

ДОКЛАДЫ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

2024. Т. 68. № 6

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

В. Л. Гурский

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

А. В. Кильчевский

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

С. А. Чижик

первый 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

Т. И. Адуло, Институт философии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

В. В. Азаренко, Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

О. Ю. Баранов, Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

В. Г. Богдан, Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

М. А. Богдасаров, Брестский государственный университет имени А. С. Пушкина, 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

А. А. Волчек, Брестский государственный технический университет, Республика Беларусь

С. В. Гапоненко, Институт физики имени Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь

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

А. Е. Дайнеко, Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований, Республика Беларусь

Н. Желев, Абергейский университет, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии

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

А. И. Иванец, Министерство образования Республики Беларусь, Республика Беларусь

- Н. С. Казак**, Национальная академия наук Беларуси, Республика Беларусь
Н. Н. Казанский, Институт лингвистических исследований Российской академии наук, Российская Федерация
И. А. Карпов, Белорусский государственный медицинский университет, Республика Беларусь
С. П. Карпов, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Российская Федерация
А. А. Коваленя, Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
Э. И. Коломиец, Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии», 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. Г. Левашкевич, Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
Н. М. Литвинко, Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
В. Ф. Логиннов, Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
П. С. Лопух, Белорусский государственный университет, Республика Беларусь
В. К. Лукашевич, Институт философии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
С. А. Лысенко, Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
Г. Маркрам, Институт мозга, Центр неврологии и технологии Швейцарского федерального института технологий, Швейцарская Конфедерация
А. А. Махнач, Институт геологии Научно-производственного центра по геологии, Республика Беларусь
В. А. Орлович, Институт физики имени 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. П. Русак, Институт языкознания имени Якуба Коласа Центра исследований белорусской культуры, языка и литературы Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
И. В. Саверченко, Институт литературоведения имени Янки Купалы Центра исследований белорусской культуры, языка и литературы Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
В. А. Садовничий, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Российская Федерация
В. Г. Сафонов, Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
Н. В. Смехович, Институт истории Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
Д. В. Тапальский, Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
А. В. Тузиков, Объединенный институт проблем информатики Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
Тьяу Ван Минь, Вьетнамская академия наук и технологий, Социалистическая Республика Вьетнам
С. А. Усанов, Институт биорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
Ю. С. Харин, Научно-исследовательский институт прикладных проблем математики и информатики, Республика Беларусь
А. Цайлингер, Австрийская академия наук, Австрийская Республика
И. П. Шейко, Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству, Республика Беларусь
А. Г. Шумилин, Президиум Национальной академии наук Беларуси, Республика Беларусь
С. С. Щербаков, Президиум 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. 2024. Т. 68. № 6

Выходит на русском, белорусском и английском языках

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

Сдано в набор 17.12.2024. Выпуск в свет 27.12.2024. Формат 60×84¹/₈. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 10,23 Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 146 экз. Заказ 260.

Цена: индивидуальная подписка – 14,01 руб.; ведомственная подписка – 32,74 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, 220084, г. Минск, Республика Беларусь.

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».
Доклады НАН Беларуси, 2024

DOKLADY OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

2024. Vol. 68. No. 6

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)*

Editor-in-Chief

Vladimir G. Gusakov

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

Editorial Board

Sergey A. Chizhik

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

Vasily L. Gursky

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

Alexander V. Kilchevsky

Deputy 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

Tadeouch I. Adoulo, Institute of Philosophy of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

Vladimir V. Azarenko, Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

Oleg Yu. Baranov, Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

Vasily G. Bogdan, Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus

Maxim A. Bogdasarov, Brest State A. Pushkin University, Republic of Belarus

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

Alexey Ye. Dayneko, Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, Republic of Belarus

Sergey V. Gaponenko, B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, 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

Andrei I. Ivanets, Ministry of Education of the Republic of Belarus, Republic of Belarus

Igor A. Karpov, Belarusian State Medical University, Republic of Belarus

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

Nikolay S. Kazak, National Academy of Sciences of Belarus, 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

Emilia I. Kolomiets, State Research and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology”, 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 G. Levashkevich, Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Nataliya M. Litvinko, Presidium 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
Petr S. Lopukh, Belarusian State University, Republic of Belarus
Vladimir K. Lukashevich, Institute of Philosophy of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Sergey A. Lysenko, 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
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. Rasha, Institute of Biology of the University of Latvia, Latvia
Baiba A. Rivza, Latvian Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Latvia
Valentina P. Rusak, Institute of Linguistics named after Yakub Kolas of the Center for Research of Belarusian Culture, Language and Literature of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Viktor A. Sadovnichiy, Lomonosov Moscow State University, Russian Federation
Vasily G. Safonov, Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Ivan V. Saverchenko, Institute of Literary Studies named after Yanka Kupala of the Center for Research of Belarusian Culture, Language and Literature of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Sergey S. Shcherbakov, Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Ivan P. Sheyko, Scientific and Practical Center for Animal Breeding, Republic of Belarus
Alexander G. Shumilin, Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Nikolay V. Smekhovich, Institute of History of the National Academy of Sciences of Belarus, Republic of Belarus
Dmitry V. Tapalski, Institute of Physiology 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, Institute of Bioorganic Chemistry 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
Aliaksandr A. Volchak, Brest State Technical University, 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. 2024. Vol. 68. No. 6

Printed in Russian, Belarusian and English languages

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

Sent for press 17.12.2024. Output 27.12.2024. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 10.23. Publisher’s signatures 11.3. Circulation 146 copies. Order 260.

Price: individual subscription – 14.01 BYN, departmental subscription – 32.74 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., 220084, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE “Publishing House “Belaruskaya Navuka”.
Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕМАТИКА

- Берник В. И., Васильев Д. В., Кудин А. С., Пантелеева Ж. И.** Длины интервалов, на которых целочисленные многочлены могут принимать малые значения 447

ХИМИЯ

- Дикусар Е. А., Акишина Е. А., Стёпин С. Г., Мукушева Г. К., Жасымбекова А. Р., Тойгамбекова Н. Н., Сейдахметова Р. Б., Поткин В. И.** Изучение противовоспалительной активности серии азотистых гетероциклических соединений и сравнение полученных данных с результатами квантово-химических расчетов 454

БИОЛОГИЯ

- Урбан В. А., Константинов Ф. О., Вересов В. Г.** Конформационные особенности белка HVEM при его дис-транс-связывании с белком BTLA 460

- Антоневич Н. Г., Бадалян И. А., Гончаров А. Е., Титов Л. П., Гринев В. В.** Разработка лентивирусной векторной системы для эктопической экспрессии и презентации меланомного антигена MLANA в клетках человека 465

МЕДИЦИНА

- Шиманович В. А., Гудиевская И. Г., Рябоконт Н. И., Яцкив А. А., Терешенко О. В., Далидович А. А., Марченко Л. Н., Кильчевский А. В.** Полиморфные варианты генов *ARMS2* (rs10490924) и *CFH* (rs1061170) как маркеры предрасположенности к неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации в белорусской популяции 474

- Юркина Е. Г., Ефимов Д. Ю., Кривенко С. И., Примакова Е. А., Назарова Е. А., Сыманович А. А., Дедуля Н. И., Смольникова В. В., Янушевская Е. А., Романова И. А., Сазановец В. В., Садовский Д. Н., Штурч И. П., Коротков С. В., Щерба А. Е., Руммо О. О.** Применение мезенхимальных клеток из плацентарно-пуповинного комплекса человека в коррекции печеночной недостаточности у пациентов с декомпенсированным циррозом печени 483

НАУКИ О ЗЕМЛЕ

- Чернюк В. Д., Кухарчик Т. И.** Химические вещества в пластмассах электрического и электронного оборудования и проблемы вторичного использования отходов 493

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ

- Артемьев В. М., Костромицкий С. М., Наумов А. О.** Анализ точности радиолокационного сопровождения неразрешенных по координатам целей 504

- Абетковская С. О., академик Чижик С. А.** Влияние жесткости и добротности зонда на характеристики его колебаний в динамическом режиме работы атомно-силового микроскопа (на англ. яз.) 513

АГРАРНЫЕ НАУКИ

- Пилюк Я. Э., Куликович Е. Н., Бобко Н. Н., Новичек А. А.** Комплексная фенотипическая оценка селекционных форм и линий озимого рапса, содержащих факторы цитоплазматической мужской стерильности 519

CONTENTS

MATHEMATICS

- Bernik V. I., Vasilyev D. V., Kudin A. S., Panteleeva Zh. I.** Lengths of the intervals where integer polynomials can attain small values 447

CHEMISTRY

- Dikusar E. A., Akishina E. A., Stepin S. G., Mukusheva G. K., Zhasymbekova A. R., Toigambekova N. N., Seidakhmetova R. B., Potkin V. I.** Studying the anti-inflammatory activity of a series of nitrogenous heterocyclic compounds and comparison of the obtained data with the results of quantum chemical calculations..... 454

BIOLOGY

- Urban V. A., Kanstantinav F. O., Veresov V. G.** Conformational features of HVEM protein upon its cis and trans binding to BTLA protein..... 460
- Antonevich N. G., Badalyan I. A., Hancharou A. Y., Titov L. P., Grinev V. V.** Development of the lentivirus-based vector system for ectopic expression and presentation of the melanoma antigen MLANA in human cells 465

MEDICINE

- Shymanovich U. A., Gudievskaya I. G., Ryabokon N. I., Yatskiu H. A., Tserashenka V. V., Dalidovich A. A., Marchenka L. N., Kilchevsky A. V.** Polymorphic variants of the *ARMS2* (rs10490924) and *CFH* (rs1061170) genes as susceptibility markers to neovascular age-related macular degeneration in the Belarusian population 474
- Yurkina E. G., Efimov D. Yu., Krivenko S. I., Primakova E. A., Nazarova E. A., Symanovich A. A., Dedyulya N. I., Smolnikova V. V., Yanushevskaya E. A., Romanova I. A., Sazanovets V. V., Sadovskiy D. N., Shturich I. P., Korotkov S. V., Shcherba A. E., Rummo O. O.** Usage of mesenchymal cells from the human placental-umbilical complex in the correction of liver failure in patients with decompensated liver cirrhosis 483

EARTH SCIENCES

- Chernyuk V. D., Kukharchyk T. I.** Chemical substances in plastics of electrical and electronic equipment and waste recycling problems 493

TECHNICAL SCIENCES

- Artemiev V. M., Kostromitsky S. M., Naumov A. O.** Analysis of the accuracy of radar tracking of unresolved by coordinates targets..... 504
- Abetkovskaia S. O., Chizhik S. A.** Influence of the probe spring constant and the quality factor on its oscillation characteristics in dynamic mode of atomic force microscopy 513

AGRARIAN SCIENCES

- Pilyuk Ya. E., Kulinkovich E. N., Bobko N. N., Novichuk A. A.** Complex phenotypic evaluation of winter rape breeding forms and lines containing factors of cytoplasmic male sterility..... 519

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

МАТЕМАТИКА
MATHEMATICS

УДК 511.42
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-447-453>

Поступило в редакцию 10.10.2024
Received 10.10.2024

В. И. Берник¹, Д. В. Васильев¹, А. С. Кудин¹, Ж. И. Пантелеева²

¹*Институт математики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*
²*Белорусский государственный аграрный технический университет, Минск, Республика Беларусь*

**ДЛИНЫ ИНТЕРВАЛОВ, НА КОТОРЫХ ЦЕЛОЧИСЛЕННЫЕ МНОГОЧЛЕНЫ
МОГУТ ПРИНИМАТЬ МАЛЫЕ ЗНАЧЕНИЯ**

(Представлено академиком Ю. С. Хариным)

Аннотация. Понятие дискриминанта многочлена второй степени позволяет легко получать информацию о его действительных и комплексных корнях. Дискриминант многочлена произвольной степени также является важной характеристикой многочлена, которая оказывается полезной во многих задачах теории диофантовых приближений. В 2023 г. белорусский математик Д. Бодягин решил поставленную в 1960-х годах проблему Давенпорта о диапазоне значений дискриминантов многочленов для случая третьей степени. В данной работе полностью решена проблема делимости дискриминантов многочленов третьей степени на большую степень простого числа.

Ключевые слова: диофантовы приближения, p -адические числа, дискриминант целочисленного многочлена, теорема Дирихле, теорема Хинчина

Для цитирования. Длины интервалов, на которых целочисленные многочлены могут принимать малые значения / В. И. Берник [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 447–453. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-447-453>

Vasili I. Bernik¹, Denis V. Vasilyev¹, Alexey S. Kudin¹, Zhanna I. Panteleeva²

¹*Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*
²*Belarusian State Agrarian Technical University, Minsk, Republic of Belarus*

**LENGTHS OF THE INTERVALS WHERE INTEGER POLYNOMIALS
CAN ATTAIN SMALL VALUES**

(Communicated by Academician Yuriy S. Kharin)

Abstract. The concept of the discriminant of a quadratic polynomial allows for easy extraction of information about its real and complex roots. The discriminant of a polynomial of an arbitrary degree is also an important characteristic of the polynomial, which proves useful in many problems in the theory of Diophantine approximation. In 2023, Belarusian mathematician D. Badziahin solved a problem posed by Davenport in the 1960s concerning the range of values of discriminants in the cubic case. The paper provides a complete solution to the problem of divisibility of discriminants by large powers of prime numbers in the case of cubic polynomials.

Keywords: Diophantine approximation, p -adic numbers, discriminant of an integer polynomial, Dirichlet's theorem, Khinchine's theorem

For citation. Bernik V. I., Vasilyev D. V., Kudin A. S., Panteleeva Zh. I. Lengths of the intervals where integer polynomials can attain small values. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 447–453 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-447-453>

Введение. В середине XIX в. П. Дирихле предложил метод, позволяющий получать хорошие приближения иррациональных чисел рациональными числами и трансцендентных чисел алгебраическими числами.

Т е о р е м а Д и р и х л е. Для любого действительного числа x из интервала $I = [a; b]$ и натурального числа $Q > 1$ всегда можно найти целые числа p и $1 \leq q \leq Q$, такие что верно неравенство

$$|x - p/q| < q^{-1}Q^{-1}. \quad (1)$$

Неравенство (1) можно переписать в виде

$$|qx - p| < Q^{-1} \quad (2)$$

и понимать $qx - p$ как значение линейного многочлена в точке x .

Для целочисленного многочлена

$$P(x) = a_n x^n + a_{n-1} x^{n-1} + \dots + a_1 x + a_0, \quad a_j \in \mathbb{Z},$$

через $\deg P = n$, $a_n \neq 0$ будем обозначать степень $P(x)$, а $H = H(P) = \max_{0 \leq j \leq n} |a_j|$ назовем высотой $P(x)$. С помощью принципа ящиков Дирихле легко доказывается теорема 1, обобщающая (2) на многочлены произвольной степени. Далее через $c_1 = c_1(n)$, c_2, \dots будем обозначать величины, зависящие от n и не зависящие от H и Q .

Т е о р е м а 1. Для любых $x \in I$ и $Q \geq 2$ найдется полином $P(x)$ из класса полиномов

$$\mathcal{P}_n(Q) = \{P(t) \in \mathbb{Z}[t]: \deg P \leq n, H(P) \leq Q\},$$

такой что

$$|P(x)| < c_1 H^{-n}. \quad (3)$$

Из (3) нетрудно доказать, что для любого трансцендентного числа x неравенство

$$|P(x)| < c_2 H^{-n} \quad (4)$$

имеет бесконечное число решений в полиномах $P(x) \in \mathbb{Z}[x]$. Неравенство (4) нельзя принципиально улучшить. Например, при $x_1 = \sqrt[n+1]{2}$ можно вычислить такую величину $c_3(x_1)$, при которой для всех $P(x)$ выполняется неравенство $|P(x_1)| > c_3 H^{-n}$ [1].

Однако неравенство (4) допускает улучшение для «большой части» $x \in I$ в смысле меры Лебега на прямой μ_1 .

Т е о р е м а 2. Для любого $\varepsilon > 0$ неравенство $|P(x)| < \varepsilon H^{-n}$ имеет для почти всех $x \in I$ бесконечное число решений в целочисленных полиномах $P(x)$.

Удивительно точную характеристику неравенств вида (3), (4) получил 100 лет назад А. Я. Хинчин [2].

Обозначим через $\Psi(x)$ монотонно убывающую функцию положительного аргумента x , а через $\mathcal{L}_n(\Psi)$ – множество $x \in I$, для которых неравенство

$$|P(x)| < H^{-n+1} \Psi(H)$$

имеет бесконечное число решений в полиномах $P(x)$.

Т е о р е м а Х и н ч и н а [2]. Справедливы равенства

$$\mu_1(\mathcal{L}_1(\Psi)) = \begin{cases} 0, & \text{если } \sum_{H=1}^{\infty} \Psi(x) < \infty, \\ \mu_1(I), & \text{если } \sum_{H=1}^{\infty} \Psi(x) = \infty. \end{cases} \quad (5)$$

В [3; 4] теорема Хинчина была обобщена с многочленов первой степени на многочлены произвольной степени. Если $\Psi(H) = H^{-\nu}$, $\nu > 1$, то ряд сходится и в этом случае справедливо равенство (5). Эта задача была сформулирована в 1932 г. К. Малером и была названа Проблемой Малера. Она была решена в 1964 г. В. Г. Спринджуком [5]. В 1998–2002 гг. аналог теоремы Хинчина был получен для произвольных кривых и поверхностей [6].

Если взять $v_1 = 2$ и $v_2 = 10^6$, то мера $\mu_1(\mathcal{L}_n(H^{-v}))$ окажется равной нулю, хотя первое из множеств $\mathcal{L}_n(H^{-v_2})$ несомненно «обильнее» второго. В этом случае для различения величин множеств используют понятие размерности Хаусдорфа \dim .

Теорема Бейкера – Шмидта – Берника [3]. Обозначим через $B(w)$ множество $x \in I$, для которого неравенство $|P(x)| < H^{-w}$, $w > n$, имеет бесконечное число решений в полиномах $P(x)$. Тогда

$$\dim B(w) = \frac{n+1}{w+1}.$$

Основные результаты. В последние годы в связи с новыми приложениями метрической теории диофантовых приближений на многообразиях [7] вырос интерес к новым задачам в данной области. Определим два класса полиномов из $\mathcal{P}_n(Q)$:

$$\mathcal{P}_n(Q, v) = \{P(t) \in \mathcal{P}_n(Q) : |P'(\alpha_1)| < Q^{1-v}, 0 \leq v\},$$

$$T_n(Q, w) = \{P(t) \in \mathcal{P}_n(Q) : 1 \leq |D(P)| < Q^{2n-2-2w}, 0 \leq w \leq n-1\},$$

где $D(P)$ – дискриминант полинома $P(t)$ с корнями $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$:

$$D(P) = a_n^{2n-2} \prod_{1 \leq i < j \leq n} (\alpha_i - \alpha_j)^2.$$

Имеется немало статей, в которых получены результаты о мощности классов $\mathcal{P}_n(Q, v)$ и $T_n(Q, w)$. Оценка снизу

$$\#T_n(Q, w) > c_4 Q^{n+1-\frac{n+2}{n}w} \tag{6}$$

получена для всех $0 \leq w \leq n-1$. Оценки сверху для $\#\mathcal{P}_n(Q, v)$ получены в [8] при $w < 1,5$, а оценки сверху для $\#T_n(Q, w)$ получены при $0 \leq w < 0,6$. Недавно Д. Бодягин [9; 10] доказал при любом $\varepsilon > 0$ и $Q > Q_0(\varepsilon)$ оценку $\#T_3(Q, w) < Q^{4-5/3w+\varepsilon}$, которая вместе с оценкой (6) дает правильный порядок $\#T_n(Q, w)$ при $n = 3$.

В данном сообщении мы предлагаем единый метод, позволяющий получать новые оценки сверху для $\#T_3(Q, w)$ и $\#\mathcal{P}_3(Q, v)$ не только в поле действительных, но и в поле p -адических чисел.

Пусть корни $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$ полинома $P(t)$ упорядочены следующим образом:

$$\alpha_1 \leq \alpha_2 \leq \dots \leq \alpha_n,$$

и α – корень, ближайший к x . В неравенстве

$$|P(x)| < Q^{-s}, \quad n \leq 3, \tag{7}$$

требуется найти меру множества $x \in I$, для которых выполняется (7). Без ограничения общности положим $j = 1$.

Лемма 1. *Справедливы неравенства*

$$|x - \alpha_1| < 2^n |P(x)| |P'(\alpha_1)|^{-1}, \tag{8}$$

$$|x - \alpha_1| < 2^n \min_{2 \leq j \leq n} (|P(x)| |P'(\alpha_1)|^{-1} |\alpha_1 - \alpha_2| \cdot \dots \cdot |\alpha_1 - \alpha_j|)^{1/j}. \tag{9}$$

Лемма 1 доказана в [11]. Недавно было доказано [12], что неравенства (8), (9) – точные, а именно, что всегда существует j , для которого выполняется неравенство, противоположное (8), (9). Эти неравенства показывают, что все решения содержатся внутри интервалов $\sigma(P)$, определяемых (8), (9). Проведем классификацию полиномов из множеств $\mathcal{P}_n(Q)$, $\mathcal{P}_n(Q, v)$, $T_n(Q, w)$ при

$Q/2 \leq H \leq Q$. Зададим $\varepsilon_1 > 0$, целое $T = [\varepsilon_1^{-1}] + 1$. Для полинома $P(x)$ степени n и высоты H определим действительные числа ρ_j , целые числа l_k и рациональные числа p_s из условий взаимного расположения корней $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$, упорядоченных следующим образом:

$$\begin{aligned} |\alpha_1 - \alpha_2| &\leq |\alpha_1 - \alpha_3| \leq \dots \leq |\alpha_1 - \alpha_n|, \\ |\alpha_1 - \alpha_j| &= H^{-\rho_j}, \quad \frac{l_j - 1}{T} \leq \rho_j < \frac{l_j}{T}, \quad 2 \leq j \leq n, \\ p_s &= T^{-1} \sum_{m=s+1}^n l_m, \quad 1 \leq s \leq n-1. \end{aligned}$$

В результате все полиномы из $\mathcal{P}_n(Q)$ делятся на конечное число классов, зависящее только от ε_1 и n . Обозначим через $\sigma(P)$ интервал, содержащий все решения $x \in I$ неравенства (7), для которых корень α_1 является ближайшим корнем. Для доказательства оценок сверху в метрических теоремах необходимо оценить меры объединений

$$V_1 = \bigcup_{P \in \mathcal{P}_n(Q, \nu)} \sigma(P).$$

Поскольку мера $\mu_1(\sigma(P))$ оценена в лемме 1, то для оценки $\mu_1 V_1$ достаточно получить оценки для количества полиномов с малой производной и ограниченным дискриминантом.

Т е о р е м а 3. Для любого $\varepsilon > 0$ при $Q > Q_0(\varepsilon)$ справедливо неравенство

$$\#\mathcal{P}_3(Q, \nu) < Q^{4-p_1+\varepsilon}, \quad 0 \leq p_1 \leq 2. \quad (10)$$

В определении множества $\#T_3(Q, w)$ заменим ограничение на дискриминант на условие $|D(P)|_p < Q^{-2w}$.

Т е о р е м а 4. Для любого $\varepsilon > 0$ при $Q > Q_0(\varepsilon)$ выполняется неравенство

$$\#T_3(Q, w) < Q^{4-5/3w+\varepsilon}, \quad 1 \leq w \leq 2.$$

Теорема 3 усиливает результат в [8], а теорема 4 обобщает [9; 11] при $1 \leq w \leq 2$ на поле p -адических чисел.

Д о к а з а т е л ь с т в о т е о р е м ы 3. Предположим, что верно неравенство, противоположное (10):

$$\#\mathcal{P}_3(Q, \nu) \geq Q^{4-p_1+\varepsilon}. \quad (11)$$

Поделим интервал I на равные интервалы J_i , длины $Q^{-l_2 T^{-1}}$. Понятно, что из (11) следует существование i , таких что на интервале J_i лежат не менее k_i корней $\alpha_1(P_i)$, $P_i \in \mathcal{P}_3(Q, \nu)$, и $k_i > c_5 Q^{4-p_1-l_2 T^{-1}+\varepsilon}$. Используя дискриминанты полиномов $P(x)$ как в [5], нетрудно доказать, что $0 \leq p_1 \leq 2$, $\frac{p_1}{2} < l_2 T^{-1} = p_1$.

Разложим полиномы $P_i(x)$ в ряд Тейлора на интервалах J_i :

$$P_i(x) = P_i(\alpha_1) + P_i'(\alpha_1)(x - \alpha_1) + \frac{1}{2} P_i''(\alpha_1)(x - \alpha_1)^2 + a_3(x - \alpha_1)^3. \quad (12)$$

Так как $P_i(\alpha_1) = 0$, $|P_i'(\alpha_1)| = |a_3(\alpha_1 - \alpha_2)(\alpha_1 - \alpha_3)| = c_6 Q^{1-p_1}$, $|x - \alpha_1| < c_7 Q^{-l_2 T^{-1}+\varepsilon}$, $|P_i''(\alpha_1)| = c_8 Q^{1-p_2}$, то (12) можно переписать в виде

$$|P_i(x)| < c_9 Q^{1-p_1-l_2 T^{-1}+\varepsilon}, \quad 1 \leq i \leq k_i = c_5 Q^{4-p_1-l_2 T^{-1}+\varepsilon}. \quad (13)$$

Воспользуемся принципом ящиков Дирихле. Положим

$$m = 4 - p_1 - l_2 T^{-1}, \quad m_1 = [m].$$

Если $m = 1 + \varepsilon$, то среди k_i полиномов $P(x)$ найдутся по крайней мере три полинома, у которых коэффициенты a_3 полиномов $P_{i_1}(x)$, $P_{i_2}(x)$, $P_{i_3}(x)$ совпадают, и следовательно, полиномы $R_{i_3}(x) = P_{i_3}(x) - P_{i_1}(x)$, $R_{i_2}(x) = P_{i_2}(x) - P_{i_1}(x)$ имеют степень не более двух.

Л е м м а 2 [13]. Пусть целочисленные полиномы $P_i(x)$, $i = 1, 2$, не имеют общих корней и на интервале I длины $Q^{-\eta}$, $\eta > 0$, удовлетворяют неравенству

$$\max_{x \in I} (|P_1(x)|, |P_2(x)|) < Q^{-\tau}, \quad \tau > 0,$$

тогда при любом $\delta > 0$ и $Q > Q_0(\varepsilon)$ выполняется неравенство

$$\tau + 1 + 2 \sum_{k=1}^n \max(\tau + 1 - k\eta, 0) < 2n + \delta. \tag{14}$$

Воспользуемся неравенствами (13) и (14). Получим при $p_1 \geq 1,5$, $\frac{p_1}{2} < l_2 T^{-1} \leq p_1$, $n = 2$, что левая часть (14) имеет вид

$$\tau + 1 + 2(\tau + 1 - l_2 T^{-1}) = l_2 T^{-1} + 3p_1 - 3\varepsilon > 4,25 - 3\varepsilon,$$

а правая часть в (14) равна $4 + \delta$. При $3\varepsilon + \delta < 0,25$ неравенство (14) противоречиво.

При $0 \leq m < 1$ имеем $l_2 T^{-1} + p_1 > 3$. Разложим полином $P(x)$ в ряд на интервалах J_i длины $Q^{-l_2 T^{-1} - m}$. В этом случае неравенство (14) примет вид

$$l_2 T^{-1} + 3p_1 + m < 6 + \delta,$$

что является противоречием. Если среди полиномов второй степени $R(x)$ не найдется двух полиномов без общих корней, то полиномы $R(x)$ приводимы, и их можно записать в виде

$$R(x) = (a_1 x + b_1)(a_2 x + b_2), \quad |a_1| = Q^\lambda, \quad |a_2| = c_{10} Q^{1-\lambda}, \quad 0 \leq \lambda \leq 1.$$

Найдем такое $a > 0$, что на всех интервалах J_i длины $c_{11} Q^{-l_2 T^{-1}}$ выполняется система неравенств

$$|a_1 x + b_1| < c_{12} Q^{-a}, \quad |a_2 x + b_2| < c_{13} Q^{1-p_1-l_2 T^{-1}+\varepsilon_2+a}. \tag{15}$$

Поскольку (15) выполняется на всем интервале J_i , то существует такая точка $x_0 \in J_i$, для которой выполняется система неравенств

$$\begin{aligned} c_{14} Q^{-l_2 T^{-1}} &< |x_0 + b_1 / a_1| < |a_1|^{-1} Q^{-a}, & |a_1 a_2| &> c_{16} Q. \\ c_{15} Q^{-l_2 T^{-1}} &< |x_0 + b_2 / a_2| < |a_2|^{-1} Q^{1-p_1-l_2 T^{-1}-\varepsilon_2+a}, \end{aligned} \tag{16}$$

Перемножив неравенства (16), при $Q > Q_0(\varepsilon)$ получаем противоречивое неравенство

$$c_{14} c_{15} Q^{-l_2 T^{-1}} < c_{16} Q^{1-p_1-\varepsilon_2}, \quad p_1 \geq l_2 T^{-1}.$$

Для доказательства теоремы 4 проведем классификацию корней из алгебраического замыкания \mathbb{Q}_p поля p -адических чисел \mathbb{Q}_p . Пусть для $\#T_3(Q, w)$ выполнено неравенство, противоположное формулировке теоремы 4. Представим цилиндр K в виде объединения цилиндров K_i с мерой Хаара μ_2 равной $Q^{-l_2 T^{-1}}$. Пусть на одном из таких цилиндров J_i окажется не менее $Q^{4-5/3w+\varepsilon/2}$ полиномов $P(\omega)$ с дискриминантами $D(P)$, такими что $|D(P)|_p < c_{17} Q^{-2w}$. Разложим

эти полиномы на цилиндре J_1 в ряд Тейлора в окрестности корня γ_1 как в (13). В итоге получим не менее $Q^{4-5/3w-l_2T^{-1}+\varepsilon/2}$ полиномов $P(\omega)$, удовлетворяющих неравенствам

$$|P_i(\omega)|_p < c_{18}Q^{-2p_1-p_3-\varepsilon/4}. \quad (17)$$

Применим к полиномам (17) принцип ящиков Дирихле, чтобы уменьшить степени $P_i(\omega)$ до второй и первой соответственно. Если среди новых полиномов окажутся полиномы $R_j(\omega)$ без общих корней, то применим к ним следующую лемму.

Л е м м а 3. Пусть целочисленные полиномы $P_i(\omega)$, $i = 1, 2$, не имеют в цилиндре K меры Хаара $Q^{-\eta}$, $\eta > 0$, общих корней. Пусть

$$\max_{\omega \in K} (|P_1(\omega)|_p, |P_2(\omega)|_p) < Q^{-\tau_1}, \quad \tau_1 > 0.$$

Тогда при любом $\delta > 0$ и $Q > Q_0(\varepsilon)$ справедливо неравенство

$$\tau_1 + 2 \sum_{k=1}^n \max(\tau_1 - k\eta, 0) < 2n + \delta.$$

Для неприводимых полиномов $R_j(\omega)$ лемма 3 приводит к противоречию. Приводимые полиномы $R_j(\omega)$ второй степени разложим на линейные множители

$$R_j(\omega) = (a_1\omega + b_1)(a_2\omega + b_2).$$

Поскольку мы можем точно оценить как сверху, так и снизу меры множеств $\omega \in \mathbb{Q}_p$, для которого верны неравенства $|a_i\omega + b_i|_p < Q^{-w_i}$, $w_i > 0$, $i = 1, 2$, то получим для $R_j(\omega)$ неравенства, аналогичные (16), которые приведут к противоречию.

Заключение. Получены точные теоремы о количестве многочленов, у которых дискриминант не превосходит заданной величины и делится на заданную степень простого числа. Теоремы могут использоваться при проектировании антенных устройств [7] и в криптографии [14].

Список использованных источников

1. Касселс, Дж. В. С. Введение в теорию диофантовых приближений / Дж. В. С. Касселс. – М., 1961. – 213 с.
2. Khintchine, A. Einige Sätze über Kettenbrüche, mit Anwendungen auf die Theorie der Diophantischen Approximationen / A. Khintchine // Mathematische Annalen. – 1924. – Vol. 92. – P. 115–125. <https://doi.org/10.1007/bf01448437>
3. Берник, В. И. Применение размерности Хаусдорфа в теории диофантовых приближений / В. И. Берник // Acta Arith. – 1982. – Т. 42, № 3. – С. 219–253. <https://doi.org/10.4064/aa-42-3-219-253>
4. Beresnevich, V. On approximation of real numbers by real algebraic numbers / V. Beresnevich // Acta Arith. – 1999. – Vol. 50, N 2. – P. 97–112. <https://doi.org/10.4064/aa-90-2-97-112>
5. Спринджук, В. Г. Проблема Малера в метрической теории чисел / В. Г. Спринджук. – Минск, 1967. – 181 с.
6. Beresnevich, V. V. A Groshev type theorem for convergence on manifolds / V. V. Beresnevich // Acta Math. Acad. Sci. Hungar. – 2002. – Vol. 94. – P. 99–130. <https://doi.org/10.1023/a:1015662722298>
7. Beresnevich, V. Number theory meets wireless communications: an introduction for dummies like us / V. Beresnevich, S. Velani // Number Theory Meets Wireless Communications / eds. V. Beresnevich [et al.]. – Springer International Publishing, 2020. – P. 1–67. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61303-7_1
8. Берник, В. И. О числе целочисленных многочленов заданной степени и ограниченной высоты с малой производной в корне многочлена / В. И. Берник, Д. В. Васильев, А. С. Кудин // Тр. Ин-та математики. – 2014. – Т. 22, № 2. – С. 3–8.
9. Badziahin, D. Simultaneous Diophantine approximation to points on the Veronese curve [Electronic resource] / D. Badziahin. – Mode of access: <https://arxiv.org/abs/2403.17685>. – Date of access: 20.06.2024.
10. Вклад Йонаса Кубилоса в метрическую теорию диофантовых приближений зависимых переменных / В. В. Бересневич [и др.] // Журн. БГУ. Математика. Информатика. – 2021. – № 3. – С. 34–50 (на англ. яз.). <https://doi.org/10.33581/2520-6508-2021-3-34-50>
11. Bernik, V. I. Metric Diophantine approximation on manifolds / V. I. Bernik, M. M. Dodson // Cambridge Tracts in Mathematics. – 1999. – N 137. – 172 p. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511565991>
12. Кемеш, О. Н. Точные оценки меры малых значений целочисленных полиномов / О. Н. Кемеш, Ж. И. Пантелеева, А. В. Титова // Весн. Магілёўскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя А. А. Куляшова. Сер. В. – 2021. – № 1 (57). – С. 81–86.

13. Метрическая теория диофантовых приближений и асимптотические оценки для количества многочленов с заданными дискриминантами, делящимися на большую степень простого числа / В. И. Берник [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2023. – Т. 67, № 4. – С. 271–278. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-271-278>
14. Криптология: учебник / Ю. С. Харин [и др.]. – Минск, 2013. – 511 с.

References

1. Cassels J. W. S. *An introduction to diophantine approximation*. Cambridge University Press, 1957. 166 p.
2. Khintchine A. Einige Sätze über Kettenbrüche, mit Anwendungen auf die Theorie der Diophantischen Approximationen. *Mathematische Annalen*, 1924, vol. 92, pp. 115–125 (in German). <https://doi.org/10.1007/bf01448437>
3. Bernik V. I. Application of Hausdorff dimension in the theory of Diophantine approximation. *Acta Arithmetica*, 1982, vol. 42, no. 3, pp. 219–253 (in Russian). <https://doi.org/10.4064/aa-42-3-219-253>
4. Beresnevich V. On approximation of real numbers by real algebraic numbers. *Acta Arithmetica*, 1999, vol. 90, no. 2, pp. 97–112. <https://doi.org/10.4064/aa-90-2-97-112>
5. Sprindzhuk V. G. *Mahler's problem in metric number theory*. Minsk, 1967. 181 p. (in Russian).
6. Beresnevich V. V. A Groshev type theorem for convergence on manifolds. *Acta Mathematica Hungarica*, 2002, vol. 94, pp. 99–130. <https://doi.org/10.1023/a:1015662722298>
7. Beresnevich V., Velani S. Number theory meets wireless communications: an introduction for dummies like us. Beresnevich V., ed. *Number Theory Meets Wireless Communications*. Springer International Publishing, 2020, pp. 1–67. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61303-7_1
8. Bernik V. I., Vasiliev D. V., Kudin A. S. On the number of integer polynomials of a given degree and bounded height with a small derivative at the root of the polynomial. *Trudy Instituta Matematiki = Proceedings of the Institute of Mathematics*, 2014, no. 2, pp. 3–8 (in Russian).
9. Badziahin D. *Simultaneous Diophantine approximation to points on the Veronese curve*. Available at: <https://arxiv.org/abs/2403.17685> (accessed 20 June 2024).
10. Beresnevich V. V., Bernik V. I., Götze F., Zasimovich E. V., Kalosha N. I. Contribution of Jonas Kubilius to the metric theory of Diophantine approximation of dependent variables. *Journal of the Belarusian State University. Mathematics and Informatics*, 2021, no. 3, pp. 34–50. <https://doi.org/10.33581/2520-6508-2021-3-34-50>
11. Bernik V. I., Dodson M. M. Metric Diophantine approximation on manifolds. *Cambridge Tracts in Mathematics*, 1999, no. 137. 172 p. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511565991>
12. Kemeshe O. N., Panteleeva Zh. I., Titova A. V. Exact estimates of the measure of small values of integer polynomials *Vesnik Magilejskaga dzyarzhajnaga yunivertsiteta imya A. A. Kulyashova. Seryya V = Bulletin Mogilev State A. Kuleshov University, Seria B*, 2021, no. 1 (57), pp. 81–86 (in Russian).
13. Bernik V. I., Vasilyev D. V., Kalosha N. I., Panteleeva Zh. I. Metric theory of diophantine approximation and asymptotic estimates for the number of polynomials with given discriminants divisible by a large power of a prime number. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2023, vol. 67, no. 4, pp. 271–278 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2023-67-4-271-278>
14. Kharin Yu. S., Agievich S. V., Vasilyev D. V., Matveev G. V. *Cryptology*. Minsk, 2013. 511 p. (in Russian).

Информация об авторе

Берник Василий Иванович – д-р физ.-мат. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bernik.vasili@mail.ru.

Васильев Денис Владимирович – канд. физ.-мат. наук. Институт математики НАН Беларуси (ул. Сурганова, 11, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vasilyev@im.bas-net.by.

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

Пантелеева Жанна Ивановна – ст. преподаватель. Белорусский государственный аграрный технический университет (пр. Независимости, 99, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: janna.panteleeva001@gmail.com.

Information about the author

Bernik Vasily I. – D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Chief Researcher. Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bernik.vasili@mail.ru.

Vasilyev Denis V. – Ph. D. (Physics and Mathematics). Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vasilyev@im.bas-net.by.

Kudin Alexey S. – Ph. D. (Physics and Mathematics). Institute of Mathematics of the National Academy of Sciences of Belarus (11, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vasilyev@im.bas-net.by.

Panteleeva Zhanna I. – Senior Lecturer. Belarusian State Agrarian Technical University (99, Nezavisimosti Ave., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: janna.panteleeva001@gmail.com.

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 615.332:615.276

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-454-459>

Поступило в редакцию 17.06.2024

Received 17.06.2024

**Е. А. Дикусар¹, Е. А. Акишина¹, С. Г. Стёпин², Г. К. Мукушева³, А. Р. Жасымбекова³,
Н. Н. Тойгамбекова³, Р. Б. Сейдахметова⁴, академик В. И. Поткин¹**

¹*Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Республика Беларусь*

³*Карагандинский исследовательский университет имени академика Е. А. Букетова,
Караганда, Республика Казахстан*

⁴*Карагандинский медицинский университет, Караганда, Республика Казахстан*

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ
СЕРИИ АЗОТИСТЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ
И СРАВНЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ
С РЕЗУЛЬТАТАМИ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ РАСЧЕТОВ**

Аннотация. Пополнение ассортимента природных и синтетических лекарственных субстанций, обладающих различными типами противовоспалительной активности, является актуальной задачей современной фармацевтики. Изучение противовоспалительной активности химических соединений путем биоскрининга и проведения исследований *in vitro* и *in vivo* является длительной и трудоемкой процедурой. В настоящей работе приводятся данные по изучению противовоспалительной активности 16 азотистых гетероциклических соединений на модели острой экссудативной реакции (перитонит) и сравнение полученных данных с результатами квантово-химических расчетов *ab initio* методом теории функционала плотности. В ряду 16 изученных соединений выявлено 7 представителей, обладающих наиболее высоким потенциалом противовоспалительного действия.

