature synthesis for heat-resistant, wear-resistant and radio-absorbing gas-thermal coatings*. Minsk, 2015. 398 p. (in Russian).
21. Leshok A. V., Ilyushchanka A. P., Dyachkova L. N., Pinchuk T. I. Tribotechnical properties of a copper-based powder friction material with the addition of iron-chromium alloy powder. *Journal of Friction and Wear*, 2021, vol. 42, no. 1, pp. 1–6. <https://doi.org/10.3103/s1068366621010049>
22. Shcherbakov I. N., Popov S. V., Ivanov V. V. Synergism effect of the anti-frictional properties and firmness to wear into compositional coatings with positive concentration gradient of the solid component. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal = International Research Journal*, 2014, no. 3 (22), pp. 21–22 (in Russian).
23. Ivanov V. V., Shcherbakov I. N. Modeling of the antifrictional properties of homogeneous compositional covers with taking into consideration the solid component of the counter-body. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Severo-Kavkazskii Region. Tekhnicheskie Nauki = University News. North Caucasian Region. Technical Sciences*, 2010, no. 6, pp. 79–82 (in Russian).
24. Ilyushchanka A. Ph., Talako T. L., Leshok A. V., Letsko A. I., Pinchuk T. I. Tribotechnical properties of sintered friction material based on copper with the additives of the ultrafine powder of aluminide of Ti–46Al–8Cr system. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 1, pp. 103–110 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-1-103-110>

### Информация об авторах

*Ильющенко Александр Федорович* – академик, д-р техн. наук, профессор, директор. Институт порошковой металлургии им. акад. О. В. Романа (ул. Платонова, 41, 220005, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexil@mail.belpak.by.

*Талако Татьяна Леонидовна* – д-р техн. наук, доцент, заместитель академика-секретаря. Национальная академия наук Беларуси (пр. Независимости, 66, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: talako@presidium.bas-net.by.

*Лешок Андрей Валерьевич* – канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник. Институт порошковой металлургии им. акад. О. В. Романа (ул. Платонова, 41, 220005, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sdilav@tut.by.

*Лецко Андрей Иванович* – канд. техн. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт порошковой металлургии им. акад. О. В. Романа (ул. Платонова, 41, 220005, Минск, Республика Беларусь). E-mail: letsko@tut.by.

*Пинчук Татьяна Иосифовна* – науч. сотрудник. Институт порошковой металлургии им. акад. О. В. Романа (ул. Платонова, 41, 220005, Минск, Республика Беларусь). E-mail: iscentr@tut.by.

### Information about the authors

*Ilyushchanka Alexander Ph.* – Academician, D. Sc. (Engineering), Professor, Director. Institute of Powder Metallurgy named after Academician O. V. Romana (41, Platonov Str., 220005, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexil@mail.belpak.by.

*Talako Tatyana L.* – D. Sc. (Engineering), Associate Professor, Deputy Academician-Secretary. National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: talako@presidium.bas-net.by.

*Leshok Andrey V.* – Ph. D. (Engineering), Senior Researcher. Institute of Powder Metallurgy named after Academician O. V. Romana (41, Platonov Str., 220005, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sdilav@tut.by.

*Letsko Andrey I.* – Ph. D. (Engineering), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Powder Metallurgy named after Academician O. V. Romana (41, Platonov Str., 220005, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: letsko@tut.by.

*Pinchuk Tatyana I.* – Researcher. Institute of Powder Metallurgy named after Academician O. V. Romana (41, Platonov Str., 220005, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: iscentr@tut.by.

