

ВЕСЦІ НАЦЫЯНАЛЬнай АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК. 2021. Т. 66, № 3

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК. 2021. Т. 66, № 3

Журнал основан в 1956 г. как «Весці Акадэміі навук БССР. Серыя біялагічных навук»,
с 1992 г. – «Весці Акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук»,
с 1998 г. – современное название

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь,
свидетельство о регистрации № 395 от 18 мая 2009 г.

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

Главный редактор

Владимир Иванович Торчик – Отделение биологических наук Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

Редакционная коллегия

М. Е. Никифоров (*заместитель главного редактора*) – Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по биоресурсам, Минск, Республика Беларусь

В. И. Парфенов (*заместитель главного редактора*) – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

В. Г. Колосовская – *ведущий редактор журнала*

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

А. Н. Евтушенко – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

А. В. Кильчевский – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Э. И. Коломиец – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Н. А. Ламан – Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
А. Г. Лобанок – Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
В. Е. Падутов – Институт леса Национальной академии наук Беларуси, Гомель, Республика Беларусь
В. Н. Решетников – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
В. В. Титок – Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
Л. В. Хотылева – Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь
В. М. Шкуматов – Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Редакционный совет

В. Ф. Багинский – Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь
А. Баршевский – Даугавпилский университет, Даугавпилс, Латвийская Республика
Я. Б. Блюм – Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина
В. Е. Гайдук – Брестский государственный университет им. А. С. Пушкина, Брест, Республика Беларусь
Ю. Ю. Дгебуадзе – Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
Н. А. Колчанов – Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация
В. В. Кузнецов – Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Российская Федерация
В. Олех-Пяэцка – Варшавский университет естественных наук, Варшава, Республика Польша
О. Н. Пугачев – Зоологический институт Российской академии наук, Санкт-Петербург, Российская Федерация
А. И. Рапопорт – Институт микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, Рига, Латвийская Республика
И. А. Тихонович – Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург, Российская Федерация
В. В. Швартау – Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

Адрес редакции:

*ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Сайт: vestibio.belnauka.by*

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.

Серия биологических наук. 2021. Т. 66, № 3.

Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *В. Г. Колосовская*
Компьютерная верстка *Ю. А. Агейчик*

Подписано в печать 05.07.2021. Выход в свет 29.07.2021. Формат 60×84^{1/8}. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 74 экз. Заказ 156.
Цена номера: индивидуальная подписка – 12,51 руб., ведомственная подписка – 29,60 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука».
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2021

PROCEEDINGS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES. 2021, vol. 66, no. 3

The Journal was founded in 1956 under the title
“Proceedings of the Academy of Sciences of BSSR. Biological series”,
since 1992 – “Proceedings of the Academy of Sciences of Belarus. Biological series”,
since 1998 it comes under its actual title

Issued four times a year

Founder is the 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. 395

*The Journal is included in the List of Journals 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 I. Torchik – Department of Biological Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus

Editorial Board

Mikhail E. Nikiforov (*Associate Editor-in-Chief*) – Scientific and Practical Center of the National Academy
of Sciences of Belarus for Bioresources, Minsk, Republic of Belarus

Viktor I. Parfyonov (*Associate Editor-in-Chief*) – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the
National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Valentina G. Kolosovskaya – *Managing Editor*

Anatoli N. Evtushenkov – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

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

Alexander V. Kilchevsky – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic
of Belarus

Emiliya I. Kolomiets – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus

Nikolai A. Laman – V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences
of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Anatoli G. Lobanok – Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk,
Republic of Belarus

Vladimir E. Padutov – Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus
Vladimir N. Reshetnikov – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir M. Shkumatov – Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus
Vladimir V. Titok – Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
Igor D. Volotovskii – Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

E d i t o r i a l C o u n c i l

Vladimir F. Baginski – F. Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus
Arvids Barsevskis – Daugavpils University, Daugavpils, Republic of Lithuania
Yaroslav B. Blume – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Yuri Yu. Dgebuadze – A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Vasiliy E. Gayduk – A. S. Pushkin Brest State University, Brest, Republic of Belarus
Nikolay A. Kolchanov – Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
Vladimir V. Kuznetsov – K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
Wanda Olech-Piasecka – Warsaw University of Life Sciences, Warsaw, Republic of Poland
Oleg N. Pugachev – Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation
Alexander I. Rapoport – Institute of Microbiology and Biotechnology of University of Latvia, Riga, Latvian Republic
Victor V. Schwartau – Institute of Plant Physiology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine
Igor A. Tikhonovich – All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russian Federation

Address of the Editorial Office:

*1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Phone: + 375 17 272-19-19; e-mail: biolvesti@mail.ru
Website: vestibio.belnauka.by*

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.

Biological series, 2021, vol. 66, no. 3.

Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *V. G. Kolosovskaya*
Computer imposition *Yu. A. Aheichyk*

Sent for press 05.07.2021. Output 29.07.2021. Format 60×84¹/₈. Offset paper.
Digital press. Printed sheets 14,88. Publisher's signatures 16,4. Circulation 74 copies. Order 156.
Number price: individual subscription – 12,51 byn., departmental subscription – 29,60 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.
Address: F. Skorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

ЗМЕСТ

Адамцевич Н. Ю., Феськова Е. В., Титок В. В., Болтовский В. С. Динамика накопления флавоноидов, макро- и микроэлементов в листьях воробейника лекарственного (<i>Lithospermum officinale</i> L.) в различные фенологические фазы	263
Казловский И. С., Зинченко А. И. Биосинтез аденозиндезаминазы <i>Escherichia coli</i> в системе бесклеточного синтеза белка.	271
Кем К. Р., Ламан Н. А. Влияние эпибрассинолида на содержание флавоноидов в проростках растений в условиях стресса, вызванного N-фосфонометилглицином	277
Кабашникова Л. Ф., Доманская И. Н., Пилипович Т. С., Пашкевич Л. В., Мартысюк А. В., Мотылева С. М., Гинс М. С., Тетяников Н. В. Содержание фотосинтетических пигментов и параметры окислительного стресса в листьях амаранта при нарастающем водном дефиците	282
Зубрицкая Г. П., Слобожанина Е. И. Литий-индуцированная модификация физико-химического состояния мембранных белков и липидов в эритроцитах человека	295
Павловский Н. Б. Оценка сохраняемости плодов голубики разных таксонов	302
Гетко Н. В., Атесленко Е. В., Кулян Р. В., Субоч В. П., Титок В. В. Ароматические соединения, выделяемые растениями рода <i>Citrus</i> L. в условиях оранжерей.	312
Дворник А. А., Дворник А. М., Куриленко Р. С., Бардюкова А. В., Сеглин В. Н., Шамаль Н. В., Король Р. А. Картирование пожарной опасности лесов в зависимости от погодных условий с использованием геоинформационных технологий (на англ. яз.)	320
Карасева Е. Н. Накопление фотосинтетических пигментов и показатели флуоресценции хлорофилла в листьях <i>Dioscorea alata</i> L. при вегетативном размножении растений на ионообменных субстратах	333
Базылева Н. А., Гулис Н. Л., Бейня В. А., Цеханович С. В. Морфобиологические особенности белорусских сортов хризантемы корейской (<i>Chrysanthemum coreanum</i>)	339

АГЛЯДЫ

Тишук О. И., Полешко А. Г., Вологовский И. Д. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Получение, свойства и перспективы применения в биологии и медицине.	345
Зинченко А. И., Биричевская Л. Л., Казловский И. С., Булатовский А. Б. Возможный ответ молекулярной биотехнологии на вызов SARS-CoV-2.	357
Позняк Т. А., Гончаров А. Е., Абашкин В. М., Становая А. И., Прохоров А. В., Щербин Д. Г. Циркулирующие опухолевые клетки и циркулирующие раковые стволовые клетки и их детекция методом проточной цитофлуориметрии	370

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

CONTENTS

Adamtsevich N. Yu., Feskova A. V., Titok V. V., Boltovskiy V. S. Dynamics of the accumulation of flavonoids, macro- and microelements in the leaves of the littlewale (<i>Lithospermum officinale</i> L.) in different phenological phases. . .	263
Kazlouski I. S., Zinchenko A. I. Biosynthesis of <i>Escherichia coli</i> adenosine deaminase using cell-free protein synthesis.	271
Kem K. R., Laman N. A. Effect of epibrassinolide on the flavonoids content in plant sprouts under stress caused by N-phosphonomethylglycine.	277
Kabashnikova L. F., Domanskaya I. N., Pilipovich T. S., Pashkevich L. V., Martysiuk H. V., Motyleva S. M., Gins M. S., Tetyannikov N. V. Photosynthetic pigments content and parameters of oxidative stress in the amaranth species with increasing water deficiency.	282
Zubritskaya G. P., Slobozhanina E. I. Lithium-induced modification of the physicochemical state of membrane proteins and lipids in human erythrocytes.	295
Pavlovskiy N. B. Estimation storage life of blueberry fruits of different taxons.	302
Hetka N. V., Ateslenko E. V., Kulyan R. V., Suboch V. P., Titok V. V. Aromatic compounds secreted by plants of the genus <i>Citrus</i> L. in greenhouse conditions.	312
Dvornik A. A., Dvornik A. M., Kurilenko R. S., Bardyukova A. V., Sehlin V. N., Shamal N. V., Korol R. A. Mapping of forest fire hazard depending on weather conditions using geoinformation technologies.	320
Karasiova A. N. Accumulation of photosynthetic pigments and indicators of fluorescence of chlorophyll in leaves of <i>Dioscorea alata</i> L. during vegetative reproduction of plants on ion-exchange substrates.	333
Bazyleva N. A., Gulis A. L., Beinia V. A., Tsekhanovich S. V. Morphobiological properties of Belarusian varieties of Korean chrysanthemum (<i>Chrysanthemum coreanum</i>)	339

REVIEWS

Tishuk O. I., Poleshko A. G., Volotovskiy I. D. Induced pluripotent stem cells. Obtaining, properties and application prospects in biology and medicine.	345
Zinchenko A. I., Birichevskaya L. L., Kazlouski I. S., Bulatovski A. B. Possible response of molecular biotechnology to call SARS-CoV-2.	357
Pozniak T. A., Hancharou A. Y., Abashkin V. M., Stanovaya A. I., Prokhorov A. V., Shcharbin D. G. Circulating tumor cells and circulating cancer stem cells and their detection by the method of flow cytometry.	370

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 581.192:615.322

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-263-270>

Поступила в редакцию 18.03.2021

Received 18.03.2021

Н. Ю. Адамцевич¹, Е. В. Феськова¹, В. В. Титок², В. С. Болтовский¹

¹Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ, МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ЛИСТЬЯХ ВОРОБЕЙНИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*LITHOSPERMUM OFFICINALE* L.) В РАЗЛИЧНЫЕ ФЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ФАЗЫ

Аннотация. В работе изучена динамика накопления флавоноидов в листьях воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.) второго года культивирования в различные фенологические фазы. Максимальное содержание флавоноидов наблюдалось в период цветения. Показано, что качественный состав экстрактов листьев воробейника лекарственного в различные фенологические фазы изменялся незначительно. На каждом этапе развития растения идентифицирован флавоноид изокверцитрин, максимальное его количество отмечалось в фазу цветения.

При сравнительной оценке элементного состава листьев воробейника лекарственного в зависимости от фенологической фазы отмечено высокое содержание кальция, калия и кремния во все фазы развития растения. Определено количественное содержание 11 макро- и микроэлементов.

Ключевые слова: воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.), флавоноиды, изокверцитрин, фенологические фазы, высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия, макроэлементы, микроэлементы

Для цитирования: Динамика накопления флавоноидов, макро- и микроэлементов в листьях воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.) в различные фенологические фазы / Н. Ю. Адамцевич [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 263–270. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-263-270>

Natallia Yu. Adamtsevich¹, Alena V. Feskova¹, Vladimir V. Titok², Valeriy S. Boltovskiy¹

¹Belarusian State Technological University, Minsk, Republic of Belarus

²Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

DYNAMICS OF THE ACCUMULATION OF FLAVONOIDS, MACRO- AND MICROELEMENTS IN THE LEAVES OF THE LITTLEWALE (*LITHOSPERMUM OFFICINALE* L.) IN DIFFERENT PHENOLOGICAL PHASES

Abstract. The dynamics of accumulation of flavonoids in the leaves of the littlewale (*Lithospermum officinale* L.) of the second year of cultivation in various phenological phases was studied. The maximum content of flavonoids was observed during the flowering phase. It was shown that the qualitative composition of the extracts of the leaves of the common sparrow in different phenological phases was changed insignificantly. At each stage of plant development, the flavonoid isoquercitrin was identified, the maximum amount of which was observed in the flowering phase.

A comparative assessment of the elemental composition of the leaves of the littlewale is carried out, depending on the phenological phase. The quantitative content of 11 macro- and microelements has been determined. A high content of calcium, potassium and silicon was noted in each phase of plant development.

Keywords: littlewale (*Lithospermum officinale* L.), flavonoids, isoquercitrin, phenological phases, high performance liquid chromatography-mass spectrometry, macroelements, microelements

For citation: Adamtsevich N. Yu., Feskova A. V., Titok V. V., Boltovskiy V. S. Dynamics of the accumulation of flavonoids, macro- and microelements in the leaves of the littlewale (*Lithospermum officinale* L.) in different phenological phases. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 263–270 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-263-270>

Введение. Помимо первичных метаболитов – углеводов, аминокислот, жирных кислот, хлорофиллов, цитохромов, нуклеотидов, а также соединений, являющихся интермедиатами различных метаболических реакций, растения содержат вещества, которые не участвуют в основном обмене. Их принято называть вторичными метаболитами либо веществами вторичного происхождения [1–3].

Последние десятилетия характеризуются бурным развитием разделов физиологии и фармакологии, связанных с изучением веществ вторичного происхождения растений. Наиболее распространенными среди них являются разнообразные флавоноиды. Данный класс соединений играет важную роль в метаболизме растений и принимает участие в их росте и развитии. Большинство флавоноидов придает яркую окраску цветкам и плодам. Это привлекает насекомых-опылителей, что способствует размножению и распространению растений [4–6]. Антистрессовая (защитная) функция данного класса соединений против различных негативных факторов внешней среды (механическое повреждение, инфекции, насекомые, ультрафиолетовое излучение, температурный стресс) заключается в их участии в окислительно-восстановительных процессах, антибиотической активности, способности связываться с протеинами, служить материалом для построения клеточной стенки [3, 5–8]. Протекторная функция флавоноидов в тканях растений (против любых биотических и абиотических стрессоров) дает основание рассматривать их в роли универсальных физиологических адаптогенов к неблагоприятным факторам среды [5].

В растениях флавоноиды локализируются преимущественно в листьях, цветках и плодах, реже – в стеблях и подземных органах. Обычно данные соединения сосредоточены в вакуолях, хотя некоторые из них обнаружены в хромопластах и хлоропластах растительной ткани [1, 3].

На состав и накопление биологически активных веществ (БАВ) в растениях оказывают влияние генотип, фаза развития растения, условия произрастания и множество других факторов. Общих закономерностей, влияющих на изменение качественного и количественного состава БАВ, в онтогенезе растения не выявлено [2].

Изучение динамики накопления флавоноидов имеет как практическое, так и теоретическое значение. С теоретической точки зрения выясняется биохимическая роль флавоноидов в период роста и развития растения, с практической – устанавливаются оптимальные сроки сбора растительного сырья (период максимального накопления БАВ) в целях рационального использования ресурсов лекарственного растения.

Воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.) – вид двудольных растений рода Воробейник (*Lithospermum*) семейства Бурачниковые (Boraginaceae), включен в 3-е издание Красной книги Республики Беларусь [9]. С целью сохранения и распространения воробейника лекарственного в качестве лекарственного и медоносного вида он культивируется в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси (ЦБС).

Воробейник лекарственный является многолетним растением с утолщенным, прямостоячим, разветвленным стеблем, ланцетными листьями, расположенными поочередно. Сверху листва окрашена в темный цвет, снизу – светло-зеленая. Цветки мелкие, желтоватые. Цветет в июне–июле [10].

При исследовании химического состава некоторых видов лекарственных растений из коллекции ЦБС в экстракте листьев воробейника лекарственного обнаружен изокверцитрин [11], который является одним из ключевых флавоноидов, способствующих регенерации тканей [12, 13]. Таким образом, воробейник лекарственный представляет интерес и для медицинской практики.

Лекарственные растения способны накапливать жизненно необходимые макро- и микроэлементы, которые оказывают определенное влияние на рост и развитие растения, активизируют ферментные системы, играют важную роль в пластических процессах и поддержании кислотно-щелочного баланса [14]. Кроме того, лечебный эффект содержащихся в растительном сырье БАВ может успешно сочетаться с действием микроэлементов, которые могут стимулировать или ингибировать процессы роста, развития и репродуктивную функцию растений, действуя через ферментную систему или непосредственно связываясь с биополимерами растений [15].

В работе [16] при определении элементного состава некоторых видов растений в воробейнике лекарственном преобладающими элементами являлись кальций, калий и кремний.

Цель работы – изучение динамики накопления флавоноидов и исследование элементного состава листьев воробейника лекарственного в различные фенологические фазы.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования являлись листья воробейника лекарственного второго года культивирования из коллекции лекарственных растений ЦБС, собранные в различные фенологические фазы (урожай 2020 г.).

Растительное сырье собирали вручную, раскладывали тонким слоем и сушили естественным путем без доступа прямых солнечных лучей. Влажность сырья определяли согласно методике, приведенной в Государственной фармакопее Республики Беларусь (ГФ РБ) [17].

Измельченное (фракция 2–3 мм) сухое растительное сырье экстрагировали в течение 40 мин при ранее подобранных оптимальных условиях: 50 %-ный этиловый спирт, температура 65–70 °С, соотношение массы сырья к объему экстрагента 1:20 [18].

Общее содержание флавоноидов в экстрактах определяли с помощью спектрофотометрического метода, основанного на реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия (методика приведена в работе [18]). Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре SPECORD 200 (Analytik Jena, Германия) при длине волны 411 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Водно-спиртовые экстракты листьев воробейника лекарственного анализировали с помощью хромато-масс-спектрометра жидкостного (Waters, США), колонка – BDS HYPERSIL C₁₈ 250×4,6 мм, 5 мкм (Thermo Electron Corporation, США). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил и воду с 1 %-ной муравьиной кислотой в соотношении 20:80 в изократическом режиме при скорости элюирования 1 мл/мин. Регистрацию хроматографического разделения осуществляли с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 200–700 нм и масс-детектора с электроспрей-ионизацией (ESI). Регистрацию масс-спектров проводили в области отрицательных и положительных ионов при следующих параметрах: напряжение на капилляре – 3 кВ, напряжение на конусе – 20 В, напряжение на экстракторе – 3 В, температура десольватации – 350 °С, температура источника – 130 °С, общий расход инертного газа (азота) – 480 л/ч. Обработку результатов осуществляли при помощи программного обеспечения Mass Lynx. Для качественного и количественного определения изокверцитрина использовали стандартный раствор коммерческого препарата изокверцитрина (Sigma, Германия).

Определение общего количества золы выполняли согласно методике, приведенной в ГФ ГБ [17]. Элементный состав образцов золы изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-5610 LV с системой химического анализа EDX JED-2201 (JEOL, Япония).

Все анализы проводили в трехкратной повторности. Для статистической обработки полученных результатов использовали программу Microsoft Office Excel 2007. Значения статистически значимо различались при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Поскольку флавоноиды участвуют во всех процессах роста и развития растения, их содержание в различные фенологические фазы варьируется.

На рис. 1 представлены результаты изучения динамики накопления флавоноидов в листьях воробейника лекарственного на разных этапах развития растения.

В фазу вегетации содержание флавоноидов в листьях воробейника лекарственного составляло $1,06 \pm 0,05$ % от массы абсолютно сухого сырья. В период бутонизации (вторая половина мая) концентрация флавоноидов увеличилась до $1,83 \pm 0,09$ %. В фазу цветения (июнь) содержание данного класса БАВ продолжало увеличиваться и в период массового цветения (середина июня) достигло $2,53 \pm 0,11$ %. В фазу плодоношения (начало июля) количество флавоноидов уменьшилось незначительно, однако к концу июля составило $2,21 \pm 0,09$ %. Таким образом, максимальное содержание флавоноидов в листьях воробейника лекарственного наблюдалось в фазу массового цветения.

Функции флавоноидов в период роста и развития растения довольно значимы. Например, благодаря способности поглощать ультрафиолетовое излучение (330–350 нм) и часть видимого света (520–560 нм) они защищают растительные ткани от избыточной радиации. Флавоноиды являются фактором устойчивости растений к поражению некоторыми травоядными насекомыми, патогенными бактериями и грибами. Возможно, высокое содержание флавоноидов в листьях воробейника лекарственного в фазу цветения и начала плодоношения может быть связано с их защитными функциями и необходимостью выживания растения на таких важных стадиях развития.

Исследование образцов методом ВЭЖХ-МС показало, что в экстрактах листьев воробейника лекарственного в течение сезонного развития имеется до 15 компонентов (рис. 2).

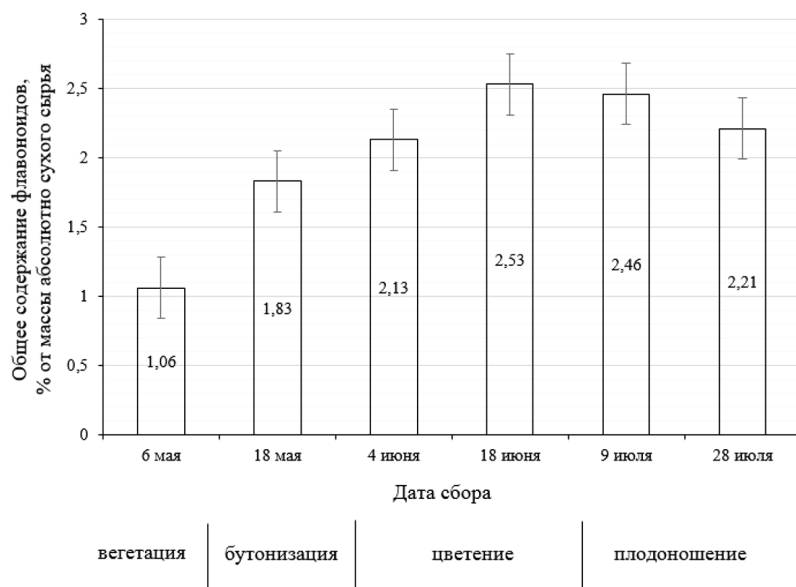


Рис. 1. Динамика накопления флавоноидов в листьях *Lithospermum officinale* L. в различные фенологические фазы

Fig. 1. The dynamics of accumulation of flavonoids in the leaves of the *Lithospermum officinale* L. in various phenological phases

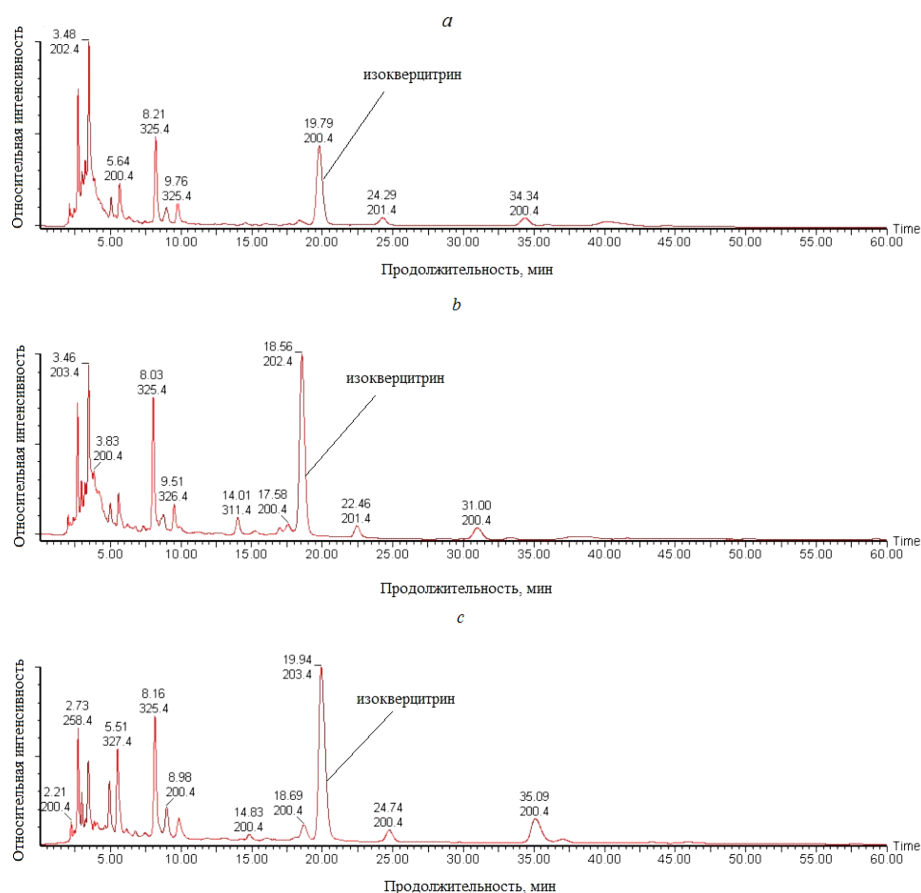


Рис. 2. Хроматограммы экстрактов листьев *Lithospermum officinale* L. в различные фенологические фазы (a – фаза бутонизации, b – фаза цветения, c – фаза плодоношения)

Fig. 2. Chromatograms of extracts of the leaves of the *Lithospermum officinale* L. in various phenological phases (a – budding phase, b – flowering phase, c – fruiting phase)

При сравнении хроматограмм экстрактов установлено, что в различные фенологические фазы число пиков, их относительное расположение на хроматограмме и соотношение площадей изменялись незначительно.

В листьях воробейника лекарственного содержится флавоноид изокверцитрин – гликозид кверцетина (углеводная часть представлена глюкозой). Данный флавоноид идентифицирован во всех образцах, однако по мере развития растения его количественное содержание изменялось (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Содержание изокверцитрина в листьях *Lithospermum officinale* L. в различные фенологические фазы

Table 1. Isoquercitrin content in the leaves of the *Lithospermum officinale* L. in various phenological phases

Фенологическая фаза	Содержание изокверцитрина, мг/г абсолютно сухого сырья
Бутонизация	$2,09 \pm 0,09$
Цветение	$4,22 \pm 0,18$
Плодоношение	$3,64 \pm 0,16$

Как видно из табл. 1, наибольшее содержание изокверцитрина наблюдалось в экстрактах листьев воробейника лекарственного в фазу цветения.

Для полноценного развития растения необходимы макро- и микроэлементы, так как они являются составляющими многих компонентов, включая белки, нуклеиновые кислоты и хлорофилл, важны для таких физиологических процессов, как дыхание, поддержание осмотического давления, входят в состав ферментов, которые, являясь катализаторами биохимических процессов, повышают активность последних.

В листьях воробейника лекарственного определено количественное содержание 11 макро- и микроэлементов (табл. 2). При сравнительном анализе исследуемых образцов отмечено варьирование в содержании отдельных важных элементов в зависимости от фазы развития растения.

Из представленных в табл. 2 данных следует, что в листьях воробейника лекарственного преобладают такие элементы, как кальций, калий и кремний, что соответствует литературным данным.

Т а б л и ц а 2. Содержание макро- и микроэлементов в золе листьев *Lithospermum officinale* L. в различные фенологические фазы (г/100 г золы)

Table 2. Content of macro- and microelements in the leaves of the *Lithospermum officinale* L. in various phenological phases (g/100 g ash)

Элемент	Фенологическая фаза		
	Бутонизация	Цветение	Плодоношение
Натрий	$0,55 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,01$	—
Магний	$4,47 \pm 0,03$	$3,44 \pm 0,05$	$2,14 \pm 0,03$
Алюминий	$0,72 \pm 0,01$	$0,60 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,01$
Кремний	$10,80 \pm 0,05$	$14,40 \pm 0,06$	$10,42 \pm 0,02$
Фосфор	$3,26 \pm 0,03$	$1,98 \pm 0,03$	$3,18 \pm 0,02$
Сера	$1,35 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,02$	$0,44 \pm 0,01$
Хлор	$0,52 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$
Калий	$25,19 \pm 0,09$	$17,75 \pm 0,06$	$19,91 \pm 0,05$
Кальций	$24,27 \pm 0,07$	$28,22 \pm 0,10$	$32,50 \pm 0,08$
Медь	$4,34 \pm 0,03$	$2,18 \pm 0,04$	$1,22 \pm 0,01$
Цинк	$1,47 \pm 0,02$	$1,87 \pm 0,03$	$1,98 \pm 0,02$

Кальций участвует в углеводном и белковом обмене растений, образовании и росте хлоропластов, необходим для нормального усвоения растением аммиачного азота. От содержания кальция зависит построение нормальных клеточных оболочек [15]. Данный элемент накапливается в листьях воробейника лекарственного в течение всего периода развития растения, а в фазу плодоношения его содержание составляет $32,50 \pm 0,08$ г/100 г золы.