Ключевые слова: антиэкссудативная противовоспалительная активность, азотистые гетероциклы, диклофенак натрия, квантово-химические расчеты, теория функционала плотности, граничные молекулярные орбитали, метод Фукуи

Для цитирования. Изучение противовоспалительной активности серии азотистых гетероциклических соединений и сравнение полученных данных с результатами квантово-химических расчетов / Е. А. Дикусар [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 454–459. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-454-459>

**Evgenij A. Dikusar¹, Ekaterina A. Akishina¹, Svjatoslav G. Stepin², Gulim K. Mukusheva³,
Aigirim R. Zhasymbekova³, Nurizat N. Toigambekova³, Roza B. Seidakhmetova⁴, Academician Vladimir I. Potkin¹**

¹*Institute of Physical-Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus*

³*Karaganda Buketov University, Karaganda, Republic of Kazakhstan*

⁴*Karaganda Medical University, Karaganda, Republic of Kazakhstan*

**STUDYING THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF A SERIES OF NITROGENOUS
HETEROCYCLIC COMPOUNDS AND COMPARISON OF THE OBTAINED DATA
WITH THE RESULTS OF QUANTUM CHEMICAL CALCULATIONS**

Abstract. Replenishing the range of natural and synthetic medicinal substances with different anti-inflammatory activity is an urgent task of modern pharmaceuticals. Studying the anti-inflammatory activity of chemical compounds through bioscreening and *in vitro* and *in vivo* studies is a lengthy and labor-intensive procedure. This paper presents the data on the

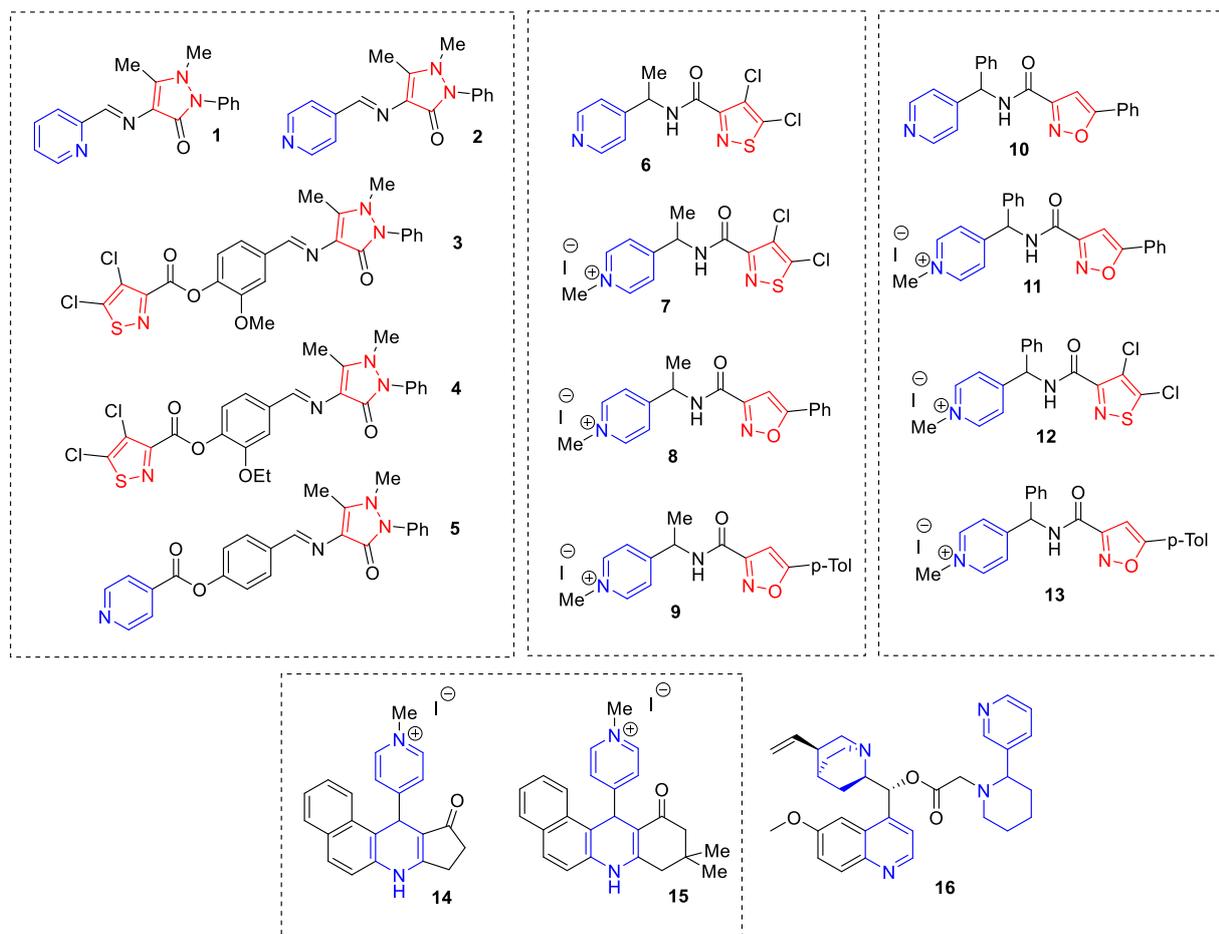
anti-inflammatory activity of nitrogenous heterocyclic compounds on a model of acute exudative reaction (peritonitis) and comparison of the obtained data with the results of *ab initio* quantum chemical calculations using the density functional theory method. Among the 16 studied compounds, 7 representatives were identified with the highest potential anti-inflammatory action.

Keywords: anti-exudative anti-inflammatory activity, nitrogen heterocycles, sodium diclofenac, quantum chemical calculations, density functional theory, boundary molecular orbitals, Fukui method

For citation. Dikusar E. A., Akishina E. A., Stepin S. G., Mukusheva G. K., Zhasymbekova A. R., Toigambekova N. N., Seidakhmetova R. B., Potkin V. I. Studying the anti-inflammatory activity of a series of nitrogenous heterocyclic compounds and comparison of the obtained data with the results of quantum chemical calculations. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 454–459 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-454-459>

Введение. Пополнение ассортимента природных и синтетических лекарственных субстанций, обладающих различными типами противовоспалительной активности, является актуальной задачей, поскольку спрос на них на фармацевтических рынках постоянно растет [1–4]. Изучение противовоспалительной активности химических соединений является довольно затратной и трудоемкой процедурой. В настоящей работе приводятся данные по изучению противовоспалительной активности 16 азотистых гетероциклических соединений на модели острой экссудативной реакции (перитонит) [5] и по сравнению полученных данных с результатами квантово-химических расчетов *ab initio* методом DFT (теории функционала плотности, англ. Density Functional Theory [6; 7]).

Материалы и методы исследования. Противовоспалительную активность образцов 1–16 (схема) изучали на модели острой экссудативной реакции (перитонит) на белых беспородных крысах обоего пола массой 190–210 г. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак натрия. Острую экссудативную реакцию (перитонит) вызывали внутрибрюшинным введением



Структура азотистых полигетероциклических соединений 1–16

1 %-ного раствора уксусной кислоты в объеме 1 мл на 100 г массы тела крыс. Через 3 ч животных забивали, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и оценивали его объем [5]. Исследуемые объекты изучали в дозе 25 мг/кг при пероральном введении в виде крахмальной слизи. Препарат сравнения диклофенак натрия вводили животным внутривентрикулярно однократно в его эффективной дозе 8 мг/кг (ED50). Контрольные животные получали эквивалентное количество крахмальной слизи. Исследуемые объекты вводили однократно за 1 час до введения 1 %-ного раствора уксусной кислоты. Противовоспалительную активность выражали в процентах уменьшения количества воспалительного экссудата в брюшной полости у опытных крыс по сравнению с контрольными. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0. Полученные результаты представлены в виде «среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения». Межгрупповые отличия оценивали непараметрическим критерием Манна–Уитни U -тест. Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Квантово-химическое моделирование *ab initio* проводилось методом DFT с применением уровня теории B3LYP/MIDI, программного пакета GAMESS [6] и базового набора MIDI [7].

Результаты и их обсуждение. Результаты исследования противовоспалительной активности соединений **1–16** приведены в табл. 1. В результате проведенного эксперимента выявлено, что соединения **1, 3, 5, 7, 9, 14, 15** в дозах 25 мг/кг проявляют антиэкссудативную противовоспалительную активность, вызывая уменьшение количества воспалительного экссудата в брюшной полости у крыс по сравнению с контролем на 23,5–35,2 %. Вещества **2, 6, 8, 11, 13** показали слабую противовоспалительную активность (уменьшение количества воспалительного экссудата в сравнении с контролем на 11,7–19,1 %). Соединения **4, 10, 12, 16** антиэкссудативную активность не проявили (уменьшение количества воспалительного экссудата в сравнении с контролем всего на 4,4–8,8 %).

Таблица 1. Противовоспалительная активность азотистых полигетероциклических соединений 1–16
Table 1. Anti-inflammatory activity of nitrogen-containing polyheterocyclic compounds 1–16

Соединение Compound	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Количество экссудата, мл Amount of exudate, ml	Уменьшение количества воспалительного экссудата, % Reduction in the amount of inflammatory exudate, %
Контроль	–	6,8 \pm 0,3	100
Диклофенак натрия	8	4,1 \pm 0,5	39,7
1	25	4,6 \pm 0,7*	32,3
2	25	5,9 \pm 1,2	13,2
3	25	4,4 \pm 0,9*	35,2
4	25	6,4 \pm 0,8*	5,8
5	25	4,8 \pm 0,7*	29,4
6	25	5,5 \pm 0,9	19,1
7	25	5,2 \pm 0,7*	23,5
8	25	5,6 \pm 0,8	17,6
9	25	5,0 \pm 0,7*	26,5
10	25	6,5 \pm 1,0	4,4
11	25	6,0 \pm 0,8*	11,7
12	25	6,2 \pm 0,9	8,8
13	25	5,7 \pm 0,6	16,1
14	25	4,7 \pm 0,6*	30,8
15	25	5,2 \pm 0,8*	23,5
16	25	6,4 \pm 1,0	5,8

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем. Полу жирным шрифтом выделены данные тех азотистых гетероциклических соединений, которые продемонстрировали высокую противовоспалительную активность.

Note: * – $p < 0.05$ compared to control. The data for those nitrogen heterocyclic compounds that demonstrated high anti-inflammatory activity are shown in bold.

С целью выявления зависимости противовоспалительной активности изучаемых азотистых гетероциклов **1–16** от их атомарного строения и электронной структуры проведен анализ энерге-

тического положения и локализации таких дескрипторов биологической активности, как граничные орбитали (ГО), каковыми являются энергия верхней занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) и энергия нижней вакантной молекулярной орбитали (НВМО) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Данные квантово-химических расчетов соединений 1–16

T a b l e 2. Data from quantum chemical calculations of compounds 1–16

Соединение Compound	E_f , а. е.	$E_{\text{ВЗМО}}$, eV	$E_{\text{НВМО}}$, eV	ΔF , eV	D , Db	M	n
1	-946,02450	-5,3552	-1,7715	3,5837	6,94	292,34	38
2	-946,03217	-5,6138	-0,2313	5,3825	7,62	291,35	39
3	-2711,05932	-5,4586	-1,8096	3,6490	4,49	517,38	52
4	-2750,14892	-5,9920	-1,2463	4,7457	4,40	531,41	55
5	-1363,19155	-5,4777	-1,5837	3,8940	5,93	412,45	51
6	-1972,35654	-6,6886	-2,3538	4,3348	3,73	302,17	27
7	-8910,78536	-5,0668	-3,0178	2,0490	8,80	444,11	32
8	-7904,22551	-4,8818	-1,3062	3,5756	13,75	435,27	42
9	-7943,31393	-4,8600	-2,1035	2,7565	14,47	449,29	45
10	-1156,42178	-6,4872	-0,9851	5,5021	3,40	355,40	44
11	-8094,84076	-4,9280	-1,1402	3,7878	12,91	497,34	49
12	-9101,39664	-5,0559	-1,5919	3,4640	9,73	506,18	39
13	-8133,92901	-4,9199	-2,0735	2,8464	13,65	511,36	51
14	-7927,20351	-4,5062	-1,6926	2,8136	11,75	454,31	45
15	-8044,43068	-4,5634	-0,9959	3,5675	15,86	496,39	54
16	-1677,01839	-5,6518	-0,6857	4,9661	1,41	526,68	77

П р и м е ч а н и я: E_f – полные энергии системы (атомные единицы Хартри), $E_{\text{ВЗМО}}$ – энергии высших занятых молекулярных орбиталей (eV), $E_{\text{НВМО}}$ – энергии низших вакантных молекулярных орбиталей (eV), ΔF – разности энергий ВЗМО и НВМО (eV), D – дипольные моменты (Db), M – молекулярная масса (дальтон), n – общее число атомов соединений 1–16. Полу жирным шрифтом выделены данные тех азотистых гетероциклических соединений, которые продемонстрировали высокую противовоспалительную активность.

N o t e s: E_f – total systems energies (a. u.), $E_{\text{ВЗМО}}$, $E_{\text{НВМО}}$ – energies HOMO and LUMO (eV), ΔF – energy gap between HOMO and LUMO (eV), D – dipole moments (Debye), M – molecular weight (dalton), n – total atoms number of compounds 1–16. The data for those nitrogen heterocyclic compounds that demonstrated high anti-inflammatory activity are shown in bold.

Путем анализа разности энергий ВЗМО и НВМО с использованием метода, разработанного К. Фукуи [8], были вычислены значения (ΔF , eV) (табл. 2):

$$\Delta F = |E_{\text{ВЗМО}} - E_{\text{НВМО}}|.$$

Величина (ΔF) показывает, что чем меньше ее значение, тем меньше энергии необходимо для перехода одного электрона с ВЗМО на НВМО, а следовательно, и перехода молекулы в возбужденное состояние [9]. Эта величина очень хорошо коррелирует с экспериментально установленной способностью соединений проявлять биологическую активность [10].

Величина (ΔF) хорошо согласуется с экспериментальными данными, полученными для серии близких по химическому строению соединений. Например, для серии производных 1,2-дигидро-3Н-пиразол-3-она 1–5, производных пиридинкарбоксамидов и их иодметилатов 6–9, производных 5-фенил-N-фенилпиридин-4-илметилизоксазол-3-карбоксамидов и их иодметилатов 10–13, замещенных циклопентахинолинов и бензакридинов 14, 15.

Заключение. Таким образом, сочетания квантово-химических расчетов и полученных с их помощью корреляционных зависимостей структура–активность, в частности, при исследовании противовоспалительной активности, могут позволить значительно сократить затратность и трудоемкость процесса биотестирования новых химических соединений (при условии их предварительного квантово-химического изучения и выбора наиболее перспективных объектов).

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (проект № ИРН AP19674667).

Acknowledgments. The work was carried out with the financial support of the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (project No. ИРН AP19674667).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Исследование противовоспалительной активности производных хиназолинона-4 и их ациклических форм / Э. Т. Оганесян [и др.] // Биомедицина. – 2010. – № 5. – С. 105–107.
2. Судакова, О. А. Исследование противовоспалительной активности новых производных гидрохинонсульфо-кислоты [Электронный ресурс] / О. А. Судакова, М. А. Демидова // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=5786>. – Дата доступа: 03.06.2024.
3. Исследование противовоспалительной активности новых производных 1,3-диазинона-4 и их ациклических предшественников, полученных на основе дофамина / И. С. Луговой [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 140–143.
4. Ермоленко, Т. И. Экспериментальное изучение противовоспалительной активности комбинированного препарата уролитолитического действия / Т. И. Ермоленко // Медичні перспективи. – 2015. – Т. 20, № 2. – С. 25–29.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р. У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М., 2005. – 832 с.
6. General atomic and molecular electronic structure system / M. W. Schmidt [et al.] // J. Comput. Chem. – 1993. – Vol. 14, N 11. – P. 1347–1363. <https://doi.org/10.1002/jcc.540141112>
7. Gaussian basis sets for molecular calculations / S. Huzinag [et al.]. – Amsterdam, 1984. – Vol. 16. – 426 p. – (Physical Sciences Data. Vol. 16). <https://doi.org/10.1016/c2009-0-07152-9>
8. Fukui, K. A Molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons / K. Fukui, T. Yonezawa, H. Shingu // J. Chem. Phys. – 1952. – Vol. 20, N 4. – P. 722–725. <https://doi.org/10.1063/1.1700523>
9. Дьюар, М. Теория возмущений молекулярных орбиталей / М. Дьюар, Р. Догерти. – М., 1977. – 695 с.
10. Putz, M. V. DFT chemical reactivity driven by biological activity: applications for the toxicological fate of chlorinated PAHs / M. V. Putz, A. M. Putz // Applications of density functional theory to biological and bioinorganic chemistry. – Berlin, 2013. – P. 181–231. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32750-6_6

References

1. Oganesyans E. T., Kodonidi I. P., Lysenko T. A., Ivchenko A. V., Zolotykh D. S., Becherov A. V. Study of anti-inflammatory activity of quinazolinone-4 derivatives and their acyclic forms. *Biomeditsina = Journal Biomed*, 2010, no. 5, pp. 105–107 (in Russian).
2. Sudakova O. A., Demidova M. A. Estimation of anti-inflammatory activity of new derivatives hydroquinone sulfonic acid. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*, 2012, no. 2. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=5786> (accessed 03 June 2024) (in Russian).
3. Lugovoy I. S., Kodonidi I. P., Sergeeva E. O., Smirnova L. P., Adzhienko V. V. Research of antiinflammatory activity of new derivatives of 1,3-diazinon-4 and their acyclic predecessors received on the basis of dopamine. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in the XXI century*, 2017, vol. 19, no. 3, pp. 140–143 (in Russian).
4. Iermolenko T. I. Experimental study of anti-inflammatory activity of the new combined with drug urolytolytic action. *Medichni perspektivi = Medical perspectives*, 2015, vol. 20, no. 2, pp. 25–29 (in Russian).
5. Khabriev R. U., ed. *Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*. 2d ed., revised. and additional. Moscow, 2005. 832 p. (in Russian).
6. Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boat J. A., Elbert S. T., Gordon M. S., Jensen J. H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K. A., Su S., Windus T. L., Dupuis M., Montgomery J. A. General atomic and molecular electronic structure system. *Journal of Computational Chemistry*, 1993, vol. 14, no. 11, pp. 1347–1363. <https://doi.org/10.1002/jcc.540141112>
7. Huzinaga S., Andzelm J., Radzio-Andzelm E., Sakai Y., Tatewaki H., Klobukowski M. *Gaussian basis sets for molecular calculations. Physical Sciences Data. Vol. 16*. Amsterdam, 1984, vol. 16. 426 p. <https://doi.org/10.1016/c2009-0-07152-9>
8. Fukui K., Yonezawa T., Shingu H. A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemical Physics*, 1952, vol. 20, no. 4, pp. 722–725. <https://doi.org/10.1063/1.1700523>
9. Dewar M. Y. S., Dougherty R. C. *The PMO theory of organic chemistry*. New York, 1975. 576 p. <https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4404-9>
10. Putz M. V., Putz A.-M. DFT Chemical Reactivity Driven by Biological Activity: Applications for the Toxicological Fate of Chlorinated PAHs. *Applications of density functional theory to biological and bioinorganic chemistry*. Berlin, 2013, pp. 181–231. https://doi.org/10.1007/978-3-642-32750-6_6

Информация об авторах

Дикусар Евгений Анатольевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: evgen_58@mail.ru.

Акишина Екатерина Александровна – науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: che.semenovaea@mail.ru.

Information about the authors

Dikusar Evgenij A. – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: evgen_58@mail.ru.

Akishina Ekaterina A. – Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: che.semenovaea@mail.ru.

Степин Святослав Генрихович – канд. хим. наук, доцент. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (пр. Фрунзе, 27, 210023, Витебск, Республика Беларусь). E-mail: stepins@tut.by.

Мукушева Гулим Кенесбековна – канд. хим. наук, профессор, заведующий кафедрой. Карагандинский исследовательский университет им. Е. А. Букетова (ул. Университетская, 28, 100024, Караганда, Республика Казахстан). E-mail: mukusheva1977@list.ru.

Жасымбекова Айгирим Рысбековна – докторант. Карагандинский исследовательский университет им. Е. А. Букетова (ул. Университетская, 28, 100024, Караганда, Республика Казахстан). E-mail: aigera-93-93@mail.ru.

Тойгамбекова Нуришат Нуржановна – докторант. Карагандинский исследовательский университет им. Е. А. Букетова (ул. Университетская, 28, 100024, Караганда, Республика Казахстан). E-mail: nukonti92@mail.ru.

Сейдахметова Роза Батталовна – канд. мед. наук, профессор. Карагандинский медицинский университет (ул. Гоголя, 40, 100008, Караганда, Республика Казахстан). E-mail: rozabat@mail.ru.

Поткин Владимир Иванович – академик, д-р хим. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: potkin@ifoch.bas-net.by

Stepin Svyatoslav G. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor. Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (27, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: stepins@tut.by.

Mukusheva Gulim K. – Ph. D. (Chemistry), Professor, Head of the Department. Karaganda Buketov University (28, Universitetskaya Str., 100024, Karaganda, Republic of Kazakhstan). E-mail: mukusheva1977@list.ru.

Zhasymbekova Aigirim Rysbekovna – Doctoral Student. Karaganda Buketov University (28, Universitetskaya Str., 100024, Karaganda, Kazakhstan). E-mail: aigera-93-93@mail.ru.

Toigambekova Nurizat N. – Doctoral Student. Karaganda Buketov University (28, Universitetskaya Str., 100024, Karaganda, Republic of Kazakhstan). E-mail: nukonti92@mail.ru.

Seidakhmetova Roza B. – Ph. D. (Medicine), Professor. Karaganda Medical University (40, Gogol Str., 100008, Karaganda, Republic of Kazakhstan). E-mail: rozabat@mail.ru.

Potkin Vladimir I. – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: potkin@ifoch.bas-net.by.

БИОЛОГИЯ**BIOLOGY**

УДК 577.352.4

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-460-464>

Поступило в редакцию 14.02.2024

Received 14.02.2024

В. А. Урбан, Ф. О. Константинов, В. Г. Вересов*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь***КОНФОРМАЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКА HVEM
ПРИ ЕГО ЦИС- И ТРАНС-СВЯЗЫВАНИИ С БЕЛКОМ BTLA***(Представлено членом-корреспондентом Е. И. Слобожаниной)*

Аннотация. Активация Т-клеток начинается при распознавании антигена Т-клеточным рецептором и регулируется сигналами, генерируемыми костимулирующими и коингибирующими молекулами. Эти молекулы, называемые иммунными контрольными точками (иммунными чекпойнтами), являются привлекательными терапевтическими мишенями для иммунотерапии рака и аутоиммунных заболеваний. Коингибиторный сигнальный путь, образуемый между TNF-рецептором HVEM (HerpesVirus Entry Mediator, TNFRSF14) и BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator), ограничивает активацию Т-клеток. Однако BTLA может также служить активирующим лигандом для HVEM при его транс-взаимодействии с BTLA, находящимся на соседней клетке. Эксперименты с использованием мутагенеза показали, что HVEM и BTLA как при цис-, так и при транс-связывании обладают идентичными контактными поверхностями, что предполагает наличие значительных конформационных перестроек в стволовых областях между эктодоменом и трансмембранным доменом белка HVEM при переходе от цис- к транс-связыванию с белком BTLA. Однако из-за технических сложностей кристаллизации рецепторов на поверхности клеток, обладающих длинными стволовыми участками, атомистические 3D-структуры HVEM в цис- и транс-состоянии, а также атомистические 3D-структуры полноцепочечных цис- и транс-комплексов между HVEM и BTLA до настоящего времени неизвестны. В настоящей работе с использованием подходов биоинформатики установлены структуры полноцепочечных белков HVEM и BTLA и их комплексов при их цис- и транс-взаимодействии. Полученные результаты могут быть использованы при разработке иммунорегуляторов для лечения рака и аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: Т-клетка, иммунные контрольные точки, HVEM, BTLA, цис- и транс-связывание

Для цитирования. Урбан, В. А. Конформационные особенности белка HVEM при его цис- и транс-связывании с белком BTLA / В. А. Урбан, Ф. О. Константинов, В. Г. Вересов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 460–464. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-460-464>

Viktor A. Urban, Frants O. Kanstantinau, Valery G. Veresov*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus***CONFORMATIONAL FEATURES OF HVEM PROTEIN UPON ITS CIS
AND TRANS BINDING TO BTLA PROTEIN***(Communicated by Corresponding Member Ekaterina I. Slobozhanina)*

Abstract. T-cell activation begins upon antigenic recognition by T-cell receptor and is regulated by signals generated by co-stimulating and co-inhibiting molecules. These molecules, known as immune checkpoints, are attractive therapeutic targets for the therapy of cancer and autoimmune diseases. Co-inhibiting signal pathway formed between TNF-receptor HVEM (HerpesVirus Entry Mediator, TNFRSF14) and BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator) limits T-cell activation. However, BTLA can serve also as activating ligand when interacts with HVEM on adjacent cell. Mutagenesis experiments have shown that the same interface is formed between HVEM and BTLA both upon cis and trans interactions thus suggesting significant conformational re-

arrangement in the HVEM stalk region between ectodomain and transmembrane domains upon transfer from cis to trans binding to BTLA. However, because of technical problems of the crystallization of surface receptor with long stalks, HVEM atomistic 3D-structures including stalk region are absent up to now. In this study, the approaches of structural bioinformatics were used to determine the structures of full-length proteins HVEM and BTLA and their complexes upon cis- and trans-interactions. The results obtained can be used upon developing immunoregulators for the immunotherapy of cancer and autoimmune diseases.

Keywords: T-cell, immune checkpoints, HVEM, BTLA, cis and trans binding

For citation. Urban V. A., Kanstantinau F. O., Veresov V. G. Conformational features of HVEM protein upon its cis and trans binding to BTLA protein. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 460–464 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-460-464>

Введение. Представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (РФНО, TNFRSF) HVEM (HerpesVirus Entry Mediator, TNFRSF14) регулирует иммунный ответ Т-клеток, активируя как воспалительный, так и ингибиторный сигнальные пути [1; 2]. HVEM является уникальным представителем суперсемейства РФНО, действуя и как рецептор ФНО-подобных лигандов, и как лиганд для белка иммуноглобулинового суперсемейства BTLA (B and T Lymphocyte Attenuator), что отличает HVEM от других иммунорегулирующих молекул. Клеточный контекст, в рамках которого HVEM связывается с BTLA, определяет будет ли клеточный ответ активирующим или ингибирующим. При экспрессии на различных иммунных клетках (транс-взаимодействие) связывание BTLA с HVEM является активирующим для HVEM и BTLA, в то время как связывание на одной клетке (цис-взаимодействие) является ингибирующим [3; 4]. Эксперименты с использованием мутагенеза показали, что HVEM и BTLA, как при цис-, так и при транс-связывании обладают идентичным интерфейсом [4], что предполагает наличие значительных конформационных перестроек в шарнирных областях между эктодоменом и трансмембранным доменом белка HVEM при переходе от цис-связывающего белка к транс-связывающему, однако локализация шарнирных областей и атомные структуры образующихся комплексов неизвестны. В настоящей работе осуществлены моделирование цис- и транс-комплексов между белками HVEM и BTLA и идентификация шарнирных областей белка HVEM.

Материалы и методы исследования. Предсказание атомистических 3D-структур белка BTLA и цис- и транс-структур белка HVEM осуществляли с использованием программы ассемблирования доменов DeepAssembly [5]. Разделение на домены, необходимое для работы программы DeepAssembly, осуществляли следующим образом. В качестве одного из доменов в каждом из трех случаев рассматривали внеклеточные сегменты белков, известные из рентгеноструктурного анализа (сегмент BTLA, включающий остатки 26–137, сегмент HVEM, включающий остатки 39–139), а также N-концевые домены, предшествующие эктодоменам с экспериментально установленной структурой (остатки 1–25 для BTLA и 1–38 для HVEM), трансмембранные домены (остатки 158–178 для BTLA и 203–223 для HVEM) и цитозольные домены (остатки 179–189 для BTLA и 224–283 для HVEM). Разделение белка на домены внутри сегментов белков в промежутке между сегментами с экспериментально установленной структурой и трансмембранными доменами осуществляли с использованием программ FUPred [6] и ThreaDom [7]. Установление шарнирных областей осуществляли с использованием программ LGA-GDT [8] и DynOmics [9]. Переход из цис-конформации в транс- исследовали с помощью программы KOSMOS [10], позволяющей оценить энергетический барьер между двумя конформациями.

Результаты и их обсуждение. В результате выполнения протокола разделения белка BTLA на домены были сформированы следующие домены: остатки 1–25 (домен 1); остатки 26–137 (домен 2, структура определена посредством рентгеноструктурного анализа); остатки 138–157 (домен 3); остатки 158–178 (домен 4, трансмембранный домен); остатки 179–289 (домен 5, цитозольный домен). Для белка HVEM-транс были сформированы домены: остатки 1–38 (домен 1); остатки 39–139 (домен 2, имеется экспериментальная структура для этого домена); остатки 140–154 (домен 3); остатки 155–189 (домен 4); остатки 190–202 (домен 5); остатки 203–223 (домен 6; трансмембранный домен); остатки 224–283 (домен 7; цитозольный домен). Для белка HVEM-цис остатки 140–202 рассматривали как единый домен. В результате HVEM-цис рассматривали как 5-доменный белок. Результаты расчета 3D-структуры белков BTLA, HVEM-цис, HVEM-транс с использованием программы DeepAssembly приведены на рис. 1. С использованием программ LGA-GDT [8] и DynOmics [9] были определены шарнирные области белка HVEM, ответствен-

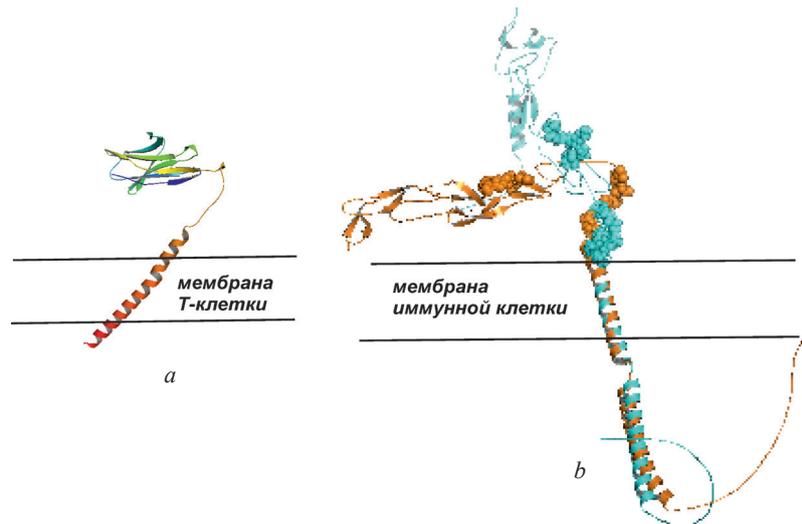


Рис. 1. Структурные модели белков BTLA и HVEM в мембранном окружении. Приведено изображение белка BTLA (*a*) и белка HVEM (*b*). Цис-конформация белка HVEM изображена коричневым цветом, транс-конформация показана в бирюзовом цвете. Шарнирные области белка HVEM показаны сферами. Иммунные HVEM⁺ клетки – иммунные клетки, экспрессирующие HVEM (Т-клетки, дендритные клетки, регуляторные Т-клетки, В-клетки)

Fig. 1. Structural models of BTLA and HVEM in the membrane environment. Shown are BTLA (*a*) and HVEM (*b*). HVEM cis-conformation and trans-conformation are depicted in brown and cyan, respectively. HVEM hinge regions are shown as spheres. HVEM⁺ immune cells stand for HVEM expressing immune cells

ные за переход белка из цис- в транс-конформацию. Такими оказались области белка 150VQG-GT155 (шарнир 1) и 188LVTKAGAGTS196 (шарнир 2) (рис. 1).

Структурная суперпозиция полноцепочечных белков HVEM (цис- и транс-) и BTLA на структуру комплекса эктодоменов двух белков, полученную с использованием рентгеноструктурного анализа (PDB-код: 2AW2), позволила предсказать атомистические цис- и транс-комплексы белков HVEM и BTLA (рис. 2).

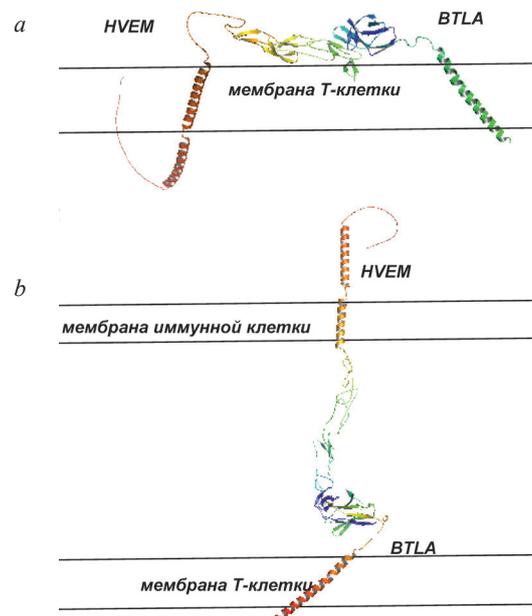


Рис. 2. Структурные модели полноцепочечных цис- и транс-комплексов белка BTLA и HVEM: *a* – структурная модель цис-комплекса; *b* – структурная модель транс-комплекса.

Под иммунной клеткой на рисунке *b* подразумевается любая иммунная клетка экспрессирующая белок HVEM

Fig. 2. Structural models of the full-length cis- and trans- BTLA/HVEM complexes. Shown are: structural models of the cis-complex (*a*) and of the trans-complex (*b*)

Анализ конформационной перестройки белка HVEM при переходе из транс-конформации в цис-конформацию с использованием нормальных мод и программы KOSMOS [10] показал наличие двух высоких энергетических барьеров при транс-цис-переходе белка HVEM. Динамика энергетической оценочной функции при переходе из цис- в транс-конформацию приведена на рис. 3. На рисунке видно наличие значительного энергетического барьера при переходе от цис- к транс-конформации, что позволяет предположить сосуществование двух популяций белков HVEM с цис- и транс-конформациями уже после посттрансляционного сворачивания.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить изгиб белка HVEM в его стволовой области, включающей домены CRD3 (сегмент 150VQGGT155; шарнир 1) и CRD4 (сегмент 188LVTKAGAGTS196; шарнир 2). Транс- и цис-конформации соответствуют двум глубоким потенциальным ямам в энергетическом ландшафте белка, что позволяет предположить образование двух различных конформаций и популяций белка HVEM (цис- и транс-) при его посттрансляционном сворачивании.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б22-016).

Acknowledgements. The work has been sponsored by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Grant Б22-016).

Список использованных источников

1. Beyond the anti-PD-1/PD-L1 era: promising role of the BTLA/HVEM axis as a future target for cancer immunotherapy / C. Sordo-Bahamonde [et al.] // *Mol. Cancer*. – 2023. – Vol. 22. – Art. 142. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01845-4>
2. Steinberg, M. W. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation / M. W. Steinberg, T. C. Cheung, C. F. Ware // *Immunol. Rev.* – 2011. – Vol. 244, N 1. – P. 169–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2011.01064.x>
3. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival / T. C. Cheung TC [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106, N 15. – P. 6244–6249. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902115106>
4. T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding micro-environment / T. C. Cheung [et al.] // *J. Immunol.* – 2009. – Vol. 183, N 11. – P. 7286–7296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902490>
5. Multi-domain and complex protein structure prediction using inter-domain interactions from deep learning / Y. Xia [et al.] // *Commun. Biol.* – 2023. – Vol. 6. – Art. 1221. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05610-7>
6. FUPred: detecting protein domains through deep-learning-based contact map prediction / W. Zheng [et al.] // *Bioinformatics*. – 2020. – Vol. 36, N 12. – P. 3749–3757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa217>
7. ThreaDom: Extracting Protein Domain Boundary Information from Multiple Threading Alignments / Z. Xue [et al.] // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, N 13. – P. i247–i256. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt209>
8. Zemla, A. LGA: A method for finding 3D similarities in protein structures / A. Zemla // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31, N 13. – P. 3370–3374. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg571>
9. DynOmics: dynamics of structural proteome and beyond / H. Li [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45, N W1. – P. W374–W380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx385>
10. Seo, S. KOSMOS: a universal morph server for nucleic acids, proteins and their complexes / S. Seo, M. K. Kim // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40, N W1. – P. W531–W536. <https://doi.org/10.1093/nar/gks525>

References

1. Sordo-Bahamonde C., Lorenzo-Herrero S., Granda-Díaz R., Martínez-Pérez A., Aguilar-García C., Rodrigo J. P., García-Pedrero J. M., Gonzalez S. Beyond the anti-PD-1/PD-L1 era: promising role of the BTLA/HVEM axis as a future target for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 2023, vol. 22, art. 142. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01845-4>
2. Steinberg M. W., Cheung T. C., Ware C. F. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. *Immunological Reviews*, 2011, vol. 244, no. 1, pp. 169–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2011.01064.x>

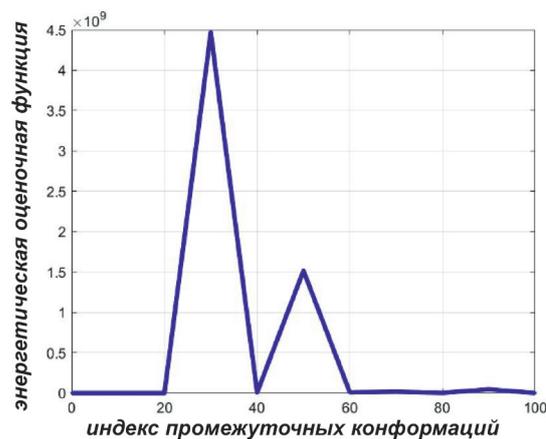


Рис. 3. Изменения безразмерной энергетической оценочной функции KOSMOS при переходе белка HVEM из цис- в транс-конформацию

Fig. 3. Changes of the dimensionless KOSMOS energy scoring function upon the transfer of the HVEM protein from cis to trans conformation

3. Cheung T. C., Steinberg M. W., Osborne L. M., Macauley M. G., Fukuyama S., Sanjo H., D'Souza C., Norris P. S., Pfeffer K., Murphy K. M., Kronenberg M., Spear P. G., Ware C. F. Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, vol. 106, no. 15, pp. 6244–6249. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902115106>
4. Cheung T. C., Osborne L. M., Steinberg M. W., Macauley M. G., Fukuyama S., Sanjo H., D'Souza C., Norris P. S., Pfeffer K., Murphy K. M., Kronenberg M., Spear P. G., Ware C. F. T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. *Journal of Immunology*, 2009, vol. 183, no. 11, pp. 7286–7296. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902490>
5. Xia Y., Zhao K., Liu D., Zhou X., Zhang G. Multi-domain and complex protein structure prediction using inter-domain interactions from deep learning. *Communications Biology*, 2023, vol. 6, art. 1221. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05610-7>
6. Zheng W., Zhou X., Wuyun Q., Pearce R., Li Y., Zhang Y. FUPred: detecting protein domains through deep-learning-based contact map prediction. *Bioinformatics*, 2020, vol. 36, no. 12, pp. 3749–3757. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa217>
7. Xue Z., Xu D., Wang Y., Zhang Y. ThreaDom: extracting protein domain boundary information from multiple threading alignments. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29, no. 13, pp. i247–i256. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt209>
8. Zemla A. LGA: A method for finding 3D similarities in protein structures. *Nucleic Acids Research*, 2003, vol. 31, no. 13, pp. 3370–3374. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg571>
9. Li H., Chang Y. Y., Lee J. Y., Bahar I., Yang L. W. DynOmics: dynamics of structural proteome and beyond. *Nucleic Acids Research*, 2017, vol. 45, no. W1, pp. W374–W380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx385>
10. Seo S., Kim M. K. KOSMOS: a universal morph server for nucleic acids, proteins and their complexes. *Nucleic Acids Research*, 2012, vol. 40, no. W1, pp. W531–W536. <https://doi.org/10.1093/nar/gks525>

Информация об авторах

Урбан Виктор Андреевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: urban@ibce.by.

Константинов Франц Олегович – аспирант. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: frantskanstantinau@gmail.com.

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

Information about the authors

Urban Viktor A. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: urban@ibce.by.

Kanstantinau Frants O. – Postgraduate Student. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: frantskanstantinau@gmail.com.

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

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

УДК 616-006.81.04:[57.085.23+577.21+612.017.1]
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-465-473>

Поступило в редакцию 26.08.2024
Received 26.08.2024

**Н. Г. Антоневи́ч¹, И. А. Бадаля́н¹, А. Е. Гонча́ров¹,
академик Л. П. Титов², В. В. Гринев³**

¹*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья,
Минск, Республика Беларусь*

³*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

РАЗРАБОТКА ЛЕНТИВИРУСНОЙ ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКТОПИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ И ПРЕЗЕНТАЦИИ МЕЛАНОМНОГО АНТИГЕНА MLANA В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Освоены и испытаны лентивирусные векторы экспрессии, кодирующие два генно-инженерных варианта белка MLANA, названных MLANA-FLAG[®] и MLANA-FLAG[®]-LAMP1. Транскрипционная/трансляционная активность сконструированных последовательностей в клетках линии HEK 293T и дендритных клетках подтверждена методами флуоресцентной конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. Созданные генетические конструкции могут быть использованы для генетической модификации дендритных клеток и разработки новых методов клеточной терапии меланомы.

Ключевые слова: меланома, белок MLANA, лентивирусная трансдукция, дендритные клетки, презентация антигена

Для цитирования. Разработка лентивирусной векторной системы для эктопической экспрессии и презентации меланомного антигена MLANA в клетках человека / Н. Г. Антоневи́ч [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 465–473. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-465-473>

**Natalia G. Antonevich¹, Iryna A. Badalyan¹, Andrei Y. Hancharou¹,
Academician Leonid P. Titov², Vasily V. Grinev³**

¹*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus*

³*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

DEVELOPMENT OF THE LENTIVIRUS-BASED VECTOR SYSTEM FOR ECTOPIC EXPRESSION AND PRESENTATION OF THE MELANOMA ANTIGEN MLANA IN HUMAN CELLS

Abstract. Lentivirus-based vectors encoding two engineered melanoma associated MLANA proteins, named MLANA-FLAG[®] and MLANA-FLAG[®]-LAMP1, were developed and tested. Transcriptional and translational activity of engineered proteins was confirmed in HEK 293T cells and dendritic cells by fluorescence confocal microscopy and flow cytometry. These new vectors can be used for lentiviral transduction of dendritic cells and the creation of new cell therapies for human melanoma.

Keywords: melanoma, MLANA protein, lentiviral transduction, dendritic cells, antigen presentation

For citation. Antonevich N. G., Badalyan I. A., Hancharou A. Y., Titov L. P., Grinev V. V. Development of the lentivirus-based vector system for ectopic expression and presentation of the melanoma antigen MLANA in human cells. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 465–473 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-465-473>

Введение. Меланома – злокачественное новообразование кожи, формирующееся из трансформированных меланоцитов кожи, сетчатки глаз или слизистых оболочек. Из-за быстрого роста опухоли и развития ранних отдаленных метастазов меланома занимает одно из первых мест в отношении неблагоприятного прогноза лечения среди всех онкологических заболеваний. По данным ВОЗ, заболеваемость меланомой кожи за последние 50 лет увеличилась в 7 раз, ежегодно во всем мире регистрируется свыше 300 тыс. случаев заболевания меланомой [1].

Классическая триада – хирургическое, химиотерапевтическое и радиолучевое лечение – зачастую оказывается малоэффективной в лечении метастатической меланомы. Комбинированная терапия IV стадии меланомы дает лишь от 5 до 22,5 % 5-летней выживаемости [2]. Таким образом, по-прежнему существует острая необходимость в разработке более эффективных методов лечения меланомы, улучшающих показатели выживаемости пациентов, особенно когда речь идет о прогрессировании заболевания и переходе онкологического процесса в терминальную стадию.

Известно, что при прогрессировании меланомы происходят глубокие изменения в работе системы иммунитета. В частности, снижение количества дендритных клеток (ДК), которые являются ключевыми активаторами адаптивного иммунного ответа и играют ведущую роль в индукции противоопухолевого иммунного ответа [3]. Основной функцией ДК является поглощение антигенов, в том числе опухолевых, их процессинг и презентация на мембране в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГСК) I и II класса, в таком виде антиген может быть распознан CD8⁺ и CD4⁺ Т-клетками соответственно. Клетки опухоли способны нарушать межклеточную сигнализацию, увеличивая выработку иммуносупрессивных цитокинов, что приводит, с одной стороны, к торможению активации Т-клеток, с другой – к снижению уровня экспрессии ГСК I и II ДК и их способности к антигенной презентации.

Учитывая, с одной стороны, снижение активности иммунной системы во время прогресса меланомы, и с другой – важность ДК и презентации ими опухолеспецифических или опухолеассоциированных антигенов для противоопухолевого иммунитета, инновационным подходом адъювантной иммунотерапии меланомы может быть использование ДК в качестве биомедицинского клеточного продукта (БМКП). Показано, что такого рода клеточные продукты являются эффективным средством для иммунотерапии онкологических заболеваний и безопасны в использовании [4]. Вместе с тем в случае меланомы результаты лечения с использованием ДК не всегда удовлетворительны. Одним из подходов повышения функциональной активности ДК является их генетическая модификация. Генетическая модификация ДК с помощью трансдукции (переноса генов посредством рекомбинантных вирусов) является предпочтительным способом получения клеток, презентующих целевой антиген, в тех случаях, когда нужна стабильная долгосрочная иммунизация. Наиболее эффективным вариантом такой модификации является лентивирусная трансдукция – перенос генов с помощью рекомбинантных лентивирусов [5; 6].