**АГРАРНЫЕ НАУКИ****AGRARIAN SCIENCES**

УДК 636.2.082.12.034

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-122-128>

Поступило в редакцию 21.01.2022

Received 21.01.2022

**Академик В. К. Пестис, В. В. Пешко, О. А. Епишко, А. А. Ситько***Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Республика Беларусь***ПРИМЕНЕНИЕ ДНК-ТЕСТИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА  
ПО ГЕНАМ LTF И MBL1 ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ  
ПРОИЗВОДСТВА МОЛОКА**

**Аннотация.** У коров белорусской черно-пестрой породы, содержащихся в СПК им. И. П. Сенько, установлен полиморфизм генов лактоферрина и манноза-связывающего лектина. Выявлены генотипы LTF<sup>AA</sup>, LTF<sup>AB</sup> и MBL1<sup>TT</sup>, MBL1<sup>TC</sup>, MBL1<sup>CC</sup>. Изучена молочная продуктивность (удой, жирномолочность, количество молока базисной жирности), количество соматических клеток в молоке и рассчитана экономическая эффективность производства молока от коров с различными генотипами по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина. Установлено, что прибыль у коров с генотипом LTF<sup>AA</sup> была на 7,91 руб. выше, чем у коров с генотипом LTF<sup>AB</sup>, а у животных с генотипом MBL1<sup>TC</sup> – на 24,69–191,85 руб. больше, чем у особей с генотипами MBL1<sup>CC</sup> и MBL1<sup>TT</sup>, а более высокая прибыль на 1 голову была получена от коров с генотипами LTF<sup>AB</sup>MBL1<sup>CC</sup> и LTF<sup>AA</sup>MBL1<sup>TC</sup>, что составило 3249,49 и 2855,40 руб. соответственно.

**Ключевые слова:** ген лактоферрина, ген манноза-связывающего лектина, количество соматических клеток, экономическая эффективность

**Для цитирования.** Применение ДНК-тестирования крупного рогатого скота по генам LTF и MBL1 для повышения эффективности производства молока / В. К. Пестис [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 1. – С. 122–128. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-122-128>

**Academician Vitold K. Pestis, Valentin V. Peshko, Olga A. Epishko, Anastasia A. Sitko***Grodno State Agrarian University, Grodno, Republic of Belarus***USING OF DNA-TESTING OF CATTLE FOR THE LTF AND MBL1 GENES TO INCREASE  
THE MILK PRODUCTION EFFICIENCY**

**Abstract.** In cows of the Belarusian black-motley breed, the polymorphism of genes for lactoferrin and mannose-binding lectin was established. The genotypes LTF<sup>AA</sup>, LTF<sup>AB</sup> and MBL1<sup>TT</sup>, MBL1<sup>TC</sup>, MBL1<sup>CC</sup> were identified. The milk productivity (yield, fat content, amount of milk of basic fat content), the number of somatic cells in milk were studied, and the economic efficiency of milk production from cows with different genotypes for the genes of lactoferrin and mannose-binding lectin was calculated. It was found that the profit in cows with the LTF<sup>AA</sup> genotype was 7.91 rubles higher than in cows with the LTF<sup>AB</sup> genotype, in individuals with the MBL1<sup>CC</sup> and MBL1<sup>TT</sup> genotypes, and a higher profit per head was obtained from cows with the LTF<sup>AB</sup>MBL1<sup>CC</sup> and LTF<sup>AA</sup>MBL1<sup>TC</sup> genotypes, which amounted to 3249.49 and 2855.40 rubles respectively.

**Keywords:** lactoferrin gene, mannose-binding lectin gene, somatic cell count, economic efficiency

**For citation.** Pestis V. K., Peshko V. V., Epishko O. A., Sitko A. A. Using of DNA-testing of cattle for the LTF and MBL1 genes to increase the milk production efficiency. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 1, pp. 122–128 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-1-122-128>

**Введение.** В Республике Беларусь за последние годы уровень продуктивности молочного крупного рогатого скота увеличился почти вдвое, вследствие чего особо актуальной стала проблема заболеваемости маститом. Ежегодно в хозяйствах страны по причинам, связанным с болезнями молочной железы, выбраковывается до 17 % животных. Распространение и развитие

маститы вызывает снижение экономической составляющей молочного скотоводства и включает в себя уменьшение молочной продуктивности, ухудшение качества и технологических свойств молока, увеличение финансовых затрат на профилактику и лечение заболевания, уменьшение фертильности коров, увеличение нетехнологического выбытия высокопродуктивных животных [1].