Калий, выполняя важную физиологическую функцию в углеводном и белковом обмене растений, в процессах фотосинтеза и водного обмена, повышает устойчивость растения к увяданию и преждевременному обезвоживанию, укрепляет его ткани и делает их более устойчивыми к болезням и вредителям. Наибольшее количество калия в листьях воробейника лекарственного наблюдается в период бутонизации.

В листьях воробейника лекарственного в достаточных количествах обнаружены медь и цинк, которые выполняют важную биохимическую функцию [19]. Данные элементы имеют разные тенденции накопления: наибольшее количество меди в листьях воробейника лекарственного отмечается в фазу бутонизации, а содержание цинка достигает максимального значения в период плодоношения.

Натрий относится к элементам, которые условно необходимы растениям. В химическом и физиологическом отношении натрий близок к калию. Калий может практически всегда заменить натрий, однако сам натрием не заменяется [15]. В листьях воробейника лекарственного натрий обнаружен в достаточно низком количестве, а в фазу плодоношения он вовсе отсутствует. При этом содержание калия в период плодоношения несколько увеличивается по сравнению с его содержанием в период цветения.

Заключение. Изучена динамика накопления флавоноидов в листьях воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.) в различные фенологические фазы. Максимальное количество флавоноидов установлено в фазу цветения – $2,53 \pm 0,11$ % от массы абсолютно сухого сырья. Качественный состав экстрактов листьев воробейника лекарственного в различные фенологические фазы изменялся незначительно. Флавоноид изокверцитрин идентифицирован на всех стадиях развития растения, однако максимальное его накопление наблюдалось в фазу цветения. Следовательно, оптимальным временем заготовки листьев воробейника лекарственного является фаза массового цветения.

Проведен сравнительный анализ элементного состава золы листьев воробейника лекарственного, заготовленных в различные фенологические фазы. Определено количественное содержание 11 макро- и микроэлементов, преобладающими из которых на каждом этапе развития растения являлись кальций, калий и кремний.

Список использованных источников

1. Основы биохимии вторичного обмена растений / Г. Г. Борисова [и др.]. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2014. – 128 с.
2. Медведев, С. С. Физиология растений / С. С. Медведев. – СПб. : БХВ-Петербург, 2012. – 512 с.
3. Филиппова, Г. Г. Основы биохимии растений / Г. Г. Филиппова, И. И. Смолич. – Минск : БГУ, 2004. – 136 с.
4. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю. С. Тараховский [и др.]. – Пушкино : Synchrobook, 2013. – 310 с.
5. Макаренко, О. А. Физиологические функции флавоноидов в растениях / О. А. Макаренко, А. П. Левицкий // Физиология и биохимия культурных растений. – 2013. – Т. 45, № 2. – С. 100–112.
6. Brown, J. E. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications / J. E. Brown, M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton : CRC Press, 2006. – 1197 p.
7. Parr, A. J. Phenols in the plant and man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile / A. J. Parr, G. P. Bolwell // J. Sci. Food Agric. – 2000. – Vol. 80, N 7. – P. 985–1012. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7)
8. Mierziak, J. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment / J. Mierziak, K. Kostyn, A. Kulma // Molecules. – 2014. – Vol. 19, N 10. – P. 16240–16265. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
9. Красная книга Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://redbook.minpriroda.gov.by/plantsinfo.html?id=85>. – Дата доступа: 27.01.2021.
10. Гаммерман, А. Ф. Лекарственные растения (растения-целители) : справ. пособие / А. Ф. Гаммерман, Г. Н. Кадаев, А. А. Яценко-Хмельевский. – 4-е изд. – М. : Высш. школа, 1990. – 544 с.
11. Условия экстракции и идентификации флавоноидов, стимулирующих регенерацию тканей / Е. В. Феськова [и др.] // Тр. БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. – 2019. – № 1. – С. 49–53.
12. Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides [Electronic resource]. – Mode of access: www.google.com/patents/US20120087980. – Date of access: 30.01.2021.
13. Evaluation of the wound healing potential of isoquercetin-based cream on scald burn injury in rats / N. Bhatia [et al.] // Burns and Trauma. – 2016. – Vol. 4. <https://doi.org/10.1186/s41038-016-0032-1>

14. Шамсутдинова, С. Р. Определение содержания макро- и микроэлементов в сырье бодяка полевого в разных фазах вегетации растения / С. Р. Шамсутдинова, К. А. Пупыкина // Башкир. хим. журн. – 2015. – Т. 22, № 3. – С. 70–72.
15. Володько, И. К. Микроэлементы и устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды / И. К. Володько. – Минск : Наука и техника, 1983. – 192 с.
16. Определение элементного состава травы некоторых растений / Н. Н. Бойко [и др.] // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2015. – № 1. – С. 19–25.
17. Государственная фармакопея Республики Беларусь разработана на основе Европейской фармакопеи (ГФ. РБ II) : в 2 т. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». – Молодечно : Тип. «Победа», 2016. – Т. 2 : Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья. – 1367 с.
18. Адамцевич, Н. Ю. Влияние параметров экстракции на выход флавоноидов из листьев воробейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.) / Н. Ю. Адамцевич, В. С. Болтовский, В. В. Титок // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 4. – С. 402–411.
19. Особенности накопления макро- и микроэлементов в надземной части *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim в разные фенологические фазы / И. Д. Зыкова [и др.] // Химия раст. сырья. – 2013. – № 2. – С. 189–193.

References

1. Borisova G. G., Ermoshin A. A., Maleva M. G., Chukina N. V. *Fundamentals of biochemistry of secondary plant metabolism*. Yekaterinburg, Ural University Publishing House, 2014. 128 p. (in Russian).
2. Medvedev S. S. *Plant physiology*. Saint Petersburg, BHV-Petersburg Publ., 2012. 512 p. (in Russian).
3. Filiptsova G. G., Smolich I. I. *Fundamentals of plant biochemistry*. Minsk, Publishing house of the Belarusian University, 2004. 136 p. (in Russian).
4. Tarakhovskii Yu. S., Kim Yu. A., Abdrasilov B. S., Muzafarov E. N. *Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine*. Pushchino, Synchronobook Publ., 2013. 310 p. (in Russian).
5. Makarenko O. A., Levitskii A. P. Physiological functions of flavonoids in plants. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants], 2013, vol. 45, no. 2, pp. 100–112 (in Russian).
6. Brown J. E., Andersen M., Markham K. R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton, CRC Press Publ., 2006. 1197 p.
7. Parr A. J., Bolwell G. P. Phenols in the plant and man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, vol. 80, no. 7, pp. 985–1012. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7)
8. Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 2014, vol. 19, no. 10, pp. 16240–16265. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
9. *The Red Book of the Republic of Belarus*. Available at: <http://redbook.minpriroda.gov.by/plantsinfo.html?id=85> (accessed 27.01.2021) (in Russian).
10. Gammerman A. F., Kadaev G. N., Yatsenko-Khmelevskii A. A. *Medicinal plants (Healing plants)*. 4th ed. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1990. 544 p. (in Russian).
11. Fes'kova E. V., Leont'ev V. N., Ignatovets O. S., Adamtsevich N. Yu., Besarab A. Yu. Extraction conditions and identification of flavonoids which stimulate tissue regeneration. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Seriya 2: Khimicheskie tekhnologii, biotekhnologiya, geoekologiya* [Proceedings of the Belarusian State Technological University. Series 2. Chemical engineering, biotechnologies, geoecology], 2019, no. 1, pp. 49–53 (in Russian).
12. *Stimulation of neuroregeneration by flavonoid glycosides*. Available at: www.google.com/patents/US20120087980 (accessed 30.01.2021).
13. Bhatia N., Kaur G., Soni V., Kataria J., Dhawan R. K. Evaluation of the wound healing potential of isoquercetin-based cream on scald burn injury in rats. *Burns and Trauma*, 2016, vol. 4, p. 8. <https://doi.org/10.1186/s41038-016-0032-1>
14. Shamsutdinova S. R., Pupykina K. A. The determination of the contents of macro- and microelements in the raw material *Cirsium Arvense* in different phases of the vegetation of the plant. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal* [Bashkir chemical journal], 2015, vol. 22, no. 3, pp. 70–72 (in Russian).
15. Volod'ko I. K. *Trace elements and plant resistance to unfavorable environmental factors*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1983. 192 p. (in Russian).
16. Boiko N. N., Zaitsev A. I., Belikov K. N., Grishina E. V. Determination of the element composition of the herbs of some plants. *Upravlinnia ekonomika ta zabezpechennia yakosti v farmatsii* [Management, economics and quality assurance in pharmacy], 2015, no. 1, pp. 19–25 (in Russian).
17. *The State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus was developed on the basis of the European Pharmacopoeia (GF. RB II). Vol. 2. Quality control of substances for pharmaceutical use and medicinal plant raw materials*. Molodechno, Tipografiya "Pobeda" Publ., 2018. 1367 p. (in Russian).
18. Adamtsevich N. Yu., Boltovskiy V. S., Titok V. V. The influence of extraction parameters on the output of flavonoids from littlewale (*Lithospermum officinale* L.). *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 4, pp. 402–411 (in Russian).
19. Zykova I. D., Efremov A. A., Gerasimov V. S., Leshok A. A. Features of accumulation of macro- and microelements in the aerial part of *Filipendula Ulmaria* (L.) Maxim in different phenological phases. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant materials*, 2013, no. 2, pp. 189–193 (in Russian).

Информация об авторах

Адамцевич Наталья Юрьевна – аспирант. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: natallia.adamtsevich@mail.ru

Феськова Елена Владимировна – канд. техн. наук, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Титок Владимир Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, директор. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Болтовский Валерий Станиславович – д-р техн. наук, доцент, профессор. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: v-boltovsky@mail.ru

Information about the authors

Natallia Yu. Adamtsevich – Postgraduate student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natallia.adamtsevich@mail.ru

Alena V. Feskova – Ph. D. (Engineering), Senior Researcher. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lena.feskova@mail.ru

Vladimir V. Titok – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Director. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Sarganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Valeriy S. Boltovskiy – D. Sc. (Engineering), Associate Professor, Professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v-boltovsky@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.66:577.217.3+579.842.11

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-271-276>

Поступила в редакцию 15.01.2021

Received 15.01.2021

И. С. Казловский, А. И. Зинченко

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

БИОСИНТЕЗ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* В СИСТЕМЕ БЕСКЛЕТОЧНОГО СИНТЕЗА БЕЛКА

Аннотация. Одним из новых перспективных направлений молекулярной биотехнологии является бесклеточный синтез белка (БСБ). Процедура БСБ основана на реконструкции *in vitro* всех этапов биосинтеза белка в клетке, включая транскрипцию, аминоацилирование тРНК и трансляцию мРНК рибосомами.

Ранее нами был сконструирован штамм *Escherichia coli*, продуцирующий гомологичную аденозиндезаминазу (АДазу). В настоящем исследовании в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию в ферментере, была изучена возможность синтеза АДазы в системе БСБ. Для синтеза этого фермента использовали S30-клеточный экстракт *E. coli*, РНК-полимеразу бактериофага Т7 и высококопийный плазмидный вектор pET42mut со встроенным в него геном АДазы.

В результате выполнения работы нами впервые продемонстрирована возможность синтеза АДазы *E. coli* в системе БСБ. В частично оптимизированных условиях проведения процесса получен экспериментальный образец рекомбинантной АДазы с активностью 530 Ед/мл ферментного препарата.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, *Escherichia coli*, бесклеточный синтез белка, высококопийная pET42mut-плазмида, ферментный препарат

Для цитирования: Казловский, И. С. Биосинтез аденозиндезаминазы *Escherichia coli* в системе бесклеточного синтеза белка / И. С. Казловский, А. И. Зинченко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 271–276. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-271-276>

Illia S. Kazlouski, Anatoli I. Zinchenko

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

BIOSYNTHESIS OF *ESCHERICHIA COLI* ADENOSINE DEAMINASE USING CELL-FREE PROTEIN SYNTHESIS

Abstract. One of the recent perspective trends of molecular biotechnology is cell-free protein synthesis (CFPS). The procedure of CFPS is based on *in vitro* reconstruction of all stages of a biosynthesis of protein in a whole cell, including a transcription, an aminoacylation of tRNA and translation of mRNA by ribosomes.

Previously, we constructed a strain *Escherichia coli* that produces homologous adenosine deaminase (ADase). In the present study, as an alternative to canonical submerged cultivation in a fermenter, the possibility of the ADase synthesis in the system of CFPS was studied. For synthesis of this enzyme we used the *E. coli*-30 cell extract, T7 bacteriophage RNA polymerase, and high-copy plasmid vector pET42mut with gene ADase inserted into it.

As a result of the work we have demonstrated for the first time the possibility of synthesis of ADase *E. coli* in the CFPS system. In a partially optimized process conditions, an experimental sample of recombinant AD with an activity of 530 U/ml of enzyme preparation was obtained.

Keywords: adenosine deaminase, *Escherichia coli*, cell-free protein synthesis, high-copy pET42mut plasmid, enzyme preparation

For citation: Kazlouski I. S., Zinchenko A. I. Biosynthesis of *Escherichia coli* adenosine deaminase using cell-free protein synthesis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 271–276 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-271-276>

Введение. В качестве альтернативы генно-инженерной технологии получения хозяйственно важных белков и вирусоподобных частиц [1, 2], мембранных белков [3] и белков, содержащих неприродные аминокислоты [4, 5], ряд исследовательских групп использует бесклеточные системы протеинового синтеза, в которых при обеспечении оптимальных условий возможна наработка как простых протеинов, так и протеинов со сложной структурой с устранением всех барьеров

несовместимости для трансляции мРНК. Однако, несмотря на то что этот методический подход был предложен гораздо раньше, чем генно-инженерный, к детальному изучению возможностей его широкого практического использования приступили совсем недавно [6].

Реакционная смесь для бесклеточного синтеза белка (БСБ) – открытая система без такого физического барьера, как клеточная мембрана. Выход конечного продукта зависит от концентрации каждого компонента, которую можно варьировать в широких пределах, в отличие от ситуации *in vivo*. При этом конечная концентрация белка может достигать более 2 мг/мл.

Система БСБ предусматривает транскрипцию гена и трансляцию мРНК *in vitro* – в лизате клеток, в который вносят рекомбинантную ДНК, аминокислоты, нуклеотиды, кофакторы и АТФ-регенерирующую систему. Эндогенная генетическая информация (ДНК и мРНК клетки-хозяина) при этом удаляется [7].

Первоначально система БСБ была предложена как платформа для синтеза белков *in vitro* [8], а также в качестве инструмента для изучения механизмов репликации ДНК.

После ряда усовершенствований система БСБ стала более надежной, экономичной, универсальной и масштабируемой технологией для синтеза препаративных количеств различных белковых продуктов, в том числе вакцин [9], антител [10] и цитокинов [11]. Изучение системы БСБ дало толчок развитию новой дисциплины – бесклеточной метаболической инженерии [12]. В последние годы на основе системы БСБ были разработаны недорогие биосенсоры [13] и портативные устройства для диагностики различных заболеваний [14, 15].

Аденозиндезаминаза (АДаза; КФ 3.5.4.4) – фермент, играющий важную роль в метаболизме пуриновых нуклеозидов. Этот фермент осуществляет необратимую реакцию превращения аденозина в инозин путем замены NH_2 -группы в гетероциклическом основании нуклеозида на гидроксил. Помимо своего основного субстрата (аденозина) АДаза *E. coli* может использовать ряд других природных и модифицированных нуклеозидов – 2'-дезоксаденозин, 3'-дезоксаденозин, 2',3'-дидезоксаденозин, 6-метиламинопуририбозид, 2,6-диаминопуририбозид [16]. Способность фермента осуществлять дезаминирование модифицированных пуриновых нуклеозидов делает его привлекательным для использования в химико-ферментативных схемах получения различных субстанций с потенциальной фармакологической активностью.

Цель настоящей работы – получение гомологичной АДазы при помощи системы бесклеточного синтеза белка на основе клеточного лизата *E. coli*.

Материалы и методы исследования. Источником гена АДазы (*add*; GenBank ID: 945851) служила ДНК *E. coli* K-12, выделенная из бактериальной биомассы с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Целевой фрагмент ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК и синтетических праймеров.

Подбор олигонуклеотидов осуществляли с помощью программного обеспечения UGENE 1.22 (UniPro, Россия) на основе нуклеотидных последовательностей гена АДазы: прямой *add*-F (5'-gtggtgtgccacaacatgattgataccaccctgc-3') и обратной *add*-R (5'-gggtgatggtgatgctccttcgcggcgact-3'). На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET42mut [17].

Амплификацию осуществляли по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °C), 30 циклов амплификации (10 с при 98 °C; 15 с при 55 °C; 30 с при 72 °C), финальная элонгация (75 с при 72 °C).

На втором этапе линейаризовали плазмиду pET42mut методом ПЦР с использованием Diamant-ДНК-полимеразы [18] и двух праймеров: прямого pET42mut-F (5'-catatgtatatctccttcttaagtttaaaaaattattctagag-3') и обратного pET42mut-R (5'-gagcatcaccatcaccaccaccaccactaattg-3'). Амплификацию вектора проводили по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °C), 30 циклов амплификации (10 с при 98 °C, 15 с при 55 °C, 3 мин при 72 °C), финальная элонгация (3 мин и 25 с при 72 °C).

На третьем этапе объединяли линейаризованный вектор и целевой ген методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [19] по следующей программе: этап предденатурации (30 с при 98 °C), 16 циклов амплификации (10 с при 98 °C; 15 с при 50 °C; 4 мин при 72 °C),

финальная элонгация (5 мин при 72 °С). На этом этапе в качестве матрицы и затравки были использованы полученные на первых двух этапах фрагменты в эквимольных количествах.

Синтезированным в ходе ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL (Novagen, США) с последующим их посевом на плотную селективную питательную среду Luria-Bertani (LB; 0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % NaCl, 1 % триптона) с добавлением канамицина (100 мкг/мл).

Для определения наличия плазмид, содержащих целевые «вставки ДНК» часть одиночной колонии отбирали при помощи стерильного наконечника и вносили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Трис-НСl (рН 8,3); 17 мМ (NH₄)₂SO₄; 2 мМ MgCl₂; 0,02 % Твин-20; смесь четырех канонических дНТФ (каждый в концентрации 0,2 мМ) и 1 ед. ДНК-полимеразы Diamant [18]. В качестве ДНК-затравки использовали праймеры (по 10 пмоль) к последовательности промотора фага Т7 (прямой Т7р-Ф 5'-taatacgaactcactataggg-3') и к последовательности, кодирующей АДазу (обратный *add*-R). ПЦР проводили по следующей программе: этап начальной денатурации (2 мин при 94 °С), 25 циклов амплификации (30 с при 94 °С; 15 с при 55 °С; 1 мин при 72 °С), финальная элонгация (2 мин при 72 °С).

Клетки-трансформанты выращивали в LB-среде с добавлением канамицина с конечной концентрации 80 мкг/мл. Клетки, содержащие целевые плазмиды, культивировали в жидкой среде LB с последующим выделением плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.

Для синтеза АДазы использовали реакционную смесь (1,0 мл), содержащую 0,25 мл клеточного экстракта S30, 0,65 мл премикса, 5 000 ед. активности РНК-полимеразы бактериофага Т7, 500 нг полученной на предыдущем этапе работы плазмидной ДНК, которую затем инкубировали при 30 °С в течение 5–6 ч.

После этого определяли активность полученного фермента по скорости дезаминирования аденозина. Реакционную смесь, содержащую 20 мМ нуклеозида, 50 мМ Трис-НСl-буфера (рН 8,0) и фермент, инкубировали при 37 °С в течение от 30 мин до 1,5 ч. Из анализируемых образцов при помощи микрокапилляра отбирали аликваты (5 мкл), которые наносили на хроматографические пластины для тонкослойной хроматографии Silufol-UV254.

Хроматографию проводили в системе растворителей хлороформ: метанол:аммиак в соотношении 10:10:2,5. Расположение пятен субстратов и продуктов реакции определяли в УФ-свете. Вещества элюировали 5 мл воды.

УФ-светопоглощение элюатов измеряли с помощью спектрофотометра при $\lambda = 255$ нм. Активность фермента определяли на начальной стадии реакции, когда выход продукта не превышал 10–15 % от максимального. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое обеспечивало образование 1 мкмоль продукта за 1 мин в соответствующих условиях реакции. Активность фермента выражали в ед/мл ферментного препарата.

Результаты и их обсуждение. На начальном этапе работы методом ПЦР амплифицировали ген *add*, кодирующий аминокислотную последовательность АДазы. Праймеры для ПЦР-амплификации гена подбирали таким образом, чтобы после их амплификации 5'- и 3'-окончания ПЦР-продуктов содержали нуклеотидные последовательности, комплементарные вектору рЕТ42mut.

Постановка горизонтального ДНК-электрофореза в агарозном геле после выделения и амплификации гена позволила получить нуклеотидную последовательность требуемого размера – 1000 п. н. (рис. 1).

На следующем этапе проводили линейаризацию вектора рЕТ42mut с помощью ПЦР. Праймеры для линейаризации вектора подбирали таким образом, чтобы при встраивании в плазмиду к 3'-окончанию целевого гена добавлялась последовательность нуклеотидов, которая обеспечивает

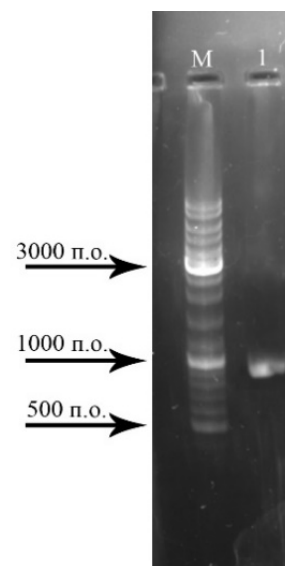


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации гена *add* (1). М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Fig. 1. Electrophoregram of amplified fragments of gene *add* (1). M – DNA molecular size markers

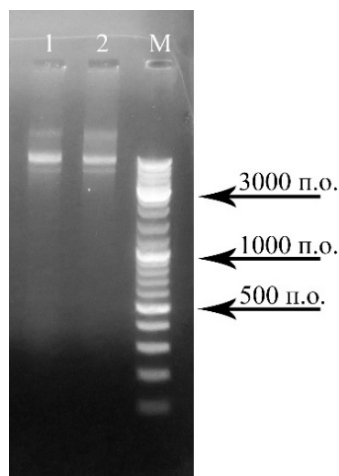


Рис. 2. Электрофореграмма плазмид (1 и 2), полученных при помощи щелочного лизиса клеток-трансформантов. М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Fig. 2. Electrophoregram of plasmids (1 and 2) obtained by alkaline lysis of transformed cells. M – DNA molecular size markers

ных рибонуклеозидтрифосфатов в концентрации 1 мМ; 0,05 % NaN_3 ; 2 % полиэтиленгликоля 8000; 0,04 мг/мл пируваткиназы; 5,5 мкг/мл РНК-полимеразы фага T7; 0,3 мг/мл плазмидной ДНК, содержащей ген, кодирующий АДазу; 0,5 мг/мл суммарной тРНК (из *E. coli* MRE 600) и экстракт S30, полученный из лизата клеток *E. coli* (30 % от общего объема реакционной смеси).

Инкубацию проводили в течение 6 ч при 30 °С и умеренном перемешивании. Для контроля синтеза АДазы каждый час отбирали по 1 мкл для анализа ферментативной активности синтезируемого белка. В качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь БСБ с внесением вместо плазмидной ДНК соответствующего количества буферного раствора. Результаты представлены на рис. 3.

Выход АДазы в эксперименте, описанном выше, достиг 530 Ед/мл реакционной смеси. В плане сравнения следует отметить, что при проведенном ранее синтезе рекомбинантной АДазы

наличие дополнительного октагистидинового олигопептида на С-конце целевого белка.

Затем проводили постановку ПП-ПЦР, которая, в отличие от стандартной ПЦР, требует наличия в векторе и вставке перекрывающихся комплементарных участков, включаемых на стадии клонирования целевых генов.

Как известно, при проведении ПП-ПЦР [19] вставка с вектором образуют смесь линейных конкатемеров, содержащих различное количество повторов «вставка–вектор». Данной смесью высокомолекулярных линейных молекул трансформируются клетки-реципиенты, в которых происходит формирование нескольких кольцевых молекул – плазмид, несущих в себе целевой ген.

Таким образом, ген *add*, кодирующий АДазу *E. coli*, был встроен в плазмиду pET42mut. Полученной смесью ПП-ПЦР трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL. Из полученных трансформантов с помощью щелочного лизиса выделили плазмиды и проанализировали их при помощи электрофоретического разделения в 1 %-ном агарозном геле (рис. 2).

На следующем этапе работы проводили оценку эффективности синтеза АДазы в БСБ на основе S30 экстракта из *E. coli*. Конечная концентрация компонентов реакции включала: 100 мМ HEPES-KOH (pH 8,0); 8 мМ Mg (CH_3COO)₂; 90 мМ KCH₃COO; 20 мМ фосфонолпируват калия; набор аминокислот (каждая в концентрации 1,3 мМ); 0,15 мг/мл фолиевой кислоты, каждый из четырех природ-

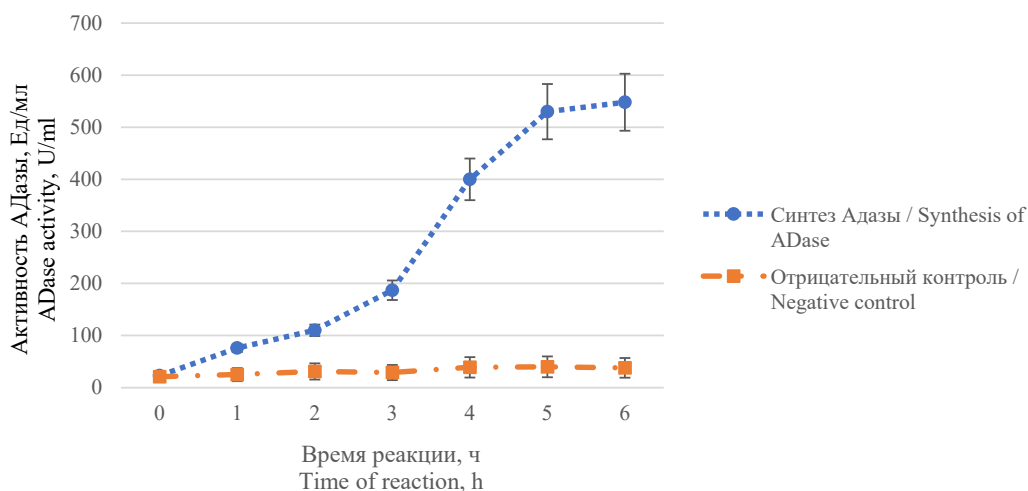


Рис. 3. Динамика накопления АДазы в реакционной смеси при синтезе ее в системе БСБ

Fig. 3. Dynamics of accumulation of adenosine deaminase in reaction mixture during cell-free protein synthesis

E. coli в цельноклеточной системе экспрессии максимальный выход ферментативной активности составлял 1,0 Ед/мл культуральной жидкости [20].

Заклучение. Впервые продемонстрирована возможность синтеза АДазы *E. coli* в системе БСБ. В частично оптимизированных условиях проведения процесса получен экспериментальный образец рекомбинантной АДазы с активностью 530 Ед/мл ферментного препарата.

По нашему мнению, синтез АДазы в системе БСБ может выступать в качестве варианта, альтернативного каноническому глубинному культивированию в ферментере.

Благодарности. Работа выполнена в рамках задания 3.13 Государственной программы научных исследований «Микробные биотехнологии», 2016–2020 гг.

Acknowledgements. The work was supported by the grant 3.13 from the Belarus State Research Program “Microbial Biotechnologies”, 2016–2020.