В качестве генов, переносимых в ДК с помощью лентивирусной трансдукции, могут выступать гены, кодирующие как опухолеассоциированные, так и опухолеспецифические меланомные антигены. Среди опухолеассоциированных антигенов меланомы интересен белок MLANA (MART-1, или антиген, связанный с меланомой, распознаваемый Т-клетками). Он представляет собой специфический для меланоцитов трансмембранный белок, экспрессируемый в нормальных меланоцитах, пигментном эпителии сетчатки и клетках меланомы. Внутриклеточно этот белок обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме, транс-отделе аппарата Гольджи и меланосомах [7], в созревании которых MLANA участвует путем обеспечения стабильности, транспортности и процессинга белка Pmel17 (gp100), что важно для образования меланосом II стадии созревания.

Цель исследования – разработка лентивирусной векторной системы для эктопической экспрессии и презентации антигена MLANA в дендритных клетках человека как основы дальнейшего получения БМКП для лечения меланомы.

Материалы и методы исследования. В работе были использованы плазмиды pUC57 с конструкциями, кодирующими разработанные авторами генно-инженерные варианты белка MLANA (Synbio Technologies, Южная Корея), лентивирусный вектор экспрессии pHR-SINcPPT-SIEW, вектор упаковки pCMV-dR8.91, вектор оболочки pMD2.G, линия клеток НЕК 293Т и бактериальный штамм *E. coli* DH5a.

Трансформацию бактерий *E. coli* DH5a плазмидной ДНК осуществляли кальциевым методом. Эндонуклеазы рестрикции SgsI и BamHI (Thermo Fisher Scientific, США) использовали для подготовки нуклеотидных последовательностей для клонирования. Очистку плазмид для ко-трансфекции проводили с помощью набора реагентов Endotoxin-free Plasmid DNA Purification

Xtra Midi Plus EF (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Германия). Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью реагентов «АртДНК MiniSpin Гель» (Беларусь).

Ко-трансфекцию клеток линии НЕК 293Т осуществляли с помощью полиэтиленимина: к смеси векторов экспрессии, упаковки и оболочки, взятых в соотношении 3 : 2 : 1 по массе, добавляли полиэтиленимин в массовом соотношении 3 : 1 с плазмидной ДНК, через 24 ч меняли ростовую среду на свежую. Сбор рекомбинантных псевдотипированных лентивирусов осуществляли через 48–72 ч после завершения ко-трансфекции. Концентрирование вирусных частиц проводили методом ультрацентрифугирования на протяжении 120 мин при 120000g и температуре +4 °С. Трансдукцию клеток проводили методом спинокуляции (1500g, 2 ч, +32 °С) с добавлением 4 мкг/мл Polybrene® как описано ранее [8; 9].

Через 48–72 ч после трансдукции осуществляли иммунофенотипирование клеток методом проточной цитометрии на визуализирующих проточных цитометрах Luminex Amnis FlowSight и Luminex Amnis ImageStream mkII (Luminex Corporation, США). Для иммунофенотипирования использовали антитела к белкам MLANA (APC, клон REA1093; Miltenyi Biotec, Германия), LAMP1/CD107a (BV605, клон H4A3; BioLegend, США) и аминокислотной последовательности FLAG® (FLAG-tag) (PE-Cy7, клон L5; BioLegend, США). Ядро визуализировали с помощью Hoechst 33258. Для обработки данных использовали программы IDEAS версии 6.2 и 6.4 (Luminex Corporation, США) и FCS Express, версия 7 (DeNovo Software, США). Микрофотографии клеток получали с использованием флуоресцентного микроскопа IX-73 (Olympus, Япония), обработку проводили в программе ImageJ версии 1.54 (NIH, США).

Вторичную структуру молекул РНК рассчитывали с помощью сервиса RNAfold с параметрами, взятыми по умолчанию. Вторичную структуру генно-инженерных белков рассчитывали с помощью сервиса Jpred4. Пространственно-мембранную локализацию белка рассчитывали с помощью программ Protter [10], I-TASSER [11], RosettaLoop [12] и GalaxyRefine2 [13].

Результаты и их обсуждение. Разработка экспрессионной кассеты на основе комплементарной ДНК гена *MLANA* человека. Ген человека *MLANA* (*Melan-A*, *MART-1*, *MART1*) локализован в сегменте 9p24.1 хромосомы 9 с координатами chr9:5890889-5910606. Нами проведен биоинформатический анализ транскриптомных данных, полученных по технологии RNA-Seq, для уточнения структуры и глобального профиля экспрессии гена *MLANA* в клетках человека. Результаты проведенного анализа указывают на то, что экспрессия этого гена может приводить к образованию в клетках пяти основных изоформ РНК. При этом три изоформы (депонированные в базе Ensembl под идентификационными номерами ENST00000381477, ENST00000381476 и ENST00000381471) являются матричными РНК и имеют высокую степень подтвержденности, а вот две другие изоформы (ENST00000482341 и ENST00000490518 по базе Ensembl) могут быть классифицированы как некодирующие и имеют низкий уровень подтверждения.

Разнообразие изоформ мРНК гена *MLANA* формируется за счет использования альтернативных точек начала и терминации транскрипции, а также альтернативного сплайсинга 5'-концевой области первичных РНК. Структура же открытой рамки считывания (ORF) при этом не меняется, что определяет существование у гена *MLANA* одной консенсусной последовательности CCDS6466.1, кодирующей только одну изоформу белка MLANA (Q16655 по UniProtKB).

Более детальный анализ 5'-концевых последовательностей мРНК гена *MLANA* показывает, что они обладают рядом особенностей, усложняющих дизайн единой комплементарной ДНК для клонирования. Во-первых, общим у всех трех изоформ мРНК является фрагмент длиной 27 нуклеотидов, непосредственно примыкающий к стартовому кодону, что недостаточно для выполнения роли полноценной 5'-нетранслируемой области (5'UTR) в будущем искусственном гене: согласно данным Ensembl первый квартиль распределения длин 5'UTRs 71981 мРНК человека равен 88 нуклеотидам. Во-вторых, стартовый кодон трансляции во всех этих молекулах РНК не является частью последовательности Козак. Причем, в-третьих, транскрипты ENST00000381476 и ENST00000381471 имеют в 5'UTR еще и криптоические стартовые кодоны. Как минимум один из таких кодонов в транскрипте ENST00000381471 может служить стартовым для короткой открытой рамки считывания uORF, начинающейся 117 нуклеотидом и заканчивающейся 329-м. Наконец, в-четвертых, расчет вторичной структуры 5'UTRs обсуждаемых транскриптов с помо-

щью RNAfold показывает, что 5'UTR транскрипта ENST00000381471 укладывается в термодинамически стабильную вторичную структуру с минимумом свободной энергии $-116,20$ ккал/моль, в то время как 5'UTR транскрипта ENST00000381477 стабилизируется с высвобождением лишь $15,9$ ккал/моль. Влияют ли такие вторичные структуры на эффективность трансляции мРНК гена *MLANA* не известно.

Таким образом, учитывая существенные различия в структуре 5'UTRs мРНК гена *MLANA*, а также отсутствие эмпирически выверенных сведений о влиянии таких 5'UTRs на эффективность трансляции транскриптов целевого гена видится целесообразным создание не одной, а нескольких последовательностей транскрибируемой части экспрессионной кассеты *MLANA*, различающихся по 5'-концевому региону. Однако это существенно усложнило бы работу по созданию конечной генетической конструкции, поэтому нами было принято решение о разработке экспрессионной кассеты *MLANA* на основе полноразмерных 5'UTR и ORF от транскрипта ENST00000381477. 5'UTR указанного транскрипта имеет минимально необходимый размер, не содержит криптических стартовых кодонов и обладает подходящим термодинамическим профилем. В дополнение к указанным элементам в экспрессионную кассету сразу же за ORF была добавлена 24-нуклеотидная вставка, кодирующая 8-аминокислотный ярлык DYKDDDDK в составе ожидаемого белка *MLANA-FLAG[®]* (рис. 1, *a*), необходимый для идентификации целевого белка с помощью универсальных анти-*FLAG[®]* антител.

Очевидно, что для презентации пептидов *MLANA* в комплексе с антигенами HLA класса I каких-то дополнительных конструктивных изменений описанной выше транскрибируемой последовательности не требуется: часть синтезируемого в клетках белка *MLANA* будет процессироваться и предоставляться Т-клеткам в комплексе с антигенами HLA класса I благодаря конститутивному механизму презентации [14]. Однако для презентации таких пептидов в комплексе с антигенами HLA класса II требуется попадание белка в лизосомальный или поздне-эндосомальный компартменты клетки. Необходимая компартиментализация может быть достигнута путем добавления к целевому белку, который экспрессируется эктопически, сигнальных пептидов от белков *LAMP1* или *LAMP3*, либо инвариантной цепи, ассоциированной с антигенами главного комплекса гистосовместимости класса II [15].

Сравнительный анализ имеющихся эмпирических данных показывает, что экспериментально наиболее подтверждена эффективность применения сигнального пептида от лизосомального мембранного гликопротеина *LAMP1*. При этом для встраивания целевого белка в лизосомальную мембрану целесообразно использовать не только сигнальный пептид, но и трансмембранный домен *LAMP1*. В связи с этим нами была спроектирована альтернативная конструкция кодирующей части экспрессионной кассеты *MLANA*, которая способна обеспечить наработку в целевых клетках гибридного белка *MLANA-FLAG[®]-LAMP1* (рис. 1, *a*) с заданной внутриклеточной локализацией.

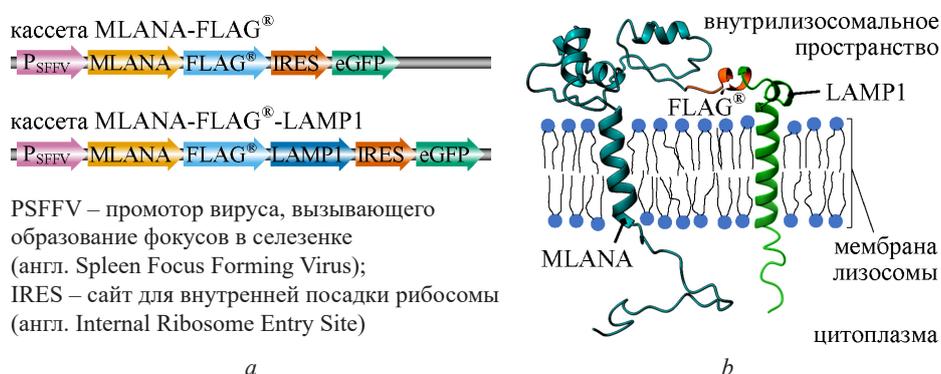


Рис. 1. Структура экспрессионных кассет (*a*), кодирующих разработанные белки *MLANA-FLAG[®]* и *MLANA-FLAG[®]-LAMP1*, и мембранная модель (*b*) гибридного белка *MLANA-FLAG[®]-LAMP1*

Fig. 1. The structure of the expression cassettes (*a*) encoding the developed *MLANA-FLAG[®]* and *MLANA-FLAG[®]-LAMP1* proteins, and membrane model (*b*) of the *MLANA-FLAG[®]-LAMP1* hybrid protein

Проведенный с помощью сервиса Jpred4 предварительный расчет вторичной структуры разработанного гибридного белка MLANA-FLAG[®]-LAMP1 показал, что он должен эффективно встраиваться в лизосомальную мембрану за счет сигнального пептида и трансмембранного домена от белка LAMP1. При этом основная часть белка MLANA должна экспонироваться во внутрелизосомальное пространство, что обеспечит его доступность для лизосомальных гидролаз и процессинг. Результаты данного этапа моделирования также указывают на то, что ярлык FLAG[®] должен остаться доступным для антител в случае встраивания в лизосомальную мембрану двух доменов MLANA и LAMP1 (рис. 1, b).

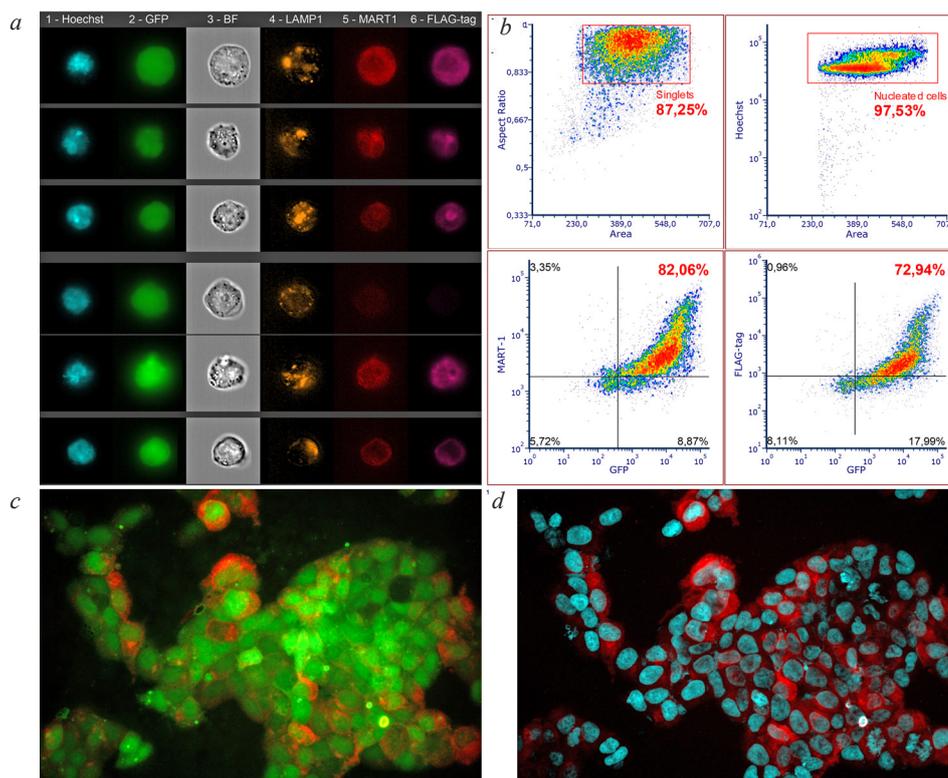


Рис. 2. Экспрессия целевых белков в клетках линии HEK 293Т, трансдуцированных рекомбинантными лентивирусами на основе вектора pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1: *a* – визуализирующая проточная цитометрия генетически модифицированных клеток линии HEK 293Т (6 репрезентативных клеток в 6 каналах: 1 – Hoechst 33258, 2 – eGFP, 3 – видимый свет, 4 – LAMP1, 5 – MLANA, 6 – FLAG[®]). Учет проводился на визуализирующем проточном цитометре Amnis ImageStream mkII (Cytex Biosciences, США) при увеличении $\times 60$; *b* – анализ экспрессии eGFP, белка MLANA и FLAG[®] (показано выделение одиночных клеток (singlets), ядросодержащих клеток и оценка в этом регионе количества трансдуцированных eGFP⁺ MLANA⁺ и eGFP⁺ FLAG[®] + клеток на цитограммах); *c* – ко-экспрессия зеленого флуоресцирующего белка eGFP (зеленый цвет) и белка MLANA (красный цвет); *d* – ко-локализация белка MLANA (красный цвет) и клеточных ядер (Hoechst 33258, голубой цвет). Флуоресцентная микроскопия ($\times 400$) генетически модифицированных клеток линии HEK 293Т спустя 72 ч после трансдукции

Fig. 2. Expression of target proteins in HEK 293T cells transduced with recombinant lentiviruses based on the pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1 vector: *a* – imaging flow cytometry analysis of genetically modified HEK 293T cells (6 representative cells in 6 channels: 1 – Hoechst 33258, 2 – eGFP, 3 – brightfield, 4 – LAMP1, 5 – MLANA, 6 – FLAG[®]); *b* – analysis of eGFP, MLANA and FLAG[®] protein expression (the gating of singlets and nucleated cells and evaluation of transduced eGFP⁺ MLANA⁺ and eGFP⁺ FLAG[®] + cells are shown on cytograms); *c* – coexpression of the fluorescent reporter protein eGFP (green) and MART-1 (APC, red), 72 h after transduction HEK 293T ($\times 400$); *d* – expression of MART-1 (APC, red) and visualization of nuclei with Hoechst 33258 (blue), 72 h after transduction of HEK 293T ($\times 400$)

Получение рекомбинантных лентивирусных частиц и оценка трансляционной активности генно-инженерных конструкций. Целевые фрагменты ДНК, кодирующие спроектированные генно-инженерные белки, были переклонированы из двух векторов на основе pUC57 со вставками MART1-FLAG[®] (472 п. н.) и MART1-FLAG[®]-LAMP1 (589 п. н.) в лентивирусный вектор экспрессии pHR-SINcPPT-SIEW второго поколения. В результате были получены рекомбинантные

векторы, названные pHR'-MLANA-FLAG[®] и pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1, правильность структуры которых была подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием.

Рекомбинантные псевдотипированные лентивирусы получали в культуре клеток HEK 293T путем ее ко-трансфекции пакующим вектором pCMV-dR8.91, вектором оболочки pMD2.G и одним из полученных рекомбинантных векторов экспрессии pHR'-MLANA-FLAG[®] и pHR'-MLANA-FLAG[®]-LAMP1 [8; 9]. В результате были получены препараты рекомбинантных лентивирусов с функциональным титром в диапазоне 3,0–4,0 логарифмов.

Пилотное испытание эффективности трансдукции такими лентивирусами и экспрессии трансгенов в модифицированных клетках было проведено с использованием клеточной линии HEK 293T, оптимально подходящей для решения поставленных задач. После трансдукции клеток HEK 293T транскрипционная/трансляционная активность сконструированных нами последовательностей подтверждалась методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. При этом учитывалась экспрессия репортерного флуоресцирующего белка eGFP и генно-инженерных белков MLANA-FLAG[®] и MLANA-FLAG[®]-LAMP1.

Как видно на рис. 2, *a*, экспрессия eGFP и MLANA в модифицированных клетках HEK 293T хорошо согласована. Более того, данные проточной цитометрии показывают, что среди eGFP-положительных клеток доля клеток, экспрессирующих MLANA и FLAG[®], превышает 80 % (рис. 2, *b*). Интересно, что в клетках HEK 293T, трансдуцированных трансгеном MLANA-FLAG[®]-LAMP1, интенсивность экспрессии белка LAMP1 в eGFP-положительных и eGFP-отрицательных не от-

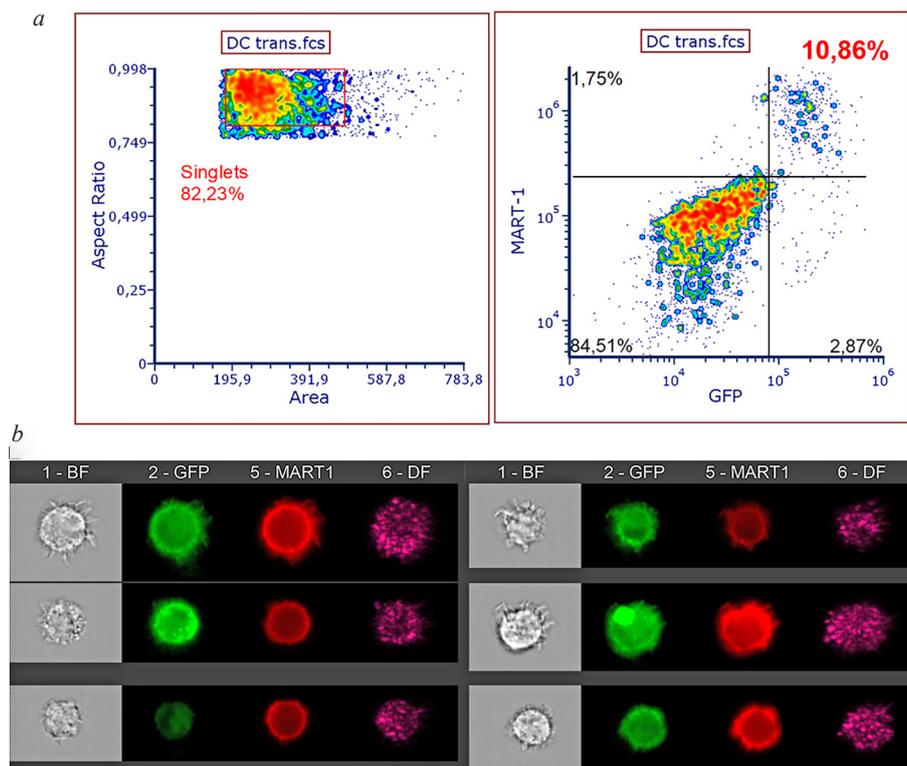


Рис. 3. Экспрессия целевых белков в ДК, трансдуцированных рекомбинантными лентивирусами на основе вектора pHR'-MLANA-FLAG[®]: *a* – анализ экспрессии eGFP и белка MLANA (показано выделение одиночных клеток (singlets) и оценка в этом регионе количества трансдуцированных eGFP⁺ MLANA⁺ ДК на цитограммах); *b* – визуализирующая проточная цитометрия генетически модифицированных ДК (показаны 3 репрезентативные клетки в 4 каналах: 1 – видимый свет, 2 – eGFP, 5 – MLANA, 6 – темное поле).

Учет проводился на визуализирующем проточном цитометре Amnis ImageStream mkII (Cytek Biosciences, США) при увеличении $\times 60$

Fig. 3. Expression of target proteins in DC transduced with recombinant lentiviruses based on the pHR'-MLANA-FLAG[®] vector: *a* – analysis of eGFP, MLANA protein expression (the gating of singlets and evaluation of transduced eGFP⁺MLANA⁺ DC in singlets gate); *b* – imaging flow cytometry analysis of genetically modified DC (shows 3 representative cells in 4 channels: 1 – brightfield, 2 – eGFP, 5 – MLANA, 6 – dark field)

личается. По-видимому, это обусловлено тем, что в клетках НЕК 293Т этот белок эндогенно экспрессируется на очень высоком уровне и дополнительный вклад трансгенного LAMP1 оказывается незначительным.

Согласно данным визуализирующей проточной цитометрии распределение eGFP, MLANA и FLAG® в модифицированных клетках носит равномерный диффузный характер (рис. 2, *c, d*). Интересно, что в клетках, экспрессирующих белок MLANA-FLAG®-LAMP1, не наблюдается преимущественная ассоциация антигена MLANA с лизосомами и/или поздними эндосомами. Наконец следует отметить, что в клетках НЕК 293Т экспрессия всех описанных трансгенов остается относительно стабильной на протяжении трех пассажей (данные не показаны).

Для подбора оптимальных условий трансдукции ДК на первом этапе проводилась оценка влияния Polybrene® в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл на жизнеспособность ДК с и без центрифугирования в течение 2 ч, что имитировало условия спинокуляции. Было установлено, что нетоксичными для ДК являются концентрации Polybrene® в диапазоне до 4 мкг/мл, центрифугирование не оказывало цитотоксического эффекта на ДК, клетки сохраняли жизнеспособность на уровне более 90 %. Использование концентрации Polybrene® более 4 мкг/мл приводило к резкому снижению жизнеспособности ДК – ниже 50 % (данные не показаны).

Была проанализирована эффективность трансдукции методом спинокуляции с множественностью инфицирования (МИ) в диапазоне 1–50 ед. Установлено, что при использовании МИ в диапазоне 1–30 ед. цитотоксический эффект на ДК не выявлялся, при использовании более высокой дозы лентивирусов жизнеспособность ДК падала ниже 90 %. При МИ 30 были получены наилучшие результаты с использованием обоих рекомбинантных лентивирусов, однако уровень трансдукции ДК не превышал 17 %. Из двух векторов наилучшие результаты получены с использованием рHR'-MLANA-FLAG® (рис. 3, *a, b*), уровень же трансдукции ДК с использованием рHR'-MLANA-FLAG®-LAMP1 не превышал 10 %.

Заключение. Нами получены и испытаны лентивирусные векторы экспрессии, кодирующие два генно-инженерных варианта белка MLANA, названных MLANA-FLAG® и MLANA-FLAG®-LAMP1. Рекомбинантные лентивирусы, продуцируемые клетками НЕК 293Т после ко-трансфекции последних одним из разработанных векторов экспрессии совместно с пакующим вектором рCMV-dR8.91 и вектором оболочки рMD2.G, способны переносить генетическую конструкцию в клетки линии НЕК 293Т и ДК. Транскрипционная и трансляционная активность сконструированных нами последовательностей в изучаемых клетках подтверждается методами флуоресцентной микроскопии и визуализирующей проточной цитометрии не только по наличию флуоресценции белка eGFP, но и по появлению в модифицированных клетках эктопических белков MLANA-FLAG® и MLANA-FLAG®-LAMP1, распознаваемых специфическими антителами. Эти данные указывают на то, что разработанные генетические конструкции могут быть использованы при условии дальнейшей доработки и исключения eGFP и маркерной вставки FLAG-tag для генетической модификации аутологичных ДК и разработки новых методов клеточной терапии меланомы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке гранта на исследование 1.17 ГПНИ «Биотехнологии-2» (№ 20220247 от 10.03.2022).

Acknowledgements. This research was supported by project grant 1.17 of the State program of scientific research «Biotechnology-2» (No. 20220247 dated 10 March 2022).

Список использованных источников

1. Всемирный день борьбы с меланомой [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://minzdrav.gov.by/ru/novoe-na-sayte/vsemirnyy-den-borby-s-melanomoy/>. – Дата доступа: 31.07.2024.
2. Efficacy of immune checkpoint inhibition in metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis / J. P. Pham [et al.] // *Melanoma Research*. – 2023. – Vol. 33, N 4. – P. 316–325. <https://doi.org/10.1097/cmr.0000000000000900>
3. Gonzalez, H. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression / H. Gonzalez, C. Hagerling, Z. Werb // *Genes Dev*. – 2018. – Vol. 32. – P. 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>
4. Применение биомедицинского клеточного продукта на основе моноцитарных дендритных клеток в лечении пациентов, страдающих раком мочевого пузыря: результаты клинического исследования / А. Е. Гончаров [и др.] // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сб. науч. тр. – Минск, 2021. – Вып. 11. – С. 205–215.

5. Dendritic Cell Vaccine Loaded with MG-7 Antigen Induces Cytotoxic T Lymphocyte Responses against Gastric Cancer / B. Zhu [et al.] // *J. Healthc. Eng.* – 2022. – Vol. 2022. – Art. 1964081. <https://doi.org/10.1155/2022/1964081>
6. GP96 and SMP30 Protein Priming of Dendritic Cell Vaccination Induces a More Potent CTL Response against Hepatoma / R. Huang [et al.] // *J. Healthc. Eng.* – 2022. – Vol. 2022. – Art. 2518847. <https://doi.org/10.1155/2022/2518847>
7. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins / A. M. De Mazière [et al.] // *Traffic*. – 2002. – Vol. 3, N 9. – P. 678–693. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30909.x>
8. Высокоэффективный перенос и стабильная экспрессия двух генов при лентивирусной трансдукции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга человека / В. В. Гринева [и др.] // *Генетика*. – 2012. – Т. 48, № 3. – P. 389–400.
9. Вирусные векторы для стабильной трансдукции мезенхимальных стволовых клеток человека: системы на основе аденоассоциированных вирусов и лентивирусов / А. В. Шахбазов [и др.] // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. – 2008. – № 4. – P. 216–218.
10. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data / U. Omasits [et al.] // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, N 6. – P. 884–886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>
11. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction / X. Zhou [et al.] // *Nat. Protoc.* – 2022. – Vol. 17. – P. 2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>
12. Park, H. CASP11 refinement experiments with ROSETTA / H. Park, F. DiMaio, D. Baker // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 84, N S1. – P. 314–322. <https://doi.org/10.1002/prot.24862>
13. GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure / G. R. Lee [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, N W1. – P. 451–455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz288>
14. Abualrous, E. T. Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II proteins: impact of polymorphism on antigen presentation / E. T. Abualrous, J. Sticht, C. Freund // *Curr. Opin. Immunol.* – 2021. – Vol. 70. – P. 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.04.009>
15. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules / A. Bonehill [et al.] // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, N 11. – P. 6649–6657. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6649>

References

1. *World Melanoma Day*. Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/novoe-na-sayte/vsemirnyy-den-borby-s-melanomoy/> (accessed 20 June 2024) (in Russian).
2. Pham J. P., On L., Ardolino L., Hurwitz J., Salaun H., Sim H.-W., Joshua A. M. Efficacy of immune checkpoint inhibition in metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Research*, 2023, vol. 33, no. 4, pp. 316–325. <https://doi.org/10.1097/cmr.0000000000000900>
3. Gonzalez H., Hagerling C., Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes and Development*, 2018, vol. 32, pp. 1267–1284. <https://doi.org/10.1101/gad.314617.118>
4. Hancharou A. Y., Prokhorov A. V., Timohina O. V., Antonevich N. G., Minich Y. S., Rynda A. G., Prokhorov V. A. The use of a biomedical cell product based on monocytic dendritic cells in the treatment of bladder cancer patients: results of a clinical research. *BGMU v avangarde meditsinskoj nauki i praktiki: sbornik nauchnykh trudov* [BSMU at the forefront of medical science and practice: collection of scientific papers]. Minsk, 2021, iss. 11, pp. 205–215 (in Russian).
5. Zhu B., Sun Y., Wei X., Zhou H., Cao J., Li Ch., Wu N. Dendritic Cell Vaccine Loaded with MG-7 Antigen Induces Cytotoxic T Lymphocyte Responses against Gastric Cancer. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022, vol. 2022, art. 1964081. <https://doi.org/10.1155/2022/1964081>
6. Huang R., Pan J., Zhang Y., Qin Q., Chao N., Huang T., Chen Ch., Zhao F., Luo G. GP96 and SMP30 Protein Priming of Dendritic Cell Vaccination Induces a More Potent CTL Response against Hepatoma. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022, vol. 2022, art. 2518847. <https://doi.org/10.1155/2022/2518847>
7. De Mazière A. M., Muehlethaler K., van Donselaar E., Salvi S., Davoust J., Cerottini J.-Ch., Lévy F., Slot J. W., Rimoldi D. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic*, 2002, vol. 3, no. 9, pp. 678–693. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30909.x>
8. Grinev V. V., Seviaryn I. N., Posrednik D. V., Kosmacheva S. M., Potapnev M. P. Highly efficient transfer and stable expression of two genes upon lentivirus transduction of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Russian Journal of Genetics*, 2012, vol. 48, pp. 336–346. <https://doi.org/10.1134/s1022795412030039>
9. Shakhbazov A. V., Seviaryn I. N., Goncharova N. V., Grinev V. V., Kosmacheva S. M., Potapnev M. P. Viral vectors for stable transduction of human mesenchymal stem cells: systems based on adeno-associated viruses and lentiviruses. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2008, vol. 146, pp. 531–533. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0320-x>
10. Omasits U., Ahrens Ch. H., Müller S., Wollscheid B. Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 6, pp. 884–886. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt607>
11. Zhou X., Zheng W., Li Y., Pearce R., Zhang Ch., Bell E. W., Zhang G., Zhang Ya. I-TASSER-MTD: a deep-learning-based platform for multi-domain protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 2022, vol. 17, pp. 2326–2353. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00728-0>
12. Park H., DiMaio F., Baker D. CASP11 refinement experiments with ROSETTA. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2016, vol. 84, no. S1, pp. 314–322. <https://doi.org/10.1002/prot.24862>
13. Lee G. R., Won J., Heo L., Seok Ch. GalaxyRefine2: simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. *Nucleic Acids Research*, 2019, vol. 47, no. W1, pp. 451–455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz288>

14. Abualrous E. T., Sticht J., Freund C. Major histocompatibility complex (MHC) class I and class II proteins: impact of polymorphism on antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, 2021, vol. 70, pp. 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.04.009>

15. Bonehill A., Heirman C., Tuyaerts S., Michiels A., Breckpot K., Brasseur F., Zhang Y., Van der Bruggen P., Thielemans K. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *Journal of Immunology*, 2004, vol. 172, no. 11, pp. 6649–6657. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6649>

Информация об авторах

Антоневич Наталья Георгиевна – канд. биол. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: antonevich.n@gmail.com. ORCID: 0000-0001-9535-7157.

Бадалян Ирина Артуровна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: irina1512.37533@gmail.com. ORCID: 0009-0002-8909-2767.

Гончаров Андрей Евгеньевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4869-9864.

Титов Леонид Петрович – академик, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ул. Казинца, 50, 220099, Минск, Республика Беларусь). E-mail: leotit310@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4524-3730.

Гринева Василий Викторович – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grinev_vv@bsu.by. ORCID: 0000-0001-9981-7333.

Information about the authors

Antonevich Natalia G. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antonevich.n@gmail.com. ORCID: 0000-0001-9535-7157.

Badalyan Iryna A. – Junior Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: irina1512.37533@gmail.com. ORCID: 0009-0002-8909-2767.

Hancharou Andrei Y. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Director. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andrei.hancharou@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4869-9864.

Titov Leonid P. – Academician, D. Sc. (Medicine), Professor, Chief Researcher. Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (50, Kazinets Str., 220099, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leotit310@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4524-3730.

Grinev Vasily V. – Ph. D. (Biology), Associate Professor. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grinev_vv@bsu.by. ORCID: 0000-0001-9981-7333.

МЕДИЦИНА

MEDICINE

УДК 577.29:575.23:617.735-007.23

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-474-482>

Поступило в редакцию 26.07.2024

Received 26.07.2024

В. А. Шиманович¹, И. Г. Гудиевская², Н. И. Рябокони¹, А. А. Яцкив¹, О. В. Терешенко²,
А. А. Далидович², Л. Н. Марченко², академик А. В. Кильчевский¹

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

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

**ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *ARMS2* (rs10490924) И *CFH* (rs1061170)
КАК МАРКЕРЫ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К НЕОВАСКУЛЯРНОЙ
ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ В БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ**

Аннотация. Изучена значимость полиморфных вариантов rs10490924 (A69S) гена предрасположенности к возрастной макулопатии 2 (*ARMS2*) и rs1061170 (Y402H) гена фактора H системы комплемента (*CFH*) для оценки риска возникновения неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации (нВМД) в белорусской популяции. Установлено, что гетеро- и гомозиготы по минорным аллелям ассоциированы с высоким риском возникновения нВМД. Показано, что риск заболевания возрастает многократно с каждой копией минорного аллеля (лог-аддитивная модель наследования) как для rs10490924, так и для rs1061170. Наибольшую рисковую значимость имеет полиморфизм rs10490924 гена *ARMS2*. При этом анализ парных сочетаний генотипов по исследуемым локусам обладает большей информативностью для оценки риска, чем по отдельным локусам. Полученные результаты могут быть использованы для определения генетической предрасположенности к нВМД у населения Беларуси.

Ключевые слова: неоваскулярная возрастная макулярная дегенерация, белорусская популяция, rs10490924 *ARMS2*, rs1061170 *CFH*, оценка риска, модель наследования

Для цитирования. Полиморфные варианты генов *ARMS2* (rs10490924) и *CFH* (rs1061170) как маркеры предрасположенности к неоваскулярной возрастной макулярной дегенерации в белорусской популяции / В. А. Шиманович [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 474–482. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-474-482>

Uladzislau A. Shymanovich¹, Irena G. Gudievskaya², Nadezhda I. Ryabokon¹, Hanna A. Yatskiu¹,
Volha V. Tserashenka², Anastassia A. Dalidovich², Ludmila N. Marchenka², Academician Alexander V. Kilchevsky¹

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

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

**POLYMORPHIC VARIANTS OF THE *ARMS2* (rs10490924) AND *CFH* (rs1061170) GENES
AS SUSCEPTIBILITY MARKERS TO NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION
IN THE BELARUSIAN POPULATION**

Abstract. The significance of the polymorphic variants rs10490924 (A69S) of the age-related maculopathy susceptibility 2 gene (*ARMS2*) and rs1061170 (Y402H) of the complement factor H gene (*CFH*) for risk assessment of neovascular age-related macular degeneration (nAMD) in the Belarusian population was studied. It was established that by minor alleles hetero- and homozygotes are associated with a high risk of nAMD. It was shown that the risk of disease development increases many times with each minor allele copy (the log-additive inheritance model) both for rs10490924 and rs1061170. The *ARMS2* rs10490924 polymorphism has the greatest risk significance. At the same time, the analysis of paired genotype combinations by the loci studied is more informative for risk assessment than for individual loci. The results obtained can be used to assess a genetic predisposition to nAMD in the Belarusian population.

Keywords: neovascular age-related macular degeneration, Belarusian population, *ARMS2* rs10490924, *CFH* rs1061170, risk assessment, inheritance model

For citation. Shymanovich U. A., Gudievskaya I. G., Ryabokon N. I., Yatskiu H. A., Tserashenka V. V., Dalidovich A. A., Marchenka L. N., Kilchevsky A. V. Polymorphic variants of the *ARMS2* (rs10490924) and *CFH* (rs1061170) genes as susceptibility markers to neovascular age-related macular degeneration in the Belarusian population. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 474–482 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-474-482>

Введение. Возрастная макулярная дегенерация или дистрофия (ВМД) – это прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, поражающее в первую очередь фовеа – часть сетчатки, содержащую высокую концентрацию фоторецепторов и ответственную за остроту центрального зрения. По клиническим проявлениям выделяют сухую (атрофическую) и влажную (экссудативную, или неоваскулярную) формы заболевания. Неоваскулярная ВМД (нВМД) имеет более тяжелое течение, характеризуется разрастанием сосудов (неоваскуляризацией) вблизи сетчатки, что приводит к накоплению жидкости в самой сетчатке и близлежащем пространстве, а также кровоизлиянию, отслойке ретинального пигментного эпителия и гибели фоторецепторов. ВМД является одной из ведущих причин нарушения зрения и слепоты у пожилых людей во всем мире, особенно в развитых странах. В европейских популяциях распространенность ранних и промежуточных стадий ВМД у лиц от 60 лет и старше составляет в среднем 25,3 %, а поздних стадий заболевания – 2,4 %. Вследствие старения популяций ожидается 15-процентный рост распространенности ВМД к 2050 г. [1], что указывает на необходимость всестороннего изучения патогенетических механизмов возникновения заболевания и принятия контрмер, включая выделение групп с повышенным риском возникновения ВМД для последующего проведения профилактических мероприятий и ранней постановки диагноза.

ВМД относится к мультифакториальным заболеваниям. При этом возраст, курение и питание с недостаточным количеством антиоксидантов и микроэлементов признаны самыми важными модифицирующими факторами, повышающими в несколько раз вероятность развития ВМД в целом, а также тяжелых поздних стадий заболевания [2; 3]. Однако особая роль отводится генетическим факторам риска возникновения ВМД. По результатам 20-летнего исследования близнецов показано, что вклад генетических факторов в развитие ВМД составляет около 49 % [4]. Молекулярно-генетические исследования значительно расширили понимание патофизиологии данного заболевания. Установлено, что гены, ассоциированные с ВМД, вовлечены во многие молекулярные процессы, включая липидный обмен, ангиогенез, ремоделирование внеклеточного матрикса, апоптоз, регуляцию активности системы комплемента, воспалительный ответ и другие [2; 5]. Самое крупное исследование с применением полногеномного секвенирования, опубликованное в 2016 г., обнаружило 52 независимых генетических варианта и 34 локуса, связанных с риском развития ВМД [6]. Среди них полиморфные варианты генов *CFH* и *ARMS2* выделяются как наиболее значимые в возникновении ВМД, определяя наследуемость заболевания на 50 или более процентов [5; 7].

Ген *CFH* кодирует фактор комплемента Н, который играет важную роль в поддержании гомеостаза иммунной системы. Являясь основным регулятором альтернативного пути активации системы комплемента, *CFH* ограничивает местное воспаление тремя основными способами: конкурируя с фактором В за связывание с *C3b*, ускоряя распад конвертазы *C3bB* и выступая в качестве кофактора в протеолитическом расщеплении *C3b* [8].

Ген *ARMS2* кодирует белок предрасположенности к возрастной макулопатии 2. Его структура, локализация и функции остаются недостаточно изученными. Предполагается, что *ARMS2* участвует в регуляции активности системы комплемента, являясь поверхностным активатором комплемента, однако эти данные нуждаются в подтверждении. Также было отмечено, что окислительный стресс локально повышает экспрессию *ARMS2* в моноцитах, а дисфункция этого белка вызывает окислительные повреждения в сетчатке [5; 9].

Цель исследования – изучить значимость полиморфных вариантов генов *ARMS2* (rs10490924) и *CFH* (rs1061170) для оценки риска нВМД в белорусской популяции.

Материалы и методы исследования. Исследуемые группы формировались в период с 2022 по 2023 г. на базе Учреждения здравоохранения «3-я городская клиническая больница имени Е. В. Клумова» г. Минска. Включение пациентов в исследование и взятие биологического материала проводились после подписания информированного согласия в соответствии с Хельсинкской декларацией. В группы включались пациенты в возрасте старше 50 лет. Постановка диагноза осуществлялась по результатам комплексного офтальмологического обследования, включающего оптическую когерентную томографию заднего полюса глаза с использованием прибора Stratus OCT (Carl Zeiss, Германия).

Общее количество лиц, включенных в исследование, составило 363. Группа исследования была сформирована из 234 человек с диагнозом нВМД. В группу клинического контроля (сравнения) были включены 129 человек с различными глазными патологиями, не связанными с ВМД.

Данные по полу и возрасту пациентов в исследуемых группах представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Демографическое описание исследуемых групп

Table 1. The demographic description of the study groups

Характеристика Characteristic		Группа клинического контроля Clinical control group	Группа с нВМД nAMD group	<i>p</i> -value
Пол	Мужчины, <i>n</i> (%)	31 (24,0)	72 (30,8)	>0,05
	Женщины, <i>n</i> (%)	98 (76,0)	162 (69,2)	
Возраст, годы	Медиана (минимальное – максимальное значение)	67 (51–93)	74 (52–93)	<0,0001

Тотальная ДНК получена из буккального эпителия пациентов с помощью набора для выделения ДНК «Нуклеосорб» в комплектации «А» (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь). Оценка концентрации и чистоты образцов ДНК проведена с использованием NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы ДНК до начала генотипирования хранились в лабораторных коллекциях Института генетики и цитологии НАН Беларуси при –20 °С.

Генотипирование всех образцов ДНК выполнено с использованием технологии конкурентной аллель-специфичной ПЦР (KASP – Kompetitive Allele Specific PCR), лежащей в основе наборов реактивов производства LGC Biosearch Technologies (Великобритания). ПЦР в реальном времени проведена с применением амплификатора CFX96 Touch (BioRad, США).