Анализ эпизоотологической ситуации в стаде можно провести по такому показателю, как определение количества соматических клеток в молоке, которые присутствуют в молочной железе и молоке и представляют собой отмершие эпителиальные, белые кровяные (лейкоциты) и другие клетки организма, участвующие в регуляции иммунного статуса животных. Число соматических клеток в молоке находится в прямой зависимости от возраста животных, уровня и качества кормления, физиологического состояния, однако основополагающим фактором увеличения их количества является воспаление молочной железы.

Начиная с 1960-х годов количество соматических клеток в молоке признано наилучшим индикатором прогнозирования наличия инфекции в молочной железе и в зависимости от пропорции его фракционного состава (лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов и др.) можно судить о степени воспалительного процесса в вымени. Анализ количества соматических клеток в молоке позволяет провести оценку санитарно-гигиенического качества полученного молока и является индикатором здоровья вымени коров. Таким образом, данный показатель может использоваться в качестве диагностического инструмента, позволяющего проводить раннее выявление различных форм мастита.

Мастит находится под полигенным характером наследования множества генов, которые контролируют этот признак в различных локусах. Поэтому изучение маркерных генов, имеющих влияние на резистентность к маститам, носит прикладной характер [2].

Проведенные исследования М. S. Lund, J. Ogorovc, O. M. Fedota и соавт. показывают возможность использования генетических маркеров для ведения селекции на устойчивость к маститам крупного рогатого скота. Выявлено около 16 потенциальных генов-кандидатов (BoLA-DRB3, IL8RA TLR4, MBL1, C5AR1, CD14, IFNG, IL1B, IL6, IL8, LBP, SAA3, TLR2, TLR4, TNF, LTF, B-4 defensin), использование которых в селекции делает возможным мониторинг резистентности коров к маститу [3–9].

В настоящее время большое внимание уделяется изучению влияния гена лактоферрина (LTF) и манноза-связывающего лектина (MBL1) у крупного рогатого скота на устойчивость к маститу.

Таким образом, использование в селекционной работе генов-маркеров устойчивости к маститу позволит проводить отбор животных и создавать стада, невосприимчивые к данному заболеванию.

Цель работы – изучение эффективности производства молока от коров белорусской черно-пестрой породы с различными генотипами по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проведены в учреждении образования «Гродненский государственный аграрный университет» в отраслевой научно-исследовательской лаборатории ДНК-технологий.

Объектом исследований являлся генетический материал (ушной выщип) коров белорусской черно-пестрой породы, содержащихся в СПК им. И. П. Сенько Гродненского района, Гродненской области ( $n = 210$ ).

ДНК-диагностику генотипов по гену лактоферрина и манноза-связывающего лектина проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Ядерную ДНК выделяли перхлоратным методом. Основные растворы для выделения ДНК, амплификации и рестрикции готовили по [10].

Для амплификации участка гена LTF использовали следующие праймеры:

F5'-GCCTCATGACAACCTCCACAC-3';

R5'-CAGGTTGACACATCGGTTGAC-3'.

ПЦР-программа включает в себя следующий режим: «горячий старт» при 94 °С в течение 5 мин, 35 циклов: денатурация при 94 °С – 45 с, отжиг праймеров при 62 °С – 45 с, синтез при температуре 72 °С – 45 с; далее элонгация при 72 °С – 5 мин.

Реакционная смесь для проведения амплификации по гену LTF готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: 1,5 мкл буфер, 0,5 мкл MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл dNTP's, 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 19,5 мкл H<sub>2</sub>O, 100–200 нг/мкл геномной ДНК.

Детекцию результатов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле (при напряжении 120 В). Длина продукта амплификации составила 300 п. о.