Список использованных источников

1. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis / M. T. Smith [et al.] // *Biotechnol. Progr.* – 2012. – Vol. 28, N 2. – P. 549–555. <https://doi.org/10.1002/btpr.744>
2. *De novo* expression and antibacterial potential of four lactoferricin peptides in cell-free protein synthesis system / N. El-Baky [et al.] // *Biotechnol. Rep.* – 2020. – Vol. 29. – Art. e00590. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00590>
3. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes / N. T. Hovijitra [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2009. – Vol. 104, N 1. – P. 40–49. <https://doi.org/10.1002/bit.22385>
4. Patel, K. G. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide–alkyne click chemistry / K. G. Patel, J. R. Swartz // *Biocon. Chem.* – 2011. – Vol. 22, N 3. – P. 376–387. <https://doi.org/10.1021/bc100367u>
5. *In vitro* production of perdeuterated proteins in H₂O for biomolecular NRM studies / L. Imbert [et al.] // *Meth. Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 2199. – P. 127–149. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_8
6. On-chip automation of cell-free protein synthesis: new opportunities due to a novel reaction mode / V. Georgi [et al.] // *Lab. Chip.* – 2016. – Vol. 16, N 2. – P. 269–281. <https://doi.org/10.1039/C5LC00700C>
7. Cell-free protein synthesis: The transition from batch reactions to minimal cells and microfluidic devices / M. H. Ayoubi-Joshaghani [et al.] // *Biotechnol. Bioengin.* – 2020. – Vol. 117, N 4. – P. 1204–1229. <https://doi.org/10.1002/bit.27248>
8. Zubay, G. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems / G. Zubay // *Annu. Rev. Genet.* – 1973. – Vol. 7. – P. 267–287. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.07.120173.001411>
9. Assessing sequence plasticity of a virus-like nanoparticle by evolution toward a versatile scaffold for vaccines and drug delivery / Y. Lu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2015. – Vol. 112. – P. 12360–12365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510533112>
10. Production of bispecific antibodies in “knobs-into holes” using a cell-free expression system / Y. Xu [et al.] // *mAbs.* – 2015. – Vol. 7, N 1. – P. 231–242. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989013>
11. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production a new approach for shortening protein production development timelines / J. F. Zawada [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* – 2011. – Vol. 108, N 7. – P. 1570–1578. <https://doi.org/10.1002/bit.23103>
12. Guo, W. Mini-review: in vitro metabolic engineering for biomanufacturing of high-value products / W. Guo, J. Sheng, X. Feng // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* – 2017. – Vol. 15. – P. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.006>
13. A cell-free protein synthesis approach to biosensing hTR β -specific endocrine disruptors / A. S. Salehi [et al.] // *Anal. Chem.* – 2017. – Vol. 89, N 6. – P. 3395–3401. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04034>
14. Paper-based synthetic gene networks / K. Pardee [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 159, N 4. – P. 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.004>
15. Tonooka, T. Microfluidic device with integrated freeze-dried cell-free protein synthesis system for small-volume biosensing / T. Tonooka // *Micromachines.* – 2020. – Vol. 12. – P. 27–37. <https://doi.org/10.3390/mi12010027>
16. Enzymatic synthesis of 2'-deoxyguanosine with nucleoside deoxyribosyltransferase-II / K. Okuyama [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2003. – Vol. 67, N 5. – P. 989–995. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.989>
17. Казловский, И. С. Модификация экспрессионной рЕТ-системы для использования в бесклеточном синтезе белка / И. С. Казловский, А. Н. Рымко, А. И. Зинченко // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси. – Минск, 2018. – Т. 10. – С. 69–78.
18. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction / A. S. Korovashkina [et al.] // *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development* / eds. : S. D. Varfolomeev, G. E. Zaikov, L. P. Krylova. – New York, 2012. – P. 1–6.
19. You, C. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* / C. You, X. Z. Zhang, Y. H. P. Zhang // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – Vol. 78, N 5. – P. 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/AEM.07105-11>
20. Квач, С. В. Оптимизация условий экспрессии штамма-суперпродуцента аденозиндеаминазы *Escherichia coli* / С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко // *Динамика исследований* – 2008: материалы IV Междуна. науч.-практ. конф., София, 16–31 июля 2008 г. – София, 2008. – С. 26–29.

References

1. Smith M. T., Varner C. T., Bush D. B., Bundy B. C. The incorporation of the A2 protein to produce novel Q β virus-like particles using cell-free protein synthesis. *Biotechnology Progress*, 2012, vol. 28, no. 2, pp. 549–555. <https://doi.org/10.1002/btpr.744>

2. El-Baky N., Elkhawaga M., Abdelkhalek E., Sharaf M. M., Redwan E. M., Kholef H. R. *De novo* expression and antibacterial potential of four lactoferricin peptides in cell-free protein synthesis system. *Biotechnology Reports*, 2020, vol. 29, art. e00590. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00583>
3. Hovijitra N. T., Wu J. J., Peaker B., Swartz J. R. Cell-free synthesis of functional aquaporin Z in synthetic liposomes. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, vol. 104, no. 1, pp. 40–49. <https://doi.org/10.1002/bit.22385>
4. Patel K. G., Swartz J. R. Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide–alkyne click chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, 2011, vol. 22, no. 3, pp. 376–387. <https://doi.org/10.1021/bc100367u>
5. Imbert L., Lenoir-Capello R., Crublet E., Vallet A., Awad R., Ayala I. [et al.]. *In vitro* production of perdeuterated proteins in H₂O for biomolecular NRM studies. *Methods in Molecular Biology*, 2021, vol. 2199, pp. 127–149. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0892-0_8
6. Georgi V., Georgi L., Blechert M., Bergmeister M., Zwanzig M., Wustenhagen D. A., Bier F. F., Junga E., Kubick S. On-chip automation of cell-free protein synthesis: new opportunities due to a novel reaction mode. *Lab on a Chip*, 2016, vol. 16, no. 2, pp. 269–281. <https://doi.org/10.1039/C5LC00700C>
7. Ayoubi-Joshaghani M. H., Dianat-Moghadam H., Seidi K., Jahanban-Esfahalan A., Zare P., Jahanban-Esfahlan R. Cell-free protein synthesis: The transition from batch reactions to minimal cells and microfluidic devices. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, vol. 117, no. 4, pp. 1204–1229. <https://doi.org/10.1002/bit.27248>
8. Zubay G. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. *Annual Review of Genetics*, 1973, vol. 7, pp. 267–287. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.07.120173.001411>
9. Lu Y., Chan W., Ko B., VanLang C., Swartz J. R. Assessing sequence plasticity of a virus-like nanoparticle by evolution toward a versatile scaffold for vaccines and drug delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, vol. 112, no. 40, pp. 12360–12365. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510533112>
10. Xu Y., Lee J., Tran C., Heibeck T., Wang W., Yang J. [et al.]. Production of bispecific antibodies in “knobs-into holes” using a cell-free expression system. *mAbs*, 2015, vol. 7, no. 1, pp. 231–242. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989013>
11. Zawada J. F., Yin G., Steiner A. R., Yang J., Naresh A., Roy S. M., Gold D. S., Heinsohn H. G., Murray C. J. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, vol. 108, no. 7, pp. 1570–1578. <https://doi.org/10.1002/bit.23103>
12. Guo W., Sheng J., Feng X. Mini-review: in vitro metabolic engineering for biomanufacturing of high-value products. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2017, vol. 15, pp. 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.01.006>
13. Salehi A. S., Shakalli Tang M. J., Smith M. T., Hunt J. M., Law R. A., Wood D. W., Bundy B. C. A cell-free protein synthesis approach to biosensing hTRβ-specific endocrine disruptors. *Analytical Chemistry*, 2017, vol. 89, no. 6, pp. 3395–3401. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04034>
14. Pardee K., Green A., Ferrante T., Cameron D. E., DaleyKeyser A., Yin P., Collins J. J. Paper-based synthetic gene networks. *Cell*, 2014, vol. 159, no. 4, pp. 940–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.004>
15. Tonooka T. Microfluidic device with integrated freeze-dried cell-free protein synthesis system for small-volume biosensing. *Micromachines*, 2020, vol. 12, pp. 27–37. <https://doi.org/10.3390/mi12010027>
16. Okuyama K., Shibuya S., Hamamoto T., Noguchi T. Enzymatic synthesis of 2'-deoxyguanosine with nucleoside deoxyribosyltransferase-II. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2003, vol. 67, no. 5, pp. 989–995. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.989>
17. Kazlovskii I. S., Rymko A. N., Zinchenko A. I. Modification of expression system of pET for using in cell-free protein synthesis. *Mikrobnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 10* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects: a collection of scientific papers. Vol. 10]. Minsk, 2018, pp. 69–78 (in Russian).
18. Korovashkina A. S., Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Zinchenko A. I. Production of thermostable DNA polymerase suitable for whole-blood polymerase chain reaction. *Biochemistry and Biotechnology: Research and Development*. New York, 2012, pp. 1–6.
19. You C., Zhang X. Z., Zhang Y. H. P. Simple cloning via direct transformation of PCR product (DNA multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, vol. 78, no. 5, pp. 1593–1595. <https://doi.org/10.1128/AEM.07105-11>
20. Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Zinchenko A. I. Optimization of expression conditions of the strain-superproducent adenosine deaminase *Escherichia coli*. *Dinamika issledovaniy – 2008: materialy IV Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Sofiya, 16–31 iyulya 2008 goda)* [Dynamics of research – 2008: Proceedings of the IV International scientific and practical conference (Sofia, July 16–31, 2008)]. Sofia, 2008, pp. 26–29 (in Russian).

Информация об авторах

Казловский Илья Сергеевич – магистр биол. наук, науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: leonardo_139@mail.ru

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Information about the authors

Illia S. Kazlouski – Master of Biology, Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: leonardo_139@mail.ru

Anatoli I. Zinchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 581.192.8; 58.04

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-277-281>

Поступила в редакцию 09.03.2021

Received 09.03.2021

К. Р. Кем, Н. А. Ламан

*Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

ВЛИЯНИЕ ЭПИБРАССИНОЛИДА НА СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ПРОРОСТКАХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО N-ФОСФОНОМЕТИЛГЛИЦИНОМ

Аннотация. Исследовано влияние эпибрасинолида (ЭБЛ) на содержание флавоноидов в проростках льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) и ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в условиях химического стресса, вызванного N-фосфонометилглицином (глифосатом). Отмечена видовая специфичность ответной реакции проростков изучаемых культур на внесение ЭБЛ в смеси с ингибирующей рост дозой глифосата. Данная специфичность выражается в ослаблении ингибирующего эффекта глифосата на содержание флавоноидов в тканях льна-долгунца и в отсутствии изменения уровня флавоноидов в корнях и надземной части проростков ярового ячменя.

Ключевые слова: флавоноиды, стресс, глифосат, N-фосфонометилглицин, брассиностероиды, эпибрасинолид, ингибирование

Для цитирования: Кем, К. Р. Влияние эпибрасинолида на содержание флавоноидов в проростках растений в условиях стресса, вызванного N-фосфонометилглицином / К. Р. Кем, Н. А. Ламан // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 277–281. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-277-281>

Karina R. Kem, Nikolai A. Laman

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

EFFECT OF EPIBRASSYNOLIDE ON THE FLAVONOIDS CONTENT IN PLANT SPROUTS UNDER STRESS CAUSED BY N-PHOSPHONOMETHYLGLYCINE

Abstract. The effect of epibrassinolide (EBL) on the content of flavonoids in seedlings of fiber flax (*Linum usitatissimum* L.) and spring barley (*Hordeum vulgare* L.) under chemical stress caused by N-phosphonomethylglycine (glyphosate) was studied. The species specificity of the response of the seedlings to the introduction of EBL in a mixture with an inhibitory dose of glyphosate was noted. This specificity is expressed in the suppression of the inhibitory effect of glyphosate on the flavonoids' content in the tissues of fiber flax and the absence of changes in the level of the content of flavonoids in the roots and aerial part of spring barley seedlings.

Keywords: flavonoids, stress, glyphosate, N-phosphonomethylglycine, brassinosteroids, epibrassinolide, inhibition

For citation: Kem K. R., Laman N. A. Effect of epibrassinolide on the flavonoids content in plant sprouts under stress caused by N-phosphonomethylglycine. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 277–281 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-277-281>

Введение. Флавоноиды относятся к классу полифенольных соединений, которые синтезируются только высшими растениями. Эти соединения выполняют различные функции в клетках – участвуют в окислительно-восстановительных реакциях (ОВР), играют роль аттрактантов для насекомых и животных, что способствует размножению и распространению растений. Важной функцией флавоноидов является также защита растений от внешних неблагоприятных абиотических и биотических факторов [1–3]. Так как одним из важнейших свойств данных соединений является их участие в ОВР и нейтрализации активных форм кислорода, изменение содержания флавоноидов в тканях растений может являться показателем, характеризующим ответную реакцию организма на стресс.

Известно, что гербицидный эффект глифосата (N-фосфонометилглицина) связан с его способностью ингибировать фермент 5-еноилпирувил-шикимат-3-фосфат-синтазу – необходимый

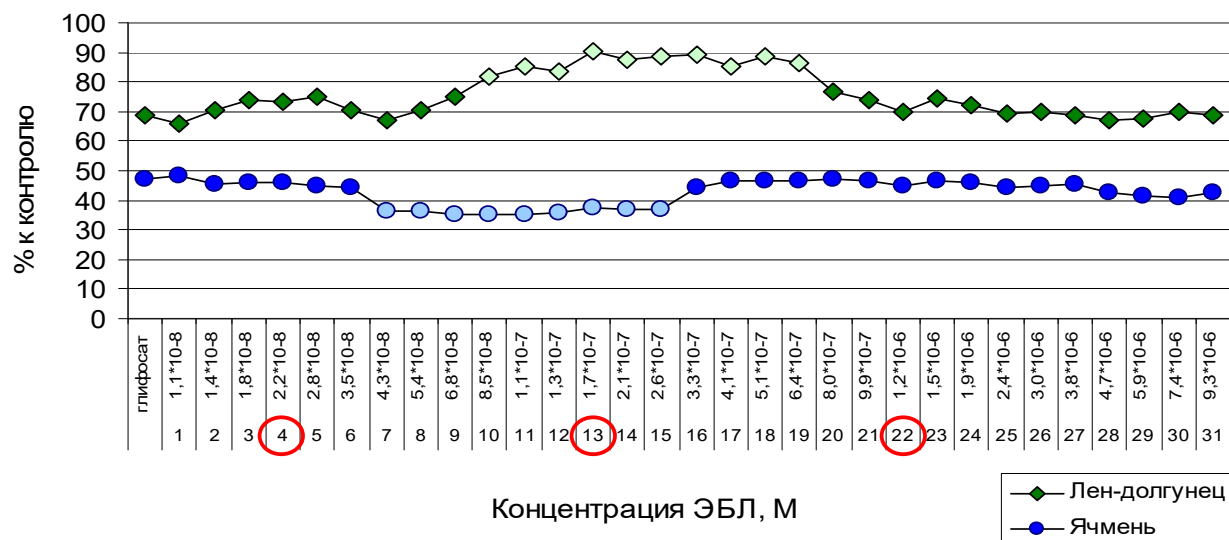


Рис. 1. Зависимость длины корня проростков льна-долгунца и ярового ячменя от концентрации ЭБЛ при концентрации глифосата $5,5 \cdot 10^{-2}$ М

Fig. 1. The dependence of the length of the root of fiber flax and spring barley seedlings on the concentration of EBL, at a glyphosate concentration of $5,5 \cdot 10^{-2}$ М

элемент шикиматного пути биосинтеза ароматических соединений: ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана), фенольных соединений, терпеноидных хинонов, лигнинов, а также ряда других важных метаболитов (токоферолов, алкалоидов, фитогормонов) [4]. В этой связи было выдвинуто предположение, что внесение эпибрасинолида (ЭБЛ) в смеси с ингибирующей дозой глифосата непосредственным образом должно отразиться на содержании фенольных соединений (в частности, флавоноидов) в тканях растений.

В проведенных ранее исследованиях по изучению действия ЭБЛ на проростки растений в условиях химического стресса (в качестве стрессового фактора использовался гербицид глифосат) нами установлено, что в определенных диапазонах концентраций ЭБЛ способен как ослаблять ингибирующий эффект гербицида на рост корневой системы проростков (лен-долгунец), так и усиливать его (яровой ячмень) (рис. 1). Выявлено сходство данных диапазонов концентраций ЭБЛ у двух исследуемых культур [5].

Цель исследования – определить содержание флавоноидов в корнях и надземной части проростков льна-долгунца и ярового ячменя, семена которых были обработаны смесями глифосата в ингибирующей дозе и эпибрасинолида в различных концентрациях, и сопоставить результаты исследования с данными, полученными при изучении морфометрических показателей проростков при инкрустации семян указанными смесями.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили проростки льна-долгунца (сорт Грант) и ярового ячменя (сорт Радзимиц).

Исследования зависимости доза–эффект при воздействии смесей глифосата в ингибирующей дозе и ЭБЛ в широких диапазонах концентраций на линейный рост проростков при инкрустации семян, выполненные ранее, позволили выделить дозы ЭБЛ, соответствующие трем точкам: до интервала взаимодействия компонентов смеси, внутри интервала и после интервала. Данные концентрации были использованы в настоящем опыте и составляли $2,2 \cdot 10^{-8}$, $1,7 \cdot 10^{-7}$ и $1,2 \cdot 10^{-6}$ М (на рис. 1 указанные концентрации обозначены кружком).

Концентрация глифосата $5,5 \cdot 10^{-2}$ М, используемая в опыте, была выбрана в соответствии с графиком зависимости доза–эффект в точке, где ингибирование роста корневой системы проростков составляло около 50 %. Контроль-1 – вариант с обработкой семян 1 %-ным раствором пленкообразователя Гисинар; контроль-2 – глифосат в концентрации $5,5 \cdot 10^{-2}$ М без ЭБЛ. Опыт по каждой исследуемой части проростка (корневая система и надземная часть) проводили в трехкратной повторности (каждая повторность включала 50 проростков).

Проращивание семян проводили методом рулонной культуры [6] в стеклянных емкостях объемом 1 л. После посева рулоны выдерживали в термостате 2 сут при температуре 22–24 °С, а на 3-и сутки перемещали в условия искусственного освещения интенсивностью 7,5 тыс. лк с режимом 14 ч – свет, 10 ч – темнота. Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрическим способом по методике, приведенной в работе [7], на 9-дневных проростках с использованием 5 %-ного спиртового раствора хлорида алюминия.

Статистическую обработку проводили с помощью стандартного пакета программ Microsoft Excel. В работе приведены средние значения и величины стандартной ошибки средней арифметической, по которым наглядно видны отличия между вариантами опытов.

Результаты и их обсуждение. Исследование воздействия брассиностероидов в широком диапазоне концентраций на рост проростков растений при инкрустации семян показало, что в оптимальных условиях проращивания в течение 9 сут брассиностероиды не оказывали влияния на рост корневой системы и надземной части проростков, а также на другие регистрируемые эффекты [8].

В опыте с корнями проростков при исследовании влияния ЭБЛ на содержание флавоноидов в тканях проростков льна-долгунца и ярового ячменя на фоне химического стресса были получены следующие результаты: в контроле-1 содержание флавоноидов составило 1,02 % у льна-долгунца и 0,49 % у ячменя; в контроле-2 – 0,60 и 0,29 % соответственно, т. е. глифосат снижал содержание флавоноидов в 1,7 раза у обеих культур (рис. 2).

При исследовании проростков льна-долгунца среди вариантов со смесями ЭБЛ и глифосата наибольшее содержание флавоноидов в корнях (по отношению к контролю-2) отмечалось в том варианте, где концентрация ЭБЛ составляла $1,7 \cdot 10^{-7}$ М (0,89 %). Эта концентрация соответствует интервалу взаимодействия между глифосатом и ЭБЛ, выявленному в опыте по изучению влияния смесей данных агентов на длину корневой системы проростков. Следует отметить, что добавление ЭБЛ во всех вариантах вызывало снижение ингибирующего эффекта гербицида по данному показателю.

В опытах с яровым ячменем добавление ЭБЛ в смеси не вызывало изменений количественного содержания флавоноидов в корнях проростков по отношению к контролю-2, а все отклонения по данному параметру не имели статистической достоверности.

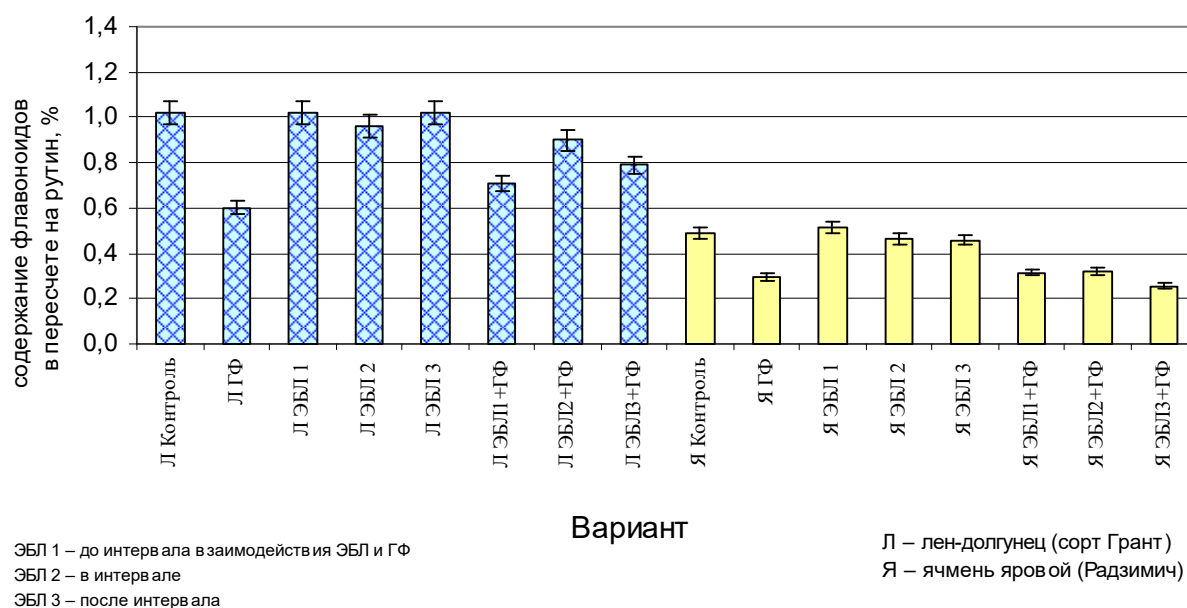


Рис. 2. Содержание флавоноидов в корнях проростков льна-долгунца и ярового ячменя при обработке семян смесями ЭБЛ и глифосата

Fig. 2. The content of flavonoids in the roots of fiber flax and spring barley seedlings under treatment of seeds with mixtures of EBL and glyphosate

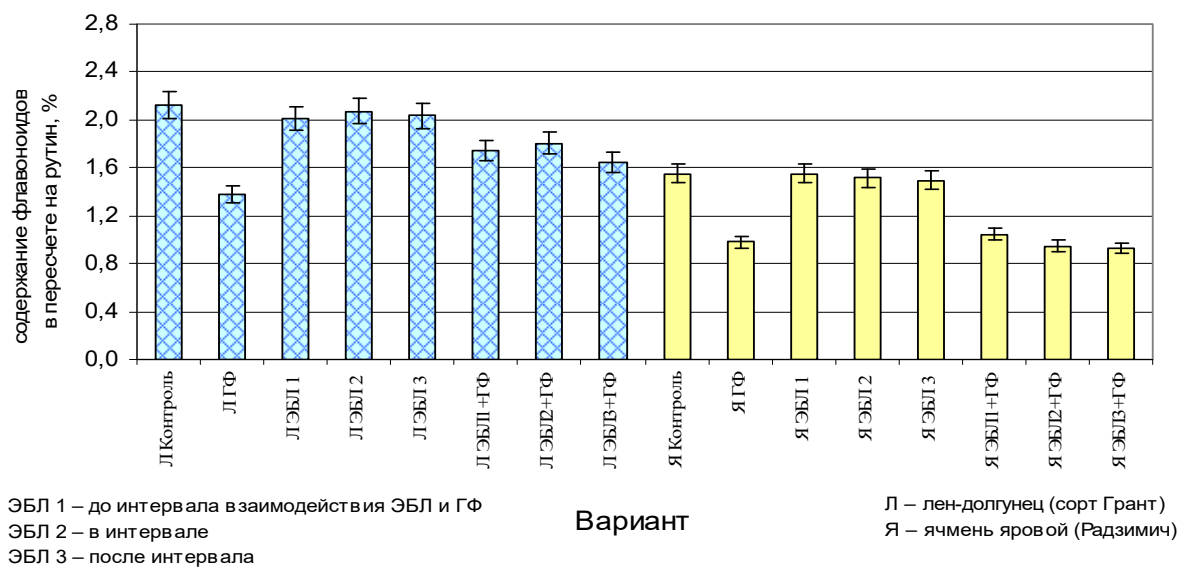


Рис. 3. Содержание флавоноидов в надземной части проростков льна-долгунца и ярового ячменя при обработке семян смесями ЭБЛ и глифосата

Fig. 3. The content of flavonoids in the aerial part of fiber flax and spring barley seedlings under treatment of seeds with mixtures of EBL and glyphosate

Содержание флавоноидов в надземной части проростков в контроле-1 составило 2,12 % у льна-долгунца и 1,55 % у ярового ячменя, в контроле-2 – 1,38 и 0,98 % соответственно (рис. 3). У льна-долгунца, как и в случае с корнями проростков, наблюдалось повышение уровня флавоноидов по сравнению с контролем-2 при внесении в смеси ЭБЛ. Наибольшее их содержание выявлено в варианте, где концентрация ЭБЛ составляла $1,7 \cdot 10^{-7}$ М (1,81 %), однако статистически значимого преимущества по сравнению с другими концентрациями ЭБЛ этот вариант не имел.

Что касается ярового ячменя, то, как и в опытах с корневой системой, при добавлении ЭБЛ в смеси с глифосатом изменения содержания флавоноидов в надземной части проростков по отношению к контролю-2 также не зарегистрировано.

Заключение. Результаты исследования содержания флавоноидов согласуются с полученными ранее данными. Выявлена значительная видовая специфичность реакции на инкрустацию семян смесями ЭБЛ и глифосата. Так, для проростков льна-долгунца характерно значительное снижение ингибирующего эффекта глифосата на содержание флавоноидов за счет внесения в смеси ЭБЛ, тогда как для проростков ярового ячменя такого снижения не выявлено. Предполагается, что более высокую антистрессовую активность ЭБЛ проявляет в концентрациях, близких к $1,7 \cdot 10^{-7}$ М.

В последние годы в европейском и мировом научном сообществе уделяется немало внимания изучению формирования стрессоустойчивости у растений под воздействием brassinosteroids. Результаты выполненных нами исследований морфометрических и биохимических показателей проростков ярового ячменя и льна-долгунца на фоне стрессового (ингибирующего) действия глифосата позволяют с высокой степенью достоверности осуществлять воспроизводимую количественную оценку ростовой активности не только ЭБЛ, но и ряда других природных brassinosteroids и их синтетических аналогов. Это свидетельствует об актуальности полученных результатов и возможных перспективах их использования в научной практике для оценки стресс-протекторного действия brassinosteroids.

Список использованных источников

1. Макаренко, О. А. Физиологические функции флавоноидов в растениях / О. А. Макаренко, А. П. Левицкий // Физиология и биохимия культурных растений. – 2013. – Т. 45, № 2. – С. 100–112.
2. Flavonoids: chemistry, biochemistry and application / ed. : O. M. Andersen, K. R. Markham. – New York : CRC Press, 2005. – 1256 p.

3. Stevenson, D. E. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? / D. E. Stevenson, R. D. Hurst // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2007. – Vol. 64, N 22. – P. 2900–2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7237-1>
4. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail / E. Schonbrunn [et al.] // *PNAS.* – 2001. – Vol. 98, N 4. – P. 1376–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376>
5. Влияние инкрустации семян смесями N-фосфонометилглицина и эпибрассинолида на рост растений / Н. А. Ламан [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 6. – С. 84–90.
6. Ламан, Н. А. Проращивание мелких, плоских и долго прорастающих семян рулонным методом с использованием синтетической вентиляционной сетки / Н. А. Ламан, С. И. Будай, О. Э. Барнатович // Изв. Акад. аграр. наук Респ. Беларусь. – 2000. – № 4. – С. 57–61.
7. Бубенчиков, Р. А. Спектрофотометрический метод определения содержания суммы флавоноидов в надземной части *Viola odorata* / Р. А. Бубенчиков // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – № 15–2 (104). – С. 192–195.
8. Влияние эпибрассинолида в широком диапазоне концентраций на рост проростков растений / Н. А. Ламан [и др.] // Регуляция роста, развития и продуктивности растений : материалы VIII Междунар. науч.-практ. конф., Минск, 28–30 окт. 2015 г. / науч. ред. Н. А. Ламан. – Минск, 2015. – С. 68.