Статистическое различие в соотношении женщин и мужчин в двух группах оценено критерием χ^2 , а различие по возрасту – при помощи *U*-теста Манна–Уитни в пакете прикладных программ Statistica 7. Соответствие распределения частот генотипов равновесию Харди–Вайнберга, выбор модели наследования, а также анализ ассоциаций проводили с помощью веб-инструмента SNPStats. Анализ ассоциаций выполнен с поправкой на пол и возраст по пяти возможным моделям наследования: кодоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной (аддитивной или мультипликативной), каждая из которых отражает различные варианты сравнения частот генотипов (или аллелей). Для выбора наиболее вероятной модели наследования и интерпретации результатов использовался информационный критерий Акаике (ИКА). Модели с наименьшими значениями ИКА определялись как наиболее вероятные. Об ассоциации генотипов (или аллелей) с заболеванием судили по величине отношения шансов (odds ratio – OR) и 95 %-ного доверительного интервала (95 % confidence interval – 95 % CI). Все значения *p* < 0,05 принимались за статистически значимые.

Результаты и их обсуждение. Проверка распределения частот генотипов в группе клинического контроля показала его соответствие закону Харди–Вайнберга как для rs10490924 гена *ARMS2*, так и для rs1061170 гена *CFH*. Установлено также, что частоты минорных аллелей этих локусов в контрольной группе статистически не отличаются от данных по другим европейским популяциям (табл. 2), включая население Нидерландов, Дании, Швеции, Финляндии, Великобритании и Эстонии, а также от данных международного проекта 1000Genomes, представленных в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) [10].

Группа клинического контроля состояла на 58,1 % из пациентов с катарактой, 15,5 % – с деструкцией стекловидного тела, 14,0 % – с гиперметропией, 3,9 % – с миопией слабой степени, 3,1 % – с глаукомой, 5,4 % пациентов имели другие заболевания глаз, не связанные с ВМД. Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей в этих подгруппах не выявил статистически значимых различий, что может указывать на отсутствие связи исследуемых локусов rs10490924 и rs1061170 с перечисленными офтальмологическими заболеваниями и, соответственно, на возможность использования этих подгрупп в качестве контроля к группе пациентов с нВМД.

Результаты сравнительного анализа распределения частот генотипов и аллелей в группе с нВМД и в группе клинического контроля приведены в табл. 3. Статистически значимую

($p < 0,0001$) ассоциацию с основным заболеванием показали оба исследуемых локуса по четырем из пяти возможных моделям наследования. Наименьшие значения ИКА были получены для лог-аддитивной модели, а далее по возрастанию – для кодоминантной модели. Лог-аддитивная модель наследования говорит о том, что риск заболевания растет по логарифмическому закону с каждой копией альтернативного аллеля. Кодоминантная модель позволяет оценить риски для различных генотипов с альтернативным аллелем независимо друг от друга.

Т а б л и ц а 2. Сравнение частот минорных аллелей исследованных локусов в группе клинического контроля с данными по европейским популяциям и проекта 1000Genomes

Table 2. Comparison of minor allele frequencies of the studied loci in the clinical control group with the data on European populations and the 1000Genomes project

Ген Gene	Локус Locus	Минорный аллель Minor allele	Частота минорного аллеля, % Minor allele frequency, %			p-value
			Беларусь (данное исследование) Belarus (this study)	Европа (минимальное – мак- симальное значения) [10] Europe (min –max) [10]	1000Genomes [10]	
<i>ARMS2</i>	rs10490924	T	25,2	18,9–29,2	28,0	>0,05
<i>CFH</i>	rs1061170	C	34,9	35,8–43,1	27,1	>0,05

По кодоминантной модели наследования рисковые для белорусской популяции генотипы G/T и T/T полиморфного локуса rs10490924 гена *ARMS2* имели высокие значения отношения шансов: OR = 3,53 (95 % CI = [1,99–6,24]; $p < 0,0001$) и OR = 17,49 (95 % CI = [7,58–40,38]; $p < 0,0001$) соответственно. Примечательно, что в случае гомозиготного по минорному аллелю генотипа T/T отношение шансов развития нВМД многократно выше, чем для гетерозиготы. Эта тенденция статистически подтверждена ($p < 0,0001$) лог-аддитивной моделью с высоким значением отношения шансов, равным 4,01, для минорного аллеля T (табл. 3). Полученные данные уточняют вероятную модель наследования, описанную ранее для rs10490924 в белорусской популяции [11], а также указывают на более высокие риски возникновения ВМД при наличии в геноме минорного аллеля rs10490924. В то же время сравнивая наши данные с результатами исследований Консорциума EYE-RISK, полученными по 4 европейским популяциям (Португалии, Нидерландов, Германии и Испании) [12], можно предположить, что в белорусской популяции связь рискового аллеля T rs10490924 с ВМД приближена к среднеевропейскому уровню (OR = 4,01 versus OR = 3,29).

Следует отметить, что полиморфный вариант rs10490924 *ARMS2* приводит к замене аланина на серин в положении 69 (A69S) в конечном белке. Известно также, что rs10490924 тесно связан с rs11200638 – однонуклеотидной заменой в промоторной области гена сериновой пептидазы 1 (*HTRAI*), что осложняет точное определение статистическими методами того, какой именно из этих локусов ответственен за возникновение ВМД [9]. Однако обнаружено, что rs10490924 *ARMS2* находится в тесной связи с другими полиморфными локусами *HTRAI*, а его включение вместе с этими локусами в комплексные модели оценки риска ВМД усиливает предсказательную точность исследуемых моделей [13], тем самым указывая на важность rs10490924 *ARMS2* в формировании ВМД.

Полиморфный локус rs1061170 гена *CFH* в белорусской популяции также демонстрирует значительную связь с нВМД (табл. 3), с увеличением отношения шансов от гетеро- к гомозиготному по минорному аллелю генотипу: OR = 2,56; 95 % CI = [1,47–4,48]; $p < 0,0001$ для генотипа C/T; и OR = 5,80; 95 % CI = [2,74–12,29]; $p < 0,0001$ для генотипа C/C. Значение отношения шансов для минорного аллеля C достигает 2,43. Полученные результаты в полной мере согласуются с данными мета-анализа 39 исследований, проведенных в европейских популяциях и показавших усредненное значение отношения шансов в размере 2,43–2,90 для различных форм ВМД [14].

Из всех вариантов гена *CFH*, ассоциированных с риском развития ВМД, исследуемый нами полиморфизм rs1061170 считается наиболее важным [5]. Он приводит к замене аминокислоты тирозина на гистидин в 402 положении (Y402H), что уменьшает аффинность фактора Н к его лигандам. Хотя точные механизмы влияния варианта Y402H на патофизиологию ВМД остаются не полностью изученными, показано, что такая изоформа *CFH* менее эффективно связывается

Т а б л и ц а 3. Анализ ассоциации генотипов и аллелей rs10490924 *ARMS2* и rs1061170 *CFH* с предрасположенностью к нВМД (использована поправка на пол и возраст)
 T a b l e 3. Analysis of the genotype and allele associations of *ARMS2* rs10490924 and *CFH* rs1061170 with nAMD susceptibility (age and gender adjusted)

Ген, locus Gene, locus	Генетическая модель Genetic model	Генотипы и аллели Genotypes and alleles	Частота (%) в группе клинического контроля (<i>n</i> = 129) Frequency (%) in the clinical control group (<i>n</i> = 129)	Частота (%) в группе с нВМД (<i>n</i> = 234) Frequency (%) in the nAMD group (<i>n</i> = 234)	OR [95% CI]	<i>p</i> -value	ИКА AIC
<i>ARMS2</i> , rs10490924	Кодоминантная	G/G	56,6	22,6	1,00		
		G/T	36,4	41	3,53 [1,99–6,24]	<0,0001	360,4
		T/T	7	36,3	17,49 [7,58–40,38]		
	Доминантная	G/T+T/T	43,4	77,3	5,78 [3,38–9,91]	<0,0001	376,6
		T/T	7	36,3	8,66 [4,05–18,53]	<0,0001	378,3
		G/T	36,4	41	1,23 [0,76–1,99]	0,37	421,2
<i>CFH</i> , rs1061170	Кодоминантная	T	25,2	56,8	4,01 [2,73–5,90]	<0,0001	358,8
		T/T	41,1	17,5	1,00		
		C/T	48,1	53,4	2,56 [1,47–4,48]	<0,0001	399,5
	Доминантная	C/C	10,8	29,1	5,80 [2,74–12,29]		
		C/T+C/C	58,9	82,5	3,19 [1,87–5,44]	<0,0001	403,4
		C/C	10,8	29,1	3,13 [1,63–6,03]	<0,0001	408,7
Лог-аддитивная	C/T	48,1	53,4	1,24 [0,78–1,98]	0,37	421,2	
	C	34,9	55,8	2,43 [1,68–3,52]	<0,0001	397,5	

П р и м е ч а н и е: ИКА – информационный критерий Акаике.
 N o t e: AIC – the Akaike information criterion.

с С-реактивным белком и фибромодулином, а также мембраной Бруха, прилегающей к пигментному эпителию сетчатки [8]. Кроме того, было показано, что этот вариант фактора Н ассоциирован с неконтролируемой активацией системы комплемента, а также со снижением доли CD4⁺ Т-лимфоцитов и повышением уровня С-реактивного белка у здоровых людей, вызывая провоспалительные изменения в динамике иммунной реакции [5; 15].

Дальнейший статистический анализ распределения генотипов в белорусской популяции показал, что гомозиготы дикого типа имеют протективное действие по отношению к нВМД при высоких значениях уровня значимости: OR = 0,40; 95 % CI = [0,26–0,61]; $p < 0,0001$ для генотипа G/G rs10490924; и OR = 0,43; 95 % CI = [0,27–0,68]; $p < 0,001$ для генотипа T/T rs1061170 (табл. 3).

Результаты анализа парных сочетаний генотипов по исследуемым локусам в группе с нВМД по сравнению с клиническим контролем представлены на рисунке. В этом комплексе данных обращают на себя внимание следующие факты. Наблюдается постепенное снижение риска развития ВМД по мере уменьшения общего количества рисковых аллелей от 4 до 1, что находится в строгом соответствии с лог-аддитивными моделями наследования рисковых аллелей каждого локуса в отдельности. При этом наличие гомозиготы по минорному аллелю Т rs10490924 гена *ARMS2* определяет риск развития ВМД даже в присутствии гомозиготы по мажорному аллелю Т rs1061170 *CFH*, обладающему сильным протекторным эффектом. В то же время гомозигота по минорному аллелю С rs1061170 *CFH* теряет свою рисковую значимость в присутствии протекторного генотипа G/G rs10490924 *ARMS2*. В комплексе эти данные свидетельствуют о том, что полиморфизм rs10490924 гена *ARMS2* в большей степени, чем rs1061170 *CFH*, определяет возникновение нВМД, и этот факт должен учитываться при оценке риска заболевания.

		rs10490924 <i>ARMS2</i>		
		G/G	G/T	T/T
rs1061170 <i>CFH</i>	T/T	OR = 0,22 95 % CI = [0,10–0,47] $p = 6,58E-05$	OR = 0,25 95 % CI = [0,13–0,49] $p = 2,39E-05$	OR = 4,35 95 % CI = [0,98–19,33] $p = 3,87E-02$
	C/T	OR = 0,29 95 % CI = [0,17–0,50] $p = 5,45E-06$	OR = 2,23 95 % CI = [1,20–4,13] $p = 1,12E-02$	OR = 5,58 95 % CI = [2,15–14,48] $p = 6,95E-05$
	C/C	OR = 0,85 95 % CI = [0,36–2,02] $p = 8,22E-01$	OR = 5,48 95 % CI = [1,63–18,43] $p = 2,23E-03$	OR = 8,28 95 % CI = [1,93–35,42] $p = 8,74E-04$

Отношения шансов при комбинации генотипов rs10490924 *ARMS2* и rs1061170 *CFH* в группе пациентов с нВМД по отношению к группе клинического контроля

Odds ratio for the combination of *ARMS2* rs10490924 and *CFH* rs1061170 genotypes in the nAMD group versus the clinical control group

Заклучение. Таким образом, в ходе проведенного исследования установлено, что повышенные частоты минорных аллелей в локусах rs10490924 гена *ARMS2* и rs1061170 гена *CFH* ассоциированы с возникновением нВМД в белорусской популяции. При этом риск развития заболевания возрастает с каждой копией минорного аллеля как для rs10490924, так и rs1061170. Наибольшую рисковую значимость имеет полиморфизм rs10490924, а комплексный анализ генотипов по двум локусам обладает большей информативностью, чем по отдельным локусам. Полученные результаты указывают на возможность использования локусов rs10490924 и rs1061170 для оценки риска возникновения нВМД у населения Беларуси.

Благодарности. Работа выполнена в рамках мероприятия 14 «Исследовать фармакогеномику возрастной макулярной дегенерации сетчатки (ВМД) и разработать систему оценки эффективности анти-VEGF терапии у пациентов с прогрессирующей формой заболевания» (2022–2024 гг.) подпрограммы «Инновационные биотехнологии-2025» государственной программы «Научные технологии и техника» на 2021–2025 годы. Авторы выражают благодарность медицинским работникам учреждения здравоохранения «3-я городская клиническая больница им. Е. В. Клумова» (г. Минск), принявшим участие в сборе биологического материала, а также научным сотрудникам Института генетики и цитологии НАН Беларуси, участвовавшим в формировании коллекции ДНК, используемой в данной работе.

Acknowledgements. The work was performed within the framework of activity 14 “To study the pharmacogenomics of age-related macular degeneration (AMD) and develop a system for assessing the effectiveness of anti-VEGF therapy in patients with a progressive form of the disease” (2022–2024) of the subprogram “Innovative biotechnology-2025” of the State Program “Knowledge-intensive technologies and equipment” for 2021–2025. The authors are grateful to the medical workers of the Health Care Institution “3rd City Clinical Hospital named after E. V. Klumov” (Minsk) who took part in the collection of biological material, as well as the researchers of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, who contributed to the formation of the DNA collection used in this work.

Список использованных источников

1. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis / J. Q. Li [et al.] // *British Journal of Ophthalmology*. – 2020. – Vol. 104, N 8. – P. 1077–1084. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-314422>
2. Risk factors for progression of age-related macular degeneration / T. J. Heesterbeek [et al.] // *Ophthalmic and Physiological Optics*. – 2020. – Vol. 40, N 2. – P. 140–170. <https://doi.org/10.1111/opo.12675>
3. Genetic risk, lifestyle, and age-related macular degeneration in Europe / J. M. Colijn [et al.] // *Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 128, N 7. – P. 1039–1049. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.11.024>
4. Heritability and risk factors of incident small and large drusen in the Copenhagen Twin cohort eye study: A 20-year follow-up / M. Belmouhand [et al.] // *Ophthalmologica*. – 2022. – Vol. 245, N 5. – P. 421–430. <https://doi.org/10.1159/000525652>
5. Shughoury, A. Molecular genetic mechanisms in age-related macular degeneration / A. Shughoury, D. D. Sevgi, T. A. Ciulla // *Genes*. – 2022. – Vol. 13, N 7. – Art. 1233. <https://doi.org/10.3390/genes13071233>
6. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants / L. G. Fritsche [et al.] // *Nature Genetics*. – 2016. – Vol. 48. – P. 134–143. <https://doi.org/10.1038/ng.3448>
7. Genetics of age-related macular degeneration (AMD) / M. M. DeAngelis [et al.] // *Human Molecular Genetics*. – 2017. – Vol. 26, N 1. – P. 45–50. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx343>
8. Factor H: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions / A. Kopp [et al.] // *Biomolecules*. – 2012. – Vol. 2, N 1. – P. 46–75. <https://doi.org/10.3390/biom2010046>
9. Ongoing controversies and recent insights of the *ARMS2-HTRA1* locus in age-related macular degeneration / A. May [et al.] // *Experimental Eye Research*. – 2021. – Vol. 210. – Art. 108605. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108605>
10. The single nucleotide polymorphism database (dbSNP) of nucleotide sequence variation [Electronic resource] // National Center for Biotechnology Information. – Bethesda, 2006. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. – Date of access: 06.03.2024.
11. Генетические факторы предрасположенности к развитию влажной формы возрастной макулярной дистрофии сетчатки / И. Г. Гудиевская [и др.] // *Сб. науч. тр. XIV Рос. общенац. офтальмолог. форума*. – М., 2021. – Т. 1. – С. 28–32.
12. Development of a genotype assay for age-related macular degeneration: The EYE-RISK Consortium / A. de Breuk [et al.] // *Ophthalmology*. – 2021. – Vol. 128, N 11. – P. 1604–1617. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.07.037>
13. Genome-wide association study and identification of systemic comorbidities in development of age-related macular degeneration in a hospital-based cohort of Han Chinese / C. H. Shih [et al.] // *Frontiers in Genetics*. – 2023. – Vol. 14. – Art. 1064659. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1064659>
14. Maugeri, A. The association between complement factor H rs1061170 polymorphism and age-related macular degeneration: a comprehensive meta-analysis stratified by stage of disease and ethnicity / A. Maugeri, M. Barchitta, A. Agodi // *Acta Ophthalmologica*. – 2019. – Vol. 97, N 1. – P. 8–21. <https://doi.org/10.1111/aos.13849>
15. Complement factor H Y402H polymorphism results in diminishing CD4+ T cells and increasing C-reactive protein in plasma / M. K. Nielsen [et al.] // *Scientific Reports*. – 2023. – Vol. 13. – Art. 19414. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46827-0>

References

- Li J. Q., Welchowski T., Schmid M., Mauschitz M. M., Holz F. G., Finger R. P. Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Ophthalmology*, 2020, vol. 104, no. 8, pp. 1077–1084. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2019-314422>
- Heesterbeek T. J., Lorés-Motta L., Hoyng C. B., Lechanteur Y. T. E., den Hollander A. I. Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 2020, vol. 40, no. 2, pp. 140–170. <https://doi.org/10.1111/opo.12675>
- Colijn J. M., Meester-Smoor M., Verzijden T., de Breuk A., Silva R., Merle B. M. J., Cougnard-Grégoire A., Hoyng C. B., Fauser S., Coolen A., Creuzot-Garcher C., Hense H.-W., Ueffing M., Delcourt C., den Hollander A. I., Klaver C. C. W. Genetic risk, lifestyle, and age-related macular degeneration in Europe. *Ophthalmology*, 2021, vol. 128, no. 7, pp. 1039–1049. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.11.024>
- Belmouhand M., Rothenbuehler S. P., Bjerager J., Dabbah S., Hjelmberg J. B., Munch I. C., Dalgård C., Larsen M. Heritability and risk factors of incident small and large drusen in the Copenhagen Twin cohort eye study: A 20-year follow-up. *Ophthalmologica*, 2022, vol. 245, no. 5, pp. 421–430. <https://doi.org/10.1159/000525652>
- Shughoury A., Sevgi D. D., Ciulla T. A. Molecular genetic mechanisms in age-related macular degeneration. *Genes*, 2022, vol. 13, no. 7, art. 1233. <https://doi.org/10.3390/genes13071233>
- Fritsche L. G., Igl W., Cooke Bailey J. N., Grassmann F., Sengupta S., Bragg-Gresham J. L., Burdon K. P. [et al.]. A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants. *Nature Genetics*, 2016, vol. 48, pp. 134–143. <https://doi.org/10.1038/ng.3448>
- DeAngelis M. M., Owen L. A., Morrison M. A., Morgan D. J., Li M., Shakoob A., Vitale A., Iyengar S., Stambolian D., Kim I. K., Farrer L. A. Genetics of age-related macular degeneration (AMD). *Human Molecular Genetics*, 2017, vol. 26, no. 1, pp. 45–50. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx343>
- Kopp A., Hebecker M., Svobodová E., Józsi M. Factor H: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. 46–75. <https://doi.org/10.3390/biom2010046>
- May A., Su F., Dinh B., Ehlen R., Tran C., Adivikolanu H., Shaw P. X. Ongoing controversies and recent insights of the ARMS2-HTRA1 locus in age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 2021, vol. 210, art. 108605. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2021.108605>
- The single nucleotide polymorphism database (dbSNP) of nucleotide sequence variation. *National Center for Biotechnology Information*. – Bethesda, 2006. – Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> (accessed 06 March 2024).
- Gudievskaya I. G., Marchenko L. N., Shapturenko M. N., Vakula S. I., Kondratyuk A. V., Grischuk E. V., Kilchevsky A. V. Genetic predisposition factors to the development of the wet form of age-related macular degeneration. *Sbornik nauchnykh trudov XIV Rossijskogo obshchenatsional'nogo oftal'mologicheskogo foruma* [Collection of scientific papers of the Russian National Ophthalmological Forum]. Moscow, 2021, vol. 1, pp. 28–32 (in Russian).
- de Breuk A., Acar I. E., Kersten E., Schijvenaars M., Colijn J. M., Haer-Wigman L., Bakker B. [et al.]. Development of a genotype assay for age-related macular degeneration: The EYE-RISK Consortium. *Ophthalmology*, 2021, vol. 128, no. 11, pp. 1604–1617. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2020.07.037>
- Shih C. H., Chuang H. K., Hsiao T. H., Yang Y. P., Gao C. E., Chiou S. H., Hsu C. C., Hwang D. K. Genome-wide association study and identification of systemic comorbidities in development of age-related macular degeneration in a hospital-based cohort of Han Chinese. *Frontiers in Genetics*, 2023, vol. 14, art. 1064659. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1064659>
- Maugeri A., Barchitta M., Agodi A. The association between complement factor H rs1061170 polymorphism and age-related macular degeneration: a comprehensive meta-analysis stratified by stage of disease and ethnicity. *Acta Ophthalmologica*, 2019, vol. 97, no. 1, pp. 8–21. <https://doi.org/10.1111/aos.13849>
- Nielsen M. K., Subhi Y., Falk M., Singh A., Sørensen T. L., Nissen M. H., Faber C. Complement factor H Y402H polymorphism results in diminishing CD4+ T cells and increasing C-reactive protein in plasma. *Scientific Reports*, 2023, vol. 13, art. 19414. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46827-0>

Информация об авторах

Шиманович Владислав Андреевич – мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: u.shymanovich@igc.by.

Гудиевская Ирина Геннадьевна – науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, Минск, Республика Беларусь). E-mail: eyeill@bsmu.by.

Рябоконе Надежда Ивановна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: n.ryabokon@igc.by.

Information about authors

Shymanovich Uladzislau A. – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: u.shymanovich@igc.by.

Gudievskaya Irena G. – Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eyeill@bsmu.by.

Ryabokon Nadezhda I. – Ph. D. (Biology), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: n.ryabokon@igc.by.

Яцкив Анна Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.yatskiv@igc.by.

Терешенко Ольга Викторовна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olyia.tereshenko@gmail.com.

Далидович Анастасия Александровна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, Минск, Республика Беларусь). E-mail: eyeill@bsmu.by.

Марченко Людмила Николаевна – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220083, Минск, Республика Беларусь). E-mail: eyeill@bsmu.by.

Кильчевский Александр Владимирович – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kilchev@presidium.bas-net.by.

Yatskiu Hanna A. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.yatskiv@igc.by.

Tserashenka Volha V. – Junior Researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olyia.tereshenko@gmail.com.

Dalidovich Anastassia A. – Ph. D. (Medicine), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eyeill@bsmu.by.

Marchenka Ludmila N. – D. Sc. (Medicine), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220083, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: eyeill@bsmu.by.

Kilchevsky Alexander V. – Academician, D. Sc. (Biology), Professor, Chief Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kilchev@presidium.bas-net.by.

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

УДК 616.36-004:[616.36-008.64-08:616.155.011]
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-483-492>

Поступило в редакцию 17.10.2024
Received 17.10.2024

**Е. Г. Юркина¹, Д. Ю. Ефимов¹, С. И. Кривенко¹, Е. А. Примакова¹, Е. А. Назарова¹,
А. А. Сыманович¹, Н. И. Дедюля¹, В. В. Смольникова¹, Е. А. Янушевская¹, И. А. Романова¹,
В. В. Сазановец¹, Д. Н. Садовский², И. П. Штурич¹, С. В. Коротков¹, А. Е. Щерба¹,
академик О. О. Руммо¹**

¹*Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,
Минск, Республика Беларусь*

²*«Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента
Республики Беларусь, Минск, Республика Беларусь*

ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПЛАЦЕНТАРНО-ПУПОВИННОГО КОМПЛЕКСА ЧЕЛОВЕКА В КОРРЕКЦИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ДЕКОМПЕНСИРОВАННЫМ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

Аннотация. Исследование проведено с целью оценки безопасности и потенциальной эффективности системного введения мезенхимальных клеток из плацентарно-пуповинного комплекса человека для коррекции печеночной недостаточности у пациентов с декомпенсированным циррозом печени. Проведено открытое интервенционное проспективное случай–контроль исследование, включающее 40 пациентов старше 18 лет с декомпенсированным циррозом печени, находящихся на стационарном лечении в ожидании трансплантации печени. Для терапии использовали биомедицинские клеточные продукты на основе мезенхимальных клеток плацентарно-пуповинного комплекса. Методика системной терапии заключалась в продленной инфузии в кубитальную вену суспензии клеток в физиологическом растворе объемом 40 мл системой инфузомат со скоростью 1 мл/мин, доза клеток составила 2,5 (2,0–3,1) млн/кг массы тела пациента. Системное введение клеток не вызвало побочных явлений, не было ассоциировано с осложнениями введения либо ухудшением клинической картины. Лабораторно эффективность терапии подтверждена статистически значимым снижением уровня общего билирубина, отмечен прирост общего белка, а также стабилизация коагулопатии. Из 20 пациентов 8 (40 %) была успешно выполнена трансплантация печени, у 10 пациентов (50 %) наблюдалась стабилизация клинического течения, что позволило продолжить наблюдение на амбулаторном этапе. 2 (10 %) пациента, у которых клеточная терапия была не эффективна, умерли. Показатель однолетней выживаемости в группе клеточной терапии составил 85 % (против 56,5 % в группе сравнения, $p = 0,04$). Системное введение мезенхимальных клеток плацентарного происхождения является перспективной терапевтической опцией для пациентов с декомпенсированным циррозом печени, позволяющей увеличить сроки ожидания экстренной трансплантации печени и стабилизировать клиническое течение заболевания.

Ключевые слова: мезенхимальные клетки человека, плацентарно-пуповинный комплекс, хориальная пластинка, декомпенсированный цирроз печени, HGF

Для цитирования. Применение мезенхимальных клеток из плацентарно-пуповинного комплекса человека в коррекции печеночной недостаточности у пациентов с декомпенсированным циррозом печени / Е. Г. Юркина [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 483–492. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-483-492>

**Ekaterina G. Yurkina¹, Denis Yu. Efimov¹, Svetlana I. Krivenko¹, Evgenia A. Primakova¹, Ekaterina A. Nazarova¹,
Alla A. Symanovich¹, Natalya I. Dedyulya¹, Victoria V. Smolnikova¹, Ekaterina A. Yanushevskaya¹,
Irina A. Romanova¹, Victoria V. Sazanovets¹, Denis N. Sadovskiy², Ivan P. Shturich¹, Sergei V. Korotkov¹,
Alexey E. Shcherba¹, Academician Oleg O. Rummo¹**

¹*Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus*

²*“Republican clinical medical center” of Administration President of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

USAGE OF MESENCHYMAL CELLS FROM THE HUMAN PLACENTAL-UMBILICAL COMPLEX IN THE CORRECTION OF LIVER FAILURE IN PATIENTS WITH DECOMPENSATED LIVER CIRRHOSIS

Abstract. Acute-on-chronic liver failure is an acute liver decompensation in cirrhotic patients, which leads to organ failures and high short-term mortality. The treatment is based on the management of complications and, in severe cases, liver transplantation. Liver transplantation is the most effective treatment, but the lack of donor livers and a high cost of

transplantation limit its broad application. Human placenta-umbilical cord complex derived mesenchymal stem cells (MSCs) can be considered as an allogeneic source for liver disease. The aim of the study was to assess the safety and potential effectiveness of systemic administration of mesenchymal cells from the human placental-umbilical cord complex for liver failure correction in patients with decompensated cirrhosis of the liver. An open interventional prospective case-control study was conducted, including 40 patients over 18 years of age with decompensated liver cirrhosis who were hospitalized awaiting liver transplantation. Laboratory efficacy of therapy was confirmed by a significant decrease in a total bilirubin level by 39 %, an increase in total protein was noted (by 11 %), as well as stabilization of coagulopathy (decrease in INR by 25 %). Systemic administration of mesenchymal cells of placental origin is a promising therapeutic option for patients with decompensated liver cirrhosis, allowing one to increase the waiting period for emergency liver transplantation and stabilize the clinical course of the disease.

Keywords: human mesenchymal cells, placental-umbilical complex, chorionic plate, decompensated liver cirrhosis, HGF

For citation. Yurkina E. G., Efimov D. Yu., Krivenko S. I., Primakova E. A., Nazarova E. A., Symanovich A. A., Dedyulya N. I., Smolnikova V. V., Yanushevskaya E. A., Romanova I. A., Sazanovets V. V., Sadovskiy D. N., Shturich I. P., Korotkov S. V., Shcherba A. E., Rummo O. O. Usage of mesenchymal cells from the human placental-umbilical complex in the correction of liver failure in patients with decompensated liver cirrhosis. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 483–492 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-483-492>

Введение. Декомпенсированный цирроз печени и другие хронические заболевания печени занимают 14-е место среди наиболее распространенных причин смерти в мире, внося значительный вклад в смертность и продолжительность жизни с поправкой на инвалидность. Смертность от цирроза печени резко возрастает, достигая 80 % в течение одного года, что создает существенную нагрузку для систем здравоохранения во всем мире как на глобальном, так и на региональном уровнях. Единственным радикальным методом лечения декомпенсированного цирроза печени является трансплантация печени. Однако существует проблема доступности органа для экстренной трансплантации печени у пациентов с острой декомпенсацией. Ввиду этого активно разрабатываются альтернативные трансплантации технологии, позволяющие увеличить потенциальные сроки ожидания донорского органа либо достичь стабилизации клинического течения декомпенсации. Наиболее перспективным направлением сегодня является терапия печеночной недостаточности с применением различных клеточных продуктов, а именно – клиническое применение мезенхимальных стромальных клеток человека (МСК).

Терапия с использованием МСК является многообещающей опцией в стимуляции регенерации и репарации при острой печеночной недостаточности и циррозе печени [1; 2]. МСК, полученные из плаценты человека, обладают иммуномодулирующими, противовоспалительными и антифибротическими свойствами, что обосновывает их клиническое применение у пациентов с различными заболеваниями, сопровождающимися явлениями печеночной недостаточности [3]. Наиболее значимыми завершёнными исследованиями, посвященными применению МСК для терапии печеночной недостаточности, являются следующие.

В [4] изучали влияние МСК на течение печеночной недостаточности у мышей. В ходе исследования было выяснено, что в группе мышей, где применялись МСК, уровни АСТ, АЛТ, аммиака, а также количество гепатоцитов в стадии апоптоза были значительно ниже по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В [5] в экспериментах на крысиной модели выявили, что после введения МСК на второй день ($p < 0,05$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$) и пятый день ($p < 0,001$) уровни АСТ, АЛТ и билирубина были значительно ниже, чем в нулевой день. Результаты были лучше в группе внутривенного введения по сравнению с группой интраперитонеального введения. Кроме того, уровень VEGF значительно повышался в обеих группах введения ($p < 0,001$), однако наиболее значимый прирост был в группе внутривенного введения, что позволило авторам сделать заключение о том, что наиболее оптимальный путь введения – внутривенный, а функция МСК сводится не только к замещению некротизированных тканей.

В клиническом исследовании [6] изучали применение МСК, полученных из костного мозга, в терапии пациентов с острой печеночной недостаточностью. В исследовании приняли участие 9 пациентов. Группа сравнения, которая включала в себя 5 пациентов, получала стандартную медикаментозную терапию и плацебо-инфузию физиологическим раствором. В основной группе ($n = 4$) пациенты получали стандартную медикаментозную терапию и 5 инфузий МСК, выделенных из костного мозга (доза клеток 1 млн/кг массы тела пациента) в течение 3 недель. Обе

группы наблюдались в течение 90 дней. Среднее количество инфузий у всех пациентов составило 3 (от 1 до 5). Трое пациентов (2 в группе сравнения и 1 в основной группе) получили все инфузии по протоколу. Побочных эффектов, связанных с инфузией, не наблюдалось, хотя у одного пациента в основной группе после третьей и пятой инфузий развилась гипернатриемия и язва желудка. 90-дневная выживаемость в группе сравнения составила 20 %, по сравнению с основной – 25 %. Пациент, завершивший весь протокол инфузий МСК, полученных из костного мозга, показал значительное улучшение показателей по шкале Child (от C-14 до B-9), по шкале MELD (от 32 до 22) и по степени печеночной недостаточности (от 3 до 0).

Все вышеперечисленное позволяет сформировать гипотезу о том, что системное введение МСК у пациентов с декомпенсированным циррозом печени потенциально может позволить инициировать стабилизацию клинического течения декомпенсированного цирроза печени, обеспечить увеличение сроков ожидания экстренной трансплантации печени, а также оптимизировать применение трансплантационных технологий у данной группы пациентов. Целью настоящего исследования явилась оценка безопасности и потенциальной эффективности системного внутривенного введения МСК из плацентарно-пуповинного комплекса человека для коррекции печеночной недостаточности у пациентов с декомпенсированным циррозом печени.

Материалы и методы исследования. МСК выделяли из образцов плацент, полученных от здоровых обследованных рожениц, подписавших информированное согласие на участие в данном исследовании.

Основаниями для забора плаценты являлись отрицательные результаты обследования рожениц на наличие инфекций (вирусные гепатиты, цитомегаловирусная инфекция, ВИЧ, сифилис, токсоплазмоз) и отсутствие онкологических заболеваний. Промежуток времени от момента забора до выделения клеток составлял не более 6 ч.

Выделение МСК из децидуальной ткани, хориальной пластинки, ворсинок хориона и амниотической мембраны проводили путем ферментативного расщепления тканей плаценты раствором ферментов Коллагеназы I типа (Gibco, Великобритания) и Диспазы (Gibco, Великобритания) по ранее разработанному протоколу [7; 8] с некоторыми модификациями. Подсчет мононуклеарных клеток производили по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Клетки засеивали в культуральные флаконы для адгезивных культур с разной площадью поверхности дна в зависимости от количества выделенных мононуклеарных клеток. Из пупочного канатика клетки получали методом экспланта. После механической гомогенизации кусочки пупочного канатика помещали в культуральные флаконы в среду для культивирования клеток.

Клеточные культуры исследовали на универсальном инвертированном микроскопе (Micros, Австрия и Nikon, Япония) с применением методов фазового контраста. Жизнеспособность клеток определяли общепринятым методом по исключению трипанового синего.

Для идентификации МСК методом проточной цитофлуориметрии использовали следующую панель моноклональных антител (МКАТ): CD45 PE, CD34 APC, CD105 PE, CD90 FITC, CD13 PE, CD9 FITC, CD44 PE, CD31 (Beckman Coulter).

Для сравнения скорости пролиферации *in vitro* для каждой исследуемой культуры клеток определяли значение PDT (время удвоения популяции клеток). PDT рассчитывали по формуле

$$PDT = \frac{t \times \ln 2}{\ln(N_f / N_i)},$$

в которой t – время культивирования в часах; N_i – количество посаженных клеток; а N_f – количество выращенных клеток.

Адипогенную, остеогенную и хондрогенную дифференцировку проводили в соответствии с протоколами к наборам для дифференцировки МСК человека (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение концентрации продуктов секреции МСК проводили на анализаторе Luminex 200 мультиплексным анализом с использованием магнитных частиц в составе наборов Milliplex MAP Kit (Merck KGaA, Германия).

Стерильность клеточного продукта определяли на автоматизированном анализаторе ВaсТ/ALERT 3D (Франция) с использованием факультативно-анаэробных сред на основе триптиказо-соевого бульона. В ходе исследования проводилось тестирование на анаэробную и аэробную флору, а также грибковые инфекции. Во всех случаях были получены отрицательные результаты.

В проспективное интервенционное случай–контроль исследование было включено 40 пациентов (20 в основную группу и 20 в группу сравнения). Исследование одобрено на заседании независимого этического комитета ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» (протокол № 1 от 11.02.2022). Критериями включения являлись наличие декомпенсированного цирроза печени, уровень общего билирубина более 100 ммоль/л, потенциальная необходимость в трансплантации печени, возраст старше 18 лет. Критерии исключения: тромбоз воротной вены, сепсис, наличие злокачественного новообразования, продолжающееся желудочно-кишечное кровотечение.

Методика системного введения заключалась в продленной инфузии в кубитальную вену суспензии клеток в физиологическом растворе объемом 40 мл системой инфузомат со скоростью 1 мл/мин в дозе $(2-3)10^6$ на кг массы тела реципиента. После введения в динамике осуществляли мониторинг стандартных лабораторных маркеров и общеклинических показателей. Оценивали следующие лабораторные показатели и клинические исходы: уровень общего билирубина, маркеры синтетической функции печени (общий белок, альбумин), показатели коагулограммы, а также однолетнюю выживаемость.

Анализ результатов исследования проведен с использованием программы Statistica (Ver. 10, StatSoftInc.), Microsoft Office и Microsoft Excel. Параметры распределения количественных переменных, которое было отличным от нормального, представлены медианой с 25 % и 75 % квартилями. Для анализа сравнения были применены непараметрические методы: для сравнения двух независимых групп по одной количественной переменной использовали *U*-тест Манна–Уитни, а для сравнения в трех и более выборках использовали критерий Краскела–Уоллиса. Для проверки нулевой статистической гипотезы об отсутствии различий частот бинарных переменных в двух независимых группах выполняли Chi-Square или двусторонний тест точного критерия Фишера (Fisher's exact).

Результаты и их обсуждение. МСК, полученные из разных тканей плаценты, имеют ряд общих характеристик, однако они также демонстрируют значительные отличия по биологическим свойствам, что может влиять на их клиническую эффективность. В связи с этим была проведена сравнительная характеристика МСК, выделенных из различных тканей плацентарно-пуповинного комплекса.

Иммунофенотипически МСК плацентарно-пуповинного комплекса экспрессировали на своей поверхности стромально-ассоциированные маркеры (CD90, CD105, CD13, CD44, CD29, CD73), при отсутствии эндотелиальных и гемопоэтических маркеров (CD34, CD45, CD14 и CD31) и HLA-DR.

МСК, полученные из тканей плацентарно-пуповинного комплекса, в целом характеризовались высокой скоростью пролиферации. При сравнении кривых роста отчетливо видно, что клетки, выделенные из хориальной пластинки, амниотической мембраны и пупочного канатика, обладали более высокой пролиферативной активностью по сравнению с клетками, полученными из децидуальной ткани и ворсинок хориона (рис. 1).

Была проведена оценка способности МСК, полученных из плаценты человека, к дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях.

В культурах МСК, полученных из пупочного канатика и амниотической мембраны, регистрировали специфическое красное окрашивание единичных липидных включений, в отличие от культур клеток, полученных из децидуальной ткани, хориальной пластинки и ворсинок хориона. Данный факт свидетельствует о более низком дифференцировочном потенциале клеток из указанных тканевых источников в адипогенном направлении.

Все культуры МСК, выделенные из разных тканей плаценты, дифференцировались в остеогенном направлении. Однако более высокая продукция внеклеточных преципитатов солей кальция наблюдалась в культурах клеток, полученных из хориальной пластинки, ворсинок хориона

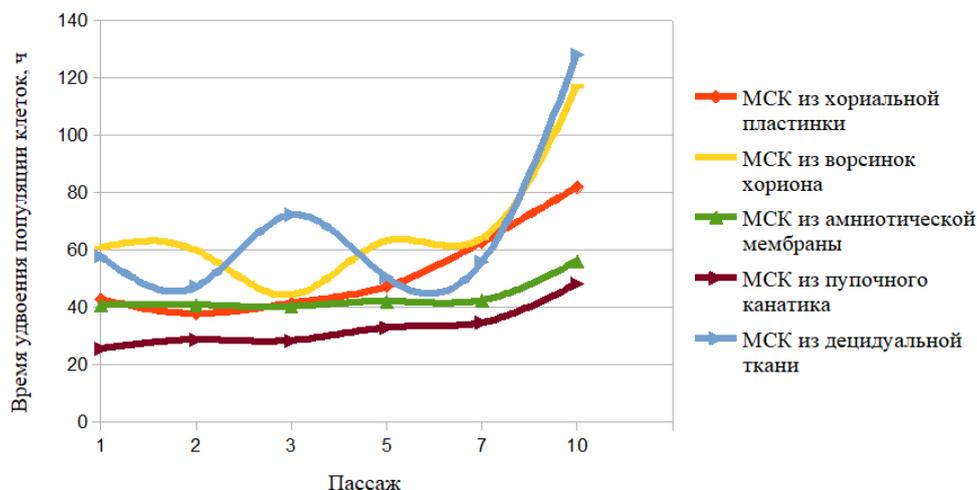


Рис. 1. Проллиферативная активность мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из различных тканей плацентарно-пуповинного комплекса

Fig. 1. Proliferative activity of mesenchymal stem cells isolated from various tissues of the placental-umbilical cord complex

и амниотической мембраны. Данный факт свидетельствует о том, что эти клетки все же обладают более высоким дифференцировочным потенциалом в остеогенном направлении, по сравнению с клетками, полученными из децидуальной ткани и пупочного канатика.

Существенных различий в способности к дифференцировке в хондрогенном направлении выявлено не было.

МСК секретируют различные факторы роста и ангиомодуляторы, такие как HGF (фактор роста гепатоцитов), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), IL-6 (интерлейкин-6), VCAM-1 (молекула адгезии сосудистых клеток 1-го типа), которые поддерживают жизнеспособность и пролиферацию поврежденных гепатоцитов [9; 10]. Секреция HGF, VEGF и IL-6 посредством паракринного эффекта способствует регенерации кровеносных сосудов и клеток печени, а также подавляет запрограммированную гибель гепатоцитов [11; 12]. Экспрессия VEGF усиливает плюрипотентность МСК и способствует хоумингу МСК в печени [13]. Особенности секреторной функции МСК играют важную роль в реализации клинических эффектов клеточной терапии.

В нашем исследовании МСК из различных тканей плацентарно-пуповинного комплекса показали значительные различия в уровнях секреции продуцируемых ростовых факторов и цитокинов. Наиболее высокие концентрации HGF определялись в образцах супернатантов культур МСК, выделенных из хориальной пластинки (68317,37 [11901,48; 689235,59] пк/мл) и ворсинок хориона (56610,78 [26168,12; 1477592,01] пк/мл), тогда как для МСК из децидуальной ткани данный показатель составил 19829,61 [6148,90; 32334,20] пк/мл, из амниотической мембраны – 10294,65 [3378,86; 19182,05] пк/мл и из пупочного канатика – 30631,79 [8093,27; 63615,28] пк/мл соответственно ($p = 0,0004$) (рис. 2).

МСК, выделенные из децидуальной ткани (669,66 [620,20; 719,13] пк/мл), хориальной пластинки (21,02 [1,75; 1180,20] пк/мл) и ворсинок хориона (58,11 [19,39; 602,13] пк/мл), характеризовались более высоким уровнем секреции VEGF по сравнению с МСК, полученными из амниотической мембраны (9,97 [1,75; 38,24] пк/мл) и пупочного канатика (12,07 [3,58; 15,89] пк/мл) ($p = 0,03$).