Для генотипирования по локусу гена лактоферрина использовали эндонуклеазу EcoRI, которая имеет сайт рестрикции GAATC/C и продукт амплификации с длиной 301 п. н. Рестрикция проводится при температуре 37 °С в течение 16 ч. Результат расщепления продукта амплификации с помощью эндонуклеазы EcoRI проводили в 3 %-ном агарозном геле при напряжении 130 В в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия на системе геле-документирования Gel Doc RX+ (BIORAD) и идентифицировали следующие генотипы: LTF<sup>AA</sup> – 300 п. н., LTF<sup>AB</sup> – 300, 200, 100 п. н.

Для амплификации участка гена MBL1 использовали следующие праймеры:

MBL1f: 5'-GTGGTGGCAAATGTTGGCTAAAC-3' (23 н.);

MBL1r: 5'-TGGCTCTCCSTTTTCTCCSTT-3' (21 н.).

ПЦР-программа включала в себя следующий режим: «горячий старт» при 94 °С в течение 5 мин, 35 циклов: денатурация при 94 °С – 30 с, отжиг праймеров при 62 °С – 45 с, синтез при температуре 72 °С – 45 с; далее элонгация при 72 °С в течение 5 мин.

Реакционная смесь для проведения амплификации по гену MBL1 готовилась в объеме 25 мкл и включала следующие компоненты: 1,5 мкл буфер, 0,5 мкл MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл dNTP's, 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 19,5 мкл H<sub>2</sub>O, 100–200 нг/мкл геномной ДНК.

Детекцию результатов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле (при напряжении 120 В). Длина продукта амплификации составила 255 п. о.

Для генотипирования по локусу манноза-связывающего лектина использовали эндонуклеазу HaeIII, которая имеет сайт рестрикции GG↑CC, CC↓GG и продукт амплификации с длиной 255 п. н. Рестрикция проводилась при температуре 37 °С в течение 16 ч. При расщеплении продукта амплификации с помощью эндонуклеазы HaeIII были идентифицированы следующие генотипы: MBL1<sup>TT</sup> – 255 п. н., MBL1<sup>CC</sup> – 178,77 п. н. и MBL1<sup>TC</sup> – 255, 178, 77 п. н.

Молочную продуктивность подопытных коров определяли при помощи проведения контрольных доений. У животных с различными генотипами по изучаемым генам учитывали удой, жирномолочность за 305 дней по 3 лактации, содержание соматических клеток в молоке.

Для расчета экономической эффективности производства молока от коров с различными генотипами по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина учитывали: средний удой животных по третьей лактации, среднее содержание жира в молоке и базисную жирномолочность (3,6 %), себестоимость производства молока и цену его реализации в хозяйстве, где проводились исследования по состоянию на 1 ноября 2021 г.

**Результаты и их обсуждение.** В настоящее время в нашей стране практически отсутствует характеристика генофонда сельскохозяйственных животных по полиморфизму генов, связанных не только с показателями молочной продуктивности, но и участвующих в поддержании здоровья животных. Однако такая характеристика необходима для рационального подхода к формированию генофонда сельскохозяйственных животных с более высоким качеством молока и уровнем здоровья в стаде.

На рис. 1–3 представлена частота встречаемости аллелей и генотипов, а также частота встречаемости комплексных генотипов по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина в популяции коров белорусской черно-пестрой породы.

В результате проведенных исследований установлено, что соотношение частот аллеля LTF<sup>A</sup> и LTF<sup>B</sup> в популяции коров СПК им. И. П. Сенько (рис. 1) находилось на уровне 0,819 и 0,181. Особей с генотипами LTF<sup>AA</sup> и LTF<sup>AB</sup> было 63,8 % (134 головы) и 36,2 % (76 голов) соответственно. Животных с генотипом LTF<sup>BB</sup> не выявлено.