References

1. Makarenko O. A., Levitskii A. P. Physiological functions of flavonoids in plants. *Fiziologiya i biokhimiya kul'turnykh rastenii* [Physiology and biochemistry of cultivated plants], 2013, vol. 45, no. 2, pp. 100–112 (in Russian).
2. Andersen O. M., Markham K. R. (eds.). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and application*. New York, CRC Press Publ., 2005. 1256 p.
3. Stevenson D. E., Hurst R. D. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, vol. 64, no. 22, pp. 2900–2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7237-1>
4. Schonbrunn E., Eschenburg S., Shuttleworth W. A., Schloss J. V., Amrhein N., Evans J. N. S., Kabsch W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98, no. 4, pp. 1376–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376>
5. Laman N. A., Kem K. R., Khripach V. A., Sudnik A. F. The effect of seed incrustation with mixtures of N-phosphonomethylglycine and epibrassinolide on plant growth. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 6, pp. 84–90 (in Russian).
6. Laman N. A., Budai S. I., Barnatovich O. E. Germination of small, flat and long-germinating seeds by the roll culture method using a synthetic ventilation mesh. *Izvestiya Akademii agrarnykh nauk Respubliki Belarus'* [Proceedings of the Academy of Agrarian Sciences of the Republic of Belarus], 2000, no. 4, pp. 57–61 (in Russian).
7. Bubenichikov R. A. Spectrophotometric method for determining the content of the sum of flavonoids in the aerial part of *Viola odorata*. *Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Estestvennye nauki* [Scientific bulletin of Belgorod State University. Series Natural Sciences], 2011, no. 15–2 (104), pp. 192–195 (in Russian).
8. Laman N. A., Kem K. R., Khripach V. A., Sudnik A. F. Effect of epibrassinolide in a wide range of concentrations on the growth of plant seedlings. *Regulyatsiya rosta, razvitiya i produktivnosti rastenii: materialy VIII Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (Minsk, 28–30 oktyabrya 2015 goda)* [Regulation of plant growth, development and productivity: materials of the VIII International scientific conference (Minsk, October 28–30, 2015)]. Minsk, 2015, p. 68 (in Russian).

Информация об авторах

Кем Карина Робертовна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kem-666@mail.ru

Ламан Николай Афанасьевич – академик, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

Information about the authors

Karina R. Kem – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kem-666@mail.ru

Nikolai A. Laman – Academician, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nikolai.laman@gmail.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.355:582.663:58.032.3

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-282-294>

Поступила в редакцию 04.05.2021

Received 04.05.2021

Л. Ф. Кабашникова¹, И. Н. Доманская¹, Т. С. Пилипович¹, Л. В. Пашкевич¹,
А. В. Мартысюк¹, С. М. Мотылева², М. С. Гинс³, Н. В. Тетянников²

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства,
Москва, Российская Федерация

³Федеральный научный центр овощеводства, Москва, Российская Федерация

СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ПАРАМЕТРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ЛИСТЬЯХ АМАРАНТА ПРИ НАРАСТАЮЩЕМ ВОДНОМ ДЕФИЦИТЕ

Аннотация. Изучена динамика содержания фотосинтетических пигментов и параметров окислительного стресса при нарастающем водном дефиците в листьях 40-дневных растений двух видов амаранта – *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) и *Amaranthus caudatus* L. (сорт Чырвоны аксамит), выращенных в горшечной культуре. Обнаружены видовые особенности развития водного дефицита в листьях амаранта: у растений амаранта *Amaranthus paniculatus* L. уже через 4 дня почвенной засухи отмечалось более сильное развитие водного дефицита (WD), чем у *Amaranthus caudatus* L., а через 8 дней WD у двух видов возрастал до 73,7 и 55,7 % соответственно. При умеренной засухе количество фотосинтетических пигментов (хлорофилла (Хл) и каротиноидов) в пересчете на сухую массу листа увеличивалось у двух видов амаранта, но через 8 дней почвенной засухи содержание Хл ($a + b$) было снижено в 2,0–2,1 раза, а каротиноидов – в 1,8–1,9 раза относительно физиологического уровня. В результате 4-дневной почвенной засухи в листьях *Amaranthus paniculatus* L. происходило существенное снижение содержания активных форм кислорода (АФК) и активности перекисного окисления липидов (ПОЛ), тогда как у *Amaranthus caudatus* L. наблюдалось повышение уровней АФК и ПОЛ. При возрастании давления стрессового фактора в листьях амаранта двух изученных видов отмечалось снижение содержания АФК и активности ПОЛ относительно физиологических значений. Предполагается, что на разных этапах почвенной засухи в листьях изученных видов амаранта имеются различия в механизмах генерации АФК и процессах ПОЛ.

Ключевые слова: водный дефицит, фотосинтетические пигменты, активные формы кислорода, перекисное окисление липидов, амарант, *Amaranthus paniculatus* L., *Amaranthus caudatus* L.

Для цитирования: Содержание фотосинтетических пигментов и параметры окислительного стресса в листьях амаранта при нарастающем водном дефиците / Л. Ф. Кабашникова [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 282–294. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-282-294>

Luidmila F. Kabashnikova¹, Irina N. Domanskaya¹, Tatsiana S. Pilipovich¹, Liubou V. Pashkevich¹,
Hanna V. Martysiuk¹, Svetlana M. Motyleva², Murat S. Gins³, Nikolay V. Tetyannikov²

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

²Federal Horticultural Research Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery, Moscow, Russian Federation

³Federal Scientific Center of Vegetable Growing, Moscow, Russian Federation

PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS CONTENT AND PARAMETERS OF OXIDATIVE STRESS IN THE AMARANTH SPECIES WITH INCREASING WATER DEFICIENCY

Abstract. The dynamics of the photosynthetic pigments content and parameters of oxidative stress with an increasing water deficit in the leaves of 40-days-old plants of two amaranth species – *Amaranthus paniculatus* L. (cv. Rubin) and *Amaranthus caudatus* L. (cv. Chyrvony aksamit), grown in a pot culture, was studied. Specific features of the development of water deficiency in amaranth leaves were revealed: amaranth plants *Amaranthus paniculatus* L. showed a stronger development of water deficit in leaves than *Amaranthus caudatus* L. after 4-days soil drought, which after 8 days increased in two species to 73.7 and 55.7 %, respectively. Under moderate drought, the amount of photosynthetic pigments (chlorophyll (Chl) and carotenoids) based on dry leaf weight increased in two amaranth species, but after 8 days of soil drought, the content of Chl ($a + b$) was reduced by 2.0–2.1 times, and carotenoids – 1.8–1.9 times relative to the physiological level. As a result of a 4-days soil drought in the leaves of *Amaranthus paniculatus* L., there was a significant decrease in the content of reactive oxygen species (ROS) and the activity of lipid peroxidation (LPO), while in *Amaranthus caudatus* L. an increase in the levels of ROS and LPO was observed. With an increase in the pressure of the stress factor in the leaves of amaranth of the two studied species, a decrease in the ROS content and LPO activity relative to physiological values was revealed. A conclusion

was made about the different mechanisms of ROS generation and the flow of LPO processes at different stages of soil drought in the leaves of different amaranth species.

Keywords: water deficit, photosynthetic pigments, reactive oxygen species, lipid peroxidation, amaranth, *Amaranthus paniculatus* L., *Amaranthus caudatus* L.

For citation: Kabashnikova L. F., Domanskaya I. N., Pilipovich T. S., Pashkevich L. V., Martysiuk H. V., Motyleva S. M., Gins M. S., Tetyannikov N. V. Photosynthetic pigments content and parameters of oxidative stress in the amaranth species with increasing water deficiency. *Vestsi Natsyional'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 282–294 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-282-294>

Введение. Для растительных организмов вода является физическим и биохимическим компонентом, поэтому стратегии ее эффективного использования и повышения устойчивости культурных растений к засухе имеют первостепенное значение. В течение своего жизненного цикла растения могут испытывать частые периоды дефицита воды даже за пределами засушливых и полувасушливых районов. Некоторые различия в росте и выживании растений можно отнести скорее к разной способности поглощать, транспортировать и сохранять воду, чем к различиям в метаболизме [1]. Ранние реакции растений на водный стресс можно рассматривать как первую линию защиты, позволяющую выживать в течение непродолжительного времени. Чтобы пережить более длительные стрессовые периоды, растения должны пройти процесс акклиматизации, что в свою очередь приводит к изменениям метаболизма и/или структуры, опосредованным изменениями в регуляции экспрессии генов. Степень повреждения растительной клетки в результате действия засухи зависит от вида, сорта растения, продолжительности времени обезвоживания, стрессоустойчивости культуры.

Род *Amaranthus* включает много ценных зерновых и овощных культур [2], которые по типу фотосинтеза относятся к C4-растениям. Зерна и листья растений амаранта богаты питательными веществами и минералами [3,4], которые не только используются в пищу, но и служат источником сырья для фармацевтического и биотехнологического производства биологически активных субстанций. C4-растения развивались 50–60 млн лет назад, когда температура воздуха была выше на 8–10 °C, а концентрация CO₂ в атмосфере была ниже, чем сейчас. Однако и в настоящее время эти растения, находясь в засушливых и полувасушливых условиях [5], относятся к числу наиболее продуктивных видов. Около 7500 видов C4-растений обеспечивают 23 % первичной продуктивности в наземной биосфере [6] и составляют основные продовольственные и кормовые ресурсы во всем мире. Кроме того, рост населения планеты, а также прогнозируемое уменьшение доступности воды в нескольких географических регионах в связи с изменением климата предполагает увеличение использования C4-растений в сельском хозяйстве [7]. C4-растения могут сохранять фотосинтетическую активность [8] и рост корней и побегов [9] при потенциале воды, который ингибирует большинство C3-растений, имеют более высокую устойчивость устьиц и эффективнее используют воду (water use efficiencies, WUE), чем их C3-аналоги. Тем не менее все еще остается предметом спора вопрос, являются ли C4-растения более устойчивыми к недостаточному водообеспечению [10].

Известно, что стресс в результате засухи приводит к накоплению активных форм кислорода (АФК), которые могут инициировать деструктивные окислительные процессы, такие как перекисное окисление липидов (ПОЛ), выцветание хлорофилла (Хл) и бета-лаина, а также окисление белка [11]. Растения развили как ферментативные, так и неферментативные защитные системы для удаления и детоксикации АФК, что привело к формированию антиоксидантной защитной системы [12]. В результате засухи происходит активное накопление ряда соединений (например, пролина, α-токоферола и полифенолов), которые защищают растения от окислительного повреждения и позволяют сохранять положительное тургорное давление, что является обязательным условием для поддержания апертуры устьиц и газообмена [12]. Кроме того, неферментативные антиоксиданты, такие как пигменты листьев, аскорбиновая кислота, каротиноиды, фенолы и флавоноиды, играют защитную роль во избежание образования АФК [13]. Согласно заключению, представленному в работе [14], существует три основных типа реакции растений на стресс, вызванный засухой: предотвращение потери воды (например, осмотическая коррек-

тировка); защита клеточных компонентов (например, качественные и количественные изменения пигментов) и восстановление от окислительного повреждения (например, антиоксидантные системы).

В ряде работ, выполненных на растениях амаранта в качестве объектов исследования, были изучены некоторые антиоксидантные показатели высокоурожайных сортов [14–17]. Обнаружено, что в растениях *A. tricolor* стресс в условиях засухи приводил к снижению общей биомассы растений, удельной площади листьев, относительного содержания воды (RWC), фотосинтетических пигментов (Хл a , Хл b , Хл ($a + b$)) и растворимого белка, но вызывал увеличение содержания малонового диальдегида (МДА), H_2O_2 , пролина, каротиноидов, аскорбиновой кислоты, полифенолов, флавоноидов и общей антиоксидантной активности [18]. Изученные параметры, дифференциальные по отношению к сортам и степени стрессового воздействия засухи, были предложены для использования в новых программах создания сортов и в разрабатываемых программах их размножения. Положительно значимые корреляции между МДА, H_2O_2 , осмопротекторами и неферментативными антиоксидантами (пролин, фенолы, флавоноиды, общая антиоксидантная способность) позволили авторам предположить, что эти соединения играют жизненно важную роль в детоксикации АФК в растениях *A. tricolor*.

В Беларуси внедрение культуры амаранта ограничено недостаточными знаниями о ее экологии и физиологии, что препятствует широкому распространению этой ценной овощной культуры, особенно в северных регионах с низкой весенней температурой [19]. Проведенный анализ научной литературы свидетельствует об актуальности исследований, направленных на изучение окислительного статуса растений амаранта путем сравнения сортов разных видов в условиях почвенной засухи, что имеет важное значение для выявления видовых особенностей развития окислительного стресса и маркеров, определяющих засухоустойчивость разных генотипов амаранта.

Цель данного исследования – изучение особенностей развития окислительного стресса в листьях двух видов амаранта при водном дефиците, вызванном почвенной засухой.

Объекты и методы исследования. В исследованиях использовали растения амаранта двух видов – *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) и *Amaranthus caudatus* L. (сорт Чырвоны аксамит). Вид *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) декоративного назначения, районирован в Республике Беларусь в 2002 г., имеет ветвистый округлый стебель высотой до 2 м, ярко-красной или зеленой окраски [20]. Листья яйцевидно-ромбические, заостренные, шершавые, расположены на длинных черешках, красно-зеленого цвета. Мелкие цветки собраны в кисти, образующие в верхней части крупную (длиной до 70–80 см) ветвистую прямостоячую, иногда с наклонной верхушкой, ярко-красную, бордовую или зеленую метелку. Семена очень мелкие, округлые, блестящие, окраска их может быть черной, масса 1000 семян составляет 0,5–0,9 г. Вид *Amaranthus caudatus* L. (сорт Чырвоны аксамит) декоративного назначения, создан в ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», районирован в 2020 г., имеет стебель и листья зеленого цвета и соцветия красного цвета, высота растений – 130–140 см, масса 1000 семян – 0,6 г.

Растения амаранта выращивали в горшечной культуре на торфо-песчаном субстрате (4:1) до 40-дневного возраста в условиях климатокamеры, при температуре 22–24 °C, на полихроматическом белом свете ($120 \text{ мкМ квантов м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) при 14-часовом фотопериоде. Затем растения в опыте переставали поливать в течение 4 или 8 дней до появления первых признаков увядания. Контрольные растения поливали каждые 4 дня до увлажнения почвы. Для анализа использовали листья среднего яруса 44- и 48-дневных растений амаранта.

Параметры водного обмена в листьях амаранта определяли по содержанию сухого вещества (DMC), относительному содержанию воды (RWC) и водному дефициту (WD), которые вычисляли с использованием параметра TW (биомасса листа при достижении его клетками состояния полного тургора в результате 24-часовой инкубации в дистиллированной воде) по формулам, приведенным в работе [21]. Для этого отбирали три навески из средней пробы измельченных листьев, взвешивали, затем высушивали до постоянного веса при 105 °C. Сырую (FW) и сухую (DW) биомассу определяли на весах Ohaus AR2140 (Япония).

DMC , RWC и WD вычисляли по следующим формулам:

$$DMC = DW/FW \cdot 100 \%,$$

$$RWC = (FW - DW)/(TW - DW) \cdot 100 \%,$$

$$WD = (TW - FW)/TW \cdot 100 \%.$$

Для экстракции пигментов использовали высечки из мезофилла листа. Экстракцию Хл и каротиноидов производили в трехкратной биологической повторности, используя 99,5 %-ный ацетон. Количество пигментов в экстрактах определяли по спектрам поглощения на спектрофотометре Shimadzu UV-2401PC (Shimadzu, Япония). Содержание пигментов рассчитывали по формулам, предложенным в работе [22]:

$$C_a = 9,784E_{662} - 0,99E_{644},$$

$$C_b = 21,426E_{644} - 4,65E_{662},$$

$$C_{car} = 4,695E_{440,5} - 0,268(C_a + C_b),$$

где C_a – концентрация Хл a , мкг/мл; C_b – концентрация Хл b , мкг/мл; C_{car} – концентрация каротиноидов, мкг/мл; E – экстинкция при соответствующей длине волны.

Содержание фотосинтетических пигментов рассчитывали на 1 г сухой массы листа.

Для анализа активности ПОЛ определяли количество активных продуктов, взаимодействующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по методу, приведенному в работе [23]. Растительный материал гомогенизировали в 5 мМ фосфатном буфере (рН 7,2). К гомогенату добавляли равный объем 0,5 %-ной ТБК в 20 %-ной трихлоруксусной кислоте. Полученные образцы нагревали на кипящей бане в течение 20 мин, охлаждали и центрифугировали при 3000 об/мин. Супернатант измеряли фотометрически при 532 нм. Количество МДА рассчитывали с учетом миллимолярного коэффициента экстинкции комплекса МДА-ТБК, который с поправкой на неспецифическое поглощение при $\lambda = 600$ нм ($1,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) составил $155 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [24].

Общий уровень АФК оценивали с помощью флуоресцентного теста, в основе которого лежит образование дихлорфлуоресцеина (ДХФ) из нефлуоресцирующего дихлорфлуоресцеиндиацетата (ДХФДА) в экстрактах листьев. Навески листьев по 0,25 г гомогенизовали в 2 мл 0,2 н HClO_4 . Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 г. Для нейтрализации кислотности к 500 мкл суспензии добавляли 37–38 мкл 4 М КОН (конечное значение рН – 7,5–8,0) и центрифугировали 5 мин при 13 000 г. Для определения АФК к 950 мкл 0,15 М Трис-HCL буфера (рН 7,5) последовательно добавляли 25 мкл нейтрализованного супернатанта и 25 мкл 0,15 мМ раствора ДХФДА. Контролем служит проба, состоящая из 975 мкл 0,15 М Трис-HCL буфера и 25 мкл 0,15 мМ ДХФДА. Все пробы инкубировали в течение 20 мин в термостате при 37 °С в темноте. Уровень АФК определяли по калибровочной кривой, регистрируя флуоресценцию ДХФ ($\lambda_{\text{возб}} = 496$, $\lambda_{\text{рег}} = 524$) с помощью спектрофлуориметра «СОЛАР СМ 2203» («СОЛАР», Беларусь) [25].

Для статистической обработки данных использовали стандартные пакеты программ Excel 2016, SigmaPlot 12.0 и статистические методы, принятые в области биологических исследований [26]. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Различия по сравнению с контролем считали достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Параметры водного обмена в листьях амаранта через 4 и 8 дней почвенной засухи представлены в табл. 1, 2. Обнаружено, что у вида *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) недостаток влаги вызывал снижение RWC в листьях на 33,1 % через 4 дня почвенной засухи, а через 8 дней – на 68,7 % по сравнению с контролем. Соответственно, в условиях засухи в листьях *Amaranthus paniculatus* L. водный дефицит через 4 дня возрастал в 2,6 раза, через 8 дней – в 5,2 раза, а DMC увеличилось в 1,6 и 4,3 раза соответственно. Для *Amaranthus caudatus* L. (сорт Чырвоны аксамит) признаки обезвоживания листьев через 4 дня засухи были слабо выражены, а через 8 дней параметр RWC снизился на 36,6 % относительно контроля, что вызывало увеличение показателей WD и DMC в 2,1 и 2,4 раза соответственно.

Т а б л и ц а 1. Параметры водного обмена в листьях двух видов амаранта (*Amaranthus caudatus* L. и *Amaranthus paniculatus* L.) через 4 дня почвенной засухиT a b l e 1. Parameters of water deficit in leaves of two amaranth species (*Amaranthus caudatus* L. and *Amaranthus paniculatus* L.) under 4-days of soil drought

Параметр	<i>Amaranthus caudatus</i> L. (сорт Чырвоны аksamит)		<i>Amaranthus paniculatus</i> L. (сорт Рубин)	
	Контроль	Засуха	Контроль	Засуха
<i>RWC</i> , %	71,9 ± 6,8	66,0 ± 5,8	78,2 ± 0,7	45,1 ± 3,5*
<i>WD</i> , %	25,4 ± 1,5	30,1 ± 2,7*	18,1 ± 1,3	46,2 ± 2,7*
<i>DMC</i> , %	12,4 ± 0,9	16,3 ± 1,1	13,5 ± 0,9	22,1 ± 1,6*

П р и м е ч а н и е. * – достоверность различий с соответствующим контролем при $p < 0,05$.
То же в табл. 2 и на рис. 1–3.

Т а б л и ц а 2. Параметры водного обмена в листьях двух видов амаранта (*Amaranthus caudatus* L. и *Amaranthus paniculatus* L.) через 8 дней почвенной засухиT a b l e 2. Parameters of water deficit in leaves of two amaranth species (*Amaranthus caudatus* L. and *Amaranthus paniculatus*) under 8-days of soil drought

Параметр	<i>Amaranthus caudatus</i> L. (сорт Чырвоны аksamит)		<i>Amaranthus paniculatus</i> L. (сорт Рубин)	
	Контроль	Засуха	Контроль	Засуха
<i>RWC</i> , %	70,4 ± 5,7	33,8 ± 2,1*	84,4 ± 6,4	15,7 ± 0,8*
<i>WD</i> , %	26,4 ± 1,4	55,7 ± 4,2*	14,1 ± 0,8	73,7 ± 5,6*
<i>DMC</i> , %	14,6 ± 0,9	35,7 ± 2,1*	11,2 ± 0,5	47,8 ± 2,0*

После 4-дневной почвенной засухи количество фотосинтетических пигментов (Хл и каротиноидов) в пересчете на сухую массу листа увеличивалось у двух видов амаранта, причем наиболее существенно у вида *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) (рис. 1, а). При этом соотношение Хл *a*/Хл *b* в листьях *Amaranthus caudatus* L. несколько возрастало относительно контроля, а в листьях *Amaranthus paniculatus* L. – уменьшалось на фоне сниженного соотношения Хл (*a* + *b*)/каротиноиды у двух изученных видов. Через 8 дней в физиологических условиях наблюдалось онтогенетическое увеличение содержания фотосинтетических пигментов в листьях двух видов амаранта, причем у вида *Amaranthus paniculatus* L. более значительное, чем у вида *Amaranthus caudatus* L. В условиях засухи в этот период в листьях двух видов амаранта происходило снижение содержания Хл (*a* + *b*) в 2,0–2,1 раза относительно контроля (рис. 1, б). Содержание фракций отдельных пигментов (Хл *a* и Хл *b*) изменялось аналогичным образом, в результате чего соотношение Хл *a*/Хл *b* в опыте и контроле практически не изменялось. При усилении почвенной засухи общее количество каротиноидов в листьях амаранта двух изученных видов снижалось в 1,8–1,9 раза по сравнению с контролем, без существенного изменения соотношения Хл (*a* + *b*)/каротиноиды в листьях. В целом, полученные результаты свидетельствуют о негативном влиянии засухи на накопление основных фотосинтетических пигментов (Хл и каротиноидов) в листьях двух видов амаранта. Следует отметить, что величина снижения содержания фотосинтетических пигментов (Хл (*a* + *b*) и каротиноидов) для *Amaranthus paniculatus* L. и *Amaranthus caudatus* L. оказалась практически одинаковой, несмотря на разную степень водного дефицита в листьях этих видов.

Как известно, процесс фотосинтеза в растительных организмах сопровождается образованием молекулярного кислорода (O_2), что необходимого для нормального функционирования биологических систем. Однако O_2 несет потенциальную угрозу развития в клетках фотодеструктивных процессов, связанных с образованием АФК, таких как молекулярный синглетный кислород (1O_2), супероксидный анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), и др. [27]. В процессе жизнедеятельности растений ликвидация АФК происходит за счет защитной антиоксидантной системы, включающей низкомолекулярные антиоксиданты, антиоксидантные ферменты и защитные белки. В стрессовых условиях образование АФК усиливается, что в ряде случаев приводит к усилению деструктивных процессов в растениях и даже к гибели

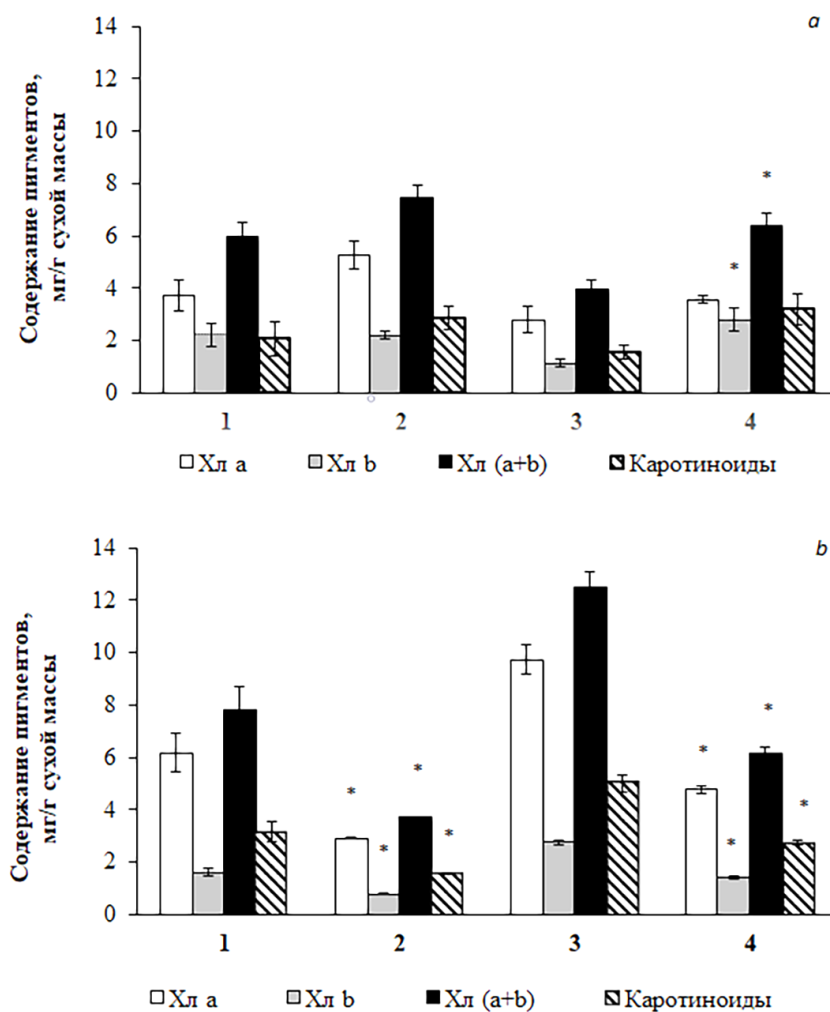


Рис. 1. Влияние 4-дневной (a) и 8-дневной (b) почвенной засухи на содержание фотосинтетических пигментов в листьях *Amaranthus caudatus* L., сорт Чырвоны аксамит (1 – контроль, 2 – засуха) и *Amaranthus paniculatus* L., сорт Рубин (3 – контроль, 4 – засуха)

Fig. 1. Effect of 4-days (a) and 8-days (b) soil drought on photosynthetic pigments content in amaranth leaves of species *Amaranthus caudatus* L., Chyrvony aksamit (1 – control, 2 – drought) and *Amaranthus paniculatus* L., Rubin (3 – control, 4 – drought)

наиболее чувствительных видов. В частности, засуха, как и другие абиотические факторы, приводит к многократному увеличению в клетках уровня АФК, таких как $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и $\cdot OH$. Повышение уровня АФК при стрессе действует как сигнал тревоги, который запускает акклиматизационные/защитные реакции посредством определенных путей передачи сигналов, которые включают H_2O_2 в качестве вторичного мессенджера. Передача сигналов АФК в условиях засухи связана с сигнальными путями, в которых участвуют абсцизовая кислота (АБК), ионы Ca^{2+} и сахара, и вызывает как активацию, так и подавление АБК-зависимых сигнальных путей [28]. В литературе накоплены сведения об участии различных АФК в трансдукции сигналов, приводящих к активации ферментов-антиоксидантов и экспрессии их генов [27].

Проведен анализ общего содержания АФК как показателя окислительного потенциала в клетках мезофилла листа у двух видов амаранта – *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) и *Amaranthus caudatus* L. (сорт Чырвоны аксамит) в физиологических условиях и при водном дефиците. В условиях прогрессирующей почвенной засухи выявлена разная динамика изменения содержания АФК и развития водного дефицита в листьях амаранта *Amaranthus caudatus* L. Так, через 4 сут в результате засухи зарегистрировано повышение содержания АФК в 1,58 раза относительно контроля (рис. 2, a), тогда как *RWC* практически не изменялось (см. табл. 1), а значения водного

дефицита увеличивались на 4,7 %, что указывает на слабое развитие водного дефицита в листьях. При усилении засухи в листьях амаранта *Amaranthus caudatus* L. отмечено снижение содержания АФК в 2,27 раза относительно контроля (рис. 2, *b*) на фоне возрастания водного дефицита в 2,1 раза (табл. 2).