МСК накапливаются в поврежденных тканях печени с помощью молекул адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), которые воздействуют на гепатоциты посредством межклеточного контакта и секреции тропных факторов HGF и VEGF [5; 14]. Уровень продукции VCAM-1 был сопоставим для исследованных культур МСК из различных тканей плацентарно-пуповинного комплекса (децидуальная ткань 32957,39 [24892,69; 37794,97] пк/мл, хориальная пластинка 27640,90 [7217,36; 101825,32] пк/мл, ворсинки хориона 33777,04 [22453,81; 40309,26] пк/мл, амниотическая мембрана 21505,98 [17350,47; 24488,82] пк/мл и пупочный канатик 22961,90 [17992,91; 29272,31] пк/мл при уровне значимости $p = 0,08$).

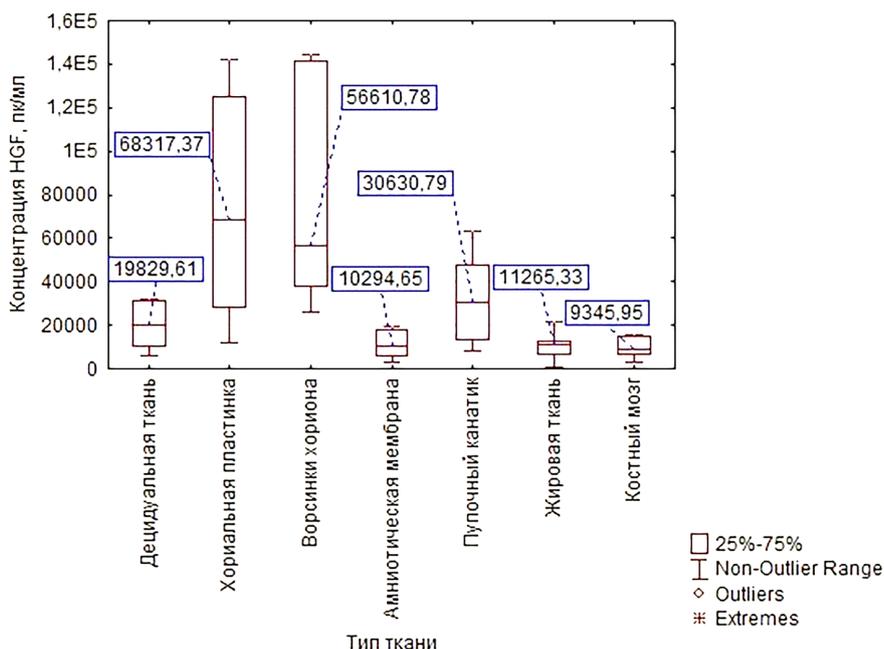


Рис. 2. Уровень секреции HGF в образцах супернатантов МСК, выделенных из тканей плацентарно-пуповинного комплекса

Fig. 2. Level of HGF secretion in samples of MSC supernatants isolated from tissues of the placental-umbilical cord complex

IL-6 играет ключевую роль в таких процессах, как регуляция иммунного ответа, воспаление, выживание клеток, апоптоз, пролиферация клеток [15]. Концентрации IL-6, секретируемого МСК, полученными из децидуальной ткани 2049,92 [1935,74; 2143,40] пк/мл, хориальной пластинки 2440,96 [2118,53; 2736,27] пк/мл, ворсинок хориона 2258,01 [1192,45; 3657,11] пк/мл и пупочного канатика 2011,76 [669,98; 3163,59] пк/мл характеризовались более высоким уровнем секреции IL-6 по сравнению с МСК, выделенными из амниотической мембраны, 922,92 [579,08; 2951,12] пк/мл.

На основании сравнительного анализа показателей пролиферативной активности (время удвоения популяции клеток), потенциала дифференцировки, а также уровня продукции HGF, VEGF, VCAM-1 и IL-6 МСК, полученных из различных тканей плацентарно-пуповинного комплекса, для терапии пациентов с печеночной недостаточностью были выбраны МСК из хориальной пластинки.

Группы пациентов были сопоставимы по возрасту, уровню билирубина, тяжести состояния по шкале MELD на момент включения в исследование (табл. 1). Так, в основной группе возраст составил 44 [36; 56] года (в группе сравнения – 44 [36; 56] года, $p = 0,8$), показатель MELD – 29 [24; 32,5] (в группе сравнения – 30 [26; 34], $p = 0,42$), уровень общего билирубина – 336 [119; 468] ммоль/л (в группе сравнения – 238 [103; 690] ммоль/л, $p = 0,42$).

Т а б л и ц а 1. Характеристика пациентов основной группы и пациентов группы контроля на момент включения в исследование

Table 1. Characteristics of patients in the main group and patients in the control group at the time of inclusion in the study

Показатель Index	Основная группа ($n = 20$) Main group ($n = 20$)	Группа сравнения ($n = 20$) Comparison group ($n = 20$)	p , Манна–Уитни p , Mann–Whitney
1. Уровень общего билирубина, ммоль/л	336 [119; 468]	238 [103; 690]	0,42
2. Уровень общего белка, г/л	52 [50; 62]	56 [52; 65]	0,59
3. Уровень МНО	2,0 [1,4; 2,2]	2,1 [1,2; 3,2]	0,5
4. MELD	29 [24; 32,5]	30 [26; 34]	0,42

При оценке безопасности клеточной терапии пациентов с декомпенсированным циррозом печени было установлено, что системное введение МСК не вызывает побочных явлений, не ассоциировано с осложнениями введения либо ухудшением клинической картины. Эффективность клеточной терапии подтверждена стабилизацией лабораторных показателей: прирост общего белка после терапии на 6 г/л (на 11 %), стабилизация коагулопатии (снижение международного нормализованного отношения (МНО)) на 0,37 (на 25 %), а также значимое снижение уровня общего билирубина в среднем на 133 ммоль/л с максимального значения (доля снижения уровня билирубина – 39 %) и соответственно снижение показателя MELD на 37 % (с 29 до 18) (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Динамика лабораторных показателей и MELD пациентов основной группы

T a b l e 2. Dynamics of laboratory parameters and MELD in patients of the main group

Показатель Index	Результаты Results		<i>p</i> , Манна–Уитни <i>p</i> , Mann–Whitney
	до клеточной терапии МСК before MSC cell therapy	после клеточной терапии МСК after MSC cell therapy	
1. Уровень общего билирубина, ммоль/л	336 [119; 468]	144 [29; 186]	0,008
2. Уровень общего белка, г/л	52 [50; 62]	62 [56; 70]	0,0001
3. МНО	2,0 [1,4; 2,2]	1,44 [1,2; 1,7]	0,09
4. MELD	29 [24; 32,5]	18 [8; 20]	0,002

Из 20 пациентов основной группы в 8 случаях (40 %) была успешно выполнена трансплантация печени, в то время как 2 (10 %) пациента умерли: один – из-за профузного варикозного кровотечения через 8 дней после инфузии, а другой – из-за тяжелой пневмонии через 8 месяцев. У остальных 10 пациентов (50 %) наблюдалась стабилизация клинического течения, что позволило продолжить их наблюдение на амбулаторном этапе. Однолетняя выживаемость в интервенционной группе составила 85 %, что значительно выше данного показателя контрольной группы – 56,5 % (точный критерий Фишера, $p = 0,04$).

Заключение. Результаты настоящего исследования показали, что клиническое применение МСК из плацентарно-пуповинного комплекса человека путем системного внутривенного введения позволило улучшить выживаемость (однолетняя: 85 % против 56,5 %, основная группа против группы сравнения; $p = 0,04$) и оптимизировать применение трансплантации печени у пациентов с печеночной недостаточностью на фоне декомпенсированного цирроза печени. Эффективность применения МСК из плацентарно-пуповинного комплекса человека подтверждена значимым снижением уровня общего билирубина, а также улучшением синтетической и метаболической функции печени, что в большинстве случаев обеспечивает стабилизацию клинического течения печеночной недостаточности, позволяющей оптимизировать применение трансплантационных технологий.

Таким образом, системное введение биомедицинского клеточного продукта на основе мезенхимальных клеток из плацентарно-пуповинного комплекса человека является перспективной терапевтической опцией для пациентов с печеночной недостаточностью на фоне декомпенсированного цирроза печени, позволяющей увеличить сроки ожидания экстренной трансплантации печени и стабилизировать клиническое течение заболевания.

Список использованных источников

1. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis / V. Volarevic [et al.] // *Stem Cells*. – 2014. – Vol. 32, N 11. – P. 2818–2823. <https://doi.org/10.1002/stem.1818>
2. Cao, Y. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis / Y. Cao, C. Ji, L. Lu // *Ann. Transl. Med.* – 2020. – Vol. 8, N 8. – Art. 562. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.119>
3. Advancements in mesenchymal stem cell therapy for liver cirrhosis: Unveiling origins, treatment mechanisms, and current research frontiers / Z. Wang [et al.] // *Tissue Cell*. – 2023. – Vol. 84. – Art. 102198. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102198>
4. Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization / J. Wang [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2021. – Vol. 12. – Art. 15. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02070-2>

5. Mesenchymal stem cells accelerate liver regeneration in acute liver failure animal model / A. Putra [et al.] // *Biomedical Research and Therapy*. – 2018. – Vol. 5, N 11. – P. 2802–2810. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v5i11.498>
6. Bone marrow mesenchymal stem cells in acute-on-chronic liver failure grades 2 and 3: A phase I–II randomized clinical trial / F. C. Schacher [et al.] // *Can. J. Gastroenterol. Hepatol.* – 2021. – Vol. 2021, N 1. – Art. 3662776. <https://doi.org/10.1155/2021/3662776>
7. Isolation and expansion of mesenchymal stem/stromal cells derived from human placenta tissue / R. A. Pelekanos [et al.] // *J. Vis. Exp.* – 2016. – N 112. – Art. e54204. <https://doi.org/10.3791/54204>
8. Human amnion-derived mesenchymal stem cells are a potential source for uterine stem cell therapy / K. Han [et al.] // *Cell Prolif.* – 2008. – Vol. 41, N 5. – P. 709–725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2008.00553.x>
9. Hu, C. Mesenchymal stromal cells promote liver regeneration through regulation of immune cells / C. Hu, Z. Wu, L. Li // *Int. J. of Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 16, N 5. – P. 893–903. <https://doi.org/10.7150/ijbs.39725>
10. Intraportal mesenchymal stem cell transplantation prevents acute liver failure through promoting cell proliferation and inhibiting apoptosis / J. F. Sang [et al.] // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* – 2016. – Vol. 15, N 6. – P. 602–611. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(16\)60141-8](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(16)60141-8)
11. *In vivo* hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis / G. Z. Zhang [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 23, N 46. – P. 8152–8168. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i46.8152>
12. Mesenchymal stromal cells engineered to produce IGF-I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice / E. J. Fiore [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2015. – Vol. 24, N 6. – P. 791–801. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0174>
13. Wang, Y. H. Mesenchymal stem cell therapy in acute liver failure / Y. H. Wang, E. Q. Chen // *Gut Liver*. – 2023. – Vol. 17, N 5. – P. 674–683. <https://doi.org/10.5009/gnl220417>
14. Henschler, R. Homing of mesenchymal stem cells / R. Henschler, E. Deak, E. Seifried // *Transfus. Med. Hemother.* – 2008. – Vol. 35, N 4. – P. 306–312. <https://doi.org/10.1159/000143110>
15. Matsuda, T. The physiological and pathophysiological role of IL-6/STAT3-mediated signal transduction and STAT3 binding partners in therapeutic applications / T. Matsuda // *Biol. Pharm. Bull.* – 2023. – Vol. 46, N 3. – P. 364–378. <https://doi.org/10.1248/bpb.b22-00887>

References

1. Volarevic V., Nurkovic J., Arsenijevic N., Stojkovic M. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells*, 2014, vol. 32, no. 11, pp. 2818–2823. <https://doi.org/10.1002/stem.1818>
2. Cao Y., Ji C., Lu L. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis. *Annals of Translational Medicine*, 2020, vol. 8, no. 8, art. 562. <https://doi.org/10.21037/atm.2020.02.119>
3. Wang Z., Yao L., Hu X., Yuan M., Chen P., Liu P., Zhang Q., Xiong Z., Dai K., Jiang Y. Advancements in mesenchymal stem cell therapy for liver cirrhosis: Unveiling origins, treatment mechanisms, and current research frontiers. *Tissue and Cell*, 2023, vol. 84, art. 102198. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102198>
4. Wang J., Liu Y., Ding H., Shi X., Ren H. Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization. *Stem Cell Research and Therapy*, 2021, vol. 12, art. 15. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02070-2>
5. Putra A., Antari A. D., Kustiyah A. R., Intan Y. S. N., Sadyah N. A. C., Wirawan N., Astarina S., Zubir N., Munir D. Mesenchymal stem cells accelerate liver regeneration in acute liver failure animal model. *Biomedical Research and Therapy*, 2018, vol. 5, no. 11, pp. 2802–2810. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v5i11.498>
6. Schacher F. C., Pezzi da Silva A. M., Silla L. M. R., Álvares-da-Silva M. R. Bone marrow mesenchymal stem cells in acute-on-chronic liver failure grades 2 and 3: A phase I–II randomized clinical trial. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2021, vol. 2021, no. 1, art. 3662776. <https://doi.org/10.1155/2021/3662776>
7. Pelekanos R. A., Sardesai V. S., Futrega K., Lott W. B., Kuhn M., Doran M. R. Isolation and expansion of mesenchymal stem/stromal cells derived from human placenta tissue. *Journal of Visualized Experiments*, 2016, no. 112, art. e54204. <https://doi.org/10.3791/54204>
8. Han K., Lee J. E., Kwon S. J., Park S. Y., Shim S. H., Kim H., Moon J. H., Suh C. S., Lim H. J. Human amnion-derived mesenchymal stem cells are a potential source for uterine stem cell therapy. *Cell Proliferation*, 2008, vol. 41, no. 5, pp. 709–725. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2008.00553.x>
9. Hu C., Wu Z., Li L. Mesenchymal stromal cells promote liver regeneration through regulation of immune cells. *International Journal of Biological Sciences*, 2020, vol. 16, no. 5, pp. 893–903. <https://doi.org/10.7150/ijbs.39725>
10. Sang J. F., Shi X. L., Han B., Huang T., Huang X., Ren H. Z., Ding Y. T. Intraportal mesenchymal stem cell transplantation prevents acute liver failure through promoting cell proliferation and inhibiting apoptosis. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*, 2016, vol. 15, no. 6, pp. 602–611. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(16\)60141-8](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(16)60141-8)
11. Zhang G. Z., Sun H. C., Zheng L. B., Guo J. B., Zhang X. L. *In vivo* hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, vol. 23, no. 46, pp. 8152–8168. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i46.8152>
12. Fiore E. J., Bayo J. M., Garcia M. G., Malvicini M., Lloyd R., Piccioni F., Rizzo M., Peixoto E., Sola M. B., Atorrasagasti C., Alaniz L., Camilletti M. A., Enguita M., Prieto J., Aquino J. B., Mazzolini G. Mesenchymal stromal cells

engineered to produce IGF-I by recombinant adenovirus ameliorate liver fibrosis in mice. *Stem Cells and Development*, 2015, vol. 24, no. 6, pp. 791–801. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0174>

13. Wang Y. H., Chen E. Q. Mesenchymal stem cell therapy in acute liver failure. *Gut and Liver*, 2023, vol. 17, no. 5, pp. 674–683. <https://doi.org/10.5009/gnl220417>

14. Henschler R., Deak E., Seifried E. Homing of mesenchymal stem cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2008, vol. 35, no. 4, pp. 306–312. <https://doi.org/10.1159/000143110>

15. Matsuda T. The physiological and pathophysiological role of IL-6/STAT3-mediated signal transduction and STAT3 binding partners in therapeutic applications. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2023, vol. 46, no. 3, pp. 364–378. <https://doi.org/10.1248/bpb.b22-00887>

Информация об авторах

Юркина Екатерина Геннадьевна – ст. науч. сотрудник. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ekatherina999@mail.ru. ORCID: 0000-0002-0966-7456.

Ефимов Денис Юрьевич – канд. мед. наук, доцент, врач-хирург. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: den.efimoff@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6834-8538.

Кривенко Светлана Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svtl_kr@tut.by. ORCID: 0000-0002-6813-4465.

Примакова Евгения Алексеевна – врач. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gane_sel@mail.ru. ORCID: 0000-0002-3011-2287.

Назарова Екатерина Александровна – канд. биол. наук, врач. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: k.nazarova-86@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7147-4834.

Сыманович Алла Александровна – канд. биол. наук, врач. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alefytyna@tut.by. ORCID: 0000-0003-1521-1620.

Дедюля Наталья Ивановна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: nata_2010@tut.by. ORCID: 0000-0001-9807-2093.

Смольникова Виктория Владимировна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vsmolnikova2603@mail.ru. ORCID: 0000-0001-5947-8285.

Янушевская Екатерина Андреевна – врач. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: cat7102@yandex.ru. ORCID: 0009-0003-1174-4179.

Романова Ирина Александровна – науч. сотрудник. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: romirina1978@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6577-9738.

Information about the authors

Yurkina Ekaterina G. – Senior Researcher. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ekatherina999@mail.ru. ORCID: 0000-0002-0966-7456.

Efimov Denis Yu. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Surgeon. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: den.efimoff@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6834-8538.

Krivenko Svetlana I. – D. Sc. (Medicine), Professor, Deputy Director for Research. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svtl_kr@tut.by. ORCID: 0000-0002-6813-4465.

Primakova Evgeniya A. – Doctor. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gane_sel@mail.ru. ORCID: 0000-0002-3011-2287.

Nazarova Ekaterina A. – Ph. D. (Biology), Doctor. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k.nazarova-86@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7147-4834.

Symanovich Alla A. – Ph. D. (Biology), Doctor. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alefytyna@tut.by. ORCID: 0000-0003-1521-1620.

Dedyulya Natalia I. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nata_2010@tut.by. ORCID: 0000-0001-9807-2093.

Smolnikova Victoria V. – Ph. D. (Biology), Leading Researcher. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vsmolnikova2603@mail.ru. ORCID: 0000-0001-5947-8285.

Yanushevskaya Ekaterina A. – Doctor. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cat7102@yandex.ru. ORCID: 0009-0003-1174-4179.

Romanova Irina A. – Researcher. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: romirina1978@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6577-9738.

Сазановец Валерия Владимировна – врач-хирург. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v_valeries@outlook.com. ORCID: 0009-0005-1592-9271.

Садовский Денис Николаевич – канд. мед. наук, доцент, врач-хирург. «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь (Ждановичский с/с, 81/5, район аг. Ждановичи, Минская область, Республика Беларусь). E-mail: id14@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-6351-1006.

Штурич Иван Павлович – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ivan.shturich@mail.ru. ORCID: 0009-0002-3017-8056.

Коротков Сергей Владимирович – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделом. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: skorotkov@tut.by. ORCID: 0000-0002-8536-6911.

Щерба Алексей Евгеньевич – д-р мед. наук, профессор, заместитель директора по хирургической работе. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleina@tut.by. ORCID: 0000-0003-0569-6150.

Руммо Олег Олегович – академик, д-р мед. наук, профессор, директор. Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии (ул. Семашко, 8, 220087, Минск, Республика Беларусь). E-mail: olegrumm@tut.by. ORCID: 0000-0001-7023-4767.

Sazanovets Valeria V. – Surgeon. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v_valeries@outlook.com. ORCID: 0009-0005-1592-9271.

Sadovskiy Denis N. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Surgeon. “Republican Clinical Medical Center” of the Administration President of Belarus (81/5, Zhdanovichsky s/s, Zhdanovich district, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: id14@yandex.ru. ORCID: 0000-0002-6351-1006.

Shturich Ivan P. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ivan.shturich@mail.ru. ORCID: 0009-0002-3017-8056.

Korotkov Sergey V. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: skorotkov@tut.by. ORCID: 0000-0002-8536-6911.

Shcherba Aleksey E. – D. Sc. (Medicine), Professor, Deputy Director for Surgical Work. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleina@tut.by. ORCID: 0000-0003-0569-6150.

Rummo Oleg O. – Academician, D. Sc. (Medicine), Professor, Director. Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology (8, Semashko Str., 220087, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: olegrumm@tut.by. ORCID: 0000-0001-7023-4767.

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

НАУКИ О ЗЕМЛЕ
EARTH SCIENCES

УДК 504.05+504.064
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-493-503>

Поступило в редакцию 20.09.2024
Received 20.09.2024

В. Д. Чернюк, Т. И. Кухарчик

Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**ХИМИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА В ПЛАСТМАССАХ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО
И ЭЛЕКТРОННОГО ОБОРУДОВАНИЯ И ПРОБЛЕМЫ ВТОРИЧНОГО
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОТХОДОВ**

(Представлено академиком В. Ф. Логиновым)

Аннотация. В составе пластмасс электрического и электронного оборудования содержатся различные химические вещества, которые вводятся на этапе их производства с антипиренами, стабилизаторами, красителями и другими добавками для придания необходимых свойств. Среди опасных веществ особую обеспокоенность вызывают полибромдифениловые эфиры (ПБДЭ), которые являются стойкими органическими загрязнителями (СОЗ). Обсуждаются результаты химико-аналитических испытаний отходов пластмасс электрического и электронного оборудования (ЭЭО) и впервые полученные для Беларуси оценки объемов образования отходов, подлежащих экологически безопасному обращению в соответствии с обязательствами по Стокгольмской конвенции о СОЗ. ПБДЭ определялись с использованием газовой хроматографии в бромсодержащих пластмассах (281 проба), бром – с использованием рентгенофлуоресцентной спектрометрии (760 проб). Показано, что бром обнаружен в 37 % случаев, ПБДЭ – в 31 % проб бромсодержащих пластмасс либо в 11,4 % общего их количества. Максимальные концентрации ПБДЭ достигают 12–17 % по массе. По встречаемости ПБДЭ в пластмассах ЭЭО ранжированы следующим образом: мониторы и телевизоры – 15,4 % случаев, крупногабаритная бытовая техника – 14 %, ИТ и телекоммуникационное оборудование – 11,7 %, копировальное оборудование – 6,9 %, мелкогабаритная бытовая техника – 3 %. По состоянию на 2022 г. объем отходов пластмасс ЭЭО, содержащих бромированные антипирены, оценивается в 5,5 тыс. т, из которых около 65 % подлежат экологически безопасному удалению. Более 70 % отходов, содержащих ПБДЭ, представлены пластмассами мониторов и телевизоров. Обсуждаются меры по улучшению системы сбора ЭЭО и необходимость сепарации отходов пластмасс ЭЭО при их вторичной переработке с целью предотвращения рециркуляции опасных веществ.

Ключевые слова: отходы пластмасс, полибромдифениловые эфиры, стойкие органические загрязнители, бромсодержащий пластик

Для цитирования. Чернюк, В. Д. Химические вещества в пластмассах электрического и электронного оборудования и проблемы вторичного использования отходов / В. Д. Чернюк, Т. И. Кухарчик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 493–503. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-493-503>

Vladimir D. Chernyuk, Tamara I. Kukharchyk

Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

**CHEMICAL SUBSTANCES IN PLASTICS OF ELECTRICAL AND ELECTRONIC EQUIPMENT
AND WASTE RECYCLING PROBLEMS**

(Communicated by Academician Vladimir F. Loginov)

Abstract. The plastics of electrical and electronic equipment (EEE) contain various chemicals that are introduced during production with flame retardants, stabilizers, dyes and other additives to impart the necessary properties. Among the hazardous substances, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), which are persistent organic pollutants (POPs), are of particular concern. The article discusses the results of chemical and analytical tests of EEE plastic waste and the first estimates

for Belarus of the volumes of waste generation subject to environmentally sound management in accordance with the obligations of the Stockholm Convention on POPs. PBDEs were determined using gas chromatography in bromine-containing plastics (281 samples), bromine – using X-ray fluorescence spectrometry (760 samples). It was shown that bromine was detected in 37 % of cases, PBDEs – in 31 % of samples of bromine-containing plastics or in 11.4 % of their total amount. The maximum concentrations of PBDEs reach 12–17 % by weight. In terms of PBDEs occurrence in EEE plastics, they are ranked as follows: monitors and TVs – 15.4 % of cases, large household appliances – 14 %, IT and telecommunications equipment – 11.7 %, copying equipment – 6.9 %, small household appliances – 3 %. As of 2022, the volume of EEE plastic waste containing brominated flame retardants is estimated at 5.5 thousand tons, of which about 65 % is subject to environmentally sound management. More than 70 % of PBDE-containing waste is represented by monitor and TV plastics. Measures to improve the EEE collection system and the need to separate EEE plastic waste during their recycling in order to prevent the recycling of hazardous substances are discussed.

Keywords: plastic waste, polybrominated diphenyl ethers, persistent organic pollutants, bromine-containing plastic, ecological sound management

For citation. Chernyuk V. D., Kukharchyk T. I. Chemical substances in plastics of electrical and electronic equipment and waste recycling problems. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 493–503 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-493-503>

Введение. Увеличение использования различных видов электронных устройств сопровождается неуклонным ростом отходов, объемы образования которых в 2022 г. достигли 62 млрд т в глобальном масштабе [1]. При этом сбор и переработка таких отходов экологически безопасным способом составляет около 22 %. Одним из лимитирующих факторов использования отходов электрического и электронного оборудования (ЭЭО) в качестве вторичного сырья является содержание широкого спектра загрязняющих веществ [2]. В пластмассах это в первую очередь полибромдифениловые эфиры (ПБДЭ) и тяжелые металлы, которые предназначены для улучшения потребительских свойств полимеров с учетом назначения. ПБДЭ, которые широко использовались в качестве антипирена, в связи с их устойчивостью к разложению, способностью к биоаккумуляции и трансграничному переносу признаны стойкими органическими загрязнителями (СОЗ) и включены в Стокгольмскую конвенцию. Согласно Стокгольмской конвенции, все запасы ПБДЭ в составе отходов должны быть выявлены и удалены экологически безопасным способом.

Несмотря на то что производство антипиренов на основе ПБДЭ запрещено или сильно ограничено, значительные объемы данных загрязнителей содержатся в изделиях, находящихся в использовании, а также в их отходах по окончании срока службы [3; 4]. Более того, подтверждено присутствие ПБДЭ и других бромированных антипиренов в потребительских товарах, изготовленных из вторичного сырья [5; 6]. Выполненные к настоящему времени работы по оценке техногенных потоков бромсодержащих отходов свидетельствуют о необходимости их извлечения из общего потока и принятия мер по утилизации [3; 7; 8].

В Беларуси сбор отходов ЭЭО начат с 2013 г. и к 2023 г. объемы сбора составили 23,04 тыс. т [9]. Следует отметить, что официальный учет отходов ЭЭО в Беларуси касается лишь той их части, которая поступает на переработку. На момент постановки данных исследований в стране было выполнено лишь предварительное изучение [10], которое подтвердило актуальность продолжения исследований с целью предотвращения рециркуляции опасных веществ и поступления в новые изделия или рассеяния в окружающей среде.

Цель работы – оценка содержания ПБДЭ в отходах пластмасс различных категорий ЭЭО, образующихся в Беларуси, и объемов образования отходов, подлежащих экологически безопасному обращению.

Материалы и методы исследования. Отбор проб отходов пластмасс ЭЭО выполнен на производственных площадках, занимающихся сбором и разборкой ЭЭО и расположенных в Минске, Вилейке, д. Станок-Водица (Смолевичский р-н) и п. Чисть (Молодечненский р-н). Отбирались образцы пластика всех категорий ЭЭО, в том числе крупногабаритной бытовой техники (14,9 % от общего количества отобранных проб), мелкогабаритной бытовой техники (13,8 %), ИТ и телекоммуникационного оборудования (21,5 %), копировального оборудования (16,5 %), мониторов и телевизоров (30,4 %). Дополнительно были отобраны пробы отходов полимерных материалов различных типов ЭЭО, прошедших процедуру дробления на шредерной дробилке, а также сырье полистирола и продукция из него. Общее количество отобранных проб пластмасс составило 760.

Отбор проб пластика ЭЭО осуществлялся с учетом рекомендаций и процедур, изложенных в стандартах ИЕС 62321-2:2013, ГОСТ ИЕС 62321-2-2016, которыми предусматривается демонтаж оборудования до основных компонентов и узлов сборки. Процедура отбора проб полимерных материалов включала в себя непосредственно отбор пробы полимерных материалов стандартными инструментами, присвоение инвентаризационного номера пробе, фотографирование пробы и заполнение протокола отбора проб. Примеры отобранных проб пластмасс приведены на рис. 1.



Рис. 1. Примеры проб пластмасс различных типов ЭЭО: *a–c* – телевизор с электронно-лучевой трубкой (ЭЛТ), *d* – монитор с ЭЛТ, *e, f* – пылесос, *g* – кухонный комбайн, *h* – смешанная проба измельченных пластмасс, *i* – смешанная проба разноцветных пластмассовых гранул, *j* – внутренние детали персонального компьютера (ПК), *k* – кулер ноутбука, *l* – внутренние детали электрочайника

Fig. 1. Examples of samples of plastics of different types of EEE: *a–c* – CRT TV, *d* – CRT monitor, *e, f* – vacuum cleaner, *g* – food processor, *h* – mixed batch of crushed plastics, *i* – mixed sample of multi-colored plastic granules, *j* – internal parts of a PC, *k* – laptop cooler, *l* – internal parts of an electric kettle

Определение содержания брома и тяжелых металлов (свинца, хрома, кадмия и ртути) осуществлялось с помощью рентгенофлуоресцентной спектрометрии в соответствии с ГОСТ ИЕС 62321-3-1-2016. ПБДЭ определялись методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС) в соответствии с СТБ ИЕС 62321-2012. Всего на содержание брома и тяжелых металлов было проанализировано 760 проб. ПБДЭ определялись в 281 пробе, в которых скрининг-метод показал наличие брома.

Для сравнения приняты предельные концентрации загрязняющих веществ в отходах ЭЭО, установленные европейской Директивой 2011/65/EU и техническим регламентом (ТР ЕАЭС 037/2016): свинца – 1 г/кг, кадмия – 0,1 г/кг, ртути – 1 г/кг, хрома – 1 г/кг, ПБДЭ – 1 г/кг. Для брома принято значение 2 г/кг согласно CLC/TS 50625-3-1:2015.

Для оценки объемов образования отходов пластмасс ЭЭО, содержащих бром и ПБДЭ, использованы методические подходы, изложенные в международном Руководстве по инвентаризации ПБДЭ [11], дополненные коэффициентами, учитывающими долю пластмассовых деталей, потенциально содержащих ПБДЭ, и встречаемость ПБДЭ в пластмассах ЭЭО различных категорий или отдельных устройств. Расчеты проводились по состоянию на 2022 г. За основу приняты данные Национального статистического комитета по обеспеченности населения предметами длительного пользования, справочные данные и результаты собственных экспериментальных исследований, касающихся оценки доли пластмассовых изделий в составе ЭЭО.

Результаты и их обсуждение. *Содержание загрязняющих веществ в отходах пластмасс ЭЭО.* Установлено, что, как и в других странах, отходы пластмасс, отобранные в Беларуси, содержат опасные загрязняющие вещества (табл. 1). Из общего количества проанализированных проб, бром обнаружен в 37 % случаев, свинец – в 27,6 %, хром – в 10,9 %, кадмий – в 8,4 %, ртуть – в 0,9 %. ПБДЭ были обнаружены в 31,0 % проб бромсодержащих пластмасс ЭЭО (281 проба), либо в 11,4 % общего их количества. Это согласуется с результатами предварительных исследований, выполненных в Беларуси [10]. Для сравнения отметим, что, например, в Великобритании доля бромсодержащего пластика оценивалась в 42,0 % от общего количества проб (267) ЭЭО [12].

Концентрация брома в пластмассах ЭЭО была в широком диапазоне: от значений ниже предела обнаружения метода (менее 10 мг/кг) до 127,9 г/кг, что соответствует результатам исследований в Австралии [13], Великобритании [12] и других странах. В 64,0 % проб бромсодержащих пластмасс содержание брома превышало величину в 2 г/кг, принятую в странах ЕС, при которой должны применяться методы экологически безопасного удаления. Кратность превышения составляла 1,1–63,9 раза. Практически в 100 % случаев бромсодержащий пластик зафиксирован во внутренних деталях персональных компьютеров (материнских платах, кулерах) и корпусах блоков бесперебойного питания. При этом в пластике блоков бесперебойного питания отмечались одни из самых высоких концентраций брома. Также бром фиксировался в пластике дискет, домофонов, магнитофонов (аудио и видео), модемов (роутеров), ноутбуков, клавиатур, сетевых фильтров и системных блоков. Практически все устройства, имеющие в своем составе бромсодержащий пластик, были произведены в странах Восточной и Южной Азии. Пластик, в котором отмечалось присутствие брома в его составе, преимущественно был представлен АБС-пластиком.

Исследования показали, что в составе крупногабаритной бытовой техники бромсодержащим пластиком представлены только мелкие детали, такие как выключатели внутреннего шкафа холодильника, индукционные катушки и корпуса модулей управления стиральных машин. В крупных деталях, например, в элементах корпуса (двери холодильников, обшивка внутреннего шкафа и теплоизоляционный материал холодильника, панель управления стиральной машины, корпус вентилятора), присутствие бромированных антипиренов не было установлено.

По частоте встречаемости брома основные категории ЭЭО ранжированы следующим образом: ИТ и телекоммуникационное оборудование (49,0 %) > мониторы и телевизоры (41,0 %) > копировальное оборудование (31,0 %) > крупногабаритная бытовая техника (30,0 %) > мелкогабаритная бытовая техника (>16,0 %).

Среднее содержание ПБДЭ в пластмассах крупногабаритной бытовой техники составило 86,1 г/кг, ИТ и телекоммуникационного оборудования – 13,0 г/кг, мониторов и телевизоров – 12,1 г/кг, копировального оборудования – 3,7 г/кг, мелкогабаритной бытовой техники – 1,1 г/кг. Наименьшие концентрации ПБДЭ обнаружены в смешанных отходах пластмасс – концентрации не превышают 1,0 г/кг. В 60 % проб, в которых было установлено присутствие ПБДЭ, зафиксировано превышение нормативных уровней его содержания с кратностью превышения в десятки раз. На основании полученных данных о концентрациях ПБДЭ можно заключить, что пластмассы были изготовлены как из первичных полимерных материалов, в которых исходное содержание бромированных антипиренов варьирует от 3,0 до 25,0 % их общей массы, так и из вторичного сырья [14]. Считается, что при содержании брома и ПБДЭ в пластике на уровне менее 3,0 % высока вероятность его производства из вторичного сырья.

Таблица 1. Содержание тяжелых металлов, брома и ПБДЭ в пробах пластика ЭО, отобранных на предприятиях Беларуси
Table 1. Content of heavy metals, bromine and PBDEs in samples of EEE plastic collected from Belarusian enterprises

Категория и тип оборудования Equipment category and type	Количество проб Number of samples	Pb		Cd		Cr		Br		ПБДЭ	
		среднее/макс, мг/кг average/max, mg/kg	% ¹	среднее/макс, мг/кг average/max, mg/kg	%						
Крупногабаритная бытовая техника	107	144,4/496	30,8	85	0,9	48,1/180	6,5	50,7/127,9	29,9	86,1/170,9	14,0
В том числе											
Микроволновая печь	11	13	9,1	н. о. ²	0	н. о.	0	3/5,6	18,2	0,2	9,1
Стиральная машина	53	132/303	45,3	н. о.	0	71/180	7,5	64,1/112,6	34	85,6/170,9	18,9
Холодильник/морозильник	36	198/496	22,2	85	2,8	17,7/29	8,3	46/127,9	27,8	119/166,9	11,1
Мелкогабаритная бытовая техника	99	56,6/380	16,2	26,2/70	5,1	90,2/322	11,1	5,5/34,7	16,2	1,1/2,5	3,0
В том числе											
Пылесос	28	42,1/178	25	28,3/70	14,3	105,5/322	28,6	0,2/0,45	17,9	н. о.	0
Утюг	8	н. о.	0	18	12,5	н. о.	0	0,2/0,2	25	н. о.	0
Электрочайник	18	88,7/380	33,3	н. о.	0	н. о.	0	20/34,7	16,7	1,1/2,5	16,7
ИТ и телекоммуникационное оборудование	163	786,9/17814	38,0	51,9/316	8,0	66,3/120	3,7	32,2/115,5	49,1	13/120,9	11,7
В том числе											
Блок бесперебойного питания	24	197,9/600	70,8	13,5/15	8,3	79/81	8,3	59,4/109,8	87,5	4,7/16,1	33,3
Блок питания	29	70,4/141	31	11	3,4	н. о.	0	15,4/70,6	65,5	12,2/37,5	13,8
Внутренние детали ПК	22	1219/8940	95,5	118/316	13,6	73/120	9,1	31,7/64,5	95,5	7,6/35,2	22,7
Ноутбук	9	64,8/79	44,4	21	11,1	н. о.	0	22,7/42,8	44,4	н. о.	0
Сетевой фильтр/удлинитель	9	9060/17814	33,3	н. о.	0	н. о.	0	20/55,7	33,3	120,9	11,1
Копировальное оборудование	130	113,3/245	27,7	27,4/99	10,8	49,8/77	12,3	60,6/121,3	30,8	3,7/16,7	6,9
В том числе											
МФУ	20	133,3/245	20	12/16	15	49,3/64	15	95,6/119,8	20	н. о.	0
Принтер	88	108,1/222	29,5	17,8/57	10,2	47,7/77	13,6	58,9/121,3	34,1	3/16,7	6,8
Факсимильный аппарат	12	140/195	41,7	н. о.	0	77	8,3	67,9/85,5	33,3	14,4	8,3
Экраны (мониторы и телевизоры)	240	136,5/508	25,4	34/234	11,7	60,7/270	17,1	34,7/127,8	40,8	12,1/144,7	15,4
В том числе											
ЖК монитор	43	84/203	11,6	13	2,3	58	2,3	14,4/96,3	32,6	2,2	2,3
ЖК телевизор	15	194/338	26,7	13/14	13,3	116,5/170	13,3	34,4/115,7	60	21,6/38,0	20
Монитор с ЭЛТ	75	154,1/580	40	47,5/234	22,7	54,8/124	42,7	54,2/127,8	45,3	0,14/0,3	5,3
Телевизор с ЭЛТ	107	114/352	20,6	13,1/21	7,5	74,3/270	5,6	25,4/111,5	38,3	13,1/144,7	27,1
Смешанные отходы пластика ЭО	14	448,5/835	14,3	284/351	21,4	67,5/82	14,3	4,9/37,8	64,3	1/3	28,6
Сырье и продукция из полистирола	7	н. о.	0	н. о.	0	н. о.	0	2,9/5,7	85,7	н. о.	0
Допустимая концентрация, мг/кг		1000		100		1000		2000		1000	

Примечания: ¹ – доля проб, содержащих загрязняющее вещество; ² – содержание ниже предела обнаружения метода (пределы обнаружения методов: РФС – 10 мг/кг, ГХ/МС (ПББ и ПБДЭ) – 5 мг/кг (50 мг/кг для декаБДЭ)).

Ранжирование ЭЭО по встречаемости ПБДЭ в пластмассах, входящих в их состав, выглядит следующим образом: мониторы и телевизоры – 15,4 % случаев, крупногабаритная бытовая техника – 14,0 %, ИТ и телекоммуникационное оборудование – 11,7 %, копировальное оборудование – 6,9 %, мелкогабаритная бытовая техника – 3,0 %. Более высоким уровнем обнаружения ПБДЭ характеризовались смешанные измельченные отходы пластмасс ЭЭО (28,6 %), что свидетельствует о перераспределении поллютанта при измельчении пластмасс различных категорий. Несмотря на присутствие брома в сырье и продукции из полистирола, ПБДЭ в данных образцах обнаружены не были, что может объясняться использованием других бромированных антипиренов, например, гексабромциклододекана (ГБЦД). В целом относительно низкая доля пластмасс ЭЭО, содержащих ПБДЭ, по сравнению с долей бромсодержащих пластмасс, вероятно, связана с содержанием других бромированных антипиренов, например, ГБЦД, тетрабромбисфенола А и др.

Присутствие свинца, хрома и кадмия установлено в пластмассах всех анализируемых категорий ЭЭО. Высокие концентрации свинца фиксировались в смешанных измельченных отходах пластмасс – до 0,8 г/кг и пластмассах экранов – до 0,6 г/кг. Аномально высокое содержание свинца (более 5 г/кг) установлено в пробах измельченной изоляции кабелей. В большинстве же проб пластмасс ИТ и телекоммуникационного оборудования содержание свинца не превышало 0,5 г/кг. Концентрации кадмия в смешанных отходах пластмасс достигали 0,35 г/кг, ИТ и телекоммуникационного оборудования – 0,32 г/кг, экранов – 0,23 г/кг. Присутствие ртути в составе пластмасс установлено в экранах, копировальном оборудовании, ИТ и телекоммуникационном оборудовании и крупногабаритной бытовой технике, а ее концентрации не превышали 100 мг/кг. Содержание хрома в пластмассах мелкогабаритной бытовой техники достигало 0,32 г/кг, мониторов и телевизоров – 0,27 г/кг, крупногабаритной бытовой техники – 0,18 г/кг, ИТ и телекоммуникационного оборудования – 0,12 г/кг. В смешанных отходах пластмасс и пластмассах копировального оборудования содержание хрома не превышало 100 мг/кг. Следует добавить, что помимо пластика, тяжелые металлы используются в других деталях ЭЭО (электронно-лучевых трубках, печатных платах, припоях и др.).

Тяжелые металлы чаще встречались в пластмассах оборудования, произведенного в странах Азии. Среди оборудования, произведенного в Европе, тяжелые металлы в пластмассах фиксировались в 30,0 % случаев, бывшего СССР – 25,0 %.

Установлена статистически значимая линейная связь между содержанием брома и свинца в отходах пластмасс различных категорий ЭЭО с наиболее высокими значениями для копировального оборудования (коэффициент ранговой корреляции Спирмена, $\rho = 0,9$) и мониторов и телевизоров ($\rho = 0,84$) (рис. 2). Связь между содержанием брома и тяжелых металлов в измельчен-

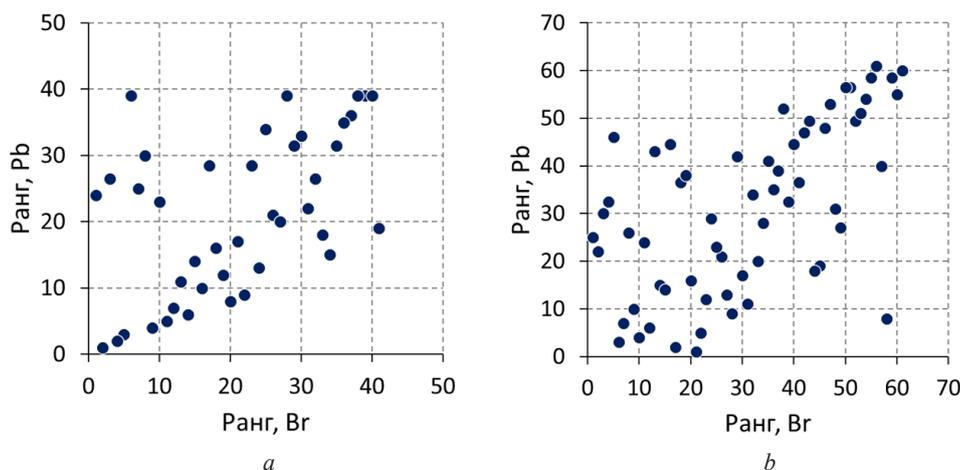


Рис. 2. Связи между содержанием брома и свинца в отходах пластмасс по Спирмену: *a* – копировальное оборудование, *b* – мониторы и телевизоры

Fig. 2. Relationships between bromine and lead content in plastic waste according to Spearman: *a* – copying equipment, *b* – monitors and televisions

ных отходах пластмасс ЭЭО не подтверждается статистически, что свидетельствует о смешивании пластмасс с различным содержанием опасных веществ.