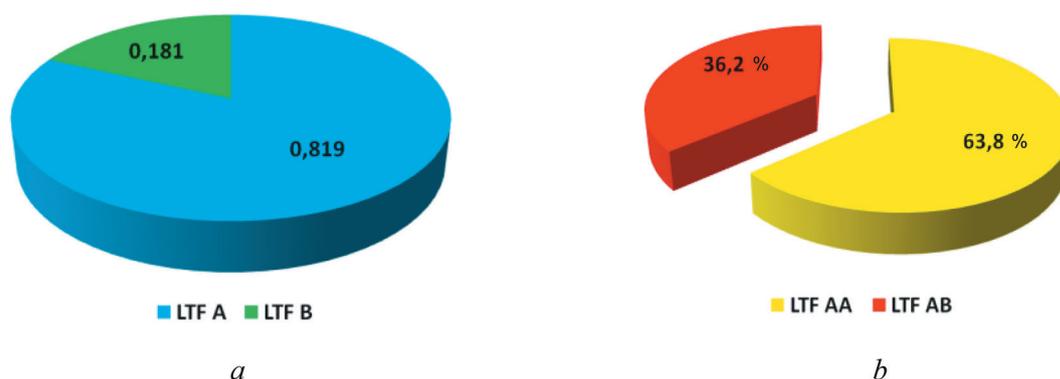


Рис. 1. Частота встречаемости аллелей (a) и генотипов (b) по гену лактоферрина в популяции коров белорусской черно-пестрой породы

Fig. 1. The frequency of occurrence of alleles (a) and genotypes (b) for the lactoferrin gene in the population of cows of the Belarusian black-motley breed

Данные рис. 2 показывают, что соотношение частот аллеля  $MBL1^T$  и  $MBL1^C$  в популяции коров СПК им. И. П. Сенько находилось на уровне 0,464 и 0,536. Генотип  $MBL1^{TT}$  выявлен у 10,5 % животных (22 головы),  $MBL1^{TC}$  – у 86,2 % (181 голова) и  $MBL1^{CC}$  – у 3,3 % (7 голов).

Известно, что формирование признаков молочной продуктивности имеет полигенный характер. В связи с этим была изучена частота встречаемости комплексных генотипов по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина у коров белорусской черно-пестрой породы (рис. 3).



Рис. 2. Частота встречаемости аллелей (a) и генотипов (b) по гену манноза-связывающего лектина в популяции коров белорусской черно-пестрой породы

Fig. 2. The frequency of occurrence of alleles (a) and genotypes (b) for the mannose-binding lectin gene in the population of cows of the Belarusian black-motley breed

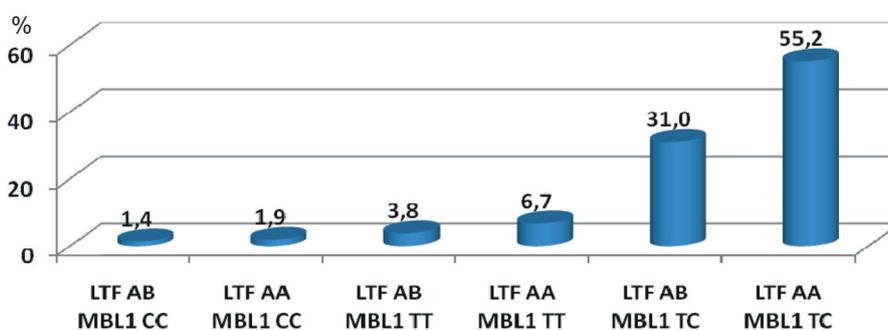


Рис. 3. Частота встречаемости комплексных генотипов по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина в популяции коров белорусской черно-пестрой породы

Fig. 3. The frequency of occurrence of complex genotypes for the genes of lactoferrin and mannose-binding lectin in the population of cows of the Belarusian black-motley breed

Данные рис. 3 показывают, что из всего изучаемого поголовья было выявлено 6 групп комплексных генотипов. Больше всего животных имели генотип  $LTF^{AA}MBL1^{TC}$  (55,2 %, или 116 голов) и генотип  $LTF^{AB}MBL1^{TC}$  (31,0 %, или 65 голов). Количество особей с другими комплексными генотипами составило от 1,4 % (3 головы) до 6,7 % (14 голов).