У растений *Amaranthus paniculatus* L. отмечено более сильное развитие водного дефицита в листьях уже через 4 дня почвенной засухи, чем у *Amaranthus caudatus* L. (см. табл. 1). Таким стрессовым условиям соответствовало уменьшение содержания АФК на 20 % по сравнению с их уровнем при нормальном поливе (рис. 2, *a*). Через 8 дней усиление действия стрессового фактора привело к росту водного дефицита в 5,2 раза по сравнению с контролем, при этом содержание АФК в листьях этого вида снизилось на 37,7 % от контрольного уровня (рис. 2, *b*). Повышение уровня АФК в листьях *Amaranthus caudatus* L. при умеренном водном дефиците можно рассматривать как сигнальный процесс, обеспечивающий формирование защитных реакций при недо-

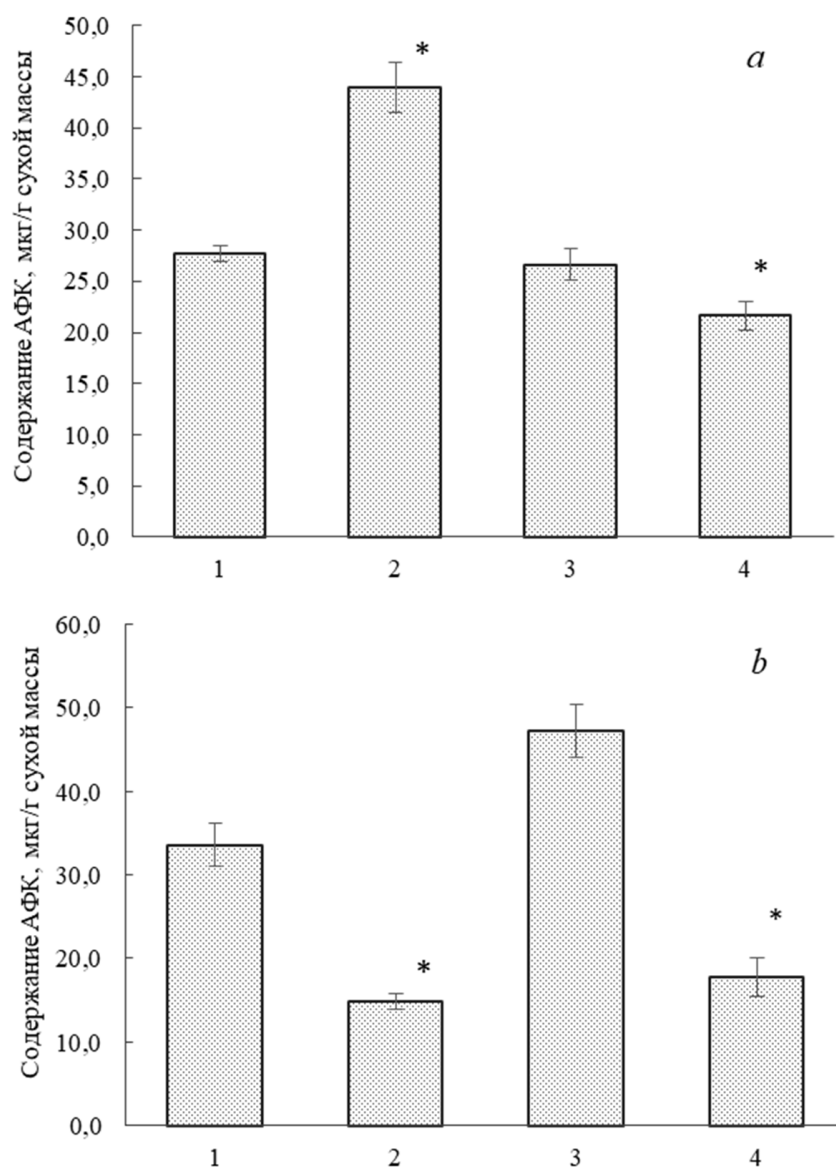


Рис. 2. Влияние 4-дневной (*a*) и 8-дневной (*b*) почвенной засухи на содержание АФК в листьях *Amaranthus caudatus* L., сорт Чырвоны аксамит (1 – контроль, 2 – засуха) и *Amaranthus paniculatus* L., сорт Рубин (3 – контроль, 4 – засуха)

Fig. 2. Effect of 4-days (*a*) and 8-days (*b*) soil drought on common content of reactive oxygen species in amaranth leaves of species *Amaranthus caudatus* L., Chyrvony aksamit (1 – control, 2 – drought) and *Amaranthus paniculatus* L., Rubin (3 – control, 4 – drought)

статочном водоснабжении растительных клеток [28]. Вместе с тем при возрастании давления стрессового фактора в листьях амаранта двух видов наблюдалось снижение уровня АФК относительно физиологических значений. Механизмы уменьшения продукции АФК в данном случае требуют специального исследования, однако в целом полученные данные свидетельствуют о различных механизмах генерации АФК в листьях амаранта на разных этапах почвенной засухи.

Полиненасыщенные жирные кислоты, присутствующие в мембранах растений, реагируют с АФК, что вызывает развитие процессов ПОЛ. В результате образуются высокореактивные химические соединения на основе липидов, которые могут подвергаться дальнейшему ферментативному или неферментативному разложению с образованием новых компонентов, таких как реактивные карбонильные соединения (РКС) [29]. Такие РКС способны избирательно взаимодействовать с белками, часто вызывая потерю их функциональной активности в результате реакций липоокисления. Хотя у растений существует базовая концентрация продуктов липоксидации (вероятно, участвующих в передаче сигналов), их концентрация и изменчивость возрастают экспоненциально, когда растения подвергаются биотическим/абиотическим стрессам. Такие условия обычно увеличивают присутствие АФК и экспрессию антиоксидантных ферментов вместе с РКС, а также метаболитов, возникающих в результате реакции последних с белками. Напротив, растения, обладающие определенной устойчивостью, могут демонстрировать повышенные уровни АФК и антиоксидантных ферментов, тогда как уровни маркеров окисления липидов в них, таких как МДА, обычно снижены [29].

Для характеристики активности ПОЛ в листьях амаранта в условиях засухи определяли содержание МДА, количество которого является одним из важнейших показателей засухоустойчивости растений [30]. Установлено, что динамика изменений содержания МДА в расчете на единицу сухой массы листа полностью соответствует динамике изменений содержания АФК в листьях двух видов амаранта (рис. 3, *a, b*). Так, для *Amaranthus caudatus* L. зарегистрировано увеличение количества МДА в 1,6 раза после 4-дневной засухи и снижение этого показателя в 2,7 раза при возрастании водного дефицита по отношению к соответствующим контрольным значениям. В листьях *Amaranthus paniculatus* L. при умеренном водном дефиците наблюдалось снижение продуктов ПОЛ в 1,9 раза по сравнению с физиологическим уровнем, а при продолжении засухи количество ТБК-активных продуктов снижалось в 1,6 раза относительно соответствующих контрольных значений. Таким образом, установлено, что в условиях почвенной засухи в листьях амаранта происходит изменение состояния липидного бислоя цитоплазматических мембран, тесно связанное со степенью оводненности листьев и видовыми особенностями растений.

Следует отметить, что для выяснения причин, лежащих в основе видовых особенностей развития окислительного стресса в листьях амаранта в условиях почвенной засухи, требуется проведение специальных исследований. Исходя из имеющихся в литературе данных, можно предположить, что важным фактором, определяющим при обезвоживании характер протекания окислительных процессов в листьях амаранта двух видов, является разное содержание низкомолекулярных антиоксидантов. Известно, что низкомолекулярные фенольные соединения в листьях этих растений представлены флавоноидами, доминирующими компонентами которых являются рутин, кверцетин и трифолен [31, 32]. Листья этого рода содержат также комплекс водорастворимых витаминов: аскорбиновую кислоту, ниацин, витамины группы В. Антиоксидантное действие флавоноидных соединений обусловлено их способностью связывать свободные радикалы и образовывать соединения с ионами металлов (меди, железа), что ингибирует их каталитическое действие в процессах окисления [33]. В работе [34] при анализе водных экстрактов из стеблевых листьев двух сортов (Валентина и Early Splendor) вида *Amarantus tricolor* L. были обнаружены водорастворимые антиоксиданты – амарантин и аскорбиновая кислота, содержание которых у сорта Валентина было значительно выше, чем у сорта Early Splendor, в то время как у последнего отмечалось максимальное количество фотосинтезирующих пигментов. Известно, что важную роль в защите растительных клеток от окислительного стресса выполняют фотосинтетические пигменты – каротиноиды, содержание которых, по нашим данным, в листьях двух изученных видов также существенно различалось (см. рис. 1). На наш взгляд, дальнейшее

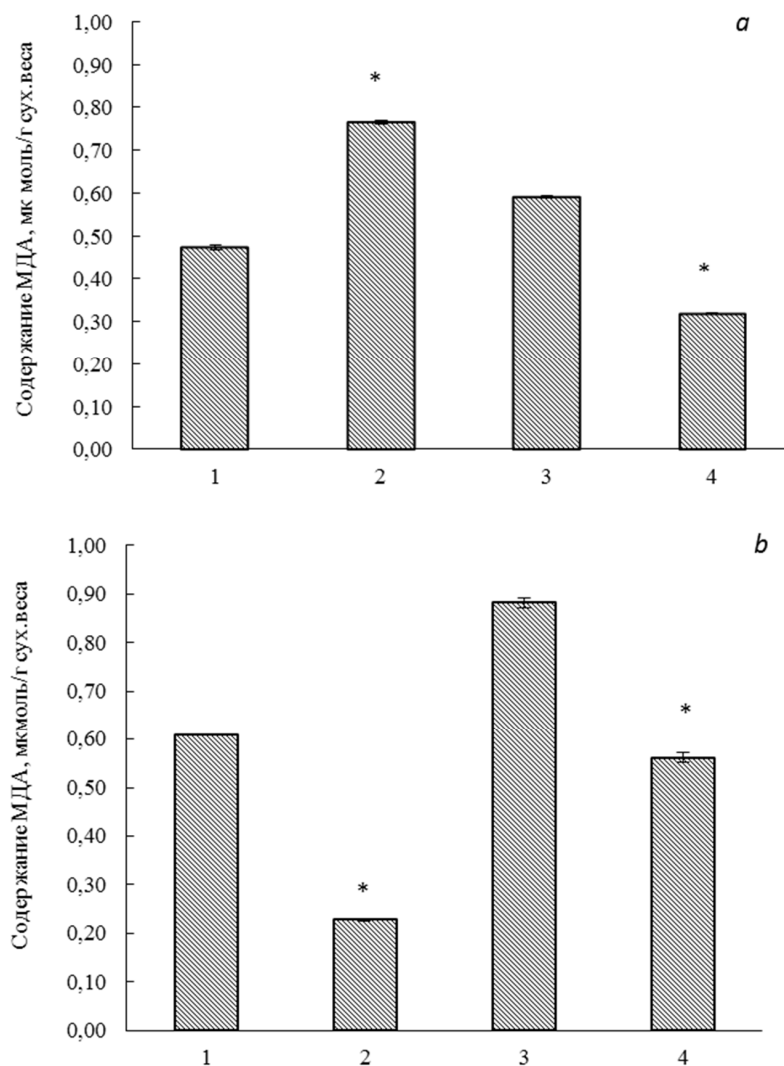


Рис. 3. Влияние 4-дневной (a) и 8-дневной (b) почвенной засухи на содержание МДА в листьях *Amaranthus caudatus* L., сорт Чырвоны аксамит (1 – контроль, 2 – засуха) и *Amaranthus paniculatus* L., сорт Рубин (3 – контроль, 4 – засуха)

Fig. 3. Effect of 4-days (a) and 8-days (b) soil drought on MDA content in leaves of species *Amaranthus caudatus* L., Chyrvony aksamit (1 – control, 2 – drought) and *Amaranthus paniculatus* L., Rubin (3 – control, 4 – drought)

изучение содержания низкомолекулярных антиоксидантов в листьях разных видов амаранта позволит установить основные причины видовых особенностей развития окислительного стресса в листьях этих растений в условиях почвенной засухи.

Закключение. Обнаружены видовые особенности развития водного дефицита в листьях амаранта в результате почвенной засухи: у растений *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) уже через 4 дня недостаточного водообеспечения отмечалось более сильное развитие водного дефицита в листьях, чем у *Amaranthus caudatus* L. (сорт Чырвоны аксамит). После 4-дневной почвенной засухи количество фотосинтетических пигментов (Хл и каротиноидов) в пересчете на сухую массу листа увеличилось у двух видов амаранта, причем наиболее существенно у вида *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин). Через 8 дней в физиологических условиях наблюдалось онтогенетическое увеличение содержания фотосинтетических пигментов в листьях двух видов амаранта, причем у *Amaranthus paniculatus* L. более значительное, чем у *Amaranthus caudatus* L., но в результате засухи содержание Хл и каротиноидов в листьях двух видов амаранта снижалось практически одинаково относительно физиологического уровня. В листьях *Amaranthus paniculatus* L. в условиях засухи происходило существенное снижение содержания АФК и активности ПОЛ, тогда как у *Amaranthus caudatus* L. при умеренном водном дефиците отмечалось повышение

этих показателей. Вместе с тем при возрастании давления стрессового фактора в листьях амаранта этих двух видов наблюдалось снижение как уровней АФК, так и активности ПОЛ относительно физиологических значений.

На основании полученных данных можно предположить, что на разных этапах почвенной засухи в листьях изученных видов амаранта имеются различия в механизмах генерации АФК и процессах ПОЛ.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биоразнообразия растительных ресурсов ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» С. Е. Лобану и И. М. Савич за научную консультацию и предоставленный семенной и посадочный материал двух видов амаранта – *Amaranthus paniculatus* L. (сорт Рубин) и *Amaranthus caudatus* L. (сорт Чырвоны аксамит).

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б20Р-298) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-516-00012).

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the staff of the laboratory of biodiversity of plant resources of the State Scientific Institution “Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus” S. Ye. Loban. and I. M. Savich for scientific advice and provided seed and planting material for two species of amaranth – *Amaranthus paniculatus* L. (Rubin variety) and *Amaranthus caudatus* L. (Chyrvony aksamit variety).

This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (project No. B20R-298) and the Russian Foundation for Basic Research (project no. № 20-516-00012).

Список использованных источников

1. Urban, L. Assessing the effects of water deficit on photosynthesis using parameters derived from measurements of leaf gas exchange and of chlorophyll a fluorescence / L. Urban, J. Aarouf, L. Bidel // Front. Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – Art. 2068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02068>
2. Variations in structural, biochemical, and physiological traits of photosynthesis and resource use efficiency in *Amaranthus* species (NAD-ME-type C4) / N. Tsutsumi [et al.] // Plant Product. Sci. – 2017. – Vol. 20, N 3. – P. 300–312. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2017.1320948>
3. Chemical and mineral composition of amaranth (*Amaranthus* L.) species collected from central Malawi / N. A. Kachiguma [et al.] // J. Food Res. – 2015. – Vol. 4, N 4. – P. 92. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n4p92>
4. Таипова, Р. М. Амарант: особенности культуры, применения, перспективы возделывания в России и создания отечественных трансгенных сортов / Р. М. Таипова, Б. Р. Кулуев // Биомика. – 2015. – Т. 7, № 4. – С. 284–299.
5. Edwards, E. J. Climate, phylogeny and the ecological distribution of C4 grasses / E. J. Edwards, Ch. J. Still // Ecol. Lett. – 2008. – Vol. 11, N 3. – P. 266–278. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01144.x>
6. Global distribution of C3 and C4 vegetation: Carbon cycle implications / Ch. J. Still [et al.] // Global Biogeochem. Cycles. – 2003. – Vol. 17, N 1. – P. 1006. <https://doi.org/10.1029/2001GB001807>
7. de Carvalho, R. C. Photosynthesis by six Portuguese maize cultivars during drought stress and recovery / R. C. de Carvalho, A. Cunha, J. M. da Silva // Acta Physiol. Plant. – 2011. – Vol. 33, N 2. – P. 359–374. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0555-1>
8. Photorespiration in C4 grasses remains slow under drought conditions / A. E. Carmo-Silva [et al.] // Plant, Cell & Environment. – 2008. – Vol. 31, N 7. – P. 925–940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01805.x>
9. Photosynthetic responses of C3 and C4 species to seasonal water variability and competition / S. Niu [et al.] // J. Exp. Bot. – 2005. – Vol. 56, N 421. – P. 2867–2876. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri281>
10. Ghannoum, O. C4 photosynthesis and water stress / O. Ghannoum // Ann. Bot. – 2009. – Vol. 103, N 4. – P. 635–644. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn093>
11. Sarker, U. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus* leafy vegetable / U. Sarker, S. Oba // BMC Plant Biol. – 2018. – Vol. 18, N 1. – Art. 258. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1484-1>
12. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress / M. Faize [et al.] // J. Exp. Bot. – 2011. – Vol. 62, N 8. – P. 2599–2613. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq432>
13. Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters / Šircelj H. [et al.] // Scientia Horticulturae. – 2007. – Vol. 113, N 4. – P. 362–369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2007.04.012>
14. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought / H. Šircelj [et al.] // J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 162, N 12. – P. 1308–1318. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.01.018>
15. Sarker, U. Catalase, superoxide dismutase, and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor* / U. Sarker, S. Oba // Sci. Rep. – 2018. – Vol. 8, N 1. – Art. 16496. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34944-0>
16. Variability, heritability and genetic association in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor*) / U. Sarker [et al.] // Span J. Agric. Res. – 2015. – Vol. 13, N 2. – P. e0702. <https://doi.org/10.5424/sjar/2015132-6843>

17. Sarker, U. Protein, dietary fiber, minerals, antioxidant pigments and phytochemicals, and antioxidant activity in selected red morph *Amaranthus* leafy vegetable / U. Sarker, S. Oba // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14, N 12. – P. e0222517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222517>
18. Sarker, U. Leaf pigmentation, its profiles and radical scavenging activity in selected *Amaranthus tricolor* leafy vegetables / U. Sarker, S. Oba // Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10, N 1. – Art. 18617. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66376-0>
19. Дроздов, С. Н. Свето-температурные характеристики фотосинтеза у двух видов амаранта / С. Н. Дроздов, Е. С. Холопцева, В. В. Коломейченко // Сельскохозяйств. биология. – 2014. – № 5. – С. 96–101.
20. Вечер, Н. Н. Влияние норм высева амаранта метельчатого (*Amaranthus paniculatus* L.) на семенную продуктивность / Н. Н. Вечер, Т. М. Дайнеко // Глав. агроном. – 2020. – № 8. – С. 52–55.
21. Кабашникова, Л. Ф. Методы оценки физиологического состояния растений в условиях засухи : науч.-метод. пособие / Л. Ф. Кабашникова, Н. Л. Пшибытко, Л. М. Абрамчик. – Минск : Белорус. наука, 2007. – 42 с.
22. Шлык, А. А. Определение хлорофилла и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев / А. А. Шлык // Биохимические методы в физиологии растений : сб. ст. / отв. ред. О. А. Павлинова. – М., 1971. – С. 154–170.
23. Мерзляк, М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки / М. Н. Мерзляк. – М. : ВИНТИ, 1989. – 168 с.
24. Heath, R. L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation / R. L. Heath, L. Packer // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – Vol. 125, N 1. – P. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
25. Kozel, N. V. Barley leaf antioxidant system under photooxidative stress induced by Rose Bengal / N. V. Kozel, N. V. Shalygo // Russian. J. Plant Physiol. – 2009. – Vol. 56, N 3. – P. 316–322. <https://doi.org/10.1134/S1021443709030030>
26. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика / П. Ф. Рокицкий. – Изд. 3-е, испр. – Минск : Вышэйш. шк., 1973. – 320 с.
27. Foyer, C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis / C. H. Foyer // Environment. Exp. Botany. – 2018. – Vol. 154. – P. 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
28. Cruz de Carvalho, M. H. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling / M. H. Cruz de Carvalho // Plant Signal Behav. – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. 156–165. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>
29. de Dios Alché, J. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants / J. de Dios Alché // Redox Biol. – 2019. – Vol. 23. – P. e101136. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>
30. Labudda, M. Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding [Electronic resource] / M. Labudda. – 2013. – Mode of access: <http://www.e-wydawnictwo.eu/Document/DocumentPreview/3342>. – Date of access: 19.03.2021.
31. Гинс, М. С. Изменение биохимического состава листьев амаранта в результате селекции на повышенное содержание пигмента амарантина / М. С. Гинс, В. К. Гинс, П. Ф. Кононков // Прикл. биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, № 5. – С. 556–562.
32. Хазиев, Р. Ш. Изучение биологически активных веществ растений рода *Amaranthus* L. : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 03.00.04 / Р. Ш. Хазиев ; Казан. гос. ун-т. – Казань, 1993. – 20 с.
33. Фаустова, Н. М. Комплексная фитохимическая, характеристика листьев *Amaranthus cruentus* (Amaranthaceae) / Н. М. Фаустова, В. М. Косман // Раст. ресурсы. – 2009. – Т. 45, вып. 4. – С. 39–53.
34. Содержание и пигментный состав автотрофной и гетеротрофной ткани листьев амаранта вида *A. tricolor* L. / М. С. Гинс [и др.] // Овощи России. – 2016. – № 3. – С. 79–83.

References

1. Urban L., Aarrouf J., Bidel L. Assessing the effects of water deficit on photosynthesis using parameters derived from measurements of leaf gas exchange and of chlorophyll a fluorescence. *Frontiers in Plant Science*, 2017, vol. 8, art. 2068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02068>
2. Tsutsumi N., Tohya M., Nakashima T., Ueno O. Variations in structural, biochemical, and physiological traits of photosynthesis and resource use efficiency in *Amaranthus* species (NAD-ME-type C4). *Plant Production Science*, 2017, vol. 20, no. 3, pp. 300–312. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2017.1320948>
3. Kachiguma N., Mwase W., Maliro M., Damaliphetsa A. Chemical and mineral composition of amaranth (*Amaranthus* L.) species collected from central Malawi. *Journal of Food Research*, 2015, vol. 4, no. 4, p. 92. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n4p92>
4. Taipova R. M., Kuluyev B. R. Amaranth: features of culture, application, prospects of cultivation in Russia and the creation of domestic transgenic varieties. *Biomika = Biomics*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 284–299 (in Russian).
5. Edwards E. J., Still Ch. J. Climate, phylogeny and the ecological distribution of C4 grasses. *Ecology Letters*, 2008, vol. 11, no. 3, pp. 266–278. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01144.x>
6. Still Ch. J., Berry J. A., Collatz G. J., DeFries R. S. Global distribution of C3 and C4 vegetation: Carbon cycle implications. *Global Biogeochemical Cycles*, 2003, vol. 17, no. 1, p. 1006. <https://doi.org/10.1029/2001GB001807>
7. De Carvalho R. C., Cunha A., da Silva J. M. Photosynthesis by six Portuguese maize cultivars during drought stress and recovery. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, vol. 33, no. 2, pp. 359–374. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0555-1>
8. Carmo-Silva A. E., Powers S. J., Keys A. J., Arrabaça M. C., Parry M. A. J. Photorespiration in C4 grasses remains slow under drought conditions. *Plant, Cell and Environment*, 2008, vol. 31, no. 7, pp. 925–940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01805.x>

9. Niu S., Yaun Z., Zhang Y., Liu W., Zhang L., Huang J., Wan S. Photosynthetic responses of C3 and C4 species to seasonal water variability and competition. *Journal of Experimental Botany*, 2005, vol. 56, no. 421, pp. 2867–2876. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri281>
10. Ghannoum O. C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*, 2009, vol. 103, no. 4, pp. 635–644. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn093>
11. Sarker U., Oba S. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of *Amaranthus* leafy vegetable. *BMC Plant Biology*, 2018, vol. 18, no. 1, art. 258. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1484-1>
12. Faize M., Burgos L., Faize L., Piqueras A., Nicolas E., Barba-Espin G., Clemente-Moreno M. J., Alcobendas R., Artlip T., Hernandez J. A. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn-superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress. *Journal of Experimental Botany*, 2011, vol. 62, no. 8, pp. 2599–2613. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq432>
13. Šircelj H., Tausz M., Grill D., Franz B. Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae*, 2007, vol. 113, no. 4, pp. 362–369. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2007.04.012>
14. Šircelj H., Tausz M., Grill D., Batic F. Biochemical responses in leaves of two apple tree cultivars subjected to progressing drought. *Journal of Plant Physiology*, 2005, vol. 162, no. 12, pp. 1308–1318. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.01.018>
15. Sarker U., Oba S. Catalase, superoxide dismutase, and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, art. 16496. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34944-0>
16. Sarker U., Islam M. T., Rabbani M. G., Oba S. Variability, heritability and genetic association in vegetable amaranth (*Amaranthus tricolor*). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2015, vol. 13, no. 2, p. e0702. <https://doi.org/10.5424/sjar/2015132-6843>
17. Sarker U., Oba S. Protein, dietary fiber, minerals, antioxidant pigments and phytochemicals, and antioxidant activity in selected red morph *Amaranthus* leafy vegetable. *PLoS ONE*, 2019, vol. 14, no. 12, p. e0222517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222517>
18. Sarker U., Oba S. Leaf pigmentation, its profiles and radical scavenging activity in selected *Amaranthus tricolor* leafy vegetables. *Scientific Reports*, 2020, vol. 10, no. 1, art. e18617. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66376-0>
19. Drozdov S. N., Kholoptseva E. S., Kolomeichenko V. V. Light-temperature characteristics of photosynthesis in two amaranth species. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2014, no. 5, pp. 96–101 (in Russian).
20. Večer N. N., Dayneko T. M. Influence of seeding rates of amaranth paniculata (*Amaranthus paniculatus* L.) on seed productivity. *Glavnyi agronom* [Chief agronomist], 2020, no. 8, pp. 52–55 (in Russian).
21. Kabashnikova L. F., Pshibytko N. L., Abramchik L. M. *Methods for assessing the physiological state of plants in drought conditions*. Minsk, Beloruskaya nauka Publ., 2007. 42 p. (in Russian).
22. Shlyk A. A. Determination of chlorophyll and carotenoids in extracts of green leaves. *Biokhimicheskie metody v fiziologii rastenii: sbornik statei* [Biochemical methods in plant physiology: collection of articles]. Moscow, 1971, pp. 154–170 (in Russian).
23. Merzlyak M. N. *Activated oxygen and oxidative processes in plant cell membranes*. Moscow, All-Russian Institute of Scientific and Technical Information of the Russian Academy of Sciences, 1989. 168 p. (in Russian).
24. Heath R. L., Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, vol. 125, no. 1, pp. 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
25. Kozel N. V., Shalygo N. V. Barley leaf antioxidant system under photooxidative stress induced by Rose Bengal. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2009, vol. 56, no. 3, pp. 316–322. <https://doi.org/10.1134/S1021443709030030>
26. Rokitskii P. F. *Biological statistics*. 3rd ed. Minsk, Vysheishaya shkola Publ., 1973. 320 p. (in Russian).
27. Foyer C. H. Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and Experimental Botany*, 2018, vol. 154, pp. 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.003>
28. Cruz de Carvalho M. H. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 2008, vol. 3, no. 3, pp. 156–165. <https://doi.org/10.4161/psb.3.3.5536>
29. De Dios Alché J. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants. *Redox Biology*, 2019, vol. 23, p. e101136. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>
30. Labudda M. *Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding*. Available at: <http://www.e-wydawnictwo.eu/Document/DocumentPreview/3342> (accessed 19.03.2021).
31. Gins M. S., Gins V. K., Kononkov P. F. Changes in the biochemical composition of amaranth leaves as a result of selection for an increased content of amarantine pigment. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology], 2002, vol. 38, no. 5, pp. 556–562 (in Russian).
32. Khaziev R. Sh. *Study of biologically active substances of plants of the genus Amaranthus L.* Abstract of Ph. D. diss. Kazan, 1993. 20 p.
33. Faustova N. M., Kosman V. M. Complex phytochemical characteristic of leaves of *Amaranthus cruentus* (Amaranthaceae). *Rastitel'nye resursy* [Vegetable resources], 2009, vol. 45, iss. 4, pp. 39–53 (in Russian).
34. Gins M. S., Pivovarov V. F., Gins V. K., Baikov A. A., Platonova S. Yu., Gins E. M. Content and pigment composition of autotrophic and heterotrophic tissue of amaranth leaves of *A. tricolor* L. *Ovoshchi Rossii* [Vegetables of Russia], 2016, vol. 3, pp. 79–83 (in Russian).

Информация об авторах

Кабашникова Людмила Федоровна – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kabashnikova@ibp.org.by

Доманская Ирина Николаевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: domanin07@mail.ru

Пилипович Татьяна Сергеевна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatsiana.bachyshch@gmail.com

Пашкевич Любовь Валерьевна – науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ljubi.k87@gmail.com

Мартысюк Анна Викторовна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anya.mart@list.ru

Мотылева Светлана Михайловна – канд. с.-х. наук, доцент, заведующий лабораторией. Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства (ул. Загорьевская, 4, 115598, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: motyleva_svetlana@mail.ru

Гинс Мурат Сабирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Федеральный научный центр овощеводства (ул. Селекционная, 14, 143080, пос. ВНИИССОК, Московская обл.). E-mail: anirr@bk.ru

Тетяников Николай Валерьевич – канд. с.-х. наук, науч. сотрудник. Федеральный научный селекционно-технологический центр садоводства и питомниководства (Загорьевская 4, 115598, г. Москва, Российская Федерация). E-mail: tetyannikovnv@ya.ru

Information about the authors

Luidmila F. Kabashnikova – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kabashnikova@ibp.org.by

Irina N. Domanskaya – Ph. D. (Biol.), 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: domanin07@mail.ru

Tatsiana S. Pilipovich – 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: tatsiana.bachyshch@gmail.com

Liubou V. Pashkevich – 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: ljubi.k87@gmail.com

Hanna V. Martysiuk – 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: anya.mart@list.ru

Svetlana M. Motyleva – Ph. D. (Agricult.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Federal Horticultural Research Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery (4, Zagorevskaya Str., 115598, Moscow, Russian Federation). E-mail: motyleva_svetlana@mail.ru

Murat S. Gins – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Federal Scientific Center of Vegetable Growing (14, Selektionnaya Str., 143080, VNISSOK village, Moscow region). E-mail: anirr@bk.ru

Nikolay V. Tetyannikov – Ph. D. (Agricult.), Researcher. Federal Horticultural Research Center for Breeding, Agrotechnology and Nursery (4, Zagorevskaya Str., 115598, Moscow, Russian Federation). E-mail: tetyannikovnv@ya.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.352.332:612.112.94

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-295-301>

Поступила в редакцию 13.04.2021

Received 13.04.2021

Г. П. Зубрицкая, Е. И. Слобожанина

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ЛИТИЙ-ИНДУЦИРОВАННАЯ МОДИФИКАЦИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Изучено влияние различных концентраций сульфата лития на эритроциты человека *in vitro*. Показано, что воздействие солей лития в максимальных фармакологических и токсических концентрациях на клетки приводит к модификации физико-химического состояния мембраносвязанных белков и липидов. Установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию ионов лития, происходит снижение активности мембраносвязанных ацетилхолинэстеразы и метгемоглобинредуктазы, а также изменение микровязкости липидного бислоя мембран. Полученные результаты могут быть использованы для создания клеточной тест-системы для оценки токсичности соединений лития.