Объемы образования отходов пластмасс, содержащих опасные вещества. Результаты исследований показали, что по состоянию на 2022 г. в Беларуси образовалось около 123 тыс. т отходов ЭЭО (13,4 кг/чел.). По оценкам, выполненным на 2020 г., их объемы составляли 128 тыс. т [15].

Из общего количества отходов ЭЭО на долю отходов пластмасс приходится 20,2 %, или 24,9 тыс. т. Наибольший вклад в образование отходов пластмасс вносит крупногабаритная бытовая техника – 45,8 % (рис. 3). Далее в порядке убывания следуют: телевизоры и мониторы – 28,6 %, ИТ и телекоммуникационное оборудование – 10,8 %, мелкогабаритная бытовая техника – 10,5 %, копировальное оборудование – 4,3 %.

Как и следовало ожидать, пространственное распределение отходов пластмасс на территории Беларуси весьма неравномерно. Наибольшие объемы отходов пластмасс образуются в Минске – 5,8 тыс. т (рис. 4). Более 1 тыс. т отходов пластмасс образовано в четырех районах с крупными городами областного подчинения (Витебский, Гомельский, Гродненский, Могилевский), на их долю пришлось 18,9 % всех отходов пластмасс. В Барановичском, Брестском, Полоцком, Минском и Бобруйском районах объемы образования отходов пластмасс находились в диапазоне 0,5–1 тыс. т. В 25,4 % районов диапазон объемов образования отходов пластмасс составлял 0,1–0,5 тыс. т. На большей части территории страны (79 районов, или 66,9 % всех районов) объемы отходов пластмасс не превышали 100 т.

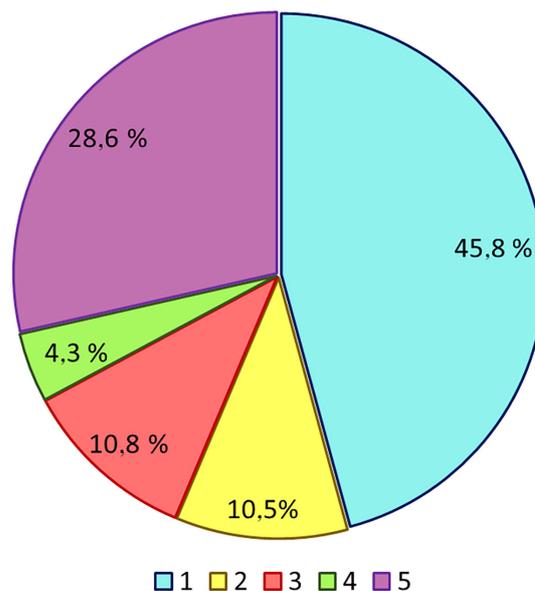


Рис. 3. Структура отходов пластмасс ЭЭО: 1 – крупногабаритная бытовая техника, 2 – мелкогабаритная бытовая техника, 3 – ИТ и телекоммуникационное оборудование, 4 – копировальное оборудование, 5 – мониторы и телевизоры

Fig. 3. The structure of waste plastics EEE: 1 – large-sized household appliances, 2 – small-sized household appliances, 3 – IT and telecommunications equipment, 4 – copying equipment, 5 – monitors and TVs

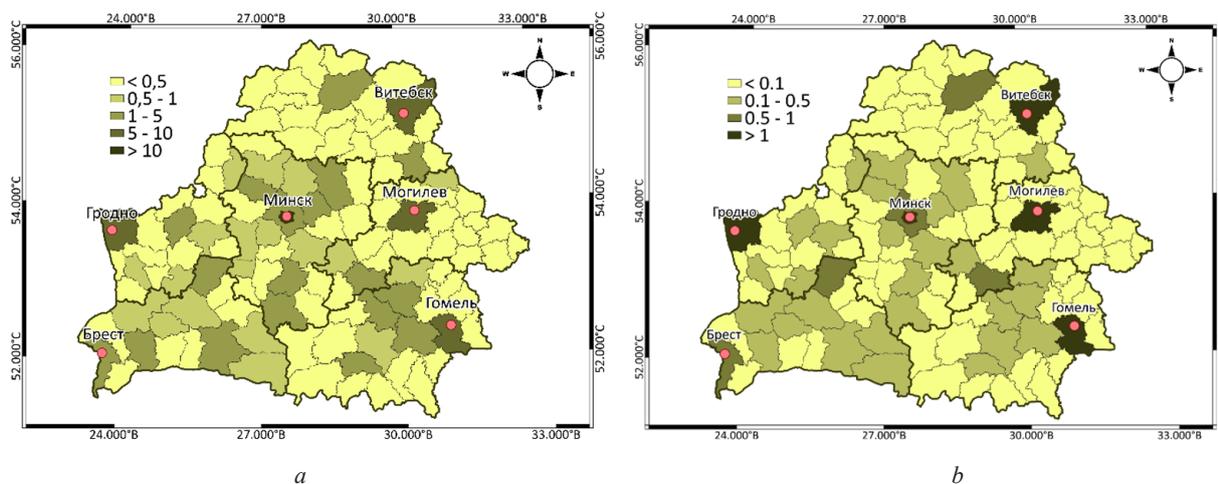


Рис. 4. Объемы образования отходов на территории Беларуси в разрезе административных районов, тыс. т (по состоянию на 2022 г.): а – ЭЭО, б – пластмасс ЭЭО

Fig. 4. Volumes of waste generation in Belarus by administrative districts, thousand tons (as of 2022): a – EEE, b – EEE plastics

С использованием данных химико-аналитического определения выполнена оценка объема образования отходов, содержащих бром и ПБДЭ. Расчеты показали, что по состоянию на 2022 г. на территории Беларуси 22,1 % отходов пластмасс (5,5 тыс. т) могут содержать в своем составе бром (табл. 2). Основной вклад в образование бромсодержащих отходов вносят мониторы и телевизоры: на их долю приходится 53,0 % общего количества бромсодержащих пластмасс. На втором месте – крупногабаритная бытовая техника (24,0 %). Объем пластмасс, содержащих бром в количестве более 2 г/кг, оценивается в 63,5 % общего их количества.

Т а б л и ц а 2. Объемы образования отходов пластмасс ЭЭО, содержащие бром и ПБДЭ (по состоянию на 2022 г.)

Table 2. Volumes of generated waste plastics WEEE containing bromine and PBDEs (as of 2022)

Категория оборудования Equipment category	Отходы пластмасс, тыс. т Plastic waste, thousand tons	Отходы пластмасс, содержащие бром, тыс. т Bromine-containing plastic waste, thousand tons		Отходы пластмасс, содержащие ПБДЭ, тыс. т Plastic waste containing PBDE, thousand tons	
		всего total	>2000 мг/кг >2000 mg/kg	всего total	>1000 мг/кг >1000 mg/kg
Крупногабаритная бытовая техника	11,5	1,3	0,98	0,12	0,1
Мелкогабаритная бытовая техника	2,7	0,3	0,07	0,003	0,001
ИТ и телекоммуникационное оборудование	2,7	0,68	0,44	0,2	0,1
Копировальное оборудование	1,1	0,33	0,3	0,07	0,02
Экраны (мониторы и телевизоры)	7,2	2,9	1,7	1,1	0,74
Всего, тыс. т	25,2	5,5	3,5	1,5	0,96

Объемы отходов пластмасс, содержащих ПБДЭ, оцениваются в 1,5 тыс. т, или 6,0 % всех отходов пластмасс. Наибольшая их доля (76,0 %) представлена отходами мониторов и телевизоров. Объемы отходов пластмасс с превышением установленного норматива содержания ПБДЭ равны 0,97 тыс. т.

Проблемы вторичного использования отходов пластмасс. Как известно, электроника являлась одним из основных секторов, в котором использовались большие количества бромированных антипиренов, включая СОЗ. Поэтому обращение с отходами, содержащими СОЗ, должно базироваться на учете их концентраций и наличия других загрязняющих веществ. Согласно Стокгольмской конвенции о СОЗ, пока действуют исключения в отношении переработки отходов, содержащих пента- и октабромдифениловые эфиры, а также в отношении производства декабромдифенилового эфира для Сторон, зарегистрировавших такие исключения. Официальной датой истечения их срока действия будут соответственно 2030 и 2036 годы. Это означает, что импорт в Беларусь новых электронных устройств и оборудования, содержащих опасные вещества, не исключается. Следует принимать во внимание и запасы старой бытовой и вычислительной техники, которая используется населением и зачастую, при выходе из эксплуатации, продолжает оставаться на хранении.

Анализ системы сбора устаревшего ЭЭО в Беларуси показал, что она налажена в областных и крупных районных центрах. В среднем уровень сбора оценивается примерно в 25,0 % по отношению к объемам образования отходов ЭЭО. Для 11,7 % районов страны характерен высокий уровень сбора отходов ЭЭО. К ним, как правило, относятся Минск и районы с городами областного подчинения либо крупными промышленными центрами. На 35,3 % территории система сбора отходов ЭЭО развернута не в полной мере и характеризуется средним уровнем сбора. К ним относятся районы, близлежащие к областным и промышленным центрам. В большей же части районов уровень сбора отходов ЭЭО остается по-прежнему низким. Согласно [9], в 2022 г. официальным сектором в Беларуси было собрано и переработано 21,8 тыс. т отходов ЭЭО. Из них более 6,1 тыс. т приходилось на отходы пластмасс, входящих в состав ЭЭО. Согласно расчетам, 16,8 % собранных отходов пластмасс могут содержать в своем составе бром.

С 1 января 2023 г. в Беларуси введен в действие ТКП 17.11-11-2022, устанавливающий правила обращения с отходами электрического и электронного оборудования, содержащими полиброми-

рованные дифениловые эфиры. Данный ТПК регламентирует требования к разборке оборудования, выявлению, разделению, хранению, обезвреживанию и захоронению отходов ЭЭО, содержащих полибромированные дифениловые эфиры. Следует отметить, что при отсутствии возможности измерения уровней содержания брома при ручной сортировке и демонтаже ЭЭО следующие виды ЭЭО и/или деталей целесообразно рассматривать как потенциально содержащие ПБДЭ: блоки питания, блоки бесперебойного питания; мониторы и телевизоры; внутренние детали ПК (материнская плата, кулер); сетевые фильтры; выключатели внутреннего шкафа холодильника; корпуса индукционных катушек и модулей управления стиральных машин. Их извлечение из общего потока ЭЭО позволит снизить общую циркуляцию опасных веществ.

Важным представляется дальнейшее совершенствование нормативной технической базы, включая уточнение классификатора отходов ЭЭО, введение предельного содержания ПБДЭ в отходах и др. Целесообразным является введение скрининг-методов определения брома в пластмассах ЭЭО как общепризнанную на мировом уровне практику обращения с отходами ЭЭО. Кроме того, с целью предотвращения поступления загрязненных отходов пластмасс на вторичную переработку и в окружающую среду требуется повышение осведомленности специалистов и обеспечение их профессиональной подготовки.

Заключение. Впервые для территории Беларуси выполнены широкомасштабные исследования отходов пластика электрического и электронного оборудования (ЭЭО), включающие отбор 760 проб фрагментов пластика и проведение химико-аналитических испытаний с определением содержания брома, тяжелых металлов и ПБДЭ.

Установлено, что бром обнаруживается в 37,0 % проб пластика, полибромдифениловые эфиры – в 11,4 %, свинец – в 27,6 %, хром – в 10,9 %, кадмий – в 8,4 %, ртуть – в 0,9 %, что согласуется с данными для других стран. Выявлена тесная статистически значимая линейная связь между содержанием свинца и брома в отходах пластмасс различных видов ЭЭО.

Наиболее высокая встречаемость ПБДЭ (28,6 %) характерна для смешанных отходов пластмасс, что свидетельствует о перераспределении поллютанта при измельчении отходов различных категорий ЭЭО. Относительно низкая доля пластмасс ЭЭО, содержащих ПБДЭ, по сравнению с долей бромсодержащих пластмасс, вероятно, связана с содержанием других бромированных антипиренов, например, ГБЦД, тетрабромбисфенола А и др., что свидетельствует о необходимости дальнейших исследований.

Впервые получены оценки объемов образования отходов пластмасс ЭЭО на территории Беларуси, содержащих опасные вещества. Показано, что объемы образования отходов ЭЭО в Беларуси по состоянию на 2022 г. составили порядка 123 тыс. т, из которых примерно 25 тыс. т представлено отходами пластмасс. Ежегодное образование отходов бромсодержащих пластмасс оценивается примерно в 5,5 тыс. т, из которых около 65,0 % подлежат экологически безопасному удалению.

Данная работа является необходимым элементом информационного обеспечения системы экологически безопасного обращения с отходами ЭЭО.

Благодарности. Работа выполнена в рамках Подпрограммы 3 «Обращение со стойкими органическими загрязнителями» Государственной программы «Охрана окружающей среды и устойчивое использование природных ресурсов» на 2021–2025 годы (№ госрегистрации 20211274) и задания Подпрограммы 1 «Природные ресурсы и их рациональное использование» ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг. (№ госрегистрации 20192480).

Acknowledgements. The study has been performed within the framework of Subprogram 3 “Management of persistent organic pollutants” of the State Program “Environmental Protection and Sustainable Use of Natural Resources” for 2021–2025 (state registration no. 20211274) and the Task of the Subprogram 1 “Natural resources and their rational use” of the State Program of Scientific Investigations “Natural Resources and Environment” for 2021–2025 (state registration no. 20192480).

Список использованных источников

1. The Global E-waste Monitor 2024 / С. P. Baldé [et al.]. – Bonn; Geneva, 2024. – 148 p.
2. Recycling plastics from WEEE: A review of the environmental and human health challenges associated with brominated flame retardants / С. Chaine [et al.] // Int. J. Environ. Res. Public Health. – 2022. – Vol. 19, N 2. – Art. 766. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020766>

3. Brominated flame retardants in Irish waste polymers: Concentrations, legislative compliance, and treatment options / D. Drage [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2018. – Vol. 625. – P. 1535–1543. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.076>
4. The non-negligible environmental risk of recycling halogenated flame retardants associated with plastic regeneration in China / Z. Cao [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2019. – Vol. 646. – P. 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.373>
5. Screening for halogenated flame retardants in European consumer products, building materials and wastes / Š. Vojta [et al.] // *Chemosphere.* – 2017. – Vol. 168. – P. 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.032>
6. Recycling plastics containing decabromodiphenyl ether into new consumer products including children's toys purchased in Japan and seventeen other countries / M. Kajiwara [et al.] // *Chemosphere.* – 2022. – Vol. 289. – Art. 133179. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133179>
7. Haarman, A. Study on the Impacts of Brominated Flame Retardants on the Recycling of WEEE plastics in Europe / A. Haarman, F. Magalini, J. Courtois. – Sofies, 2020. – 46 p.
8. Concentrations and legislative aspects of PBDEs in plastic of waste electrical and electronic equipment in Brazil / H. D. Burgos Melo [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2024. – Vol. 906. – Art. 167349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167349>
9. Об объемах сбора и использования вторичных материальных ресурсов, размерах и направлениях расходования средств, полученных от производителей и поставщиков в 2023 году: отчет за 2023 год [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://vtoroperator.by/about_us/operator-reports/?letter=%D0%92%D1%81%D0%B5%20%D0%BE%D1%82%D1%87%D1%91%D1%82%D1%8B. – Дата доступа: 07.05.2024.
10. Кухарчик, Т. И. Содержание загрязняющих веществ в отходах пластика электротехнических изделий в Беларуси / Т. И. Кухарчик, В. Д. Чернюк, В. П. Кулакович // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 2. – С. 224–233. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-2-224-233>
11. UNEP 2021. Draft guidance on preparing inventories of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) listed under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Secretariat of the Basel, Rotterdam and Stockholm conventions, United Nations Environment Programme, Geneva, 2021 [Electronic resource]. – Mode of access: <https://chm.pops.int/Implementation/NationalImplementationPlans/GuidanceArchive/GuidancefortheinventoryofPBDEs/tabid/3171/Default.aspx>. – Date of access: 18.010.2022.
12. Turner, A. Bromine in plastic consumer products – Evidence for the widespread recycling of electronic waste / A. Turner, M. Filella // *Sci. Total Environ.* – 2017. – Vol. 601–602. – P. 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.173>
13. Towards development of a rapid and effective non-destructive testing strategy to identify brominated flame retardants in the plastics of consumer products / C. Gallen [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2014. – Vol. 491–492. – P. 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.074>
14. Hansen, E. Hazardous substances in plastics. Survey of chemical substances in consumer products / E. Hansen, N. Nillson, K. S. R. Vium; The Danish Environmental Protection Agency. – Denmark, 2014. – N 132. – 182 p.
15. Чернюк, В. Д. Геоэкологическая оценка отходов пластмасс электрического и электронного оборудования на территории Беларуси: автореф. дис. ... канд. геогр. наук: 25.03.13 / В. Д. Чернюк; Ин-т природопользования НАН Беларуси. – Минск, 2023. – 26 с.

References

1. Baldé C. P., Kuehr R., Yamamoto T., McDonald R., D'Angelo E., Althaf S., Bel G., Deubzer O., Fernandez-Cubillo E., Forti V., Gray V., Herat S., Honda S., Iattoni G., Khetriwal D. S., Luda di Cortemiglia V., Lobuntsova Y., Nnorom I., Pralat N., Wagner M. *The global e-waste monitor 2024*. Bonn, Geneva, 2024. 148 p.
2. Chaine C., Hursthouse A. S., McLean B., McLellan I., McMahon B., McNulty J., Miller J., Viza E. Recycling plastics from WEEE: A review of the environmental and human health challenges associated with brominated flame retardants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, vol. 19, no. 2, art. 766. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020766>
3. Drage D. S., Sharkey M., Abdallah M. A., Berresheim H., Harrad S. Brominated flame retardants in Irish waste polymers: Concentrations, legislative compliance, and treatment options. *Science of the Total Environment*, 2018, vol. 625, pp. 1535–1543. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.076>
4. Cao Z., Chen Q., Li X., Zhang Y., Ren M., Sun L., Wang M., Liu X., Yu G. The non-negligible environmental risk of recycling halogenated flame retardants associated with plastic regeneration in China. *Science of the Total Environment*, 2019, vol. 646, pp. 1090–1096. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.373>
5. Vojta Š., Bečanová J., Melymuk L., Komprdová K., Kohoutek J., Kukučka P., Klánová J. Screening for halogenated flame retardants in European consumer products, building materials and wastes. *Chemosphere*, 2017, vol. 168, pp. 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.032>
6. Kajiwara N., Matsukami H., Malarvannan G., Chakraborty P., Covaci A., Takigami H. Recycling plastics containing decabromodiphenyl ether into new consumer products including children's toys purchased in Japan and seventeen other countries. *Chemosphere*, 2022, vol. 289, art. 133179. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133179>
7. Haarman A., Magalini F., Courtois J. *Study on the Impacts of Brominated Flame Retardants on the Recycling of WEEE plastics in Europe*. Sofies, 2020. 46 p.
8. Burgos Melo H. D., de Souza-Araujo J., Benavides Garzón L. G., Macedo J. C., Cardoso R., Mancini S. D., Harrad S., Rosa A. H. Concentrations and legislative aspects of PBDEs in plastic of waste electrical and electronic equipment in Brazil. *Science of the Total Environment*, 2024, vol. 906, art. 167349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167349>
9. *On the volumes of collection and use of secondary material resources, the sizes and directions of spending funds received from manufacturers and suppliers in 2023: report for 2023*. Available at: https://vtoroperator.by/about_us/operator-reports/?letter=%D0%92%D1%81%D0%B5%20%D0%BE%D1%82%D1%87%D1%91%D1%82%D1%8B

ter=%D0%92%D1%81%D0%B5%20%D0%BE%D1%82%D1%87%D1%91%D1%82%D1%8B (accessed 07 May 2024) (in Russian).

10. Kukharchyk T. I., Chernyuk V. D., Kulakovich V. P. Content of pollutants in waste plastic of electrical equipment in Belarus. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 2, pp. 224–233 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-2-224-233>

11. UNEP 2021. *Draft guidance on preparing inventories of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) listed under the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. Secretariat of the Basel, Rotterdam and Stockholm conventions, United Nations Environment Programme, Geneva, 2021. Available at: <https://chm.pops.int/Implementation/NationalImplementationPlans/GuidanceArchive/GuidancefortheinventoryofPBDEs/tabid/3171/Default.aspx> (accessed 18 October 2022).

12. Turner A., Filella M. Bromine in plastic consumer products – Evidence for the widespread recycling of electronic waste. *Science of the Total Environment*, 2017, vol. 601–602, pp. 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.173>

13. Gallen C., Banks A., Brandsma S., Baduel C., Thai P., Eaglesham G., Heffernan A., Leonards P., Bainton P., Mueller J. F. Towards development of a rapid and effective non-destructive testing strategy to identify brominated flame retardants in the plastics of consumer products. *Science of the Total Environment*, 2014, vol. 491–492, pp. 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.074>

14. Hansen E., Nillson N., Vium K. S. R. *Hazardous substances in plastics. Survey of chemical substances in consumer products*. Denmark, 2014, no. 132. 182 p.

15. Chernyuk V. *Geoecological assessment of waste plastics of electrical and electronic equipment in Belarus*. Minsk, 2023. 26 p. (in Russian).

Информация об авторах

Чернюк Владимир Дмитриевич – канд. геогр. наук, ст. науч. сотрудник. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 10, 220076, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chernyuk.vladimir.m@mail.ru.

Кухарчик Тамара Иосифовна – д-р геогр. наук, гл. науч. сотрудник. Институт природопользования НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 10, 220076, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tkukharchyk@gmail.com.

Information about the authors

Chernyuk Vladimir D. – Ph. D. (Geography), Senior Researcher. Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, F. Skorina Str., 220076, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chernyuk.vladimir.m@mail.ru.

Kukharchyk Tamara I. – D. Sc. (Geography), Chief Researcher. Institute of Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus (10, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tkukharchyk@gmail.com.

ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ
TECHNICAL SCIENCES

УДК 621.396.96

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-504-512>

Поступило в редакцию 31.05.2024

Received 31.05.2024

Член-корреспондент В. М. Артемьев¹,
член-корреспондент С. М. Костромицкий², А. О. Наумов¹

¹*Институт прикладной физики Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Центр радиотехники Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

**АНАЛИЗ ТОЧНОСТИ РАДИОЛОКАЦИОННОГО СОПРОВОЖДЕНИЯ
НЕРАЗРЕШЕННЫХ ПО КООРДИНАТАМ ЦЕЛЕЙ**

Аннотация. При радиолокационном сопровождении часто возникает ситуация, когда две цели оказываются неразрешенными по одной или нескольким координатам. Целью работы является разработка аналитической методики анализа точности сопровождения неразрешенных целей с использованием методов статистической линеаризации и интегрирования уравнений вероятностных моментов. Первоначально решается задача анализа точности сопровождения одиночной цели, а затем – двух целей, неразрешенных по одной из координат. Предложена методика анализа точности радиолокационного сопровождения двух неразрешенных целей, сигналы которых находятся в пределах ширины дискриминационной характеристики. Нелинейный характер задачи обусловлен необходимостью учета формы этой дискриминационной характеристики. При разработке методики использован метод статистической линеаризации нелинейных функций и метод интегрирования уравнений вероятностных моментов. Проведено математическое моделирование системы сопровождения одиночной цели и системы сопровождения двух неразрешенных целей. Точность методики оценивалась путем сопоставления результатов вычисления математических ожиданий и дисперсий ошибок сопровождения методом статистических испытаний с результатами аналитических расчетов. Полученные результаты можно использовать при решении таких задач, как сопровождение парной цели, сопровождение при пересечении траекторий, сопровождение в условиях уводящей помехи и др.

Ключевые слова: радиолокационная станция, радиолокационное сопровождение, дискриминационная характеристика, статистическая линеаризация, математическое моделирование, метод статистических испытаний

Для цитирования. Артемьев, В. М. Анализ точности радиолокационного сопровождения неразрешенных по координатам целей / В. М. Артемьев, С. М. Костромицкий, А. О. Наумов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 504–512. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-504-512>

Corresponding Member Valentin M. Artemiev¹,
Corresponding Member Sergey M. Kostromitsky², Alexander O. Naumov¹

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

²*Radio Engineering Center of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**ANALYSIS OF THE ACCURACY OF RADAR TRACKING
OF UNRESOLVED BY COORDINATES TARGETS**

Abstract. During radar tracking often a situation arises when two targets are unresolved in one or more coordinates. The aim of this work is to develop an analytical technique for analyzing the accuracy of tracking of unresolved targets using methods of statistical linearization and integration of equations of probabilistic moments. Initially, the problem of analyzing the accuracy of tracking a single target is solved, and then the problem of tracking of two targets which are unresolved in one of the coordinates. A technique for analyzing the accuracy of radar tracking of two unresolved targets, the signals of which are within the width of the discriminatory characteristic is proposed. The nonlinear nature of the problem is caused by the need to take into account the form of this discriminatory characteristic. When developing the technique, the method of statistical linearization of nonlinear functions and the method of integrating equations of probabilistic moments were used.

Mathematical simulation of a single target tracking system and a tracking system for two unresolved targets was carried out. The accuracy of the technique was assessed by comparing the results of calculating means and variances of tracking errors using Monte Carlo method with the results of analytical calculations. The obtained results can be used to solve problems such as tracking a paired target, handling crossing trajectories, tracking in conditions of radar jamming, etc.

Keywords: radar, radar tracking, discriminatory characteristic, statistical linearization, mathematical simulation, Monte Carlo method

For citation. Artemiev V. M., Kostromitsky S. M., Naumov A. O. Analysis of the accuracy of radar tracking of unresolved by coordinates targets. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 504–512 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-504-512>

Введение. При радиолокационном сопровождении цели возникает ситуация, когда соседняя цель оказывается неразрешенной по одной или нескольким координатам. Это приводит к тому, что в пределах ширины дискриминационной характеристики системы сопровождения появляются сигналы одновременно от двух целей. Такая ситуация в дальнейшем называется сопровождением неразрешенных целей, что приводит к увеличению ошибок сопровождения выбранной цели. Это характерно при сопровождении группы целей [1] или уводящей помехе [2]. В первом случае сопровождение может продолжаться длительное время в стационарном режиме, а во втором – кратковременно. При анализе точности сопровождения необходимо учитывать динамику поведения системы с учетом нелинейного характера дискриминатора, в общем случае при изменении разности координат целей.

Цель работы – разработка аналитической методики анализа точности сопровождения неразрешенных целей с использованием методов статистической линеаризации и интегрирования уравнений вероятностных моментов [3]. Первоначально решается задача анализа точности сопровождения одиночной цели [4], а затем – двух целей, неразрешенных по одной из координат.

Точность сопровождения одиночной цели. Функциональная схема системы сопровождения радиолокационной станции (РЛС) изображена на рис. 1.

На рис. 1 отображены: координата цели x_k в дискретные моменты времени $k = 0, 1, 2, \dots$; \hat{x}_k – оценка координаты; \tilde{x}_k – экстраполяция координаты на момент времени k по результатам оценок в предыдущие моменты времени. Дискриминатор измеряет ошибки экстраполяции $\varepsilon_k = x_k - \tilde{x}_k$ в виде функции $k_d f_d(\varepsilon_k)$. Здесь k_d называется коэффициентом преобразования дискриминатора (КД), зависящим от отношения сигнала к шумам в конкретных дискриминаторах, а функция $f_d(\varepsilon_k)$ – дискриминационной характеристикой (ДХ) со свойством $\partial f_d(\varepsilon_k) / \partial \varepsilon_k |_{\varepsilon_k=0} = 1$. Одним из вариантов аппроксимации ДХ может служить линейно-гауссова функция

$$f_d(\varepsilon_k) = \varepsilon_k e^{-\frac{\varepsilon_k^2}{\Delta^2}}, \tag{1}$$

где Δ – полуширина ДХ. График этой функции приведен на рис. 2.

Дискриминатор производит измерения с ошибкой w_k , которая полагается случайным процессом с нулевым математическим ожиданием. В результате выходной сигнал дискриминатора можно представить в виде

$$z_k = k_d f_d(\varepsilon_k) + w_k. \tag{2}$$

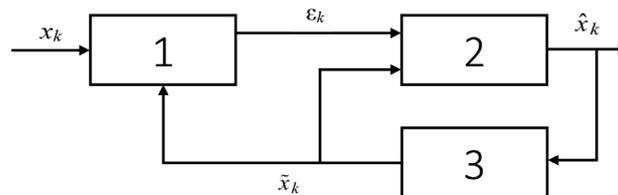


Рис. 1. Функциональная схема системы сопровождения РЛС: 1 – дискриминатор; 2 – сглаживающий фильтр; 3 – экстраполятор

Fig. 1. Functional diagram of the radar tracking system: 1 – discriminator; 2 – smoothing filter; 3 – extrapolator

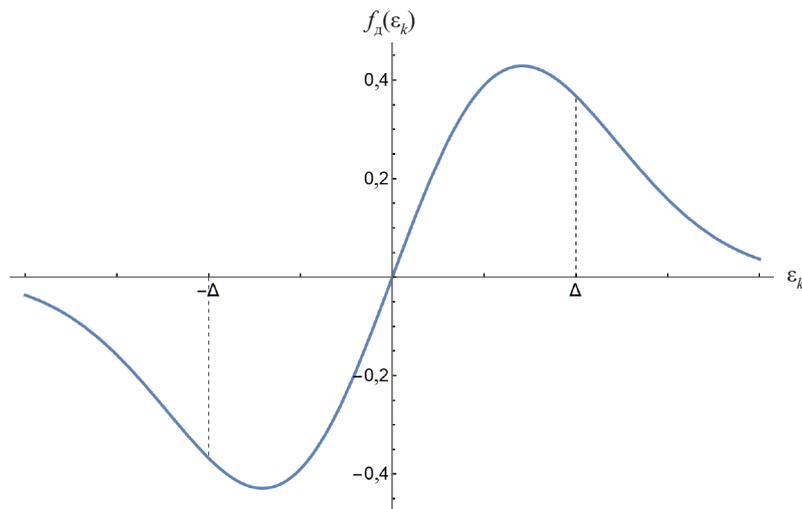


Рис. 2. Линейно-гауссова дискриминационная характеристика

Fig. 2. Linear-Gaussian discrimination characteristic

Сглаживающий фильтр служит для преобразования сигнала дискриминатора в оценку \hat{x}_k , с учетом экстраполяции \tilde{x}_k .

Нахождение алгоритма сопровождения рассматривается на основе метода наименьших квадратов, позволяющего учесть нелинейные характеристики дискриминатора, со следующим квадратичным критерием:

$$J_k(\hat{x}_k) = \alpha[z_k - k_d(\hat{x}_k - \tilde{x}_k)]^2 + (\hat{x}_k - \tilde{x}_k)^2, \quad 0 < \alpha < \infty.$$

Первое слагаемое согласует величину оценки с результатом измерений на выходе дискриминатора z_k , второе – с ее экстраполированным значением \tilde{x}_k , коэффициент α задает вес первого слагаемого. Алгоритм находится из условия минимума достаточных условий оптимальности, которое имеет вид

$$\partial J_k(\hat{x}_k) / \partial \hat{x}_k = -\alpha k_d [z_k - k_d(\hat{x}_k - \tilde{x}_k)] + (\hat{x}_k - \tilde{x}_k) = 0.$$

Из этого уравнения получается следующий алгоритм сопровождения:

$$\hat{x}_k = \tilde{x}_k + C z_k = \tilde{x}_k + C k_d z_k f_d(\varepsilon_k) + C w_k, \quad (3)$$

где коэффициент усиления фильтра $C = \frac{\alpha k_d}{1 + \alpha k_d^2}$. Структурная схема системы сопровождения приведена на рис. 3.

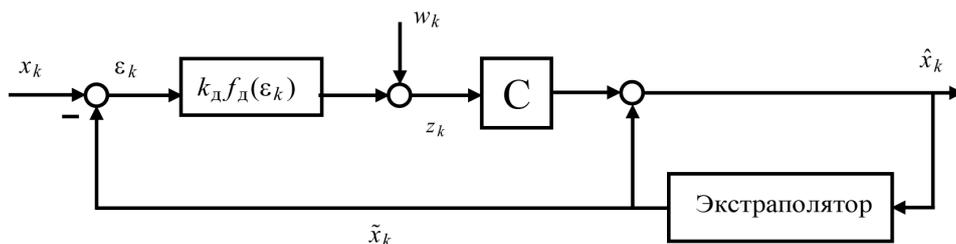


Рис. 3. Структурная схема системы сопровождения

Fig. 3. Block diagram of the tracking system

Разность $\varepsilon_k = x_k - \tilde{x}_k$ является ошибкой экстраполяции, а $e_k = x_k - \hat{x}_k$ – ошибкой сопровождения. Исходя из формул (2) и (3) получается соотношение между этими ошибками в виде нелинейного стохастического уравнения

$$e_k = \varepsilon_k - Ck_{\Delta}f_{\Delta}(\varepsilon_k) - Cw_k. \tag{4}$$

Пусть входной процесс задается посредством разностного линейного стохастического уравнения первого порядка

$$x_k = ax_{k-1} + u_k + v_k, \quad 0 < a < 1, \tag{5}$$

где v_k есть случайное приращение координаты за один период и является гауссовым белым шумом с дисперсией $\sigma_{v_k}^2$, а u_k – регулярная составляющая приращения. Уравнение для математического ожидания этого процесса $\langle x_k \rangle = m_{x_k}$ и имеет вид

$$m_{x_k} = am_{x_{k-1}} + u_k, \tag{6}$$

а уравнение для дисперсии $\langle (x_k - m_{x_k})^2 \rangle = \sigma_{x_k}^2$ выглядит следующим образом:

$$\sigma_{x_k}^2 = a^2\sigma_{x_{k-1}}^2 + \sigma_v^2. \tag{7}$$

При такой модели входного процесса в качестве экстраполирующей функции \tilde{x}_k целесообразно выбрать соотношение

$$\tilde{x}_k = a\hat{x}_{k-1}.$$

В этом случае ошибка экстраполяции выражается через ошибку сопровождения следующим образом:

$$\varepsilon_k = a(x_{k-1} - \hat{x}_{k-1}) + u_k + v_k = ae_{k-1} + u_k + v_k. \tag{8}$$

Для приближенного анализа нелинейного уравнения (4) и линейного (8) можно воспользоваться методом статистической линеаризации нелинейных функций [3]. Рассмотрим нелинейную функцию $f_{\Delta}(\varepsilon_k)$, где случайная величина ε_k имеет плотность распределения вероятностей (ПРВ) $\varphi_{\varepsilon_k}(\varepsilon_k)$ с математическим ожиданием m_{ε_k} и дисперсией $\sigma_{\varepsilon_k}^2$. Нелинейную зависимость приближенно заменяем линейной $f_{\Delta}(\varepsilon_k) \approx \varepsilon_k F_k$ таким образом, чтобы второй вероятностный момент на выходе нелинейности совпадал с аналогичным на выходе линеаризованного соотношения, что приводит к равенству

$$\int_{-\infty}^{\infty} f_{\Delta}^2(\varepsilon_k)\varphi_{\varepsilon_k}(\varepsilon_k)d\varepsilon_k = F_k^2 \int_{-\infty}^{\infty} \varepsilon_k^2\varphi_{\varepsilon_k}(\varepsilon_k)d\varepsilon_k.$$

Отсюда получаем следующее выражение для коэффициента статистической линеаризации:

$$F_k = \left[\int_{-\infty}^{\infty} f_{\Delta}^2(\varepsilon_k)\varphi_{\varepsilon_k}(\varepsilon_k)d\varepsilon_k / (m_{\varepsilon_k}^2 + \sigma_{\varepsilon_k}^2) \right]^{\frac{1}{2}}.$$

Поскольку функция ПРВ $\varphi_{\varepsilon_k}(\varepsilon_k)$ неизвестна, она аппроксимируется гауссовой с обозначением $N(\varepsilon_k, m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2)$. В результате коэффициент линеаризации становится функцией двух вероятностных моментов, т. е. $F_k = F_k(m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2)$. Например, для линейно-гауссовой дискриминационной характеристики (1) она имеет вид

$$F_k(m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2) = \left[\Delta^3 \frac{4\sigma_{\varepsilon_k}^4 + (m_{\varepsilon_k}^2 + \sigma_{\varepsilon_k}^2)\Delta^2}{(4\sigma_{\varepsilon_k}^2 + \Delta^2)^{\frac{5}{2}}(m_{\varepsilon_k}^2 + \sigma_{\varepsilon_k}^2)} e^{-\frac{2m_{\varepsilon_k}^2}{(4\sigma_{\varepsilon_k}^2 + \Delta^2)}} \right]^{\frac{1}{2}}. \tag{9}$$

В результате уравнение ошибки сопровождения (4) линеаризуется и выглядит следующим образом:

$$e_k = D_k(m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2)\varepsilon_k - Cw_k; \quad D_k(m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2) = 1 - Ck_d F_k(m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2).$$

Математическое ожидание ошибки сопровождения $\langle e_k \rangle = m_{e_k}$ находится из уравнения

$$m_{e_k} = D_k(m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2)m_{\varepsilon_k}. \quad (10)$$

Уравнение для дисперсии ошибки сопровождения $\langle (e_k - m_{e_k})^2 \rangle = \sigma_{e_k}^2$ равно

$$\sigma_{e_k}^2 = D_k^2(m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2)\sigma_{\varepsilon_k}^2 + C^2\sigma_{w_k}^2. \quad (11)$$

Исходя из уравнения (8), математическое ожидание ошибки экстраполяции $\langle \varepsilon_k \rangle = m_{\varepsilon_k}$ имеет вид

$$m_{\varepsilon_k} = am_{\varepsilon_{k-1}} + u_k, \quad (12)$$

а уравнение дисперсии ошибки экстраполяции $\langle (\varepsilon_k - m_{\varepsilon_k})^2 \rangle = \sigma_{\varepsilon_k}^2$ определяется выражением

$$\sigma_{\varepsilon_k}^2 = a^2\sigma_{\varepsilon_{k-1}}^2 + \sigma_{v_k}^2. \quad (13)$$

Уравнения (9)–(13) образуют замкнутую систему нелинейных уравнений, что позволяет оценить математическое ожидание и дисперсию как ошибок экстраполяции, так и ошибок сопровождения с учетом коэффициента статистической линеаризации. При этом функция ПРВ ошибок экстраполяции аппроксимируется гауссовой функцией $N(\varepsilon_k, m_{\varepsilon_k}, \sigma_{\varepsilon_k}^2)$, а ошибок сопровождения – функцией $N(e_k, m_{e_k}, \sigma_{e_k}^2)$. Эти уравнения позволяют оценивать точность сопровождения одиночной цели.

Результаты моделирования системы сопровождения одиночной цели. Цель моделирования состояла в сравнительной оценке ошибок сопровождения одиночной цели, полученных методами статистических испытаний и статистической линеаризации для различных параметров системы. При статистических испытаниях использовались уравнения ошибок (4) и (8), а для метода статистической линеаризации – уравнения (9)–(13). Моделирование осуществлялось в стационарном режиме, а для переменных использовался относительный масштаб с единицей измерения, равной полуширине дискриминационной характеристики Δ (рис. 2). Уравнения вероятностных моментов входного процесса (6) и (7) в стационарном режиме имеют вид

$$u = (1-a)m_x; \quad \sigma_w^2 = (1-a^2)\sigma_x^2.$$

Результаты моделирования приведены в таблицах. В табл. 1 показано влияние дисперсии ошибок измерений σ_w^2 на дисперсию ошибок сопровождения σ_e^2 при следующих параметрах: $\alpha = 1$, $\Delta = 1$, $k_d = 1$, $u = 0$, $\sigma_v^2 = 0$. Для сравнения с аналитическими результатами в табл. 1 приведены данные статистических испытаний по 10^5 реализациям.

Т а б л и ц а 1. Влияние дисперсии ошибок измерений σ_w^2 на дисперсию ошибок сопровождения σ_e^2

T a b l e 1. The impact of the variance of measurements errors σ_w^2 on the variance of tracking errors σ_e^2

σ_w^2	0,1	0,15	0,2	0,25	0,5
σ_e^2 (стат. исп.)	0,0325	0,0502	0,0682	0,0884	0,207
σ_e^2	0,0326	0,0498	0,0678	0,0864	0,190
Ошибка σ_e^2 , %	0,3	0,8	0,6	2,3	8,2

Влияние дисперсии σ_v^2 случайной составляющей процесса изменения координаты цели на дисперсию ошибок сопровождения σ_e^2 показано в табл. 2 при значениях параметров: $\alpha = 1, \Delta = 1, k_d = 1, u = 0, \sigma_w^2 = 0$.

Таблица 2. Влияние дисперсии σ_v^2 на дисперсию ошибок сопровождения σ_e^2
Table 2. The impact of the variance σ_v^2 on the variance of tracking errors σ_e^2

σ_v^2	0,01	0,025	0,05	0,075	0,1
σ_e^2 (стат. исп.)	0,0034	0,0099	0,0249	0,0477	0,0815
σ_e^2	0,0034	0,0097	0,0235	0,0415	0,0642
Ошибка σ_e^2 , %	0,0	2,0	5,6	13,0	21,2

Влияние математического ожидания координат цели m_x на величину математического ожидания m_e и дисперсии σ_e^2 ошибки сопровождения показано в табл. 3 при следующих параметрах: $\alpha = 1, \Delta = 1, k_d = 1, u = 0, \sigma_v^2 = 0,05, \sigma_w^2 = 0,2$.

Таблица 3. Влияние значений m_x на математическое ожидание m_e и дисперсию σ_e^2 ошибки сопровождения
Table 3. The impact of the values m_x on the mean value m_e the variance σ_e^2 of tracking errors

m_x	0,02	0,046	0,09	0,14	0,18
m_e (стат. исп.)	0,0163	0,0437	0,0907	0,141	0,202
σ_e^2 (стат. исп.)	0,117	0,120	0,127	0,141	0,173
m_e	0,0150	0,0379	0,0782	0,123	0,175
σ_e^2	0,105	0,106	0,108	0,112	0,117
Ошибка m_e , %	8,0	13,3	13,8	12,8	13,4
Ошибка σ_e^2 , %	10,3	11,7	15,0	20,6	32,4

Результаты позволяют выделить область параметров, где метод статистической линеаризации обеспечивает точность порядка 20 % по сравнению с результатами статистических испытаний.