При расчете стоимости одного килограмма молока исходили из затрат и расходов на его производство (себестоимость), в том числе стоимость кормов, оплата труда, транспортные услуги, сложившиеся на момент проведения исследований в СПК им. И. П. Сенько. Известно, что с увеличением количества и повышением качества получаемого молока, при сохранении прежних затрат на его производство, снижается его себестоимость и, тем самым, увеличивается прибыль предприятия (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Экономическая эффективность производства молока от коров с различными генотипами по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина

T a b l e 1. Economic efficiency of milk production from cows with different genotypes for lactoferrin and mannose-binding lectin genes

Генотип Genotype	Удой, кг Milk yield, kg	Количество соматических клеток, тыс/мл The number of somatic cells, thousand/ml	Содержание жира, % Fat content, %	Удой в пересчете на базисную жирномолочность, кг Milk yield in terms of basic fat content, kg	Стоимость молока, руб. The cost of milk, rub.	Себестоимость молока, руб. Cost of milk, rub.	Прибыль, руб. Profit, rub.
$LTF^{AA}$	8932,2	174,6	3,71	9205,1	7726,78	4896,21	2830,58
$LTF^{AB}$	8883,3	241,0	3,72	9179,4	7705,20	4882,53	2822,67
$MBL1^{TC}$	8955,6	198,1	3,72	9254,1	7767,91	4922,27	2845,64
$MBL1^{TT}$	8558,9	203,2	3,63	8630,2	7244,21	4590,42	2653,79
$MBL1^{CC}$	8974,4	197,6	3,68	9173,8	7700,51	4879,56	2820,95

Данные табл. 1 указывают на то, что в СПК им. И. П. Сенько при себестоимости 1 кг молока 0,5319 руб. и цене реализации 0,8394 руб. прибыль у коров с генотипом  $LTF^{AA}$  была на 7,91 руб. выше, чем у коров с генотипом  $LTF^{AB}$ , а у животных с генотипом  $MBL1^{TC}$  – на 24,69–191,85 руб. больше, чем у особей с генотипами  $MBL1^{CC}$  и  $MBL1^{TT}$ .

Отмечено более высокое содержание соматических клеток в молоке коров с генотипом  $LTF^{AB}$  (на 66,4 тыс/мл), чем у сверстниц с генотипом  $LTF^{AA}$ . Животные с генотипом  $MBL1^{CC}$  имели удой на 18,8–415,5 кг выше, а количество соматических клеток на 0,5–5,6 тыс/мл ниже, по сравнению со сверстницами с генотипами  $MBL1^{TT}$  и  $MBL1^{TC}$ .

В табл. 2 представлена экономическая эффективность производства молока от коров с различными комплексными генотипами по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина.

Т а б л и ц а 2. Экономическая эффективность производства молока от коров с комплексным генотипом по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина

T a b l e 2. Economic efficiency of milk production from cows with a complex genotype for lactoferrin and mannose-binding lectin genes

Генотип Genotype	Удой, кг Milk yield, kg	Количество соматических клеток, тыс/мл The number of somatic cells, thousand/ml	Содержание жира, % Fat content, %	Удой в пересчете на базисную жирномолочность, кг Milk yield in terms of basic fat content, kg	Стоимость молока, руб. The cost of milk, rub.	Себестоимость молока, руб. Cost of milk, rub.	Прибыль, руб. Profit, rub.
$LTF^{AA}MBL1^{TT}$	8691,5	211,7	3,62	8739,79	7336,18	4648,69	2687,48
$LTF^{AA}MBL1^{TC}$	8986,3	169,4	3,72	9285,84	7794,54	4939,14	2855,40
$LTF^{AA}MBL1^{CC}$	8216,5	193,0	3,58	8170,85	6858,61	4346,08	2512,54
$LTF^{AB}MBL1^{TT}$	8236,8	188,4	3,65	8351,20	7010,00	4442,00	2567,99
$LTF^{AB}MBL1^{TC}$	8901,0	249,3	3,72	9197,70	7720,55	4892,26	2828,29
$LTF^{AB}MBL1^{CC}$	9985,0	203,7	3,81	10567,46	8870,32	5620,83	3249,49