Ключевые слова: эритроцитарная мембрана, сульфат лития, липофильные зонды, ацетилхолинэстераза, метгемоглобинредуктаза, микровязкость липидов

Для цитирования: Зубрицкая, Г. П. Литий-индуцированная модификация физико-химического состояния мембранных белков и липидов в эритроцитах человека / Г. П. Зубрицкая, Е. И. Слобожанина // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 295–301. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-295-301>

Galina P. Zubritskaya, Ekaterina I. Slobozhanina

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

LITHIUM-INDUCED MODIFICATION OF THE PHYSICOCHEMICAL STATE OF MEMBRANE PROTEINS AND LIPIDS IN HUMAN ERYTHROCYTES

Abstract. The effect of various concentrations of lithium sulfate on human erythrocytes *in vitro* has been studied. It has been shown that the effect of lithium salt in maximum pharmacological and toxic concentrations on cells leads to a modification of the physicochemical state of membrane-bound proteins and lipids. It was found that in human erythrocytes exposed to lithium ions, there is a decrease in the activity of membrane-bound acetylcholinesterase and methemoglobin reductase, as well as a change in the microviscosity of the lipid bilayer of membranes. The results obtained can be used to create a cell test system for assessing the toxicity of lithium compounds.

Keywords: erythrocyte membrane, lithium sulfate, lipophilic probes, acetylcholinesterase, methemoglobin reductase, lipid microviscosity

For citation: Zubritskaya G. P., Slobozhanina E. I. Lithium-induced modification of the physicochemical state of membrane proteins and lipids in human erythrocytes. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 295–301 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-295-301>

Введение. Соли лития широко применяются в медицине в качестве психотропных и других лекарственных средств, а также в животноводстве в составе кормовых добавок. Литий используют и для изготовления литиевых аккумуляторов. В связи с этим возникла опасность неконтролируемого накопления лития в организме человека. До сих пор неизвестны механизмы, посредством которых литий оказывает свое действие на клетки, т. е. физиологическая роль и механизмы влияния лития на клеточные мембраны до конца не выяснены [1, 2]. В связи с тем что транспорт ионов лития в организме осуществляется в основном кровью, а кровь является основным индикатором элементного статуса в медицинской практике, представляет интерес изучение механизмов влияния лития на эритроциты человека. Одним из них может быть изменение физико-химических свойств клеточных мембран эритроцитов. Успехи, достигнутые в мембранологии,

позволяют рассматривать мембрану эритроцита не только в качестве структурного компонента клетки – специфически организованной оболочки с регулируемыми физико-химическими свойствами, но и как координатора работы клетки в зависимости от характера поступающих информационных сигналов химической и физической природы.

Известно, что для оценки изменений подвижности компонентов мембранной структуры как липидов, так и белков можно использовать такой интегральный показатель, как микровязкость, который отражает не только структуру, но и диффузные аспекты липидных составляющих мембран [3].

Цель настоящей работы – выявить изменение физико-химического состояния мембранных белков и липидов в эритроцитах при воздействии на них солей лития.

Материалы и методы исследования. В работе была использована кровь доноров в консерванте «глюцир», полученная из РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 1500 g 10 мин и трижды отмывали в 155 mM NaCl. Далее эритроциты подвергались воздействию сульфата лития в фармакологических (0,6 и 3 mM) и токсических (6 и 10 mM) концентрациях в течение 3 ч при 37 °C. Затем клетки отмывали в Na-фосфатном буфере (PBS-буфере) и выделяли из них мембраны эритроцитов по методу Доджа с сотр. [4]. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) определяли спектрофотометрически по методу Элмана [5], а мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы – по скорости окисления NADH [6]. Для выявления изменений микровязкости липидов в мембранах эритроцитов были использованы липофильные флуоресцентные зонды 1-(4-триметиламмоний-6-фенил-1,3,5-гексатриен (ТМА-ДФГ) и 6-додеканол-2-диметиламинонафтаден (лаурдан), параметры флуоресценции которых позволяют судить об изменении физического состояния фосфолипидов на разной глубине липидного бислоя мембран [7, 8]. Флуориметрические измерения проводили на люминесцентном спектрофотометре СМ2203 («СОЛАР», Беларусь), спектрофотометрические – на спектрофотометре «Спекорд М-40» (Германия).

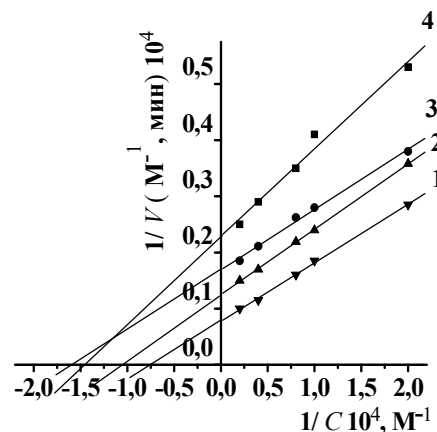
Результаты и их обсуждение. Фармакологическая эффективность препаратов лития определяется их способностью вызывать стабильное повышение концентрации ионов лития в плазме крови и эритроцитах. Повышение концентрации ионов лития в крови не только способствует стабилизации настроения пациентов с психоневрологическими расстройствами, но и проявляет нейропротекторное действие [9]. Известно, что при длительном приеме препаратов лития пациентами с биполярными расстройствами происходит накопление элемента в эритроцитах, что приводит к изменению белкового и жирнокислотного состава мембран эритроцитов [10].

Изучение молекулярных механизмов функционирования соединений лития дает возможность понять как причины эффективности его применения при заболеваниях нервной системы, так и механизмы воздействия на другие системы организма. В терапевтических дозах литий является мощным ингибитором различных фосфоинозитолфосфатаз и влияет на опосредованные ими сигналы [11, 12]. В литературе показано, что ионы лития в фармакологических концентрациях оказывают существенное влияние на гомеостаз ацетилхолина, энкефалинов, катехоламинов (в том числе допамина), серотонина и других нейротрансмиттеров. В частности, ионы лития влияют на активность АХЭ и секрецию ацетилхолина в коре головного мозга. Холин способствует активации транспорта ионов лития внутрь клеток. В процессе лечения пациентов с биполярными расстройствами карбонатом лития отмечено накопление холина в эритроцитах [13]. Соли лития способствуют также стабилизации мускариновых рецепторов ацетилхолина, влияют на активность протеинкиназы С [13]. В литературе практически отсутствует информация о влиянии ионов лития на эритроцитарную АХЭ, которая структурирована в поверхностном слое мембраны в виде липопротеидного комплекса. Каталитическая активность мембраносвязанной АХЭ находится под контролем структурного состояния липидной фазы мембраны, а нарушение же структуры мембраны под действием ионов лития может привести к изменению конформации мембраносвязанных ферментов (например, АХЭ и метгемоглобинредуктазы).

Нами проведена серия экспериментов по изучению активности мембраносвязанных ферментов (АХЭ и метгемоглобинредуктазы) в эритроцитах, подвергшихся воздействию сульфата лития

Рис. 1. Зависимости Лайнуивера–Берка для ацетилхолинэстеразы в мембранах, изолированных из эритроцитов до и после воздействия различных концентраций сульфата лития. Мембраны изолированы из эритроцитов: 1 – нативных (контроль); 2–4 – подвергшихся воздействию Li_2SO_4 в концентрациях 0,6; 3 и 10 мМ соответственно

Fig. 1. Relations Lineweaver–Burk for acetyl cholinesterase in membranes taken from erythrocytes before and after treated with various concentrations of lithium sulfate. Membranes are isolated from red blood cells: 1 – native (control); 2–4 – exposed to Li_2SO_4 at concentrations of 0.6; 3 and 10 mM, respectively



в фармакологических (0,6 и 3 мМ) и токсических (6 и 10 мМ) концентрациях. На рис. 1 представлены зависимости Лайнуивера–Берка для мембран, выделенных из нативных эритроцитов (кривая 1) и эритроцитов, подвергшихся воздействию сульфата лития (кривые 2–4).

Как видно из рис. 2, средние значения максимальной скорости ($V_{\text{макс}}$) (рис. 2, а) и константы Михаэлиса (K_M) мембраносвязанной АХЭ (рис. 2, б) достоверно снижены ($p < 0,05$) в эритроцитах, подвергшихся воздействию максимальной фармакологической и токсической концентраций сульфата лития по сравнению с контролем.

При воздействии токсических концентраций (10 мМ Li_2SO_4) обнаружен наиболее выраженный эффект снижения параметров активности АХЭ в изолированных мембранах, чем при воздействии фармакологических концентраций (3 мМ Li_2SO_4). Из литературы известно, что активность АХЭ в нервных клетках в процессе жизни может снижаться в результате химических воздействий и генетических изменений. При этом относительно небольшое снижение активности АХЭ приводит к облегчению синаптической передачи, что позволяет применять ингибиторы АХЭ при лечении ряда заболеваний, тогда как значительное снижение активности АХЭ делает синаптическую передачу затруднительной [5]. Что касается эритроцитарной АХЭ, то функциональное значение ее до конца не изучено.

Другим ферментом, который привлек наше внимание при изучении влияния солей лития на эритроциты, явилась NADH-зависимая метгемоглобинредуктаза, которая ответственна за восстановление метгемоглобина (MetHb) до оксигемоглобина.

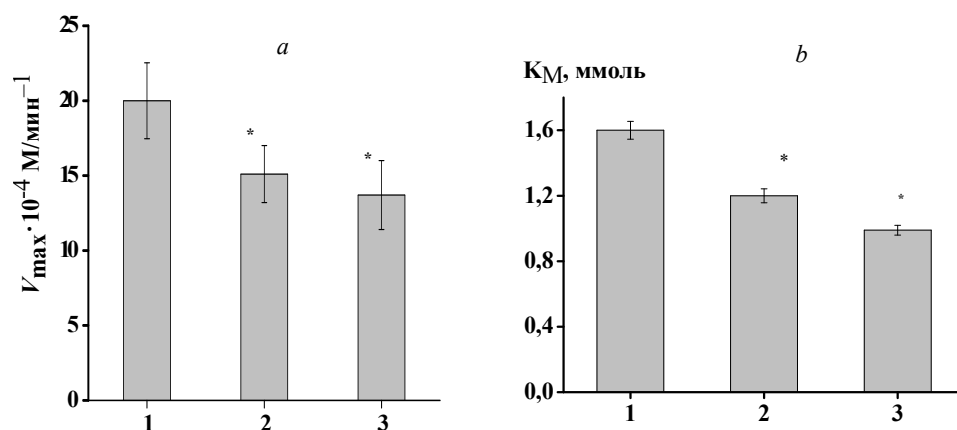


Рис. 2. Средние значения параметров активности ацетилхолинэстеразы (а – $V_{\text{макс}}$, б – K_M) в мембранах, изолированных из эритроцитов, которые были подвергнуты воздействию различных концентраций сульфата лития. Мембраны изолированы из эритроцитов: 1 – нативных (контроль); 2, 3 – подвергшихся воздействию Li_2SO_4 в концентрациях 3 и 10 мМ соответственно. * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Fig. 2. Mean observation activity of acetyl cholinesterase (а – $V_{\text{макс}}$ and (б – K_M) in membranes isolated from erythrocytes treated with various concentrations of lithium sulfate. Membranes are isolated from red blood cells: 1 – native (control); 2, 3 – exposed to Li_2SO_4 at concentrations of 3 and 10 mM, respectively. * – differences are significant compared to control ($p < 0.05$)

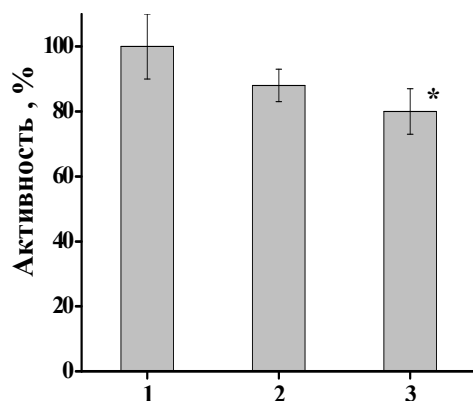


Рис. 3. Средние значения активности мембраносвязанной NADH-метгемоглобинредуктазы в мембранах, изолированных из эритроцитов, подвергшихся воздействию различных концентраций сульфата лития. Мембраны изолированы из эритроцитов: 1 – нативных (контроль); 2, 3 – подвергшихся воздействию Li_2SO_4 в концентрациях 3 и 10 мМ соответственно; * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$). За 100 % принято среднее значение активности фермента в нативных эритроцитах

Fig. 3. Mean activity of membrane bond NADH-methemoglobin reductase in erythrocytes treated with various concentrations of lithium sulfate. Membranes are isolated from red blood cells: 1 – native (control); 2, 3 – exposed to Li_2SO_4 at concentrations of 3 and 10 mM, respectively. * – differences are significant compared to control $p < 0.05$. 100 % is mean observation of enzyme activity in intact erythrocytes

В молекуле гемоглобина железо присутствует в ферроформе (Fe(II)), однако под воздействием ряда физико-химических факторов оно может окисляться до ферриформы (Fe(III)). MetHb – продукт окисления железа в молекуле гемоглобина. Нормальная оксигенация гемоглобина предполагает высвобождение электрона из атома железа для связи с кислородом. Если железо гема не переходит обратно в ферроформу, то образуется MetHb, что в свою очередь приводит к нарушению транспорта кислорода. При высоком содержании MetHb присутствуют как полностью окисленные молекулы гемоглобина, так и частично окисленные – так называемые «валентные гибриды» с измененными функциональными параметрами. Они вызывают нарушение процессов оксигенации органов и тканей с развитием гипоксии и цианоза [14, 15]. Возникновение метгемоглобинемии может быть связано с врожденными факторами, повышенным синтезом и/или уменьшением восстановления MetHb, а также с воздействием токсинов, которые резко влияют на окислительно-восстановительные реакции, увеличивая концентрацию MetHb [16].

Нами показано, что в эритроцитах, подвергшихся воздействию сульфата лития в фармакологических и токсических концентрациях, активность мембраносвязанной метгемоглобинредуктазы была снижена на 13 % (3 мМ Li_2SO_4) и 20 % (10 мМ Li_2SO_4) по сравнению с контролем (рис. 3).

Таким образом, установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся *in vitro* воздействию как фармакологических, так и токсических концентраций сульфата лития, происходит снижение активности мембраносвязанных АХЭ и метгемоглобинредуктазы, что свидетельствует об индуцированном ионами лития изменении структурно-функционального состояния мембран эритроцитов.

Известно, что ключевую роль в регуляции всех процессов, происходящих в мембранах, играет их текучесть (микровязкость). Этот комплексный показатель отражает как структуру, так и диффузные аспекты липидных составляющих мембран. Микровязкость мембран является интегральным показателем, зависящим от фосфолипидного состава, ненасыщенности липидов и содержания холестерина в мембранах. Изменение вязкостных характеристик отражает различные модификации межмолекулярных связей, которые, по сути, определяются сочетанием уровней подвижных и стабильных взаимодействий компонентов мембран. Важность поддержания относительной стабильности структуры мембран определяется необходимостью сохранения тех специфических мембранных функций, которые вызваны их тканевой принадлежностью, клеточной специализацией. Относительная стабильность связана с бислойностью липидной организации мембран, характерным для каждого вида мембран химическим составом и сохранением асимметричности в распределении белков и липидов во внутренних и поверхностных слоях и в создании агрегатов липидов с белками, липидов с липидами, липидных рафтов и белковых комплексов в пределах слоя [17, 18].

Для выявления изменений микровязкости липидов в мембранах эритроцитов при воздействии сульфата лития нами были использованы липофильные флуоресцентные зонды ТМА-ДФГ и лаурдана, параметры флуоресценции которых позволяют оценить изменение физического состояния фосфолипидов на разной глубине липидного бислоя мембран. Известно, что ТМА-ДФГ равномерно распределяется в мембране, встраиваясь в гидрофильной области полярных головок фосфолипидов [19], а лаурдан встраивается в мембрану в гидрофильно-гидрофобной области

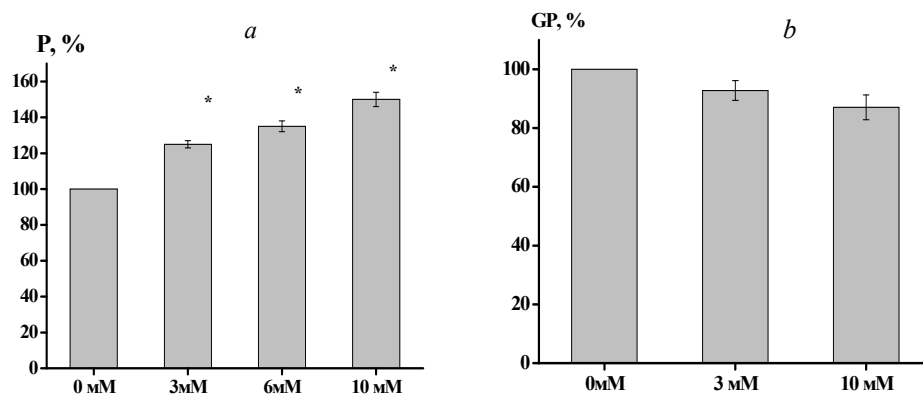


Рис. 4. Флуоресцентные параметры ТМА-ДФГ (*a*, $\lambda_{\text{возб}} = 365$ нм) и лаурдана (*b*, $\lambda_{\text{возб}} = 340$ нм), встроенных в мембраны, изолированные из эритроцитов до и после воздействия различных концентраций сульфата лития. За 100 % принято среднее значение поляризации флуоресценции зонда в контрольных образцах. * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Fig. 4. Parameters of fluorescence TMA-DPH (*a*, $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm) and laurdan (*b*, $\lambda_{\text{exc}} = 340$ nm) incorporated into erythrocyte membranes isolated after incubation various concentrations of lithium sulfate. The average value of the fluorescence probe polarization in the control samples is taken as 100 %. * – differences are significant compared to control ($p < 0.05$)

липидного бислоя, при этом остаток лауриновой кислоты локализуется в основном в области углеводородных цепочек жирных кислот фосфолипидов, а его флуоресцентный нафталиновый остаток – на уровне полярных головок фосфолипидов [20].

Нами выявлено достоверное повышение степени поляризации флуоресценции (P) ТМА-ДФГ в изолированных мембранах из эритроцитов, подвергшихся воздействию сульфата лития: в фармакологических (3 мМ) – на 25 %, в токсических концентрациях (6 и 10 мМ) – на 35 и 40–45 % соответственно по сравнению с контролем (рис. 4, *a*). Известно, что ТМА-ДФГ обладает интенсивной флуоресценцией и чувствителен к физическому состоянию липидов в мембранах, а значение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ прямо пропорционально изменению микровязкости гидрофильной области липидного бислоя мембран. Увеличение поляризации флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в изолированные мембраны эритроцитов, свидетельствует о снижении текучести липидного бислоя в мембранах под влиянием ионов лития. Обнаружено незначительное снижение генерализованной поляризации (GP) флуоресценции лаурдана, включенного в изолированные мембраны из эритроцитов, обработанных как фармакологическими, так и токсическими концентрациями сульфата лития, по сравнению с контролем (рис. 4, *b*).

Полученные результаты позволяют предположить, что имеется сильное электростатическое взаимодействие ионов лития с мембранными липидами клеток и с гидрофобными частями белковых молекул, чем отчасти можно объяснить фармакологическую и токсическую специфичность иона лития. Более высокая липофильность лития по сравнению с натрием, калием, рубидием и цезием играет важную роль в механизмах его фармакологического и токсического действия [21]. Вблизи гидрофобных участков мембран катион лития с легкостью теряет свои «водные оболочки» и электростатически взаимодействует с липидными мембранами клеток или с гидрофобными частями белковых молекул, изменяя их конфигурацию или даже встраиваясь в них [2].

Заключение. Установлено, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию *in vitro* фармакологических и токсических концентраций сульфата лития, происходит снижение активности мембраносвязанных ацетилхолинэстеразы и метгемоглобинредуктазы, а также изменение параметров флуоресценции различных по локализации в мембране липофильных зондов, что дает основание заключить, что на разной глубине липидного бислоя мембран имеет место литий-индуцированная модификация липидов. Полученные результаты могут быть использованы для создания клеточной тест-системы для оценки токсичности лития.

Благодарности. Работа финансирована в рамках Государственной программы научных исследований Республики Беларусь «Биотехнологии» (мероприятие 1.52, 2019–2020 гг.).

Acknowledgements. The work was funded within the framework of the State Program of Scientific Research of the Republic of Belarus “Biotechnologies” (grant 1.52, 2019–2020).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Could selenium administration alleviate the disturbances of blood parameters caused by lithium administration in rats? / M. Kielczykowska [et al.] // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2014. – Vol. 158, N 3. – P. 359–364. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9952-4>
2. Bekker, R. A. Lithium preparations in psychiatry, addiction medicine and neurology. Part II. Biochemical mechanisms of its action / R. A. Bekker, Yu. V. Bykov // *Acta Biomed. Scientifica.* – 2019. – Vol. 4, N 2. – P. 82–102. <https://doi.org/10.29413/ABS.2019-4.2.13>
3. Нарушение эритропоэза и изменение физико-химических свойств мембран эритроцитов у пациентов с миело-диспластическими синдромами / Е. И. Слобожанина [и др.] // *Морфологические основы патологии* / ред. В. П. Волкова. – Новосибирск, 2015. – С. 136–157.
4. Dodge, G. T. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes / G. T. Dodge, C. Mitchell, D. J. Hanahan // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1963. – Vol. 100, N 1. – P. 119–130. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90042-0)
5. Erythrocyte membrane AchE, Na, K-ATPase and Mg-ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery / D. G. Vlachos [et al.] // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2010. – Vol. 70, N 8. – P. 568–574. <https://doi.org/10.3109/00365513.2010.527365>
6. Papandreou, P. Determination of NADH₂-ferricyanide oxidoreductase (cytochrome b5 reductase, diaphorase) activity of human erythrocytes by an analysis of the time-dependence of NADH₂ oxidation / P. Papandreou, E. T. Rakitzis // *Clin. Chim. Acta.* – 1989. – Vol. 181, N 2. – P. 189–196. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90187-3](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90187-3)
7. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene / J. G. Kuhry [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* – 1985. – Vol. 845, N 1. – P. 60–67. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(85\)90055-2](https://doi.org/10.1016/0167-4889(85)90055-2)
8. Harris, F. M. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order / F. M. Harris, K. B. Best, J. D. Bell // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* – 2002. – Vol. 1565, N 1. – P. 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00514-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00514-X)
9. Хемореактивное моделирование аскорбата лития / И. Ю. Торшин [и др.] // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2016. – Т. 3. – С. 47–58.
10. First-episode bipolar disorder is associated with erythrocyte membrane docosahexaenoic acid deficits: dissociation from clinical response to lithium or quetiapine / R. Mc. Namara [et al.] // *Psychiatry Res.* – 2015. – Vol. 230, N 2. – P. 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.09.035>
11. Адаптогенные и нейропротективные свойства аскорбата лития / А. В. Пронин [и др.] // *Журн. неврол. и психиатр.* – 2016. – Т. 116, № 12. – С. 86–91.
12. Can, A. Differential antidepressant-like response to lithium treatment between mouse strains: effects of sex, maternal care, and mixed genetic background / A. Can, S. C. Piantadosi, T. D. Gould // *Psychopharmacology.* – 2013. – Vol. 228, N 3. – P. 411–418. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3045-5>
13. Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats / M. H. Hillert [et al.] // *J. Neurochem.* – 2014. – Vol. 131, N 1. – P. 42–52. <https://doi.org/10.1111/jnc.12787>
14. Топунов, А. Ф. Множественные функциональные формы гемоглобина в организме человека: современный взгляд и практическое использование / А. Ф. Топунов, О. В. Космачевская // *Биомедика.* – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 251–267.
15. Methemoglobinemia / M. Denshaw-Burke [et al.] [Electronic resource] // *Medscape.* – Mode of access: <https://emedicine.medscape.com/article/204178-overview>. – Date of access: 17.12.2020.
16. Gay, H. C. Acquired methemoglobinemia associated with topical lidocaine administration: a case report / H. C. Gay, A. P. Amaral // *Drug Safety – Case Reports.* – 2018. – Vol. 5, N 1. – P. 15–20. <https://doi.org/10.1007/s40800-018-0081-4>
17. Мокрушников, П. В. Методика и результаты измерения микровязкости биомембран / П. В. Мокрушников // *Тр. Новосиб. гос. архит.-строит. ун-та (Сибстрин).* – 2018. – Т. 2, № 1. – С. 17–24.
18. Li, H. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network / H. Li, G. Lykotrafitis // *Biophys. J.* – 2014. – Vol. 107, N 3. – P. 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.031>
19. Ballweg, S. Control of membrane fluidity: the OLE pathway in focus / S. Ballweg, R. Ernst // *Biol. Chem.* – 2017. – Vol. 398, N 2. – P. 215–228. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0277>
20. Bagatolli, L. Laurdan fluorescence properties in membranes: a journey from the fluorometer to the microscope / L. Bagatolli // *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes* / ed. : Y. Mély, G. Duportail. – Heidelberg, 2012. – P. 3–35.
21. Ruiz, P. Kaplan and Sadock's. Comprehensive textbook of psychiatry / P. Ruiz. – Cambridge : Cambridge Univ. Press, 2017. – 418 p.

References

1. Kielczykowska M., Kocot J., Kurzepa J., Lewandowska A., Żelazowska R., Musik I. Could selenium administration alleviate the disturbances of blood parameters caused by lithium administration in rats? *Biological Trace Element Research*, 2014, vol. 158, no. 3, pp. 359–364. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-9952-4>
2. Bekker R. A., Bykov Yu. V. Lithium preparations in psychiatry, addiction medicine and neurology. Part II. Biochemical mechanisms of its action. *Acta Biomedical Scientifica*, 2019, vol. 4, no. 2, pp. 82–102. <https://doi.org/10.29413/ABS.2019-4.2.13>
3. Slobozhaniina E. I., Klimkovich N. N., Zubritskaya G. P., Kozarezova T. I. Disorder of erythropoiesis and changes in the physicochemical properties of erythrocyte membranes in patients with myelodysplastic syndromes. *Morfologicheskie osnovy patologii* [Morphological foundations of pathology]. Novosibirsk, 2015, pp. 136–157 (in Russian).