Точность сопровождения двух неразрешенных целей. Полагается, что на входе дискриминатора в пределах ширины ДХ имеются сигналы от двух неразрешенных по координате целей с уравнениями статистически независимых координат $x_{1k} = \alpha x_{1k-1} + u_{1k} + v_{1k}$ и $x_{2k} = \alpha x_{2k-1} + u_{2k} + v_{2k}$, где u_{1k}, u_{2k} – регулярные составляющие, а v_{1k}, v_{2k} – белые шумы с дисперсиями σ_{1v}^2 и σ_{2v}^2 . Ошибки сопровождения целей равны $e_{1k} = x_{1k} - \hat{x}_k, e_{2k} = x_{2k} - \hat{x}_k$, а ошибки экстраполяции $\varepsilon_{1k} = x_{1k} - \tilde{x}_k, \varepsilon_{2k} = x_{2k} - \tilde{x}_k$, где \hat{x}_k – выходной процесс системы сопровождения, а \tilde{x}_k – экстраполяция координат. При линейных характеристиках антенной системы и приемника сигнал на выходе дискриминатора равен сумме сигналов от первой и второй целей. Параметры алгоритма сопровождения выбраны для первой цели, полагаемой основной. Структурная схема системы изображена на рис. 4, где коэффициент усиления фильтра $C = \alpha k_{1d} / (1 + \alpha k_{1d}^2)$, а экстраполяция координат $\tilde{x}_k = \alpha \hat{x}_{k-1}$.

Исходя из этой схемы, уравнение оценки \hat{x}_k выглядит следующим образом:

$$\hat{x}_k = \alpha \hat{x}_{k-1} + C[k_{1d}f_d(\varepsilon_{1k}) + k_{2d}f_d(\varepsilon_{2k})] + Cw_k, \tag{14}$$

где $w_k = w_{1k} + w_{2k}$ – ошибка измерений, состоящая из двух слагаемых. При использовании метода статистической линеаризации функции $f_d(\varepsilon_{1k})$ и $f_d(\varepsilon_{2k})$ заменяются на линейные вида $f_d(\varepsilon_{1k}) \approx \varepsilon_{1k}F_k(m_{1\varepsilon k}, \sigma_{1\varepsilon k}^2)$ и $f_d(\varepsilon_{2k}) \approx \varepsilon_{2k}F_k(m_{2\varepsilon k}, \sigma_{2\varepsilon k}^2)$, где коэффициенты статистической линеаризации зависят от вероятностных моментов ошибок экстраполяции первого и второго порядков $\langle \varepsilon_{ik} \rangle = m_{i\varepsilon k}, \langle (\varepsilon_{ik} - m_{i\varepsilon k})^2 \rangle = \sigma_{i\varepsilon k}^2, i = 1, 2$.

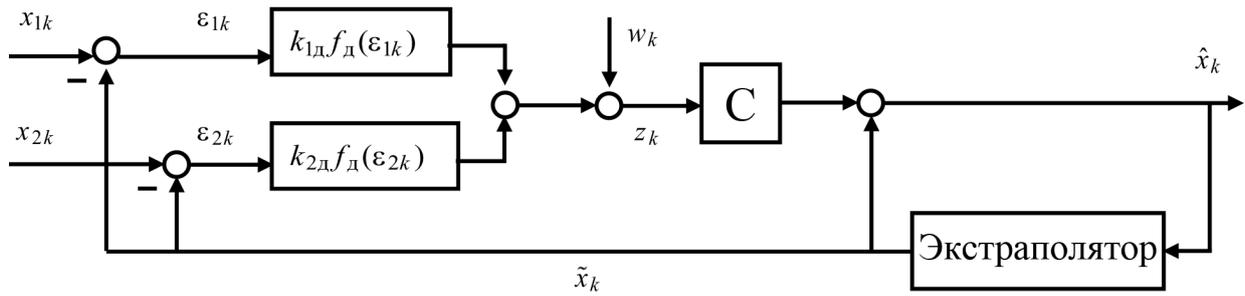


Рис. 4. Структурная схема системы сопровождения при наличии двух неразрешенных целей

Fig. 4. Block diagram of a tracking system in the presence of two unresolved targets

Уравнения ошибок сопровождения принимают вид

$$e_{ik} = D_{ik}\varepsilon_{ik} - B_{jk}\varepsilon_{jk} - Cw_k, \quad i = \overline{1, 2}, \quad j = \overline{2, 1}, \quad (15)$$

где $B_{jk} = Ck_{jд}F_k(m_{j\varepsilon_k}, \sigma_{j\varepsilon_k}^2)$, $D_{ik} = 1 - B_{ik}$.

Уравнения ошибок экстраполяции выглядят следующим образом:

$$\varepsilon_{ik} = a\varepsilon_{ik-1} + u_{ik} + v_{ik}, \quad i = \overline{1, 2}. \quad (16)$$

Уравнения (15) и (16) совместно с (9) образуют замкнутую систему стохастических разностных уравнений ошибок, линейных по координатам и нелинейных за счет коэффициентов статистической линеаризации. От стохастических уравнений ошибок можно перейти к уравнениям вероятностных моментов ошибок первого и второго порядков [4].

Для математических ожиданий ошибок экстраполяции $m_{i\varepsilon_k}$ уравнения моментов находятся исходя из уравнений (16) и имеют вид

$$m_{i\varepsilon_k} = am_{i\varepsilon_{k-1}} + u_{ik}. \quad (17)$$

Для математических ожиданий ошибок сопровождения m_{ie_k} на основе (15) находятся уравнения

$$m_{ie_k} = D_{ik}m_{i\varepsilon_k} - B_{jk}m_{j\varepsilon_k}, \quad i = \overline{1, 2}, \quad j = \overline{2, 1}. \quad (18)$$

Уравнения дисперсий ошибок экстраполяции $\sigma_{i\varepsilon_k}^2$, исходя из (16), равны

$$\sigma_{i\varepsilon_k}^2 = a^2\sigma_{i\varepsilon_{k-1}}^2 + \sigma_{iv_k}^2, \quad (19)$$

где учтено, что ошибка сопровождения e_{ik-1} статистически независима от v_{ik} . Уравнения дисперсии ошибок сопровождения $\sigma_{ie_k}^2$ находятся на основе (15) и имеют вид

$$\sigma_{ie_k}^2 = D_{ik}^2\sigma_{i\varepsilon_k}^2 + B_{jk}^2\sigma_{j\varepsilon_k}^2 + C^2\sigma_{iw_k}^2 - 2D_{ik}B_{jk}\langle(\varepsilon_{ik} - m_{i\varepsilon_k})(\varepsilon_{jk} - m_{j\varepsilon_k})\rangle, \quad i = \overline{1, 2}, \quad j = \overline{2, 1}. \quad (20)$$

Здесь учтено, что в момент k ошибки измерений w_{ik} статистически независимы от ошибок экстраполяции ε_{ik} . В дальнейшем при расчетах слагаемые с ковариационной функцией ошибок экстраполяции $\langle(\varepsilon_{ik} - m_{i\varepsilon_k})(\varepsilon_{jk} - m_{j\varepsilon_k})\rangle$ полагаем равными нулю, что при статистически независимых воздействиях x_{1k} и x_{2k} соответствует предположению о статистической независимости ошибок экстраполяции ε_{1k} и ε_{2k} .

Уравнения вероятностных моментов ошибок (17)–(20) совместно с функцией (9) образуют замкнутую систему нелинейных разностных уравнений, решение которой позволяет оценить математические ожидания m_{iek} и дисперсии σ_{iek}^2 ошибок сопровождения.

Результаты моделирования системы сопровождения двух неразрешенных целей. С целью проверки работоспособности методики анализа точности системы сопровождения проведено моделирование с использованием уравнений (9), (17)–(20) в стационарном режиме, с относительным масштабом значений переменных, равным Δ . В качестве модели траектории выбраны уравнения (5)–(7) для каждой из целей. Проведено сравнение аналитических результатов с соответствующими результатами статистических испытаний на основе уравнения (14) по 10^5 реализациям. В стационарном режиме параметры входных воздействий u_1 и u_2 полагались постоянными и исследовалось влияние разности математических ожиданий координат целей $\delta = m_{1x} - m_{2x} = (u_1 - u_2) / (1 - a)$ на математические ожидания m_{ie} и дисперсии σ_{ie}^2 ($i = \overline{1, 2}$) сопровождения каждой из них. Моделирование проводилось при следующих значениях параметров: $a = 0,9$, $\alpha = 1$, $\Delta = 1$, $u_1 = 0$, $k_{1д} = 1$, $k_{2д} = 2$, $\sigma_{1v}^2 = \sigma_{2v}^2 = 0,003$, $\sigma_w^2 = 0,03$. В качестве переменной рассматривалась разность математических ожиданий координат целей $\delta = -0,2; -0,4; -0,6; -0,8; -1$. Результаты моделирования и их сравнение с данными статистических испытаний приведены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4. Влияние разности координат целей δ на ошибки сопровождения

Table 4. The impact of the difference of the targets coordinates δ on the tracking errors

δ	-0,2	-0,4	-0,6	-0,8	-1
m_{1e} (стат. исп.)	-0,138	-0,280	-0,431	-0,585	-0,759
σ_{1e}^2 (стат. исп.)	0,0240	0,0242	0,0255	0,0289	0,0366
m_{1e}	-0,139	-0,281	-0,429	-0,585	-0,758
σ_{1e}^2	0,0268	0,0266	0,0266	0,0273	0,0291
Ошибка m_e %	0,7	0,4	0,5	0,0	0,1
Ошибка σ_{1e}^2 %	11,7	9,9	4,3	5,5	20,5
m_{2e} (стат. исп.)	0,0611	0,118	0,172	0,214	0,238
σ_{2e}^2 (стат. исп.)	0,0120	0,0110	0,0098	0,0089	0,0088
m_{2e}	0,0604	0,118	0,171	0,214	0,242
σ_{2e}^2	0,0126	0,0120	0,0114	0,0107	0,0099
Ошибка m_{2e} %	1,1	0,0	0,6	0,0	1,7
Ошибка σ_{2e}^2 %	5,0	9,1	16,3	20,2	12,5

При использованных параметрах модуль ошибки оценки математического ожидания не превышал 2 %, а дисперсии – 20 %.

Заключение. Методика оценки точности радиолокационного сопровождения неразрешенных целей основана на использовании известных методов статистической линеаризации нелинейных функций и интегрирования уравнений вероятностных моментов. Показателями точности являются математическое ожидание и дисперсия ошибки сопровождения. Сравнение ошибок сопровождения каждой из целей позволяет в среднем оценивать к какой из них ближе всего находится оцениваемая траектория. Методику можно использовать при решении таких задач, как сопровождение парной цели, сопровождение при пересечении траекторий, сопровождение в условиях уводящей помехи и др. Решение этих задач помимо оценок точности сопровождения требует нахождения вероятностей перехода с сопровождения одной цели на другую, что может быть направлением дальнейших исследований.

Список использованных источников

1. Mahler, R. Statistical Multisource-Multitarget Information Fusion / R. Mahler. – Artech House Publishers, 2007. – 888 p.
2. Цветнов, В. В. Радиоэлектронная борьба: радиоразведка и радиопротиводействие / В. В. Цветнов, В. П. Дёмин, А. И. Куприянов. – М., 1998. – 220 с.

3. Казаков, И. Е. Анализ стохастических систем в пространстве состояний / И. Е. Казаков, С. В. Мальчиков. – М., 1983. – 384 с.

4. Артемьев, В. М. Справочное пособие по методам исследования радиоэлектронных слеящих систем / В. М. Артемьев. – Минск, 1984. – 168 с.

References

1. Mahler R. *Statistical Multisource-Multitarget Information Fusion*. Artech House Publishers, 2007. 888 p.
2. Tsvetnov V. V., Demin V. P., Kupriyanov A. I. *Electronic warfare: radio intelligence and radio countermeasures*. Moscow, 1998. 220 p. (in Russian).
3. Kazakov I. E., Mal'chikov S. V. *Analysis of stochastic systems in state space*. Moscow, 1983. 384 p. (in Russian).
4. Artem'ev V. M. *Handbook on research methods for radio-electronic tracking systems*. Minsk, 1984. 168 p. (in Russian).

Информация об авторах

Артемьев Валентин Михайлович – член-корреспондент, д-р техн. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт прикладной физики НАН Беларуси (ул. Академическая, 16, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: artemiev@iaph.bas-net.by.

Костромицкий Сергей Михайлович – член-корреспондент, д-р техн. наук, профессор, директор. Центр радиотехники НАН Беларуси (ул. П. Бровки, 15/5, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: info@radiotechnika.by.

Наумов Александр Олегович – канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией. Институт прикладной физики НАН Беларуси (ул. Академическая, 16, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: naumov@iaph.bas-net.by.

Information about the authors

Artemiev Valentin M. – Corresponding Member, D. Sc. (Engineering), Professor, Chief Researcher. Institute of Applied Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (16, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: artemiev@iaph.bas-net.by.

Kostromitsky Sergei M. – Corresponding Member, D. Sc. (Engineering), Professor, Director. Radio Engineering Center of the National Academy of Sciences of Belarus (15/5, P. Brovka Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: info@radiotechnika.by.

Naumov Alexander O. – Ph. D. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. Institute of Applied Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (16, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: naumov@iaph.bas-net.by.

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

UDC 620.179
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-513-518>

Received 08.10.2024
Поступило в редакцию 08.10.2024

Sviatlana O. Abetkovskaia, Academician Sergei A. Chizhik

*A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

INFLUENCE OF THE PROBE SPRING CONSTANT AND THE QUALITY FACTOR ON ITS OSCILLATION CHARACTERISTICS IN DYNAMIC MODE OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Abstract. The work presents the results of mathematical simulation of dynamic atomic force microscopy (AFM). Influences of spring constant, the quality factor of AFM-probe on its vibration amplitude and phase shifts are studied for semi-contact interaction of tip probe and sample surface. The deformation depths of sample by probe are calculated. Also the influence of oscillation amplitude of piezogenerator, which forces probe vibration, on the characteristics of probe oscillation is shown.

Keywords: atomic force microscopy, AFM, dynamic mode, probe, oscillation, the Johnson–Kendall–Roberts model, probe spring constant, the probe quality factor, oscillation amplitude of piezogenerator, deformation depth of material

For citation. Abetkovskaia S. O., Chizhik S. A. Influence of the probe spring constant and the quality factor on its oscillation characteristics in dynamic mode of atomic force microscopy. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 513–518. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-513-518>

С. О. Абетковская, академик С. А. Чижик

*Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ВЛИЯНИЕ ЖЕСТКОСТИ И ДОБРОТНОСТИ ЗОНДА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕГО КОЛЕБАНИЙ В ДИНАМИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ РАБОТЫ АТОМНО-СИЛОВОГО МИКРОСКОПА

Аннотация. В работе приведены результаты математического моделирования динамической атомно-силовой микроскопии (АСМ). Исследовано влияние жесткости и добротности АСМ-зонда на амплитуду, сдвиг фазы колебаний его острия в режиме полуконтактного взаимодействия с поверхностью материала. Рассчитаны глубины деформирования материала зондом. Также показано влияние амплитуды колебаний пьезогенератора, вынуждающего зонд осциллировать, на характеристики колебаний зонда.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, АСМ, динамический режим, зонд, колебания, модель Джонсона–Кенделла–Робертса, жесткость зонда, добротность зонда, амплитуда колебаний пьезогенератора, глубина деформирования материала

Для цитирования. Абетковская, С. О. Влияние жесткости и добротности зонда на характеристики его колебаний в динамическом режиме работы атомно-силового микроскопа / С. О. Абетковская, С. А. Чижик // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 513–518. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-513-518>

Introduction. Dynamic atomic force microscopy (AFM) remains one of the most popular methods for studying material surfaces. Despite the appearance of such specific modes as Force modulation mode, Peak Force TappingTM, Lift mode operation, Pulsed Force Mode, ScanAsyst[®], high-speed AFM, the classic tapping mode is one of the leading ones. Its capabilities are wider in comparison with the most popular contact AFM, but its setup is also much more complicated. The complexity is enhanced by the fact that parameters for obtaining AFM images, which are “ideal” for one sample material, may be unsuitable for another sample with similar physical and mechanical characteristics.

The most common measurement errors on AFM images are defects like “break” type, which appear as noise on images and do not represent the actual relief of sample surface. Such noises are located on image in the direction of scanning the sample. They can be a consequence of incorrect adjustment of the

AFM feedback parameters or arise due to relatively high adhesion of surface of the scanned sample. The noises associated with the latter could be avoided by changing the characteristics of the dynamic interaction of probe with sample due to the selection of probe parameters.

The characteristics of probe-sample interaction (amplitude and phase shift of probe oscillations, deformation depth of sample by probe) are influenced by a set of parameters: the Young modulus and surface energy of sample; the spring constant and the quality factor of probe; oscillation amplitude of the piezoelectric generator (piezoelectric element) exciting probe oscillations.

The average spring constant of probe cantilever is specified by probe manufacturer; the probe quality factor is not given. Sometimes probes with calibrated stiffness are offered. The AFM operators could determine the spring constant and the quality factor of probe independently using its amplitude-frequency characteristic with AFM dynamic mode. The range of probe spring constant offered by manufacturers for tapping mode is wide, from 0.03 to 225 N/m [1–6].

For selection the characteristics of probe and oscillation amplitude of piezoelectric generator to avoid noises on AFM images, it is necessary to find out at what changes of these parameters switching of the probe-sample interaction modes occurs. In [7] reported that during AFM scanning of samples in tapping mode spontaneous switching between modes of higher or lower probe oscillation amplitude can occur, and causing defects of “break” type in AFM images. It was previously shown that saltatory changes in curves of dependence of probe oscillation amplitude and phase shift on the distance between probe and sample are caused by an interchange in the predominance of attractive intermolecular or repulsive (elastic) interaction forces between probe and sample [8].

The purpose and objectives of the study. The objective of the study is to identify the pattern of changes in the probe oscillation parameters under varying each of the probe characteristics separately (the spring constant, the quality factor) and piezogenerator oscillation amplitude in order to obtain recommendations for select probes for high-quality AFM images in the tapping mode of AFM.

Research method. The equation of probe oscillations during semi-contact (intermittent-contact) interaction with sample was solved using mathematical simulation methods. The model (1), developed earlier and corresponding well to the experimental data, was used [9]. At this model non-contact attractive interactions for describing the process of approaching probe tip to sample during each cycle of probe oscillations are taken into account using the Lennard–Jones potential. The contact interaction of probe and sample, occurring in the lower part of a probe oscillation cycle, is described according to the Johnson–Kendall–Roberts model for elastic-adhesive contact of a sphere and a plane [10].

The equation of probe oscillations is

$$mz'' + \frac{m\omega_0}{Q}z' + k(z - z_{\text{pos}}) = a_{\text{bm}}k \sin(\omega t) + F_{\text{ts}}(z), \quad (1)$$

where the force of interaction between probe and sample surface is

$$F_{\text{ts}}(z) = \begin{cases} F_{\text{LJ}}(z), & z > z_{F_0} \\ F_{\text{JKR}}(z), & z \leq z_{F_0} \end{cases}, \quad F_{\text{LJ}}(z) = -\frac{HR}{6} \left(\frac{1}{z^2} - \frac{\sigma^6}{4z^8} \right), \quad F_{\text{JKR}} \left(\frac{z}{z_c} \right) = \left(\frac{z}{z_c} \left(\frac{F_{\text{JKR}}}{P_c} \right) \right)^{-1},$$

$$\frac{z}{z_c} = \begin{cases} -\left(3\sqrt{\frac{F_{\text{JKR}}}{P_c} + 1} - 1 \right) \left[\frac{1}{9} \left(\sqrt{\frac{F_{\text{JKR}}}{P_c} + 1} + 1 \right) \right]^{1/3}, & \frac{z}{z_c} \leq 3^{-2/3}, \\ \left(3\sqrt{\frac{F_{\text{JKR}}}{P_c} + 1} + 1 \right) \left[\frac{1}{9} \left(1 - \sqrt{\frac{F_{\text{JKR}}}{P_c} + 1} \right) \right]^{1/3}, & 3^{-2/3} \leq \frac{z}{z_c} \leq 1, \end{cases} \quad z_c = \frac{1}{3R} \left(\frac{3RP_c}{k_s} \right)^{2/3}, \quad P_c = \frac{3}{2} \pi R \Delta\gamma,$$

$$\Delta\gamma = \frac{H}{16\pi\sigma^2}, \quad k_s = \frac{4}{3\pi} \frac{1}{\kappa_1 + \kappa_2}; \quad \kappa_i = \frac{1 - \nu_i^2}{\pi E_i}, \quad i = \overline{1, 2}.$$

Initial conditions are $z(0) = z_{\text{pos}}, \quad z'(0) = 0$.

Here z_{pos} is a position of cantilever fixing point above sample surface, nm; m is a mass of micro-probe, kg; z is a vertical displacement of tip probe, nm; t is a time, s; ω_0 is a natural angular frequency of probe, Hz; Q is the quality factor of cantilever; k is the spring constant of probe cantilever, N/m; a_{bm} is oscillation amplitude of piezoelement, on which cantilever is fixed, nm; ω is an operating angular frequency of probe, Hz; F_{ts} is an interaction force between probe and sample surface, nN; F_{LJ} is a non-contact interaction force, nN; F_{JKR} is a contact interaction force according to the Johnson–Kendall–Roberts model, nN; z_{F_0} is a distance, at which contact and non-contact interaction forces are balanced, nm; H is the Hamaker constant, aJ; R is a radius of probe tip curvature, nm; σ is an interatomic distance, nm; P_c is the maximum force of adhesion, nN; $\Delta\gamma$ is a specific surface energy of sample, J/m²; k_s is the reduced modulus of elasticity of sample and tip materials, GPa; ν_1, ν_2 are the Poisson's ratios of tip and sample materials, respectively; E_1, E_2 are the Young moduli of tip sample materials, respectively, GPa; aJ = 10⁻¹⁸ J – attojoule.

Since the distance z_{pos} between probe cantilever fixing point and sample is changed during AFM scanning of sample surface, the simulation was performed for z_{pos} from zero to values close to values of free oscillation amplitude of probe A_0 . A height of probe tip was neglected.

Based on the simulation results, the graphs were constructed for dependences of amplitude, phase shift of probe oscillations, and for deformation depth of sample material on the distance between probe and sample.

In order to study influence of probe parameters and piezogenerator oscillation amplitude, the characteristics of sample were assumed to be constant: the Young modulus was equal to 0.1 GPa; the Hamaker constant, responsible for surface energy, was equal to 0.2 aJ. Then, two of the studied parameters were fixed in turn and the third was varied. When varying spring constant of probe cantilever (from 0.01 to 100 N/m), its quality factor Q was assumed to be equal to 100, the oscillation amplitude of piezoelement $a_{\text{bm}} = 0.5$ nm. During changing the quality factor of the probe (from 80 to 400), its spring constant $k = 0.5$ N/m, $a_{\text{bm}} = 0.5$ nm. When studying influence of piezoelement oscillation amplitude (from 0.1 to 2 nm), $k = 0.5$ N/m, $Q = 100$. The radius of probe tip curvature was taken to be equal to 10 nm. The Young modulus of probe tip was equal to 179 GPa and corresponds to silicon. Deformation depth of sample surface by probe tip was $d = z - z_{F_0}$ [nm]. For each curve, 40 points were calculated.

Results and discussion. Cantilevers with the spring constant of 5–100 N/m are suitable for scanning a sample with the specified characteristics, since the corresponding curves of probe oscillation amplitude do not have abrupt changes (Fig. 1, *a*), and the phase shift curves are located in the region of negative values (Fig. 1, *b*), which indicates the predominance of the elastic mode of interaction between probe and sample [8] and is confirmed by the positive values of the probe-sample interaction force (Fig. 1, *d*). A disadvantage of the probe spring constant of 20–100 N/m is rather high values of the sample deformation depth (Fig. 1, *c*). At such values of the cantilever spring constant, its oscillations do not damp at zero distance to sample surface. The probe continues to oscillate, penetrating into sample surface by 15–32 nm. The greater sample deformation depth during scanning causes the higher errors in height of sample relief on AFM images. In this sense, the probe spring constant of 5 N/m can be called “ideal” (for samples with a sufficiently developed relief), since the maximum sample deformation depth does not exceed 8 nm.

At $k = 0.5$ N/m, a jump-like switching between the mode of prevalence of probe-sample elastic repulsive forces and the mode of prevalence of attractive interaction between them is observed (Fig. 1). The mode of prevalence of elastic forces corresponds to a higher located branch of the probe oscillation amplitude, a negative phase shift, positive values of the sample deformation depth and the probe-sample interaction force at the bottom point of the probe oscillation cycle. Accordingly, attractive interactions are indicated by a lower branch of the probe oscillation amplitude, a positive phase shift, a negative (although small in values) interaction force and zero sample deformation depth. Scanning sample in the regime of prevalence of attractive interactions actually means the implementation of the non-contact AFM mode.

A further decrease of the probe spring constant ($k = 0.1$ N/m) shows that the non-contact attractive mode is realized for this sample for almost all values of the distance z_{pos} . At $z_{\text{pos}} < 10$ nm, the probe stops

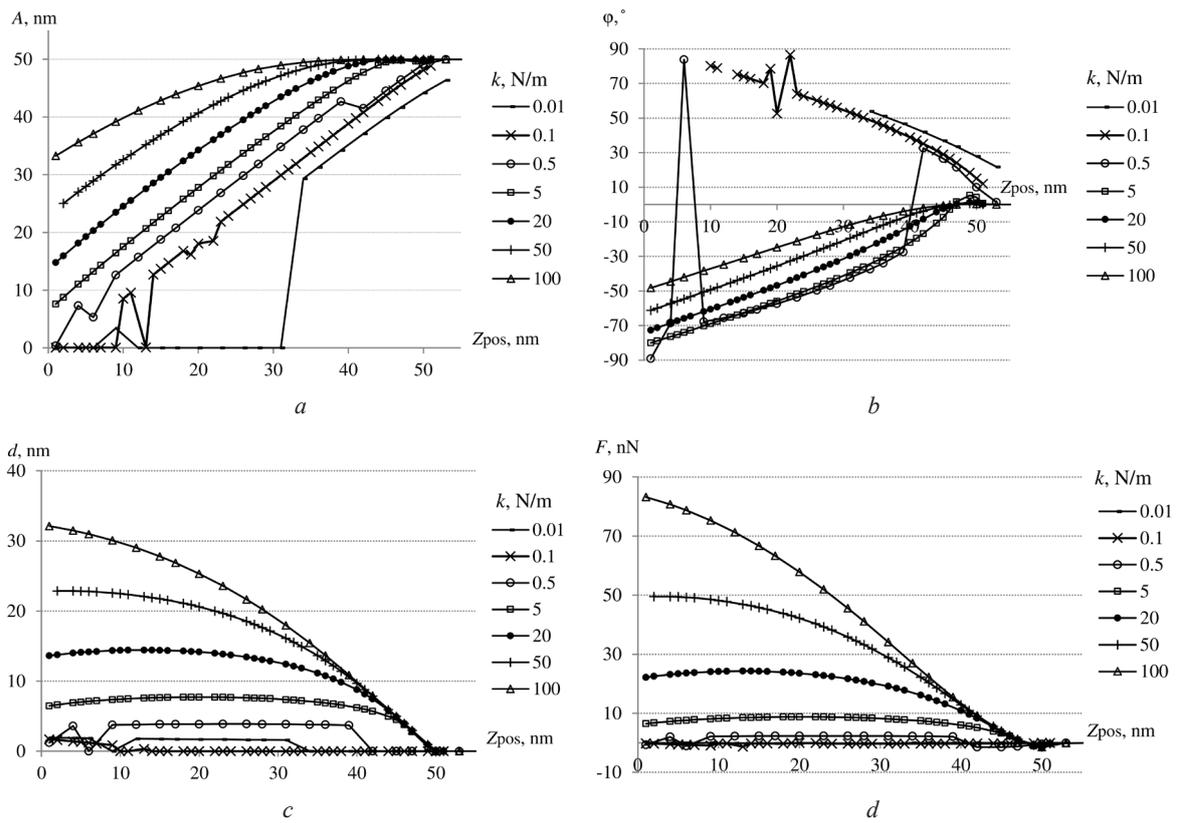


Fig. 1. Dependences of the oscillation characteristics of probes with different spring constants on distance between probe and sample: amplitude A (a); phase shift φ (b); sample deformation depth (c); interaction force F of probe and sample at the bottom point of a probe oscillation cycle (d). $Q = 100$, $a_{bm} = 0.5$ nm

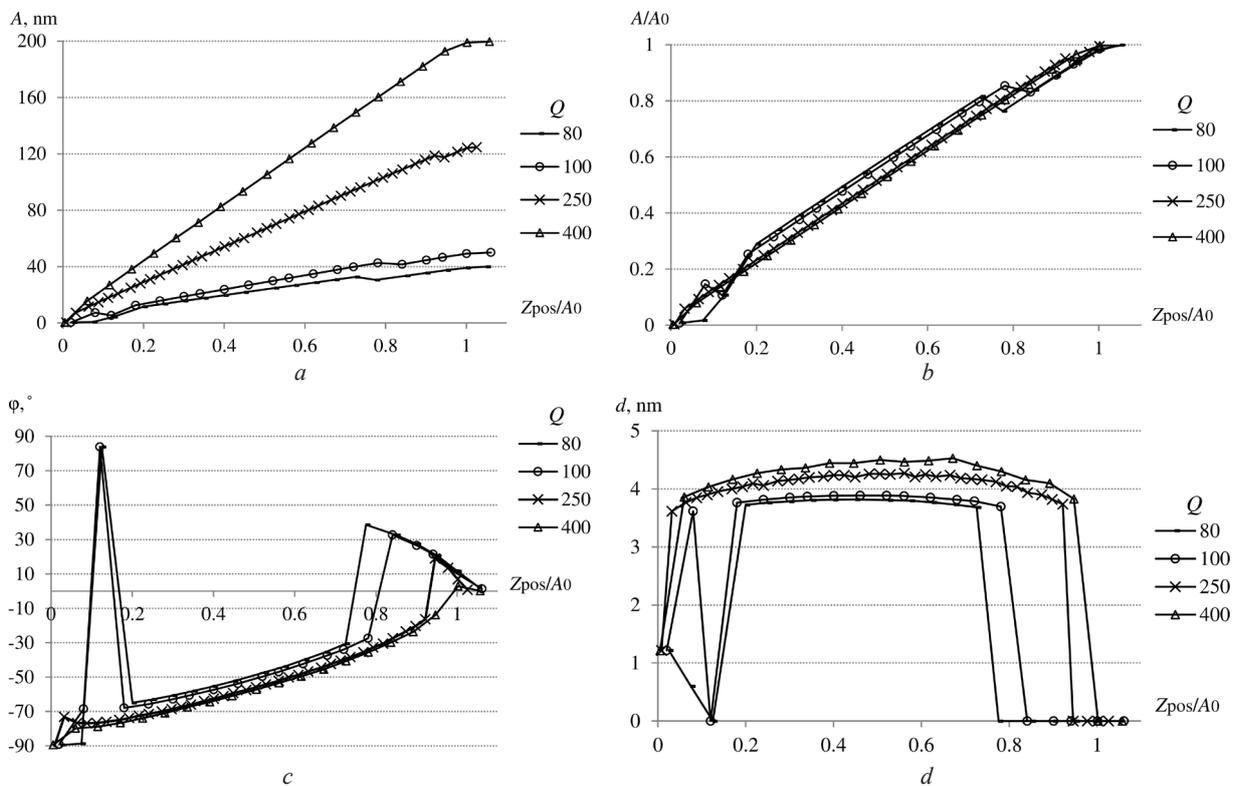


Fig. 2. Dependences of oscillation characteristics of probes with different quality factors on the normalized distance between probe and sample: (a) amplitude; relative amplitude (b); phase shift (c); sample deformation depth (d). $k = 0.5$ N/m, $a_{bm} = 0.5$ nm

oscillating (Fig. 1, *a*), and the sample deformation depth becomes, although small, non-zero ($d = 1.5$ nm). This indicates that probe adheres to sample surface, i. e., the surface adhesion of sample becomes critically significant at the probe spring constant of 0.1 N/m.

At $k = 0.01$ N/m, the sample adhesion effect increases, the probe adheres to it already at $z_{\text{pos}} = 32$ nm, and the probe tip remains immersed in the sample by 2 nm.

Varying the probe quality factor shows similar results with respect to switching the interaction modes of the probe and sample: switching from the mode of predominance of elastic forces to the mode of attraction predominance is realized faster, when the probe quality factor is lower (Fig. 2). However, unlike the probe spring constant, its quality factor has an insignificant effect on the sample deformation depth: less than 1 nm for this sample under changing of Q in a fairly wide range, from 80 to 400 (Fig. 2, *d*). Therefore, to achieve the best scanning results, higher values of the probe quality factor are preferable.

The probe behavior under varying the oscillation amplitude of the piezogenerator is generally similar to the behavior when the probe spring constant is changed: when the a_{bm} values decrease, abrupt switches from the mode of predominance of elastic forces to the mode of predominance of attractive interactions of the probe and the sample are observed; a decrease in the a_{bm} values to 0.3 nm and below leads to the non-contact mode of probe oscillations, which are damped at a small distance to the sample (Fig. 3). The sample deformation depth increases with increase of the oscillations amplitude of the piezogenerator, but not as significantly as with increase of the probe spring constant (Fig. 1, *c* and 3, *d*).

To obtain high-quality AFM images of the sample with the Young modulus of 0.1 GPa and the Hamaker constant of 0.2 aJ, the following parameter combinations are “ideal”: $k = 5$ N/m, $Q = 100$, $a_{\text{bm}} = 0.5$ nm (Fig. 1); $Q = 400$, $k = 0.5$ N/m, $a_{\text{bm}} = 0.5$ nm (Fig. 2), $a_{\text{bm}} = 2$ nm, $k = 0.5$ N/m, $Q = 100$ (Fig. 3). For material samples with other characteristics, modes suitable for scanning may occur under other conditions.

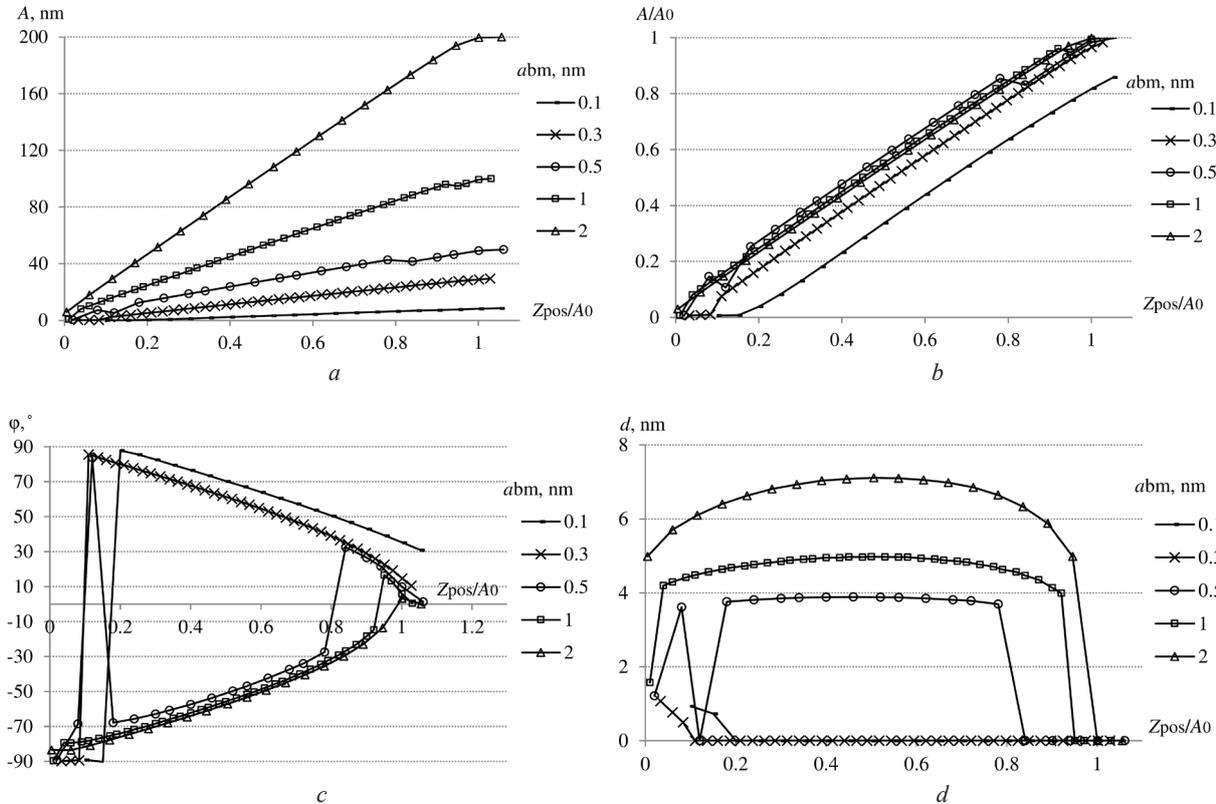


Fig. 3. Dependences of oscillation characteristics of probe on the normalized distance between probe and sample under varying oscillation amplitude of piezoelement: amplitude of probe oscillations (*a*); relative amplitude of probe oscillations (*b*); phase shift (*c*); sample deformation depth (*d*). $k = 0.5$ N/m, $Q = 100$

Conclusion. The efficiency of the model for defining the conditions for switching between the modes of predominantly attractive or repulsive interactions between probe and sample is demonstrated using one material as an example. It was found that the following parameter combinations are “ideal” in order to obtain high-quality AFM images of the sample with the Young modulus of 0.1 GPa and the Hamaker constant of 0.2 aJ. For the quality factor $Q = 100$ and the piezoelectric oscillation amplitude $a_{\text{bm}} = 0.5$ nm, the most suitable probe spring constant is $k = 5$ N/m; decreasing the spring constant to values of 0.5 or less leads to abrupt changes in the probe oscillation characteristics. For the probe spring constant $k = 0.5$ N/m, $a_{\text{bm}} = 0.5$ nm, the best quality factor is $Q = 400$, and decreasing the quality factor to 250 or less leads to switching between the modes of attraction and repulsion of probe and sample. For the probe with characteristics $k = 0.5$ N/m, $Q = 100$, the “ideal” amplitude is $a_{\text{bm}} = 2$ nm; its reduction to 1 nm or less shows abrupt changes in the curves.

Acknowledgments. The work is performed within the framework of the project 3.03.3 of the State program of scientific research “Convergence–2025” for 2021–2025.

Благодарности. Работа выполнена в рамках задания 3.03.3 ГПНИ «Конвергенция–2025» на 2021–2025 гг.

References

1. *Probes by “NT-MDT”*. Available at: <https://ntmdt-russia.com/products/probes/> (accessed 5 September 2024) (in Russian).
2. AFM probes and accessories. *Tipsnano*. Available at: <https://tipsnano.com/> (accessed 5 September 2024).
3. AFM Probes, Tips and Cantilevers. *Bruker*. Available at: <https://www.brukerafmprobes.com/> (accessed 5 September 2024).
4. AFM tips catalog. *OPUS*. Available at: <https://www.opustips.com/afm-tips-catalog> (accessed 5 September 2024).
5. *TED PELLA, Inc. Microscopy products for science and industry*. Available at: https://www.tedpella.com/probes_html/budgetsensors.aspx (accessed 5 September 2024).
6. *AFM tips catalog*. Available at: <https://www.nanosensors.com/afm-tips-catalog> (accessed 5 September 2024).
7. García R., Pérez P. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*, 2002, vol. 47, no. 6–8, pp. 197–301. [https://doi.org/10.1016/s0167-5729\(02\)00077-8](https://doi.org/10.1016/s0167-5729(02)00077-8)
8. Abetkovskaia S. O., Laktushina T. V., Chizhik S. A. Optimization of probes operating parameters in dynamic semi-contact atomic force microscopy. *Teplo- i massoperenos – 2013: sbornik nauchnykh trudov* [Heat and mass transfer – 2013: scientific papers]. Minsk, 2013, pp. 250–264 (in Russian).
9. Abetkovskaia S. O., Chizhik S. A. Dynamic force spectroscopy of “soft” materials. *Teplo- i massoperenos – 2007: sbornik nauchnykh trudov* [Heat and mass transfer – 2007: scientific papers]. Minsk, 2007, pp. 323–330 (in Russian).
10. Johnson K. *Mechanics of contact interaction: translation from English*. Moscow, 1989. 510 p. (in Russian).

Information about the authors

Abetkovskaia Sviatlana O. – Researcher. A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (15, P. Brovka Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: abetkovskaia@mail.ru.

Chizhik Sergei A. – Academician, D. Sc. (Engineering), Professor, Head of the Department. A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus (15, P. Brovka Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chizhik_sa@tut.by.

Информация об авторах

Абетковская Светлана Олеговна – научный сотрудник. Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси (ул. П. Бровки, 15, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: abetkovskaia@mail.ru.

Чижик Сергей Антонович – академик, д-р техн. наук, профессор, заведующий отделением. Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси (ул. П. Бровки, 15, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chizhik_sa@tut.by.

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

АГРАРНЫЕ НАУКИ
AGRARIAN SCIENCES

УДК 633.853.494«324»:631.527.56
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-519-528>

Поступило в редакцию 16.09.2024
Received 16.09.2024

Я. Э. Пилюк, Е. Н. Кулинкович, Н. Н. Бобко, А. А. Новичек

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию,
Жодино, Республика Беларусь*

**КОМПЛЕКСНАЯ ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЕЛЕКЦИОННЫХ ФОРМ
И ЛИНИЙ ОЗИМОГО РАПСА, СОДЕРЖАЩИХ ФАКТОРЫ
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТИ**

(Представлено членом-корреспондентом Э. П. Урбаном)

Аннотация. Представлены результаты изучения цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) рапса озимого (*Brassica napus ibernalis* L.). С использованием гистологических, морфобиологических и биохимических методов выделено 12 линий закрепителей стерильности для ЦМС типа Ogura; а также 2 линии для ЦМС Ogura и 1 для ЦМС Polima со 100 %-ной восстанавливающей способностью. Проведена оценка комбинационной способности более 20 материнских родительских ЦМС линий и получено свыше 500 экспериментальных простых стерильных и восстановленных гибридов на основе ЦМС типа Ogura. С использованием культуры *in vitro* получены удвоенные гаплоиды родительских линий рапса озимого, установлены особенности протекания процессов эмбриогенеза, морфогенеза и ризогенеза.