Анализ экономической эффективности производства молока от коров с различными комплексными генотипами по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина показал, что более высокая прибыль на 1 голову была получена от животных с генотипами LTF<sup>AB</sup>MBL1<sup>CC</sup> и LTF<sup>AA</sup>MBL1<sup>TC</sup>, что составило 3249,49 и 2855,40 руб. соответственно.

Установлено более низкое содержание соматических клеток у коров с генотипом LTF<sup>AA</sup>MBL1<sup>TC</sup> (169,4 тыс./мл), что на 34,3 тыс./мл ниже, чем у сверстниц с генотипом LTF<sup>AB</sup>MBL1<sup>CC</sup> и на 79,9 тыс./мл ниже, чем у животных с генотипом LTF<sup>AB</sup>MBL1<sup>TC</sup>.

**Заключение.** Таким образом, для повышения устойчивости поголовья крупного рогатого скота белорусской черно-пестрой породы к маститу и экономической эффективности производства молока рекомендуем использовать ДНК-диагностику животных по генам лактоферрина и манноза-связывающего лектина и проводить селекционные мероприятия на увеличение частоты встречаемости аллелей LTF<sup>A</sup> и MBL1<sup>C</sup> и генотипа LTF<sup>AA</sup>.

### Список использованных источников

1. Лучко, И. Т. Воспаление молочной железы у коров (этиология, патогенез, диагностика, лечение и профилактика) / И. Т. Лучко. – Гродно, 2019. – 183 с.
2. Genetic basis of mastitis resistance in dairy cattle – a review / G. Sender [et al.] // *Ann. Animal. Science.* – 2013. – Vol. 13, N 4. – P. 663–673. <https://doi.org/10.2478/aoas-2013-0043>
3. Яковлев, А. Ф. Связь молекулярно-генетических маркеров с продолжительностью использования молочных коров / А. Ф. Яковлев, Н. В. Деметьева, В. П. Терлецкий // *Генетика и разведение животных.* – 2014. – № 4. – С. 3–7.
4. Confirmation and fine-mapping of clinical mastitis and somatic cell score QTL in Nordic Holstein cattle / G. Sahana [et al.] // *Animal Genetics.* – 2013. – Vol. 44, N 6. – P. 620–626. <https://doi.org/10.1111/age.12053>
5. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis / J. Ogorevc [et al.] // *Animal Genetics.* – 2009. – Vol. 40, N 6. – P. 832–851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x>
6. Differential expression of immune response genes associated with subclinical mastitis in dairy buffaloes / F. Tanamati [et al.] // *Animal.* – 2019. – Vol. 13, N 8. – P. 1651–1657. <https://doi.org/10.1017/s1751731118003324>
7. Genetics of resistance to clinical mastitis in cows: a review / O. M. Fedota [et al.] // *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety.* – 2015. – Vol. 1, N 4. – P. 22–27.
8. Mastitis in Dairy Animals: An Update / A. K. Srivastava [et al.]. – India, 2015. – 403 p.
9. Ogorevc, J. An integrated map of cattle candidate genes for mastitis: a step forward to new genetic markers / J. Ogorevc, T. Kunej, P. Dovc // 16th International Symposium “Animal Science Days”. – Strunjan, Slovenia, 2008. – P. 85–91.
10. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М., 1984. – 480 с.