4. Dodge G. T., Mitchell C., Hanahan D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Archivas of Biochemistry and Biophysics*, 1963, vol. 100, no. 1, pp. 119–130. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90042-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90042-0)
5. Vlachos D. G., Schulpis K. H., Antsaklis A., Mesogitis S., Biliatis I., Tsakiris S. Erythrocyte membrane AchE, Na, K-ATPase and Mg-ATPase activities in mothers and their premature neonates in relation to the mode of delivery. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 2010, vol. 70, no. 8, pp. 568–574. <https://doi.org/10.3109/00365513.2010.527365>
6. Papandreou P., Rakitzis E. T. Determination of NADH₂-ferricyanide oxidoreductase (cytochrome b5 reductase, diaphorase) activity of human erythrocytes by an analysis of the time-dependence of NADH₂ oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 1989, vol. 181, no. 2, pp. 189–196. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90187-3](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90187-3)
7. Kuhry J. G., Duportail G., Bronner C., Laustriat G. Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammoniumdiphenylhexatriene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*, 1985, vol. 845, no. 1, pp. 60–67. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(85\)90055-2](https://doi.org/10.1016/0167-4889(85)90055-2)
8. Harris F. M., Best K. B., Bell J. D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 2002, vol. 1565, no. 1, pp. 123–128. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(02\)00514-x](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(02)00514-x)
9. Torshin I. Yu., Sardaryan I. S., Gromova O. A., Rastashanskii V. A., Fedotova L. E. Chemoreactomic modeling of lithium ascorbate. *Farmakokinetika i farmakodinamika* [Pharmacokinetics and pharmacodynamics], 2016, vol. 3, pp. 47–58 (in Russian).
10. McNamara R. K., Jandacek R., Tso P., Blom T. J., Welge J. A., Strawn J. R., Adler C. M., DelBello M. P., Strakowski S. M. First-episode bipolar disorder is associated with erythrocyte membrane docosahexaenoic acid deficits: dissociation from clinical response to lithium or quetiapine. *Psychiatry Research*, 2015, vol. 230, no. 2, pp. 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2015.09.035>
11. Pronin A. V., Gromova O. A., Sardaryan I. S., Torshin I. Yu., Stel'mashuk E. V., Ostrenko K. S., Aleksandrova O. P., Genrikhs E. E., Khaspekov L. G. Adaptogenic and neuroprotective properties of lithium ascorbate. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni C. C. Korsakova* [Journal of neurology and psychiatry named after S. S. Korsakov], 2016, vol. 116, no. 12, pp. 86–91. <https://doi.org/10.17116/jnevro201611612186-91> (in Russian).
12. Can A., Piantadosi S. C., Gould T. D. Differential antidepressant-like response to lithium treatment between mouse strains: Effects of sex, maternal care, and mixed genetic background. *Psychopharmacology*, 2013, vol. 228, no. 3, pp. 411–418. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3045-5>
13. Hillert M. H., Imran I., Zimmermann M., Lau H., Weinfurter S., Klein J. Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Journal of Neurochemistry*, 2014, vol. 131, no. 1, pp. 42–52. <https://doi.org/10.1111/jnc.12787>
14. Topunov A. F., Kosmochevskaya O. V. Multiple functional forms of hemoglobin in the human body: modern view and practical use. *Biomika* [Biomics], 2018, vol. 10, no. 3, pp. 251–267 (in Russian).
15. Denshaw-Burke M., DelGiaccio E., Curran A. L., Savior D. C., Kumar M. Methemoglobinemia. Medscape. Available at: <https://emedicine.medscape.com/article/204178-overview> (accessed 17.12.2020).
16. Gay H. C., Amaral A. P. Acquired methemoglobinemia associated with topical lidocaine administration: a case report. *Drug Safety – Case Reports*, 2018, vol. 5, no. 1, pp. 15–20. <https://doi.org/10.1007/s40800-018-0081-4>
17. Mokrushnikov P. V. Technique and results of measuring the microviscosity of biomembranes. *Trudy Novosibirskogo gosudarstvennogo arkhitekturno-stroitel'nogo universiteta (Sibstrin)* [Proceedings of the Novosibirsk State University of Architecture and Civil Engineering (Sibstrin)], 2018, vol. 2, no. 1, pp. 17–24 (in Russian).
18. Li H., Lykotrafitis G. Erythrocyte membrane model with explicit description of the lipid bilayer and the spectrin network. *Biophysical Journal*, 2014, vol. 107, no. 3, pp. 642–653. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.031>
19. Ballweg S., Ernst R. Control of membrane fluidity: the OLE pathway in focus. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, vol. 398, no. 2, pp. 215–228. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0277>
20. Bagatolli L. Laurdan fluorescence properties in membranes: a journey from the fluorometer to the microscope. *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*. Heidelberg, 2012, pp. 3–35.
21. Ruiz P. Kaplan and Sadock's. *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. Cambridge, Cambridge University Press, 2017. 418 p.

Информация об авторах

Зубрицкая Галина Петровна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: petro371@mail.ru
 Слобожанина Екатерина Ивановна – член-корреспондент, д-р биол. наук., профессор, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: slobozhanina@ibp.org.by

Information about the authors

Galina P. Zubritskaya – Ph. D. (Biol.), 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: petro371@mail.ru

Ekaterina I. Slobozhanina – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus): E-mail: slobozhanina@ibp.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 634.737:664.8.03

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-302-311>

Поступила в редакцию 27.08.2020

Received 27.08.2020

Н. Б. Павловский

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА СОХРАНЯЕМОСТИ ПЛОДОВ ГОЛУБИКИ РАЗНЫХ ТАКСОНОВ

Аннотация. На основании результатов 12-летних исследований показаны таксономические особенности лежкоспособности ягод 27 сортов и видов голубики, интродуцированных в Беларусь. Установлено, что сохраняемость плодов голубики в условиях обычной газовой атмосферы в зависимости от таксона варьировалась в пределах от 7 сут (голубика топяная) до 29 сут (голубика высокорослая, сорт ‘Darrow’) при температуре хранения +5 °С. Среди исследуемых видов плоды голубики высокорослой и сортов, полученных на основе данного таксона, сохраняли товарные качества значительно больший период времени, чем ягоды других видов голубики. Плоды позднеспелых сортов голубики высокорослой медленнее теряют массу при хранении и, соответственно, обладают более продолжительной сохраняемостью по сравнению с ягодами раннеспелых таксонов. Плоды крупноплодных сортов голубики хранятся дольше, чем ягоды мелкоплодных таксонов данной культуры. Лежкость ягод голубики вне зависимости от их таксономической принадлежности определялась главным образом естественной убылью массы, в меньшей степени – потерями от функциональных расстройств и гнили.

Ключевые слова: голубика высокорослая, *Vaccinium corymbosum*, интродукция, сохраняемость плодов, лежкость ягод, Беларусь

Для цитирования: Павловский, Н. Б. Оценка сохраняемости плодов голубики разных таксонов / Н. Б. Павловский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 302–311. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-302-311>

Nikolay B. Pavlovskiy

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ESTIMATION STORAGE LIFE OF BLUEBERRY FRUITS OF DIFFERENT TAXONS

Abstract. Based on the results of 12-year studies, the taxonomic characteristics of the keeping quality of berries of 27 cultivars and species of blueberries introduced in Belarus are shown. It was found that the storage postharvest of blueberry fruits under conditions of an ordinary gas atmosphere, depending on the taxon, varied from 7 days (swamp blueberry) to 29 days (‘Darrow’ blueberry) at a storage temperature of +5 °C. Among the studied blueberry species, the fruits of tall blueberries and varieties obtained on the basis of this taxon retained their commercial qualities for a much longer period of time, compared to berries of other blueberry species. Fruits of late-ripening tall blueberry cultivars lose weight more slowly during storage and, accordingly, have a longer shelf life compared to berries of early-maturing taxa. The fruits of large-fruited blueberry cultivars are stored longer than the berries of small-fruited taxa of this crop. The keeping quality of blueberry berries, regardless of their taxonomic affiliation, was determined mainly by the natural loss of weight and, to a lesser extent, by waste from functional disorders and rot.

Keywords: highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum*, introduction, storage life of fruits, keeping quality of berries, Belarus

For citation: Pavlovskiy N. B. Estimation storage life of blueberry fruits of different taxons. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 302–311 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-302-311>

Введение. Среди ягодных культур, возделываемых в Беларуси на промышленной основе, большую популярность, особенно в последние годы, приобретает голубика высокорослая (*Vaccinium corymbosum* = *V. × covellianum*), интродуцированная из Северной Америки. Интерес к этой культуре вызван повышенным спросом на ее плоды, обладающие отличными вкусовыми и лечебно-профилактическими свойствами [1, 2].

Практически все сорта голубики высокорослой – отдаленные гибриды, полученные при скрещивании разных видов голубик (*V. corymbosum*, *V. angustifolium*, *V. darrowii*, *V. virgatum* и др.) [3],

вследствие чего они различаются своим генотипом, а соответственно, лежкоспособность их плодов может быть разной.

Анализ литературных источников показывает, что сохраняемость плодов голубики в условиях обычной газовой атмосферы при низкой положительной температуре в зависимости от сорта составляет от 10–18 сут [4, 5] до 3–8 недель [6], при этом авторы не указывают сортовые особенности лежкости ягод. Модифицированная газовая среда создается с помощью специальной упаковки, которая обладает избирательной проницаемостью и позволяет за счет дыхания хранящихся плодов снизить содержание кислорода, а соответственно, повысить концентрацию двуокиси углерода, что дает возможность увеличить срок хранения плодов голубики [7, 8]. Послеуборочное хранение плодов голубики в условиях регулируемой (контролируемой) газовой среды, когда в хранилище искусственно создается газовая атмосфера с пониженной концентрацией кислорода и повышенным содержанием двуокиси углерода, способствует еще более длительному сохранению товарных качеств ягод [6, 9, 10].

Несмотря на научно-технические разработки, позволяющие продлить период лежкости плодов голубики, вопросы оценки потенциальной таксономической специфики их лежкоспособности и научно обоснованное прогнозирование сохраняемости ягодной продукции в производственных целях являются актуальными.

Целью настоящих исследований являлась оценка сохраняемости ягод голубики разных сортов и видов, интродуцированных в Беларусь.

Объекты и методы исследований. Сбор экспериментального материала выполнялся в 2007–2018 гг. в коллекционных насаждениях отраслевой лаборатории интродукции и технологии нетрадиционных ягодных растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси, расположенной в Ганцевичском районе Брестской области (N 52°44', E 26°22'). Объектом исследований являлись плоды 20 сортов голубики высокорослой (раннеспелые 'Bluetta', 'Croatan', 'Duke', 'Earliblue', 'Patriot', 'Reka', 'Weymouth', среднеспелые 'Bluecrop', 'Blueray', 'Denise Blue', 'Hardyblue', позднеспелые 'Bluerose', 'Carolinablue', 'Coville', 'Darrow', 'Elizabeth', 'Herbert', 'Jersey', 'Nelson', 'Rubel'), голубики полувысокорослой (раннеспелые 'Northblue', 'Northcountry', среднеспелый 'Northland'), голубики вельветолистной (*V. myrtiloides*), голубики щитковой (*V. corymbosum*), голубики топяной (*V. uliginosum*), голубики узколистной (*V. angustifolium*). Насаждения голубики созданы 2-летними корнесобственными саженцами в 1999 г. Схема посадки растений – 2,0×1,5 м. Почва на участке минеральная с pH_(H₂O) 4,5, подстилаемая рыхлым разнородным песком. Приствольная полоса насаждений замульчирована древесными опилками слоем 10 см и шириной 1 м. Междурядья содержались в естественном задернении.

Оценку сохраняемости плодов голубики проводили согласно методическим указаниям Е. П. Франчук с соавт. [11]. Ягоды снимали в стадии потребительской спелости и сразу же закладывали на хранение. В качестве тары для хранения использовали одноразовые пищевые пластиковые контейнеры Т 602 для ягод и фруктов объемом 400 мл с крышками Т 601 (с отверстиями).

Образцами служили внешне здоровые плоды. Перед закладкой ягод голубики на хранение определяли их массу. Образцы хранили в холодильнике при температуре +5 ± 1 °С и относительной влажности воздуха 30–80 %. Температуру и относительную влажность воздуха в холодильной камере измеряли термогигрометром ИВА-6.

Учеты состояния плодов проводили каждые 4–5 дней путем взвешивания и разбора на фракции, с последующей выбраковкой нестандартных плодов: с физиологическими расстройствами и пораженных болезнями. По результатам хранения учитывали следующие показатели (%): естественную убыль массы плодов, массу здоровых и нестандартных плодов. На основании вышеперечисленных показателей определяли сохраняемость плодов (в сутках). Естественной убылью плодов в процессе хранения считали потерю ими массы за счет испарения воды и расходования органических веществ. Данный показатель рассчитывали методом взвешивания плодов голубики до и после каждой инвентаризации. Выход стандартных и нестандартных ягод определяли путем сортировки на соответствующие фракции, их взвешивания и выбраковки нестандартных плодов. За показатель сохраняемости принимали максимальный срок хранения плодов, в течение которого они сохраняли потребительские качества, а общие потери (естественная убыль +

нестандарт) составляли 10 % [12]. Съем плодов с хранения проводили после потери ими массы 10 % и более от первоначального веса.

Для оценки влияния размеров ягод на их лежкость исследуемые сорта голубики классифицировали по средней массе плода на три группы: крупноплодные – ягоды массой 2,0 г и более ('Bluecrop', 'Blueray', 'Coville', 'Darrow', 'Denise Blue', 'Duke', 'Elizabeth', 'Herbert', 'Patriot'), среднеплодные – от 1,9 до 1,0 г ('Bluerose', 'Bluetta', 'Carolinablue', 'Croatan', 'Earliblue', 'Hardyblue', 'Jersey', 'Nelson', 'Northblue', 'Northland', 'Reka', 'Weymouth'), мелкоплодные – менее 1,0 г ('Northcountry', 'Rubel') [13].

Статистическую обработку данных выполняли с применением пакета анализа данных программы Microsoft Excel при 95 %-ном уровне значимости. Для оценки наименьшей существенной разницы (НСР) между сортами в качестве стандарта был принят районированный в Беларуси и широко распространенный среднеспелый сорт 'Bluecrop'. Для оценки НСР между сохраняемостью в годы исследований в качестве стандарта была принята лежкость ягод в 2017 г., так как в этот год погодно-климатические показатели (температура воздуха, количество осадков) в летний период (июнь–август) в наибольшей степени были близки к средним многолетним значениям.

Результаты и их обсуждение. Представленные в табл. 1 результаты исследований показывают, что изучаемые таксоны голубики существенно различаются по лежкоспособности плодов. Средняя сохраняемость плодов голубики в условиях обычной газовой среды при температуре +5 °C в зависимости от таксона варьируется от 7 до 29 сут при выходе товарной ягоды 90 %. Наиболее лежкоспособными из 27 изучаемых таксонов оказались плоды позднеспелого сорта 'Darrow' (29 сут). Несколько меньше (27–28 сут) сохраняли товарные качества плоды среднеспелого сорта 'Bluecrop' и позднеспелых 'Coville', 'Nelson' и 'Elizabeth'. Самый короткий период хранения плодов отмечен у голубики топяной (7 сут). На сутки дольше хранились ягоды голубики вельветолистной (8 сут). Относительно слабая сохраняемость ягод (11 сут) была характерна также для голубики узколистной. Среди полувисокорослых сортов самым коротким периодом сохраняемости характеризовался сорт 'Northcountry' – 13 сут. Непродолжительную лежкость имели плоды полувисокорослого сорта 'Northblue' – 17 сут. По-видимому, данное свойство эти сорта унаследовали от голубики узколистной, которая использовалась селекционерами для гибридизации с голубикой щитковой с целью получения более морозостойких и менее високорослых сортов голубики [3]. Следует отметить, что и високорослые раннеспелые сорта голубики, полученные от гибридизации с голубикой узколистной, в частности 'Bluetta', 'Earliblue', 'Weymouth', продуцируют плоды с относительно непродолжительным сроком хранения – 17–18 сут.

В период хранения в плодах протекают такие процессы жизнедеятельности, как транспирация, дыхание и биохимические изменения, приводящие к расходу воды и аккумулированных органических соединений и, как результат, к снижению массы плодов [14, 15]. Структурный анализ потерь при хранении ягод показал, что продолжительность сохраняемости плодов голубики определялась главным образом естественной убылью массы, доля которой от общих потерь находилась в пределах от 60 % у сорта 'Blueray' до 90 % у голубики вельветолистной. Такие же показатели получены О. В. Дрозд [16] при оценке лежкоспособности 15 сортов голубики високорослой и 1 сорта голубики низкорослой. У плодов остальных исследуемых таксонов голубики доля потерь от естественной убыли массы составляла 70–80 %. Из общей убыли плодов подавляющая часть потерь их массы во время хранения происходила из-за испарения воды. Это подтверждают результаты проведенных нами ранее исследований по оценке влияния различных по воздухопроницаемости видов упаковочных материалов на сохраняемость ягод голубики [17].

Плод – это генеративный орган, биологическая роль которого заключается в обеспечении находящихся в нем семян питательными веществами. После созревания семян начинается старение тканей околоплодника и активный распад содержащихся в нем веществ [14]. Это ведет к лизису отдельных клеток, затем к прекращению обмена веществ во всем плоде, и в результате физиологических расстройств он теряет потребительские качества – снижается его упругость и имеет место деформация. В зависимости от таксона доля потерь по причине функциональных заболеваний составила 10–40 % от общей убыли массы. Среди исследуемых таксонов в большей степени физиологическим расстройствам были подвержены плоды сорта 'Blueray' (40 %).

Таблица 1. Сохраняемость плодов голубики разных видов и сортов в условиях обычной атмосферы при температуре хранения +5 °C (2007–2018 гг.)

Table 1. Storage life of blueberry fruits of different cultivars and species in a normal atmosphere at a storage temperature of +5 °C (2007–2018)

Вид, сорт	Сохраняемость, сут			Убыль массы, %	Нестандарт, %
	средняя		предел варьирования		
	$x \pm m_x$	V , %			
Bluecrop (st)	28 ± 7	36	13–44	7 ± 1	3 ± 1
Blueray	22 ± 4	29	13–32	6 ± 1	4 ± 1
Bluerose	23 ± 5	29	8–32	8 ± 1	2 ± 1
Bluetta	20 ± 5*	40	8–30	8 ± 1	2 ± 1
Carolinablue	25 ± 4	25	14–30	7 ± 1	3 ± 1
Coville	27 ± 6	33	8–51	8 ± 1	2 ± 1
Croatan	19 ± 5*	35	10–29	8 ± 1	2 ± 1
Darrow	29 ± 6	29	14–50	7 ± 2	3 ± 1
Denise Blue	23 ± 5	31	12–36	7 ± 1	3 ± 2
Duke	24 ± 6	34	12–36	8 ± 1	2 ± 1
Earliblue	20 ± 4*	31	11–33	7 ± 1	3 ± 2
Elizabeth	27 ± 6	36	10–45	7 ± 1	3 ± 1
Hardyblue	21 ± 4*	31	11–30	8 ± 1	2 ± 1
Herbert	24 ± 6	40	6–39	7 ± 2	3 ± 2
Jersey	26 ± 5	28	11–39	8 ± 2	2 ± 1
Nelson	28 ± 7	39	16–55	8 ± 1	2 ± 1
Northblue	17 ± 5*	47	6–31	7 ± 1	3 ± 1
Northcountry	13 ± 5*	57	5–25	8 ± 2	2 ± 1
Northland	21 ± 6*	42	6–34	7 ± 2	3 ± 2
Patriot	23 ± 7	43	9–40	7 ± 1	3 ± 1
Reka	21 ± 5*	34	12–34	8 ± 1	2 ± 1
Rubel	20 ± 4*	28	12–30	8 ± 1	2 ± 1
Weymouth	21 ± 5*	35	9–31	7 ± 1	3 ± 1
<i>V. angustifolium</i>	11 ± 2*	27	7–18	7 ± 2	3 ± 2
<i>V. corymbosum</i>	18 ± 2*	17	12–26	8 ± 1	2 ± 1
<i>V. myrtiloides</i>	8 ± 1*	16	7–10	9 ± 1*	1 ± 1*
<i>V. uliginosum</i>	7 ± 1*	14	5–9	8 ± 0	2 ± 1
HCP _{0,05}	6,4			1,5	1,6

Что касается порчи плодов голубики от паразитарных заболеваний во время хранения, то следует отметить, что гниль, вызванная патогенными микроорганизмами, появлялась, как правило, позднее, когда в ягодах происходили физиологические расстройства, вследствие которых потери составляли более 10 %.

В процессе оценки лежкоспособности плодов голубики было замечено, что мелкие ягоды теряли потребительские качества из-за увядания значительно раньше, чем крупные (табл. 2). Углубленный анализ зависимости сохраняемости плодов голубики от их величины показал, что во все годы исследований плоды, характеризующиеся средними размерными показателями (1,0–1,9 г), хранились дольше, чем мелкие плоды (<1,0 г), но меньше, чем крупные (≥2,0 г), а их сохраняемость в среднем составляла 22; 17 и 25 сут соответственно (табл. 3). Мелкие плоды голубики теряли тургор раньше, чем более крупные ягоды, из-за более высокого уровня потери воды. J. C. Diaz-Perez [18], B. A. Becker и B. A. Fricke [19] объясняют это тем, что чем мельче плод, тем больше значение отношения транспирирующей площади (поверхности) плода к его массе. О более быстрой потере товарных качеств мелкими ягодами голубики по сравнению с крупными плодами в процессе хранения сообщают R. E. Gough [20] и O. B. Дрозд [16].

Т а б л и ц а 2. Корреляционная зависимость сохраняемости и биометрических параметров плодов голубики разных таксонов

Table 2. Correlation dependence of storage life and biometric parameters of blueberry fruits of different taxa

Сорт	Масса плода, г	Сохраняемость, сут	Диаметр плода, мм
Bluecrop	2,2	28	18,1
Blueray	2,0	22	17,9
Bluerose	1,8	23	16,7
Bluetta	1,6	20	16,4
Carolinablue	1,8	25	16,4
Coville	2,1	27	17,2
Croatan	1,4	19	14,1
Darrow	2,0	29	17,4
Denise Blue	2,1	23	17,3
Duke	2,1	24	16,5
Earliblue	1,6	20	17,3
Elizabeth	2,1	27	17,9
Hardyblue	1,4	21	15,1
Herbert	2,2	24	20,4
Jersey	1,4	26	15,3
Nelson	1,9	28	17,1
Northblue	1,9	17	18,4
Northcountry	0,7	13	12,2
Northland	1,3	21	15,0
Patriot	2,2	23	17,2
Reka	1,5	21	13,8
Rubel	0,9	20	14,5
Weymouth	1,5	21	17,2
r	0,91		

Т а б л и ц а 3. Динамика сохраняемости плодов голубики высокорослой в зависимости от их размеров в 2007–2018 гг.

Table 3. Dynamics of storage life of highbush blueberry fruits depending on the size of fruits in 2007–2018

Год	Сохраняемость, сут		
	Мелкоплодные сорта	Среднеплодные сорта	Крупноплодные сорта
2007	9 ± 2	11 ± 2*	12 ± 2*
2008	10 ± 3	14 ± 3*	16 ± 2*
2009	13 ± 5	18 ± 3*	22 ± 5*
2010	14 ± 3	20 ± 2*	25 ± 3*
2011	22 ± 2	26 ± 3	28 ± 3*
2012	16 ± 2	19 ± 4*	20 ± 3*
2013	17 ± 7	17 ± 4*	24 ± 4*
2014	19 ± 3	25 ± 4	27 ± 6*
2015	29 ± 2	32 ± 5	37 ± 5
2016	20 ± 3	26 ± 3	30 ± 4
2017 (st)	19 ± 4	28 ± 4	34 ± 7
2018	15 ± 1	26 ± 5	27 ± 4*
Средняя	17 ± 3	22 ± 4	25 ± 5
НСР _{0,05}	14,6	4,3	6,0

Анализ зависимости сохраняемости ягод разных сортов голубики от сроков созревания урожая позволил выявить закономерность, указывающую на то, что чем позже начинают созревать плоды, тем дольше они хранятся. Так, для ягод раннеспелых сортов средняя лежкость составляет 20 сут, для средне- и позднеспелых – 23 и 25 сут соответственно (табл. 4).

Т а б л и ц а 4. Динамика сохраняемости плодов голубики высокорослой разных сроков созревания урожая в 2007–2018 гг.

Table 4. Dynamics of storage life of highbush blueberry fruits at different ripening periods in 2007–2018

Год	Сохраняемость, сут		
	Раннеспелые сорта	Среднеспелые сорта	Позднеспелые сорта
2007	10 ± 2*	13 ± 2*	11 ± 2*
2008	12 ± 3*	17 ± 2*	16 ± 2*
2009	16 ± 3*	21 ± 2	23 ± 5*
2010	20 ± 3	20 ± 2	24 ± 3*
2011	24 ± 4	28 ± 2	28 ± 3*
2012	17 ± 4*	19 ± 3*	21 ± 2*
2013	17 ± 6*	20 ± 2*	24 ± 2*
2014	23 ± 4	25 ± 7	27 ± 2*
2015	30 ± 4*	35 ± 4	37 ± 6
2016	25 ± 3	29 ± 5	28 ± 4*
2017 (st)	25 ± 5	29 ± 3	36 ± 6
2018	22 ± 3	25 ± 4	29 ± 6*
Средняя	20 ± 4	23 ± 4	25 ± 5
НСР _{0,05}	5,1	8,2	5,6

Несмотря на очень тесную корреляционную связь между средними показателями скороспелости и сохраняемости плодов голубики ($r = 0,91$), для некоторых сортов голубики характерны исключения. Например, плоды раннеспелого сорта ‘Duke’ хранятся дольше, чем среднеспелых сортов ‘Blueray’, ‘Denise Blue’, ‘Hardyblue’, ‘Northland’ и позднеспелых ‘Bluerose’ и ‘Rubel’. Также следует отметить, что в 2007, 2008 и 2016 гг. средняя сохраняемость плодов позднеспелых сортов голубики была на 1–2 сут меньше, чем среднеспелых, что, по-видимому, обусловлено особенностями метеорологических условий в эти годы.

В условиях Беларуси цветение почти у всех сортов голубики происходит практически одновременно – во второй половине мая [21], а созревание урожая начинается у раннеспелых сортов через 33–40 дней после цветения, у среднеспелых – через 40–46, у позднеспелых – через 46–55 дней (табл. 5). Это косвенно свидетельствует о том, что в плодах раннеспелых сортов процессы роста, созревания и, соответственно, старения и отмирания тканей протекают более интенсивно, чем в плодах позднеспелых сортов. После съема плодов в них происходят те же генетически обусловленные превращения веществ, что на материнском растении. Только в плодах, находящихся на растении до образования пробкового слоя между плодоножкой и плодом или до отделения плода от материнского растения, поддержание процессов метаболизма осуществляется за счет растения, а после съема – за счет аккумулированных в плоде органических соединений [14, 15]. В итоге из-за более быстрого старения тканей околоплодника и физиологических расстройств плоды раннеспелых сортов теряют товарные качества при хранении раньше. R. E. Gough [20] указывает на более интенсивный темп транспирации плодов раннеспелых сортов голубики высокорослой по сравнению с позднеспелыми. Автор сообщает, что плоды, интенсивно испаряющие влагу, характеризуются и более высокой скоростью дыхания, биологическая роль которого заключается в обеспечении плода энергией, необходимой для поддержания в его тканях процессов метаболизма. По сведениям Т. Н. Ивановой с соавт. [15], в условиях повышенной потери воды усиливается гидролиз и расход пластических веществ, снижается устойчивость к болезням и другим неблагоприятным факторам.

Таблица 5. Продолжительность фенологического периода развития «конец цветения – начало созревания» сортов голубики разных сроков созревания в 2007–2018 гг.

Table 5. Duration of the “end of flowering – beginning of ripening” phenophase of blueberry cultivars of different harvest ripening dates in 2007–2018

Год	Раннеспелые сорта						Среднеспелые сорта						Позднеспелые сорта										
	Bluetta	Croatian	Duke	Early-blue	North-blue	North-country	Patriot	Reka	Weymouth	Blue-crop	Blueray	Denise Blue	Hardy-blue	Northland	Blue-rose	Carolinable	Coville	Darrow	Elizabeth	Herbert	Jersey	Nelson	Rubel
2007	36	39	36	27	39	43	40	37	29	48	59	41	44	34	53	54	50	51	52	48	49	49	39
2008	41	37	34	54	37	41	38	35	50	37	37	43	45	42	51	53	49	48	49	44	47	48	41
2009	30	39	21	40	37	37	30	28	45	42	39	40	47	35	50	42	41	39	41	40	48	38	39
2010	32	37	32	38	40	43	39	29	41	34	47	42	39	46	35	44	46	44	45	64	37	35	52
2011	29	36	32	35	30	32	35	33	40	42	45	43	38	35	38	38	42	37	42	53	30	25	62
2012	27	31	30	35	33	36	34	32	47	35	33	39	36	42	39	39	44	39	39	67	44	39	61
2013	28	29	27	39	32	39	36	26	40	42	62	38	36	45	47	47	32	48	47	62	41	36	62
2014	33	38	30	41	39	42	42	33	42	35	55	40	41	48	43	51	45	39	47	59	41	41	58
2015	32	29	30	35	36	39	36	38	37	38	41	38	36	42	52	52	52	49	55	50	52	49	50
2016	26	35	28	28	32	36	41	42	37	35	39	42	39	32	57	57	50	54	50	51	40	37	46
2017	37	48	40	42	50	52	51	45	40	45	49	44	49	41	57	57	57	52	54	57	49	52	58
2018	46	48	41	38	42	43	51	37	31	44	43	49	45	37	50	53	53	48	57	66	41	42	65
Средняя	33 ± 4	37 ± 4	32 ± 4	38 ± 5	37 ± 4	40 ± 3	40 ± 4	35 ± 4	40 ± 4	40 ± 3	46 ± 6	42 ± 2	41 ± 3	40 ± 4	48 ± 5	49 ± 5	47 ± 5	46 ± 4	48 ± 4	55 ± 6	43 ± 4	41 ± 5	53 ± 7

Физиолого-биологическое состояние плода, обозначаемое как зрелость, – это переход от фазы роста к стадии старения. В этот период в плоде происходят биохимические и биофизические изменения, в результате которых он достигает сначала съёмной, затем потребительской (биологической) зрелости, окончательно формируются содержащиеся в нем семена, протопектин превращается в растворимый пектин, уменьшается связь между клетками, плоды становятся мягче и сочнее. После этого плод вступает в стадию отмирания, когда происходит распад содержащихся в нем веществ – физиологические (функциональные) расстройства [14]. Период от наступления съёмной до потребительской зрелости плодов называют послеуборочным дозреванием плодов и приравнивают к понятию «лежкость». Интенсивность прохождения фазы созревания плодов и ее продолжительность обуславливают их лежкость: чем продолжительнее период послеуборочного дозревания, тем больше сохраняемость плодов. У плодов разных видов растений переход от фазы созревания к отмиранию происходит с различной скоростью. У ягодных и косточковых культур, а также у раннеспелых сортов семечковых этот интервал очень короткий и две стадии зрелости практически совпадают, поэтому их плоды обладают относительно непродолжительной лежкостью [14]. Ягоды голубики, как и плоды других ягодных растений, характеризуются слабой защищенностью покровными тканями, что способствует более быстрой потере ими воды и увяданию. По сведениям R. E. Gough [20], покровные ткани плодов голубики представлены одним слоем не имеющего устьиц наружного эпидермиса, покрытого слоем воскоподобного вещества – кутином толщиной 5 мкм. К тому же плоды ягодных растений имеют морфобиологические особенности, а именно тонкие клеточные стенки, сочную мякоть, слабую водоудерживающую способность коллоидов [14].