Ключевые слова: рапс озимый, селекция, гетерозис, ЦМС Ogura и Polima, культура *in vitro*, эмбриод, каллус, регенерант, дигаплоид

Для цитирования. Комплексная фенотипическая оценка селекционных форм и линий озимого рапса, содержащих факторы цитоплазматической мужской стерильности / Я. Э. Пилюк [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2024. – Т. 68, № 6. – С. 519–528. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-519-528>

Ya. E. Piliuk, E. N. Kulinkovich, N. N. Bobko, A. A. Novichuk

*Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming,
Zhodino, Republic of Belarus*

**COMPLEX PHENOTYPIC EVALUATION OF WINTER RAPE BREEDING FORMS
AND LINES CONTAINING FACTORS OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY**

(Communicated by Corresponding Member Eroma P. Urban)

Abstract. The paper presents the results of studying cytoplasmic male sterility (CMS) of winter rape (*Brassica napus ibernalis* L.). Using histological, morphobiological, and biochemical methods, 12 sterility fixer lines for Ogura-type CMS as well as 2 lines for Ogura CMS and 1 line for Polima CMS with 100 % restoring ability were isolated. The combining ability of more than 20 maternal parental CMS lines was evaluated and more than 500 experimental simple sterile and restored hybrids based on Ogura CMS were obtained. Using *in vitro* culture, doubled haploids of parental lines of winter rape were obtained, and the peculiarities of embryoidogenesis, morphogenesis and rhizogenesis were established.

Keywords: winter rape, breeding, heterosis, CMS Ogura and Polima, *in vitro* culture, embryoid, callus, regenerate, dihaploid

For citation. Pilyuk Ya. E., Kulinkovich E. N., Bobko N. N., Novichuk A. A. Complex phenotypic evaluation of winter rape breeding forms and lines containing factors of cytoplasmic male sterility. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2024, vol. 68, no. 6, pp. 519–528 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2024-68-6-519-528>

Введение. Рапс – уникальная масличная культура, имеющая широкие возможности применения как на пищевые и кормовые, так и на технические цели. В Республике Беларусь эта культура имеет наибольшую урожайность среди других масличных культур, что связано также и с использованием эффекта гетерозиса, который является важным резервом увеличения производства маслосемян и весьма перспективным направлением в селекции гибридов рапса на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) [1–3]. У рапса изучено несколько типов ЦМС, кото-

рые найдены внутри вида или получены на основе отдаленных скрещиваний. Наибольшее практическое применение у этой культуры нашли два типа стерильности – Ogura, полученный в результате межвидовой гибридизации, и Polima, выделенный из сорта польского происхождения [4; 5].

Механизм, ответственный за стерильность ЦМС Ogura, обусловлен дегенерацией микроспор и тапетума, что согласуется с данными [6], где доказано, что фаза образования тетрад и следующая за ней фаза являются критическим моментом, в который проявляется стерильность. В [7] также установлено, что чаще всего стерильность возникает в фазу формирования тетрад и освобождения микроспор. Стерильность типа ЦМС Polima не является результатом полной блокировки образования пыльцы, а происходит из-за отсутствия или запоздалого развития мужских археспор, вызванного пороговым эффектом суммы или высоты температуры [4].

Рациональное сочетание методов классической селекции с биотехнологическими методами позволяет быстро создавать генетически стабильные гомозиготные линии. Перевод на гомозиготный уровень новой гибридной формы требует в полевых условиях 4–6 лет, в то же время использование методов экспериментальной гаплоидии позволяет выполнить эту операцию в течение одного семенного поколения, т. е. за 1–2 года [8; 9].

Исследования по изучению цитоплазматической мужской стерильности и созданию гибридов F_1 озимого и ярового рапса на ее основе проводятся в РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» соответственно с 1988 и 1995 гг. в основном с использованием систем Ogura ЦМС (ogu) и Polima ЦМС (pol), а с 2009 г. в гетерозисной селекции рапса используется еще и система CMSC 301, представленная фирмой Dieckmann Seeds (Германия). Селекция коммерческих гибридов F_1 рапса проводится преимущественно на основе стерильной и фертильной систем ЦМС Ogura. На стерильной основе системы ЦМС Ogura районирован гибрид F_1 рапса озимого Днепр и 3 гибрида рапса ярового: Алмаз, Рубин и Геракл. Гибрид F_1 ярового рапса Алмаз включен с 2014 г. в Государственный реестр селекционных достижений Российской Федерации.

Материалы и методы исследования. Исследования по изучению генетических систем озимого рапса с использованием селекционных, морфобиологических и биотехнологических методов проводились в лабораториях и фитотронно-тепличном комплексе (ФТК), а также в полевых условиях на легкосуглинистых и супесчаных почвах РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» Смолевичского района Минской области.

Объект исследования – линии и системы ЦМС озимого рапса селекции НПЦ НАН Беларуси по земледелию. Закладка и оценка полевых опытов осуществлялась по «Методике полевого опыта» [10], «Методическим указаниям по изучению мировой коллекции масличных культур» [11] и «Методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур» [12].

Для выяснения проявления стерильности проводили гистологические исследования пыльников у типов ЦМС Ogura и Polima и для сравнения – у фертильных растений. Исследование микропрепаратов и микрофотосъемку проводили с помощью светового микроскопа Optec BK5000 (Китай), оснащенного цифровой камерой. Исследование тканей проводили при увеличении микроскопа $\times 100$. Для анализа плоидности использовали временные давленные препараты точек роста и оснований молодых листочков, которые готовили по стандартным методикам [13].

Для инициации каллусогенеза и получения первичного каллуса использовали среду Келлера–Армстронга [14], включающую минеральные соли В5. Различия в составе питательных сред касались содержания гормонов роста.

При качественном анализе семян определялось содержание сырого жира (методом инфракрасной спектроскопии на приборе NIRS 5000 после калибровки по Сокслету), сырого белка (методом инфракрасной спектроскопии на приборе NIRS 5000 после калибровки по общему азоту), глюкозинолатов (с использованием палладиевого реактива в модификации ВНИИМК, 1986, ISO/CD 9167-3), жирнокислотного состава масла (методом газожидкостной хроматографии, ВНИИМК, 1986, ISO 9167-1) [15].

Статистическая обработка данных проводилась по общепринятым методикам [10] с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. Исследования по изучению источников стерильности типа Ogura и Polima и оценка их по морфобиологическим признакам в полевых и лабораторных условиях проводили в отделах масличных культур, биохимии и биотехнологии НПЦ НАН Беларуси по земледелию.

Изучение посевных качеств стерильных линий показало, что по энергии прорастания и всхожести семян линии на стерильной и фертильной цитоплазме практически не различаются. При оценке фенотипической выраженности стерильности новых образцов озимого рапса с ЦМС типа Ogura и Polima в условиях фитотронно-тепличного комплекса в фазе семядольных листочков, розетки, стеблевания различия между фертильными и стерильными растениями не наблюдались. Морфологические различия между ними проявлялись в фазе цветения. По всем изучаемым типам ЦМС выявлены характерные для стерильности изменения морфологического строения цветка.

Все элементы цветков с ЦМС были значительно меньше, чем у фертильных образцов. Диаметр цветков у ЦМС типа Polima и Ogura по сравнению с фертильными уменьшился в 1,7 и 1,5 раза, длина пыльников – в 2,2 и 2,6 раза, длина лепестков – в 1,6 и 1,5 раза и ширина – в 1,7 раза соответственно. В то же время длина пестика почти не изменилась, что свидетельствует о нормальном развитии женских генеративных органов.

Исследованиями установлено, что у первоначально стерильных растений никогда не происходит дифференциации мужских археспор во всех пыльцевых мешочках (пыльниковых камерах), чаще всего только в 1 или 2 (рис. 1, *a*). В тот период, когда пыльники фертильных растений раскрываются, в развитых пыльцевых мешочках первоначально стерильных растений дозревают зерна пыльцы, которая при благоприятных температурных условиях, главным образом в конце цветения, высыпается из растрескавшихся пыльников (рис. 1, *b*) и в тестах на жизнеспособность хорошо окрашивается в карминовый цвет. В некоторых случаях у ЦМС Polima в отдельных пыльцевых мешочках наступало очень позднее разделение мужских археспор на материнские камеры вплоть до развития микроспор, однако эти мешочки не раскрывались до конца цветения (рис. 1, *c*). Мешочки частично стерильных растений, в отличие от фертильных, образуют меньшее количество зерен пыльцы.

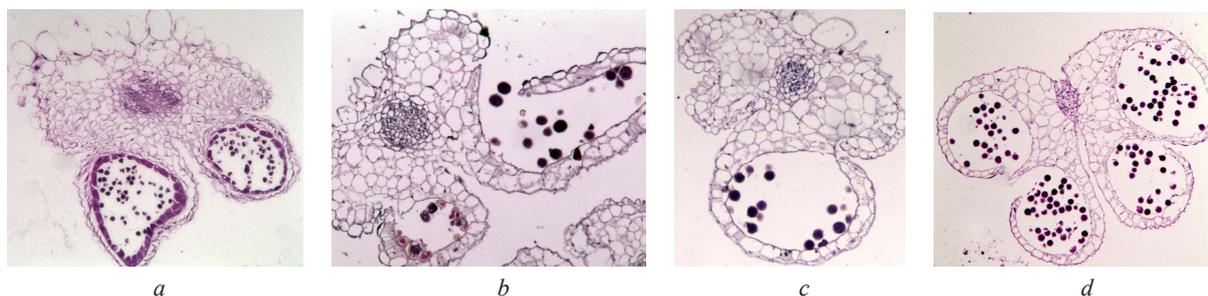


Рис. 1. Пыльники ЦМС Polima: *a* – бутон средний – 3–4 мм; *b*, *c* – только что распустившийся бутон; *d* – пыльник фертильного растения (распустившийся бутон)

Fig. 1. CMS pollinia Polima: *a* – medium bud – 3–4 mm; *b*, *c* – newly blossomed bud; *d* – fertile plant pollinium (blossomed bud)

При разрезе стерильных пыльников типа ЦМС Polima не были обнаружены дегенеративные ткани. Существует вероятность того, что при благоприятных температурных условиях может наступать дифференциация мужских археспор. Этот тип стерильности не является результатом полной блокировки образования пыльцы, а обуславливается отсутствием или запоздалым развитием мужских археспор, вызванным пороговым эффектом суммы или высоты температуры.

Пыльники стерильных растений ЦМС Ogura в разрезе под микроскопом выглядят совсем иначе, чем фертильные аналоги и стерильные растений ЦМС Polima. Ни в одной фазе развития пыльников внутри пыльцевых мешочков не было жизнеспособных зерен пыльцы. Пыльцевые мешочки наполнялись дегенерированной массой, вероятно, состоящей из дегенерированных микроспор и клеток тапетума, которые всегда отделяются, а затем также дегенерируют (рис. 2, *a*). На более поздних этапах развития пыльников дегенерированная масса постепенно исчезала, пыльцевые мешочки наполнялись воздухом, а стенки пыльников спадались (рис. 2, *b*). Таким образом, механизм, ответственный за стерильность ЦМС Ogura, обусловлен дегенерацией микроспор и тапетума.

Следовательно, по морфологическому строению цветка и гистологическим исследованиям пыльников у типов ЦМС Ogura и Polima, а также фертильных растений-аналогов можно достоверно ранжировать их между собой и проводить отбор на более ранних этапах селекционного процесса.

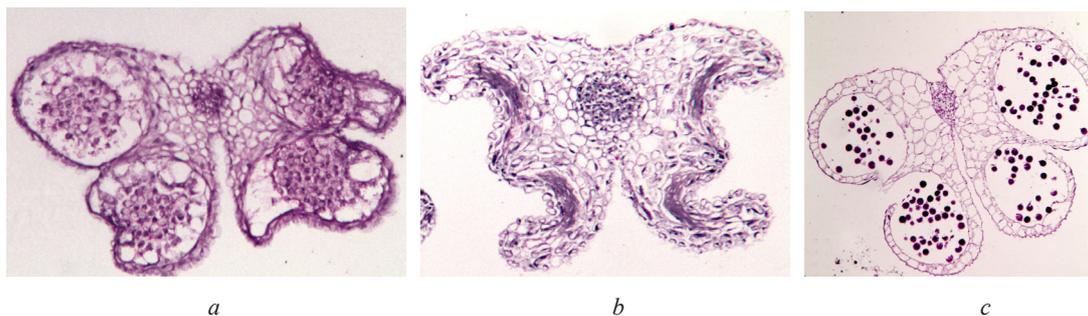


Рис. 2. Пыльники ЦМС Ogura: *a* – бутон средний – 3–4 мм; *b* – только что распустившийся бутон; *c* – пыльник фертильного растения (распустившийся бутон)

Fig. 2. CMS pollinia Ogura: *a* – medium bud – 3–4 mm; *b* – newly blossomed bud; *c* – fertile plant pollinium (blossomed bud)

Для оценки закрепляющей и восстанавливающей способности родительских линий в гетерозисной селекции постоянно проводится гибридизация линий с ЦМС типа Ogura и Polima озимого рапса, а также фенологические наблюдения и учеты.

Исследования показали, что перезимовка растений озимого рапса с ЦМС Ogura и Polima была высокой (от 87,5 до 100 %), существенно не отличалась от фертильных аналогов и изменялась от условий года.

Значительных изменений в продолжительности периодов вегетации родительских линий гибридов на стерильной и фертильной цитоплазме не установлено. У изученных линий период от всходов до цветения был практически одинаковым, за исключением стерильных растений линий А-5124/13 (ЦМС Ogura) и О-63/08 (ЦМС Polima), у которых цветение начиналось соответственно на 4 суток позднее и 5 суток раньше, чем у фертильных растений.

Высота растений рапса озимого – один из признаков, играющих важнейшую роль в устойчивости сорта или гибрида к засухе, полеганию и снижению потерь маслосемян при уборке, изменялась у родительских линий гибридов на стерильной и фертильной цитоплазме от 98,8 до 162,8 и от 131,6 до 151,4 см соответственно. Установлены небольшие положительные отличия по высоте растений между фертильными и стерильными аналогами с ЦМС Ogura (от –8 до 19,8 см), что находилось в пределах ошибки опыта и только у линий Zn-336/12 и 742-14-4 она была достоверна. У большинства изученных линий с использованием стерильной цитоплазмы ЦМС Polima наблюдалось значительное снижение высоты растений при инцухте.

При оценке продуктивности фертильных родительских линий озимого рапса в сравнении с их стерильными аналогами выявлено, что по урожайности семян они находятся в пределах ошибки опыта. Самая высокая продуктивность отмечена у мужскостерильной линии на основе ЦМС Ogura А-5124/13 (рис. 3).

Масса 1000 семян у большинства изученных линий на стерильной цитоплазме систем ЦМС Ogura и Polima варьировала от 4,26 до 6,10 г и оказалась ниже, чем у линий на фертильной цитоплазме, за исключением образца А-5124/13 (Polima), у которого масса 1000 семян существенно (на 8,0 %) была выше фертильного аналога.

При изучении влияния ЦМС Ogura и Polima на масличность семян (рис. 4) выявлено, что только у линий Zn-336/12 (Ogura) и К-42/03 (Polima) обнаружены существенные различия по этому признаку в пользу стерильных аналогов, у линий О-63/08 и Р-774 (Polima) масличность семян была существенно ниже фертильного аналога.

Установлено, что диаметр цветка у гаплоидов по сравнению с удвоенными гаплоидами уменьшился в 2,0 раза, длина пыльников – в 2,1 раза, длина и ширина лепестков – в 1,8 и 1,4 раза соответственно. При этом различия между дигаплоидами и диплоидами не были выявлены. Гомозиготные линии проанализированы по основным элементам архитектоники и структуры урожая. Высота полученных дигаплоидных линий составила 150–186 см, высота ветвления – 44–68 см, длина центральной кисти – 30–50 см, количество боковых ветвей – 7–11 шт., количество стручков на центральной кисти – 25–46 шт., на растении – 120–240 шт., семян в стручке – 15,3–22,0 шт. и масса 1000 семян – 5,40–5,80 г.

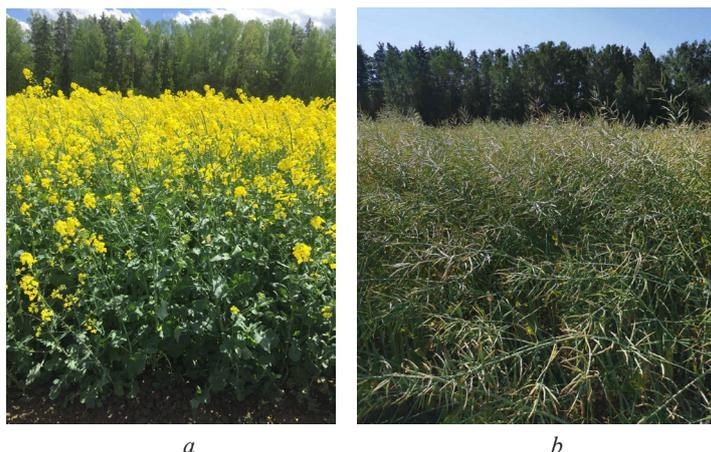


Рис. 3. Стерильная линия A-5124/13 на основе ЦМС Ogura: *a* – фаза цветения; *b* – фаза желто-зеленого стручка
 Fig. 3. Sterile line A-5124/13 based on CMS Ogura: *a* – flowering stage; *b* – yellow-green pod stage



Рис. 4. Масличность семян родительских линий озимого рапса с различным типом цитоплазмы, %
 Fig. 4. Oil content of seeds of winter rape parental lines with different types of cytoplasm, %

Оценка родительских линий озимого рапса на устойчивость к фомозу (*Phoma lingam*) путем искусственного заражения в условиях ФТК показала, что при сравнительном испытании линий на стерильной и фертильной цитоплазме не обнаружено отрицательного влияния стерильной цитоплазмы типа Ogura и Polima на устойчивость к патогену. Изученные линии обладали практически одинаковой устойчивостью к болезни, за исключением Zn-336/12 (ЦМС Ogura и Polima), у которых обнаружены существенные различия по этому признаку в пользу фертильного аналога. Практически все отечественные стерильные линии, за исключением O-63/08 (ЦМС Ogura), оказались устойчивее контроля (гибрид *ES Odis*) по этому признаку на 7,4–37,0 %. Фертильные родительские линии также показали высокую устойчивость к *Phoma lingam*, за исключением дигиплоидных гомозиготных линий № 4/1 и № 4/1-1, которые уступили контролю на 11,0–66,7 %.

Существенного различия в продолжительности периода всходы-бутонизация и бутонизация-цветение в селекции гибридов F₁ озимого рапса не выявлено, за исключением стерильного SL × Zn-336/12 и фертильного SL × 1/17-22, а также стерильных гибридов: SL × O-63/08 и SL × ЛИ-140 типа Ogura, у которых фазы «бутонизация» и «цветение» наступали соответственно на 4–5 суток позднее.

Для оценки генотипов озимого рапса по закрепляющей и восстанавливающей способности и отбора линий на основе ЦМС типа Polima и Ogura постоянно проводилась гибридизация (анализирующие, возвратные скрещивания, беккроссы) новых линий с источниками ЦМС. Практически все изучаемые образцы рапса являлись закрепителями стерильности для систем ЦМС Ogura и Polima, в оригинальном селекционном материале нами выделены линии с генами *Rf₁Rf₂*,

в различной степени восстанавливающие фертильность стерильных линий, которая изменялась в зависимости от системы ЦМС и генотипа от 45 до 100 %.

При оценке гибридов F₁ среди изучаемых образцов выделились 12 линий со 100 %-ной закрепляющей способностью для ЦМС Ogura, две линии для ЦМС типа Ogura и одна для типа Polima, имеющие 100 %-ную восстанавливающую способность.

При анализе источников закрепителей стерильности и восстановителей фертильности по биохимическим показателям качества семян установлено, что масличность семян источников закрепителей стерильности ЦМС типа Ogura и Polima находилась на уровне 41,8–49,7 %, а источников восстановителей фертильности типа Ogura и Polima – 42,8–44,0 %. Содержание глюкозинолатов у всех линий было в пределах нормы – от 13,3 мкМоль/г.

В полевых условиях также проведена оценка родительских линий на стерильной (типа Ogura и Polima) и фертильной цитоплазме на устойчивость к основным листовым болезням. У изучаемых образцов поражение болезнями при учете в фазу «конец цветения – формирование стручков», было низким, и только некоторые линии уступили контролю на 6,0–14,3 %.

По основным селекционно ценным признакам проведен анализ тестовых (восстановленных и простых стерильных) гибридов на основе ЦМС Polima и Ogura. Установлено, что у стерильных и фертильных гибридов на основе ЦМС Ogura число ветвей на растении (табл. 1) составило соответственно 7,5–10,0 и 7,0–11,8 шт., число стручков на растении 262,5–385,8 и 208,2–373,6 шт., количество семян в стручке 26,6–32,9 и 31,3–35,9 шт., масса 1000 семян 4,35–5,36 и 4,47–5,25 г, продуктивность 513–633 и 487–627 г/м². Эти же показатели у гибридов на основе ЦМС Polima варьировали следующим образом: 7,0–8,6 и 10 шт., 215,8–249,6 и 313,8 шт., 22,2–30,6 и 26,6 шт., 4,75–5,67 и 4,82 г, 487–627 и 500 г/м² соответственно. По комплексу признаков из простых стерильных гибридов на основе ЦМС Ogura и Polima выделились SL × S-d142-2-08, SL × Zn-336/12 и SL × 742-14-4 с максимальной продуктивностью 636, 627 и 627 г/м² соответственно.

Т а б л и ц а 1. Основные элементы структуры урожая (восстановленных и простых стерильных) экспериментальных гибридов F₁ на основе ЦМС Ogura и Polima

T a b l e 1. Basic elements of the yield structure (restored and simple sterile) experimental F₁ hybrids based on CMS Ogura and Polima (under field conditions)

Название образца Name of the sample	Количество, шт. Quantity, pcs.			Масса 1000 семян, г 1000-grain weight, g	Продуктивность, г/м ² Productivity, g/m ²
	ветвей I порядка	стручков на растении	семян в стручке		
<i>Стерильные на основе ЦМС Ogura</i>					
SL × O-63/08	7,5	262,5	27,3	5,36	579
SL × Zn-336/12	8,4	272,0	28,1	4,93	627
SL × S-d142-2-08	10,0	385,8	32,9	5,20	513
SL × B-648/11	8,2	296,4	27,9	5,09	574
SL × ЛИ-140	8,8	266,4	27,3	4,85	514
SL × 742-14-4	8,5	272,3	26,6	4,65	636
Среднее	8,6	292,6	28,4	5,0	574
min–max	7,5–10,0	262,5–385,8	26,6–32,9	4,35–5,36	513–636
<i>Стерильные на основе ЦМС Polima</i>					
SL × O-63/08	7,5	215,8	28,5	5,08	569
SL × Zn-336/12	8,6	217,6	24,0	5,09	627
SL × S-d142-2-08	7,6	233,8	28,7	5,27	531
SL × B-648/11	7,0	220,4	30,6	5,33	583
SL × ЛИ-140	8,0	241,2	22,2	4,75	487
SL × 742-14-4	8,2	249,6	27,7	5,67	509
Среднее	7,8	229,7	27,0	5,20	551
min–max	7,0–8,6	215,8–249,6	22,2–30,6	4,75–5,67	487–627
<i>Фертильные на основе ЦМС Ogura</i>					
SL × 1/4-22	11,8	373,6	35,9	4,47	570
SL × 1/17-22	7,0	208,2	31,3	5,25	609
Среднее	9,4	290,9	33,6	4,90	590
min–max	7,0–11,8	208,2–373,6	31,3–35,9	4,47–5,25	570–609
<i>Фертильные на основе ЦМС Polima</i>					
SL × 223/20	10	313,8	26,6	4,82	500

Масличность у простых стерильных гибридов на основе ЦМС Ogura и их родительских линий варьировала от 42,8 до 46,9 % (в среднем – 44,0 %), на основе ЦМС Polima – от 41,6 до 46,6 % (43,5 %). Лучшими фертильными гибридами по этому признаку были SL × 1/4-22 (43,6 %) и SL × 223/20 (44,0 %). Содержание глюкозинолатов у всех гибридов находилось в пределах нормы – 14,7–24,0 мкМоль/г.

В процессе исследований были изучены и отобраны родительские линии (материнские) озимого рапса на основе ЦМС Ogura, отличающиеся повышенной устойчивостью к вредителям. Повреждение растений стручковым комариком находилось в пределах 5,6–8,4 %, стеблевым скрытнохоботником от 10 %. Среди анализируемых образцов выделилась линия 9-18/23р, у которой полностью отсутствовали признаки поражения бактериозом.

При анализе основных элементов структуры урожая стерильных аналогов самоопыленных линий озимого рапса (материнских форм) на основе ЦМС Ogura и Polima по основным селекционно ценным признакам выявлено, что число ветвей на растении у стерильных линий на основе ЦМС Ogura и Polima изменялось от 5,8 до 12,0 и 5,8 – 12,6 шт., количество стручков на растении от 213,8 до 372,0 и 191,0–359,6 шт., количество семян в стручке от 21,6 до 28,8 и 20,8 – 27,2 шт., масса 1000 семян от 5,62–6,38 и 5,48–6,48 г, продуктивность от 239,0 до 434,0 и 238,0–412,0 г/м². По комплексу признаков из простых стерильных линий на основе ЦМС Ogura и Polima выделились линии А-5124/13, 742-14-4 и S-d142-2-08, А-5124/13.

В селекции рапса наряду с классическими способами успешно применяют метод культуры *in vitro*, особенно гаплоидию [14]. Для рапса характерно явление прямого эмбриогенеза, при котором образование гаплоидного растения происходит из микроспор, развивающихся в эмбриониды, а не в недифференцированный каллус [8; 14]. Частота эмбрионидогенеза у озимого рапса в культуре пыльников составляет около 1 %. Кроме того, имеются сортовые различия по данному признаку, поэтому необходимы большие объемы работ для получения достаточного количества эмбриогенных эксплантов. Известно, что холодовая предобработка незрелых бутонов при температуре +4–7 °С в течение нескольких суток синхронизирует клеточные деления и повышает выход эмбриогенных эксплантов [8]. Нашими исследованиями установлено, что холодовая предобработка донорных растений рапса озимого повышает выход эмбрионидов в 2–2,5 раза у большинства образцов (табл. 2, рис. 5, а).

У образцов, которые подвергались холодовой предобработке донорных растений, эмбриониды появились у всех номеров, включая даже генотипы с низкой эмбриогенной способностью (Х 2/20 – 0,16 % и Х 3/20 – 0,72 %). Максимальной эмбриогенной способностью обладал образец № 6/2 (31,9 %), высокой эмбриогенной способностью обладали также образцы Х 4/20 (14,2 %), Х 1/20 (9,4 %) и 2 (9,1 %). Все экспланты, полученные от растений рапса озимого без холодовой предобработки донорных растений, кроме образца Х 1/20 (2,1 %), не обладали эмбриогенной способностью.

Т а б л и ц а 2. Влияние холодовой предобработки донорных растений рапса озимого на эмбриогенную способность высаженных эксплантов

T a b l e 2. The effect of cold pretreatment of donor plants on embryogenic capacity of planted explants

Название образца Name of the sample	С холодовой предобработкой			Без холодовой предобработки		
	пыльников pollinia	эмбрионидов embryoids	эмбрионидов embryoids	пыльников pollinia	эмбрионидов embryoids	эмбрионидов embryoids
	шт.	шт.	%	шт.	шт.	%
Х 1/20	900	85	9,4	360	4	2,1
Х 2/20	630	1	0,16	–	–	–
Х 3/20	1854	14	0,75	–	–	–
№ 4/1	828	39	4,7	–	–	–
№ 6/2	522	167	31,9	252	0	0
№ 8	936	12	1,2	–	–	–
№ 2	594	54	9,1	–	–	–
№ 3/2	306	11	3,6	–	–	–
№ 13	180	4	2,2	–	–	–
Всего	7236	456	6,3	11448	52	0,45

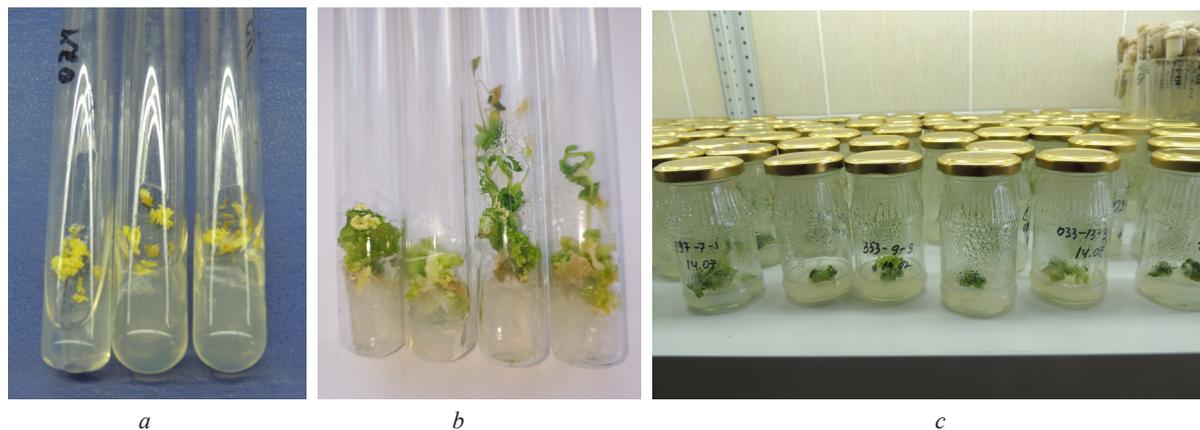


Рис. 5. Этапы получения дигаплоидов рапса в культуре *in vitro*: *a* – массовый эмбриоидогенез после холодной предобработки донорных растений; *b* – развитие эмбриоидов; *c* – микроклональное размножение озимого рапса

Fig. 5. Stages of obtaining rape dihaploids in *in vitro* culture: *a* – mass embryogenesis after cold pretreatment of donor plants; *b* – embryoids development; *c* – microclonal propagation of winter rape

На выход эмбриоидов кроме холодной предобработки большое влияние оказывает состав питательных сред. Различные концентрации 2,4-Д и НУК (1-нафтилуксусная кислота) обусловили значительные отличия в эмбриогенной способности высаженных эксплантов рапса. Количество образовавшихся эмбриоидов варьировало от 0 до 14,2 %, среднее значение данного показателя составило 3,4 %. На среде Б, с содержанием 2,4-Д – 0,5 мг/л и НУК – 0,25 мг/л эмбриогенная способность эксплантов снизилась более чем в 10 раз и среднее значение данного показателя составило 0,23 %. Таким образом, повышение концентрации гормонов роста не повлекло за собой увеличения числа образовавшихся эмбриоидов.

Анализ особенностей протекания онтогенетических процессов у полученных эмбриоидов рапса на среде для ризогенеза показал, что процессы регенерации и морфогенеза у высаженных эмбриоидов происходили с разной интенсивностью по 3 различным направлениям. У образцов Х2/20 и 1963618, № 8, характеризующихся незначительным количеством эмбриоидов, регенеранты сформировались уже при первом пассаже на ризогенной среде (табл. 3, рис. 5, *b*).

У большинства образцов рапса озимого вместо ризогенеза наблюдался процесс образования недифференцированного каллуса или на каллусных тканях, возникающих из эмбриоидов, появлялись вторичные эмбриониды, которые были вновь пересажены на ризогенную среду и из них развивались либо нормальные растения, либо каллусные ткани с эмбриоидами или без них. Таким образом, потребовалось несколько пассажей прежде, чем эмбриониды перешли в стадию ризогенеза и регенерации. В итоге вторичный или третичный эмбриоидогенез позволил образцам Х3/20, 171816418-2, 13, 171816418-1 повысить частоту возникновения регенерантов до 111–200 %. Третью группу образовывали эмбриониды, формирующие корневую систему, но с неразвитой точкой роста. Часть из них погибала, а у выживших эксплантов на стеблевой части регенеранта возникали вторичные эмбриониды, из которых удалось получить полноценные регенеранты. Всего было получено, проколхицинировано и высажено в искусственную почву Биона 213 регенерантов, из них выращено 132 хорошо сформированных растения.

Изучение каллусогенной и эмбриогенной способности источников ЦМС проводилось на 4 линиях озимого рапса, несущих гены цитоплазматической мужской стерильности, Х5/20, Х7/20, № 8, 19219. Для установления возможности микроклонального размножения стерильных форм озимого рапса незрелые пыльники данных образцов высаживались на искусственные питательные среды. Инициация каллусогенеза и получения первичного каллуса осуществлялась на среде Келлера–Армстронга.

Анализ полученных результатов показал, что у образцов Х5/20 и Х7/20 способность к эмбриоидогенезу у пыльников полностью отсутствует, № 8 и 19219 образовали незначительное количество эмбриоидов, выход которых составил 1,3 и 0,3 % соответственно. Способность к каллусогенезу выявлена у всех изученных образцов, лучшими по данному показателю были 19219 (2,6 %) и Х7/20 (1,9 %). У образца № 8 каллусогенная и эмбриогенная способность незрелых пыльников

Т а б л и ц а 3. Частота возникновения жизнеспособных регенерантов рапса озимого в зависимости от пассажа

T a b l e 3. Frequency of viable regenerants depending on passage

Название образца Name of the sample	Эмбрионов, шт. (%) Embryoids, pcs. (%)				Пригодных для колхичинирования, шт. (%) Suitable for colchicination, pcs. (%)
	Всего Total	Способных к регенерации Capable for regeneration			
		первичных primary	вторичных secondary	третичных tertiary	
X 1/20	88	4 (4,5 %)	17 (19,3 %)	6 (6,8 %)	27 (30,7 %)
X 2/20	1	1 (100 %)	–	–	–
X 3/20	14	5 (35,7 %)	1 (7,1 %)	16 (114,4 %)	22 (157,0 %)
X 4/20	69	11 (15,9 %)	8 (11,6 %)	1 (1,5 %)	20 (29,0 %)
X 8/20	13	–	1 (8,3 %)	1 (8,3 %)	2 (16,7 %)
№ 2	52	10 (19,2 %)	4 (7,7 %)	21 (40,4 %)	35 (67,3 %)
№ 3/2	11	2 (18,2 %)	1 (9,1 %)	1 (9,1 %)	4 (36,4 %)
№ 4/1	39	5 (12,8 %)	1 (2,6 %)	6 (15,4 %)	12 (30,7 %)
№ 6/2	167	25 (15,0 %)	9 (5,4 %)	4 (2,4 %)	38 (22,8 %)
№ 8	12	10 (83,3 %)	–	–	11 (91,7 %)
№ 13	4	3 (75,0 %)	1 (25,0 %)	1 (25,0 %)	5 (125,0 %)
15161019	6	2 (33,3 %)	–	–	2 (33,3 %)
19219	4	3 (75,0 %)	–	1 (25,0 %)	4 (100,0 %)
171816418-1	9	2 (22,2 %)	6 (66,7 %)	2 (22,2 %)	10 (111,1 %)
171816418-2	5	2 (40,0 %)	6 (120,0 %)	2 (40,0 %)	10 (200,0 %)
182018122	13	6 (46,2 %)	3 (23,1 %)	2 (15,4 %)	11 (84,6 %)
Всего	508	91 (17,9 %)	58 (11,4 %)	64 (12,6 %)	213 (41,9 %)

находились практически на одном уровне. Для инициации каллусогенеза и получения первичного каллуса для прямой регенерации из гипокотилей и семядолей рапса при микроклональном размножении использовали модифицированную среду МС (рис. 5, с). При микроклональном размножении применяли 5 вариантов питательных сред на разных этапах биотехнологических работ. В качестве эксплантов были взяты семядоли и гипокотильные сегменты 4–6-дневных проростков рапса. Максимальное количество клонов было получено у образца № 14/5 – 224 шт. и № 13/19 – 54 шт. По мере развития регенерантов они пересаживались на регенерационную среду для формирования полноценных растений рапса с последующей адаптацией к условиям *ex vitro*. Всего было получено 43 жизнеспособных регенеранта, которые высажены на доращивание в ФТК, а затем в полевых условиях и внедрены в селекционный процесс.

В Национальный банк семян генетических ресурсов хозяйственно полезных растений РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» передано: 5 гомозиготных линий, 12 линий с закрепляющей способностью для ЦМС типа Ogura, 5 стерильных аналогов самоопыленных линий.

Заключение. В работе представлены результаты изучения цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) рапса озимого (*Brassica napus ibernalis* L.) с использованием гистологических, морфобиологических и биохимических методов. Созданы при помощи культуры *in vitro* и оценены по комплексу хозяйственно полезных признаков и свойств новые формы и линии рапса для получения высокопродуктивных гетерозисных гибридов с улучшенными характеристиками. Выделено 12 линий закрепителей стерильности для ЦМС типа Ogura; а также 2 линии для ЦМС Ogura и 1 для ЦМС Polima со 100 %-ной восстанавливающей способностью. В Национальный банк семян генетических ресурсов хозяйственно полезных растений РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию» передано: 5 гомозиготных линий, 12 линий закрепителей стерильности для ЦМС типа Ogura, 5 стерильных аналогов самоопыленных линий. Проведена оценка комбинационной способности более 20 материнских родительских линий и получено свыше 500 экспериментальных простых стерильных и восстановленных гибридов на основе ЦМС типа Ogura.

Список использованных источников

1. Пилюк, Я. Э. Научные основы селекции и технологии возделывания рапса (*Brassica napus oleifera* Metzg.) в Беларуси / Я. Э. Пилюк. – Минск, 2021. – 80 с.
2. Fu, T. D. Discovery, study and utilisation of polima CMS in *Brassica napus* / T. D. Fu // Progr. Natl. Scien. – 1995. – N 5. – P. 169–177.

3. Горлов, С. Л. Селекция озимого рапса (*Brassica napus*) на гетерозис / С. Л. Горлов. – Краснодар, 1995. – 70 с.
4. Prakash, S. Cytoplasmic male sterility (CMS) systems either than ogu and polima in Brassica: current status / S. Prakash, P. B. Kirti, V. L. Chopra // 9th International Rapeseed Congress. Cambridge, UK. – 1995. – Vol. 1. – P. 44–48.
5. Popławska, W. Genetic and breeding evaluation of doubled haploid lines with restorer gene for CMS ogura system of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) / W. Popławska, I. Bartkowiak-Broda, L. Szała // Brassica. – 2007. – Vol. 9, N 1–4. – P. 29–32.
6. Laser, K. D. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms / K. D. Laser, N. R. Lersten // Bot. Rev. – 1972. – Vol. 38. – P. 425–454. <https://doi.org/10.1007/bf02860010>
7. Kaul, M. L. H. Sterility in higher plants (Monographs on theoretical and applied genetics) / M. L. H. Kaul. – Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1988. – 1005 p.
8. Котлярова, Е. Б. Аспекты применения методов биотехнологии в селекции ярового рапса (*Brassica napus* L.) / Е. Б. Котлярова. – Липецк, 2007. – 22 с.
9. Mishra, R. *In vitro* androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects / R. Mishra, G. J. N. Rao // Rice Sci. – 2016. – Vol. 23, N 2. – P. 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.02.001>
10. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта / Б. А. Доспехов. – М., 1985. – 351 с.
11. Методические указания по изучению мировой коллекции масличных культур / ВИР. – СПб., 1976. – 23 с.
12. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур / под ред. М. А. Федина. – М., 1988. – 121 с.
13. Паушева, З. П. Практикум по цитологии растений / З. П. Паушева. – М., 1980. – 301 с.
14. Keller, W. A. High frequency of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures / W. A. Keller, K. C. Armstrong // Z. Pflanzen-zuchtg. – 1978. – Vol. 80. – P. 100–108.
15. Марченко, Л. Н. Качество масла и пути его улучшения в процессе селекции масличных крестоцветных / Л. Н. Марченко // Селекция и семеноводство масличных культур: сб. науч. работ / ВНИИМК. – Краснодар, 1980. – С. 107–114.

References

1. Piliuk Ya. E. *Scientific bases of breeding and technologies of rape cultivation (Brassica napus oleifera Metzg.) in Belarus*. Minsk, 2021. 80 p. (in Russian).
2. Fu T. D. Discovery, study and utilisation of polima CMS in Brassica napus. *Progr. Natl. Scien*, 1995, no. 5, pp. 169–177.
3. Gorlov S. L. *Winter rape (Brassica napus) breeding for heterosis*. Krasnodar, 1995. 70 p. (in Russian).
4. Prakash S., Kirti P. B., Chopra V. L. Cytoplasmic male sterility (CMS) systems either than ogu and polima in Brassica: current status. *9th International Rapeseed Congress*. Cambridge, UK, 1995, vol. 1, pp. 44–48.
5. Popławska W., Bartkowiak-Broda I., Szała L. Genetic and breeding evaluation of doubled haploid lines with restorer gene for CMS ogura system of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Brassica*, 2007, vol. 9, no. 1–4, pp. 29–32.
6. Laser K. D., Lersten N. R. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Botanical Review*, 1972, vol. 38, pp. 425–454. <https://doi.org/10.1007/bf02860010>
7. Kaul M. L. H. *Sterility in higher plants (Monographs on theoretical and applied genetics)*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1988. 1005 p.
8. Kotlyarova E. B. *Aspects of application of biotechnology methods in spring rape breeding (Brassica napus L.)*. Lipetsk, 2007. 22 p. (in Russian).
9. Mishra R., Rao G. J. N. *In vitro* androgenesis in rice: advantages, constraints and future prospects. *Rice Science*, 2016, vol. 23, no. 2, pp. 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2016.02.001>
10. Dospikhov B. A. *Field experiment methodology*. Moscow, 1985. 351 p. (in Russian).
11. *Guidelines for the study of the world collection of oil crops*. Saint Petersburg, 1976. 23 p. (in Russian).
12. Fedin M. A., ed. *Methodology of state variety testing of crops*. Moscow, 1988. 121 p. (in Russian).
13. Pausheva Z. P. *Practical training in plant cytology*. Moscow, 1980. 301 p. (in Russian).
14. Keller W. A., Armstrong K. C. High frequency of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z. Pflanzen-zuchtg*, 1978, vol. 80, pp. 100–108.
15. Marchenko L. N. Oil quality and ways to improve it in the process of oil cruciferous breeding. *Seleksiya i semenovodstvo maslichnykh kul'tur: sbornik nauchnykh rabot* [Plant breeding and seed production of oil crops: collection of research works]. Krasnodar, 1980, pp. 107–114 (in Russian).

Информация об авторах

Пилиук Ядвига Эдвардовна – д-р с.-х. наук, профессор, заведующая отделом. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: iveya@list.ru.

Кулинкович Елена Николаевна – канд. с.-х. наук, вед. науч. сотрудник. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: enkulinkovich@mail.ru.

Бобко Наталья Николаевна – науч. сотрудник. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: bobko201@mail.ru.

Новичек Анна Александровна – науч. сотрудник. НПЦ НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Республика Беларусь). E-mail: bart_an@mail.ru.

Information about the authors

Piliuk Yadviga E. – D. Sc. (Agrarian), Professor, Head of the Department. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: iveya@list.ru.

Kulinkovich Elena N. – Ph. D. (Agrarian), Leading Researcher. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: enkulinkovich@mail.ru.

Bobko Natalia N. – Researcher. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: bobko201@mail.ru.

Novichек Anna A. – Researcher. Research and Practical Center of the National Academy of Sciences for Arable Farming (1, Timiryazev Str., 222160, Zhodino, Republic of Belarus). E-mail: bart_an@mail.ru.