### References

1. Luchko I. T. *Inflammation of the mammary gland in cows (etiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention)*. Grodno, 2019. 183 p. (in Russian).
2. Sender G., Korwin-Kossakowska A., Pawlik A., Hameed K. G. A., Oprządek J. Genetic basis of mastitis resistance in dairy cattle – a review. *Annals of Animal Science*, 2013, vol. 13, no. 4, pp. 663–673. <https://doi.org/10.2478/aoas-2013-0043>
3. Yakovlev A. F., Dementieva N. V., Terletsii V. P. Relationship molecular genetic markers with longevity of dairy cows. *Genetika i razvedenie zhivotnykh = Genetics and of Breeding Animal*, 2014, no. 4, pp. 3–7 (in Russian).
4. Sahana G., Gulbrandtsen B., Thomsen B., Lund M. S. Confirmation and fine-mapping of clinical mastitis and somatic cell score QTL in Nordic Holstein cattle. *Animal Genetics*, 2013, vol. 44, no. 6, pp. 620–626. <https://doi.org/10.1111/age.12053>
5. Ogorevc J., Kunej T., Razpet A., Dovc P. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*, 2009, vol. 40, no. 6, pp. 832–851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x>
6. Tanamati F., Stafuzza N. B., Gimenez D. F. J., Stella A. A. S., Santos D. J. A., Ferro M. I. T., Albuquerque L. G., Gasparino E., Tonhati H. Differential expression of immune response genes associated with subclinical mastitis in dairy buffaloes. *Animal*, 2019, vol. 13, no. 8, pp. 1651–1657. <https://doi.org/10.1017/s1751731118003324>
7. Fedota O. M., Ruban S. Yu., Bolotin V. I., Klochko I. O. Genetics of resistance to clinical mastitis in cows: a review. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 2015, vol. 1, no. 4, pp. 22–27.
8. Srivastava A. K., Kumaresan A., Manimaran A., Shiv Prasad. *Mastitis in Dairy Animals: An Update*. India, 2015. 403 p.
9. Ogorevc J., Kunej T., Dovc P. An integrated map of cattle candidate genes for mastitis: a step forward to new genetic markers. *16th International Symposium “Animal Science Days”*. Strunjan, Slovenia, 2008, pp. 85–91.
10. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor lab., 1982. 2230 p.

**Информация об авторах**

*Пестис Витольд Казимирович* – академик, д-р сельскохозяйственных наук, профессор, ректор. Гродненский государственный аграрный университет (ул. Терешковой, 28, 230008, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ggau@ggau.by.

*Пешко Валентин Валентинович* – канд. сельскохозяйственных наук, доцент, первый проректор. Гродненский государственный аграрный университет (ул. Терешковой, 28, 230008, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: valik-11@mail.ru.

*Епишко Ольга Александровна* – канд. сельскохозяйственных наук, доцент. Гродненский государственный аграрный университет (ул. Терешковой, 28, 230008, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ggau@ggau.by.

*Ситько Анастасия Александровна* – ветеринарный врач. Гродненский государственный аграрный университет (ул. Терешковой, 28, 230008, Гродно, Республика Беларусь). E-mail: ggau@ggau.by.

**Information about the authors**

*Pestis Vitold K.* – Academician, D. Sc. (Agrarian), Professor, Rector. Grodno State Agrarian University (28, Tereshkova Str., 230008, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: ggau@ggau.by.

*Peshko Valentin V.* – Ph. D. (Agrarian), Associate Professor, First Vice-Rector. Grodno State Agrarian University (28, Tereshkova Str., 230008, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: valik-11@mail.ru.

*Epishko Olga A.* – Ph. D. (Agrarian), Associate Professor. Grodno State Agrarian University (28, Tereshkova Str., 230008, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: ggau@ggau.by.

*Sitko Anastasia A.* – Veterinarian. Grodno State Agrarian University (28, Tereshkova Str., 230008, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: ggau@ggau.by.