Сравнительный анализ сохраняемости ягод голубики высокорослой с лежкостью плодов других распространенных и малораспространенных в Беларуси ягодных растений показывает, что в среднем плоды голубики высокорослой при низких положительных температурах хранятся значительно дольше ягод земляники, малины, облепихи и смородины, уступая плодам клюквы крупноплодной (табл. 6).

Т а б л и ц а 6. Сохраняемость плодов разных ягодных культур при низких положительных температурах

Table 6. Fruits of different berry crops are storage life at low positive temperatures

Культура	Температура хранения, °С	Сохраняемость, сут
Голубика высокорослая [4]	0	10–18
Ежевика [4]	0	2–3
Земляника садовая [22]	0	2–12
Клюква крупноплодная [4]	2–4	60–120
Крыжовник [4]	0	5
Малина [23]	0–2	3
Малина ремонтантная [24]	0	7–12
Облепиха [25]	0–1	3
Смородина черная [26]	0–1	5–7

Таким образом, результаты наших исследований и анализ литературных источников, касающихся лежкости ягод, позволяют заключить, что плоды голубики высокорослой сохраняют свои потребительские свойства значительно больший промежуток времени по сравнению с плодами других ягодных культур.

Заключение. Сохраняемость плодов голубики в условиях обычной газовой атмосферы в зависимости от таксона варьировалась от 7 сут (голубика топяная) до 29 сут (голубика высокорослая ‘Darrow’) при температуре хранения +5 °С. Среди исследуемых видов плоды голубики высокорослой и сортов, полученных на основе данного таксона, сохраняли товарные качества значительно больший период времени, чем ягоды других видов голубики. Плоды позднеспелых сортов голубики высокорослой медленнее теряли массу при хранении и, соответственно, обладали более продолжительной сохраняемостью по сравнению с ягодами раннеспелых таксонов. Плоды крупноплодных сортов голубики хранились дольше, чем ягоды мелкоплодных таксонов. Лежкость ягод голубики вне зависимости от их таксономической принадлежности определялась главным

образом естественной убылью массы, в меньшей степени – убылью вследствие функциональных расстройств и гнили.

Потенциальную лежкоспособность каждого таксона следует учитывать для успешного хранения плодов голубики. Ягоды таксонов с коротким периодом хранения во избежание значительных потерь следует сразу же после сбора охлаждать и отправлять на переработку или замораживать.

Список использованных источников

1. Голубика высокорослая – инновационная культура премиум-класса / В. В. Титок [и др.] // Наука и инновации. – 2012. – № 6 (112). – С. 25–27.
2. Биохимический состав плодов малораспространенных культур садоводства в Беларуси / Ж. А. Рупасова [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2014. – 315 с.
3. Hancock, J. Highbush blueberry breeding / J. Hancock // *Latv. J. Agronomy*. – 2009. – Vol. 12. – P. 35–38.
4. Bachmann, J. Postharvest handling of fruits and vegetables. Horticulture Technical Note / J. Bachmann, R. Earles // *ATTRA*. – 2000. – P. 1–14.
5. Water-dependent thermal transpirations in quinoa embryos / S. B. Matiacevich [et al.] // *Thermochimica Acta*. – 2006. – Vol. 448, N 2. – P. 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.06.016>
6. Effect of cultivar, controlled atmosphere storage, and fruit ripeness on the long-term storage of highbush blueberries / J. Hancock [et al.] // *HortTechnology*. – 2008. – Vol. 18, N 2. – P. 199–205. <https://doi.org/10.21273/horttech.18.2.199>
7. Shelf life determination of fresh blueberries (*Vaccinium corymbosum*) stored under controlled atmosphere and ozone / A. Concha-Mayer [et al.] // *Int. J. Food Sci.* – 2015. – Vol. 2015. – Art. ID 164143. <https://doi.org/10.1155/2015/164143>
8. Song, V. Respiration rate of blueberry in modified atmosphere at various temperatures / V. Song, H. K. Kim, K. L. Yam // *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* – 1992. – Vol. 117, N 6. – P. 925–929. <https://doi.org/10.21273/jashs.117.6.925>
9. Prange, R. Controlled atmosphere effects on blueberry maggot and lowbush blueberry fruit / R. K. Prange, P. D. Lister // *HortScience*. – 1992. – Vol. 27, N 10. – P. 1094–1096. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.10.1094>
10. Postharvest quality of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars in relation to storage methods / V. Chiabrando [et al.] // *Acta Horticulturae*. – 2006. – Vol. 715. – P. 545–552. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.715.84>
11. Проведение исследований по хранению плодов, ягод и винограда : метод. указания / Е. П. Франчук [и др.]. – М. : ВАСХНИЛ, 1983. – 76 с.
12. Лойко, Р. Э. Хранение и переработка плодов и овощей в колхозах и совхозах / Р. Э. Лойко, П. И. Дячек, Ф. И. Субоч. – Минск : Ураджай, 1987. – 149 с.
13. Павловский, Н. Б. Сравнительная морфологическая характеристика плодов голубики высокорослой (*Vaccinium corymbosum*) интродуцированных в Беларуси сортов / Н. Б. Павловский // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук*. – 2016. – № 2. – С. 108–114.
14. Физиология плодовых растений / Р. Бютнер [и др.] ; пер. с нем. Л. К. Садовской [и др.] ; под ред. Р. П. Кудрявцева. – М. : Колос, 1983. – 416 с.
15. Иванова, Т. Н. Технология хранения плодов, ягод и овощей : учеб. пособие / Т. Н. Иванова, В. С. Житникова, Н. С. Левгерова. – Орел : Орлов. гос. техн. ун-т, 2009. – 203 с.
16. Дрозд, О. В. Сохраняемость плодов голубики в зависимости от сортовой специфики и метеорологических условий сезона / О. В. Дрозд // *Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодководства» ; редкол. : В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2019. – Т. 31. – С. 242–249.*
17. Павловский, Н. Б. Влияние способа упаковки и температурного режима хранения плодов голубики высокорослой на их сохраняемость / Н. Б. Павловский // *Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодководства» ; редкол. : В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2012. – Т. 24. – С. 328–340.*
18. Díaz-Pérez, J. C. Transpiration rates in eggplant fruit as affected by fruit and calyx size / J. C. Díaz-Pérez // *Postharvest Biol. Technol.* – 1998. – Vol. 13, N 1. – P. 45–49. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(97\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(97)00078-1)
19. Becker, B. R. Transpiration and respiration of fruits and vegetables / B. R. Becker, B. A. Fricke // *Science et Technique du Floid (France)*. – Mode of access: https://b.web.umkc.edu/beckerb/publications/chapters/trans_resp.pdf. – Date of access: 28.07.2020.
20. Gough, R. E. The Highbush Blueberry and its Management / R. E. Gough. – New York ; London ; Norwood : The Haworth Press Inc., 1994. – 288 p.
21. Павловский, Н. Б. Ритмы сезонного роста и развития сортов голубики высокорослой, интродуцированных в Беларуси / Н. Б. Павловский // *Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодководства» ; редкол. : В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2015. – Т. 27. – С. 186–195.*
22. Новик, Г. А. Технологические регламент хранения ягод земляники садовой / Г. А. Новик, А. М. Криворот, М. Г. Максименко // *Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодководства» ; редкол. : В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2017. – Т. 29. – С. 214–224.*
23. Малина свежая. Требования при заготовках, поставках и реализации : СТБ 393-93. – Введ. 01.01.1994. – Минск : Госстандарт, 1994. – 7 с.
24. Емельянова, О. В. Технологические регламент хранения ягод малины ремонтантной / О. В. Емельянова, А. М. Криворот, Д. И. Марцинкевич // *Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодководства» ; редкол. : В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2016. – Т. 28. – С. 365–377.*
25. Плоды облепихи свежие. Технические условия СТБ 1012-95. – Введ. 01.04.2002. – Минск : Белстандарт, 2001. – 7 с.
26. Гудовский, В. А. Хранение плодов смородины черной в регулируемой атмосфере / В. А. Гудовский, Л. В. Кожина // *Плодоводство и ягодоводство России*. – 2019. – Т. 58. – С. 18–27.

References

1. Titok V. V., Veevnik A. A., Pavlovskiy N. B. Highbush Blueberry – innovation culture premium. *Nauka i innovatsii = Science and innovation*, 2012, no. 6 (112), pp. 25–27 (in Russian).
2. Rupasova Zh. A., Garanovich I. M., Shpitalnaya T. V., Vasilevskaya T. I. *Biochemical composition of fruits of rare gardening crops in Belarus*. Minsk, Belaruskaya navuka, 2014. 315 p. (in Russian).
3. Hancock J. Highbush blueberry breeding. *Latvian Journal of Agronomy*, 2009, vol. 12, pp. 35–38.
4. Bachmann J. Postharvest handling of fruits and vegetables. Horticulture technical note. *ATTRA*, 2000, pp. 1–14.
5. Matiacevich S. B., Castelli M. L., Maldonado S. B., Buera M. Pilar. Water-dependent thermal transpirations in quinoa embryos. *Thermochimica Acta*, 2006, vol. 448, no. 2, pp. 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2006.06.016>
6. Hancock J., Callow P., Serçe S., Hanson E., Beaudry R. Effect of cultivar, controlled atmosphere storage, and fruit ripeness on the long-term storage of highbush blueberries. *HorTechnology*, 2008, vol. 18, no. 2, pp. 199–205. <https://doi.org/10.21273/horttech.18.2.199>
7. Concha-Mayer A., Eifert J. D., Williams R. C., Marcy J. E., Welbaum G. J. Shelf life determination of fresh blueberries (*Vaccinium corymbosum*) stored under controlled atmosphere and ozone. *International Journal of Food Science*, 2015, vol. 2015, art. ID 164143. <https://doi.org/10.1155/2015/164143>
8. Song V., Kim H. K., Yam K. L. Respiration rate of blueberry in modified atmosphere at various temperatures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1992, vol. 117, no. 6, pp. 925–929. <https://doi.org/10.21273/jashs.117.6.925>
9. Prange R. K., Lidster P. D. Controlled atmosphere effects on blueberry maggot and lowbush blueberry fruit. *HortScience*, 1992, vol. 27, no. 10, pp. 1094–1096. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.10.1094>
10. Chiabrando V., Peano C., Beccaro G., Bounous G., Rolle L. Postharvest quality of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars in relation to storage methods. *Acta Horticulturae*, 2006, vol. 715, pp. 545–552. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.715.84>
11. Franchuk E. P., Lagovoi E. V., Skripnikov V. Yu., Kolesnik A. A., Osenova E. Kh., Naichenko A. M. [et al.]. *Conducting research on the storage of fruits, berries and grapes*. Moscow, All-Union Academy of Agricultural Sciences named after V. I. Lenin, 1983. 76 p. (in Russian).
12. Loiko R. E., D'yachek P. I., Suboch F. I. *Storage and processing of fruits and vegetables on collective and state farms*. Minsk, Uradzhai Publ., 1987. 149 p. (in Russian).
13. Pavlovskii N. B. Comparative morphological characteristics of tall blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruits of varieties introduced in Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2016, no. 2, pp. 108–114 (in Russian).
14. Friedrich G., Neumann D., Vogl M. (Hrsg.). *Physiologie der Obstgehlze*. Berlin, Springer-Verlag, 1978. 602 S. (Russ. ed.: Byutner R., Cherny L., Fidler V., Fisher M., Glimerot K., Katsfus M. [et al.]. *Fiziologiya plodovyykh rastenii*. Moscow, Kolos Publ., 1983. 416 p.) (in Russian).
15. Ivanova T. N., Zhitnikova V. S., Levgerova N. S. *Storage technology for fruits, berries and vegetables*. Orel, Oryol State Technical University, 2009. 203 p. (in Russian).
16. Drozd O. V. Preservation of blueberry fruits depending on the varietal specifics and meteorological conditions of the season. *Plodovodstvo: nauchnye trudy* [Fruit growing: scientific works]. Samokhvalovich, 2019, vol. 31, pp. 242–249 (in Russian).
17. Pavlovskii N. B. Influence of the method of packaging and the temperature regime of storage of tall blueberry fruits on their preservation. *Plodovodstvo: nauchnye trudy* [Fruit growing: scientific works]. Samokhvalovich, 2012, vol. 24, pp. 328–340 (in Russian).
18. Díaz-Pérez J. C. Transpiration rates in eggplant fruit as affected by fruit and calyx size. *Postharvest Biology and Technology*, 1998, vol. 13, no. 1, pp. 45–49. [https://doi.org/10.1016/s0925-5214\(97\)00078-1](https://doi.org/10.1016/s0925-5214(97)00078-1)
19. Becker B. R., Fricke B. A. *Transpiration and respiration of fruits and vegetables. science et technique du froid (France)*. Available at: https://b.web.umkc.edu/beckerb/publications/chapters/trans_resp.ppd (accessed 28.07.2020).
20. Gough R. E. *The highbush blueberry and its management*. New York, London, Norwood, The Haworth Press Inc., 1994. 288 p.
21. Pavlovskii N. B. Rhythms of seasonal growth and development of tall blueberry varieties introduced in Belarus. *Plodovodstvo: nauchnye trudy* [Fruit growing: scientific works]. Samokhvalovich, 2015, vol. 27, pp. 186–195 (in Russian).
22. Novik G. A., Krivorot A. M., Maksimenko M. G. Technological regulations for storing garden strawberries. *Plodovodstvo: nauchnye trudy* [Fruit growing: scientific works]. Samokhvalovich, 2017, vol. 29, pp. 214–224 (in Russian).
23. *Fresh raspberries. Requirements for procurement, supply and sale: STB 393-93. Introduced 01.01.1994*. Minsk, State Standard Publ., 1994. 7 p. (in Russian).
24. Emel'yanova O. V., Krivorot A. M., Martsinkevich D. I. Technological regulations for storing remontant raspberries. *Plodovodstvo: nauchnye trudy* [Fruit growing: scientific works]. Samokhvalovich, 2016, vol. 28, pp. 365–377 (in Russian).
25. *Sea buckthorn fruits are fresh. Specifications STB 1012-95. Introduced on 01.04.2002*. Minsk, Belstandard Publ., 2001. 7 p. (in Russian).
26. Gudkovskii V. A., Kozhina L. V. Storing black currant fruit in a controlled atmosphere. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii* [Fruit and berry growing in Russia], 2019, vol. 58, pp. 18–27 (in Russian).

Інфармацыя аб аўтары

Павловскіі Николай Болеславовіч – канд. біол. навук, заведуючы лабораторыі. Цэнтральны ботанічны сад НАН Беларусі (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: pavlovskiy@tut.by

Information about the author

Nikolay B. Pavlovskiy – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pavlovskiy@tut.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 582.745.12/13:581.45:[581.192.2:547.52]:635.918

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-312-319>

Поступила в редакцию 30.04.2021

Received 30.04.2021

Н. В. Гетко¹, Е. В. Атесленко¹, Р. В. Кулян², В. П. Субоч³, В. В. Титок¹

¹Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Субтропический научный центр РАН, Сочи, Российская Федерация

³Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию, Минск, Республика Беларусь

АРОМАТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ, ВЫДЕЛЯЕМЫЕ РАСТЕНИЯМИ РОДА *CITRUS* L. В УСЛОВИЯХ ОРАНЖЕРЕЙ

Аннотация. Методом GC/MS-анализа исследован химический состав ароматических летучих соединений, выделяемых листьями тропических представителей рода *Citrus* L. (сладкий лайм (лиметта) – *Citrus limetta* Risso и его сорта *Citrus limetta* ‘Марокко’, *Citrus limetta* ‘Кислая оранжевая’, сорта кислого лайма – *Citrus aurantiifolia* ‘Таити’ и *Citrus aurantiifolia* ‘Форо’, а также лимон – *Citrus limon* ‘Бесколючий’) в условиях оранжерей. Количество выявленных для каждого из них ароматических субстанций натуральных эфирных масел листьев составило 38, 41, 37, 44, 37 и 30 соединений соответственно. Характерным для всех 6 исследуемых таксонов (что подтверждает их генетическую близость) оказалось наличие у них 10 компонентов (D-лимонен, Z-citral (neral), E-citral (geranial), elemene isomer (изомеры элемена), α -copaene, trans- α -bergamotene, benzoic acid, 3-hexenyl ester, trans- γ -bisabolene, β -caryophyllene oxide, α -humulene epoxide II); для гибридов и сортов сладкого и кислого лаймов – дополнительно еще 7 компонентов, относящихся к классу терпеноидов (кислородсодержащие соединения (citronellal, citronellol, citronellyl, β -sinensal) и сесквитерпены (cadina-3,5-diene, β -caryophyllene, trans- β -bergamotene)), а также ряда индивидуальных ароматических компонентов у каждого из сортов в букете цитрусово-хвойного аромата их листьев. Исследованные таксоны могут быть рекомендованы в составе композиций ароматических растений в интерьерах различного функционального назначения.

Ключевые слова: лиметта, *Citrus limetta* Risso, *Citrus limetta* ‘Марокко’, *Citrus limetta* ‘Кислая оранжевая’, сорта лайма, *Citrus aurantiifolia* ‘Таити’, *Citrus aurantiifolia* ‘Форо’, *Citrus limon* ‘Бесколючий’, летучие компоненты листьев

Для цитирования: Ароматические соединения, выделяемые растениями рода *Citrus* L. в условиях оранжерей / Н. В. Гетко [др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 312–319. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-312-319>

Nelly V. Hetka¹, Ekaterina V. Ateslenko¹, Raisa V. Kulyan², Victor P. Suboch³, Vladimir V. Titok¹

¹Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Subtropical Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Sochi, Russian Federation

³Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

AROMATIC COMPOUNDS SECRETED BY PLANTS OF THE GENUS *CITRUS* L. IN GREENHOUSE CONDITIONS

Abstract. Using the GC/MS method analysis of the chemical composition of aromatic volatile compounds released by the leaves of tropical representatives of the genus *Citrus* L. (sweet lime (limetta) – *Citrus limetta* Risso and its varieties: *Citrus limetta* ‘Marokko’, *Citrus limetta* ‘Kislaya oranzhevaya’, sour lime – *Citrus aurantiifolia* ‘Taiti’ and *Citrus aurantiifolia* ‘Foro’, as well as lemon – *Citrus limon* ‘Beskolyuchii’) in greenhouse conditions were studied. The number of aromatic substances of the gas phase of natural essential oils of leaves revealed for each of them was 38, 41, 37, 44, 37 and 30 compounds, respectively. 10 components were characteristic of all six taxa under study, which confirm their genetic affinity: D-limonene, Z-citral (neral), E-citral (geranial), elemene isomer, α -copaene, trans- α -bergamotene, benzoic acid, 3-hexenyl ester, trans- γ -bisabolene, β -caryophyllene oxide, α -humulene epoxide II. For hybrids and varieties of sweet lime (limetta) and sour lime, 7 more components belonging to the class of terpenoids are also characteristic: oxygen-containing compounds (citronellal, citronellol, citronellyl, β -sinensal) and sesquiterpenes (cadina-3.5-diene, β -caryophyllene, trans- β -bergamotene), as well as a number of individual aromatic substances, characteristic for each of the varieties in the bouquet of their citrus-coniferous aroma of leaves. The studied taxa can be recommended as part of compositions of aromatic plants in interiors for various functional purposes.

Keywords: limetta, *Citrus limetta* Risso, *Citrus limetta* ‘Marokko’, *Citrus limetta* ‘Kislaya oranzhevaya’, lime varieties, *Citrus aurantiifolia* ‘Taiti’, *Citrus aurantiifolia* ‘Foro’, *Citrus limon* ‘Beskolyuchii’, volatile components of leaves

For citation: Hetka N. V., Ateslenko E. V., Kulyan R. V., Suboch V. P., Titok V. V. Aromatic compounds secreted by plants of the genus *Citrus* L. in greenhouse conditions. *Vesti Natsyional'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyagichnykh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 312–319 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-312-319>

Введение. Цитрусовые растения (апельсин, мандарин, грейпфрут, лимон) являются наиболее распространенными среди плодовых тропических и субтропических культур. Они занимают основные площади в США, Китае (южный и центральный районы), Японии, Индии, Пакистане, Австралии, в странах Средиземноморья. В субтропиках Грузии, Азербайджана, Таджикистана и юга России (Сочи) эти растения выращивают в условиях открытого грунта. Оранжерейная культура цитрусов получила широкое распространение в условиях умеренного климата.

Коллекционный фонд Центрального ботанического сада (ЦБС) НАН Беларуси, созданный в 1991 г., насчитывает около 100 таксонов, относящихся к роду *Citrus* L. [1]. В последнее время он пополнен представителями родительских форм и гибридных видов из группы так называемых сладких цитрусов (лайм) [2]. Редкие виды рода *Citrus* L., культивируемые в оранжереях, естественно произрастают в жарких сухих тропических и субтропических регионах земного шара и, в соответствии с перечнем плодовых растений теплых климатов Земли J. Morton [3], представлены в числе 22 природных и гибридных видов рода *Citrus* L., в том числе лимоном (*Citrus limon* (L.) Osbeck), кислым лаймом (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) и сладким лаймом (Sweet Lime), лиметтой (*Citrus limetta* Risso). Диапазон годовых температур их произрастания – от +16–18 до +45 °С.

Растения, объединяемые под общим названием «лайм», когда-то относились к лимонам и рассматривались как их гибриды. В современной таксономии различают следующие виды: кислый лайм (key lime) – *Citrus aurantiifolia* Swingle, сладкий лайм (sweet lime) – *Citrus limetta* Risso, лайм персидский – *Citrus latifolia* Tanaka и др. В зависимости от кислотности плодов гибриды относят к тому или другому виду. Из плодов, цветков и листьев лайма получают ценное эфирное масло для парфюмерной и фармацевтической промышленности [4, 5].

***Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle – лайм настоящий, кислый** (syn. *Limonia spinosum* Mill.; *L. acidissima* Houtt. (non L.); *L. aurantifolia* Christm.; *Citrus* × *lima* Macfad.; *C. acida* Roxb.; *C. notissima* Blanco; *Citrus* × *limonellus* Hassk.; *C. limetta* Risso var. *aromatic*; *C. excelsa* Wester. – полиэмбриональный вид цитрусовых растений семейства Rutaceae, генетически наиболее близкий к лимону). Вид распространен в Индостане (в долинах Гималаев) и на прилежащих островах (в диком виде), натурализовался почти везде в тропиках и жарких субтропиках.

Вид представляет собой небольшое дерево или куст высотой от 1,5 до 5,0 м, с густой кроной и ветвями, покрытыми короткими колючками. Соцветия пазушные, с 1–7 цветками, цветение ремонтантное; плоды небольшие – 3,5–6,0 см в диаметре, яйцевидные, мякоть зеленоватая, сочная, очень кислая. Кожура зеленая, желтовато-зеленая либо желтая, при полной зрелости очень тонкая.

Исследования эфирных масел, извлеченных из цветков, листьев и кожуры *Citrus aurantium* L. var. *amara* из Туниса (Набель), проведенные с использованием GC-FID и GC/MS методов [6], показали, что основными компонентами масла нероли (цветки) были линалоол (34,4 %), линалилацетат (11,3 %) и лимонен (10,9 %), петитгрейнового масла (листья) – линалоол (36,8 %), линалилацетат (22,1 %) и α-терпинеол (11,7 %), а масла кожуры лайма – лимонен (90,6 %). Произрастающие в различных географических регионах растения данного вида отличаются по набору качественных показателей получаемого из них эфирного масла. Так, в масле кожуры данного вида, произрастающего в Иране, лимонен и β-мирцен были зарегистрированы как основные компоненты, в то время как линалоол, линалилацетат и α-терпинеол преобладали в масле листьев [7].

Все виды эфирного масла кислого лайма терпкие на вкус, имеют освежающий цитрусовый горьковатый аромат и отличаются высоким содержанием тяжелых терпенов, придающих им специфическую древесно-смолистую и камфорно-скипидарную нотку. Богатое натуральными компонентами (лимонен, цимен, цитраль), оно благотворно влияет на работу легких и дыхательный путей, поэтому достойно возглавляет список самых чудодейственных природных средств [4, 5].

***Citrus limetta* Risso – сладкий лайм (sweet lime), лиметта** – вечнозеленое дерево. Считается природным гибридом, и его систематическая принадлежность обозначена в настоящее время как семейство Рутовые (Rutaceae), род – цитрус (*Citrus* L.), вид – лиметта (*Limetta*), разновидность – Risso. Предполагаемые родители – лайм, лимон или апельсин [8].

Сладкий лайм – невысокое, но достаточно мощное дерево с прямым стволом и пышной, густой шаровидной кроной. Яйцевидные листья имеют острый кончик, немного зазубренный край и изумрудно-зеленый цвет.

Период цветения растения продолжается с начала весны и до поздней осени. Небольшие округлые пятилепестковые цветы собраны в небольшие рыхлые соцветия, имеют белоснежную окраску и сильный цитрусовый аромат. Плод – сферическая, слегка приплюснутая ягода с небольшим сосочком и с тонкой, слегка маслянистой блестящей гладкой кожурой зеленовато-желтого цвета, которая легко отделяется от сочной, ароматной желтовато-зеленой мякоти, которая на вкус кислее, чем у апельсина, но намного слаще, чем у лимона и кислого лайма. Мякоть плода поделена на 10 сегментов и практически не содержит косточек.

Родиной сладкого лайма можно считать Южную Азию (точнее, полуостров Малакка). Он произрастает в странах с тропическим и жарким субтропическим климатом, таких как Куба, Италия, Индия, Египет, Шри-Ланка, Индонезия, Бразилия, Венесуэла, Мексика, в Западной Африке, а также в некоторых других регионах (оттуда идут основные поставки масла). Его добывают методом холодного отжима и путем гидроdistилляции кожуры плодов лаймового дерева. Для масла характерен запоминающийся цитрусовый, резкий, сладковатый, терпкий, морозный, освежающий аромат с древесным и фруктовым оттенком. Основных компонентов выявлено 10, из них преобладают D-limonene (92,35 %), β -myrcene (2,43 %), β -linalool (1,27 %) [8]. Все эти вещества имеют свойства, положительно влияющие на человеческий организм. Извлеченное с помощью гидроdistилляции эфирное масло из флаведо образцов сладкого лайма, произрастающего в различных районах Мексики, исследовано методами GC и MS. Выявлено 46 летучих ароматических компонентов, среди которых преобладали D-лимонен (74,4 %), бергамот (8,23 %) и β -пинен (7,62 %) [9].

Понятие «эфирное масло» предполагает два состояния летучих ароматических веществ у одного и того же растения. Одно из них, *природная форма* эфирного масла, характерно для растения, не подвергнувшегося физико-химическим воздействиям (воды, температуры, растворителей). Весь комплекс летучих веществ в таком растении соответствует природному состоянию, а аромат самого растения определяется природным составом эфирного масла. Другое состояние – это *концентрированная форма* летучих соединений эфирного масла, выделенного из растения в целом или из отдельных его частей различными методами. Концентрированная форма извлеченного эфирного масла может сильно отличаться от его природной формы как по запаху, так и по физическому состоянию, которое зависит от способа его выделения. Общепринятое (коммерческое) понятие об эфирном масле связывают с его концентрированной формой. Для извлечения масла из надземной части, листьев и стеблей обычно используется метод гидроdistилляции.

Цель работы – оценить видовое разнообразие таксонов, представляющих группу растений рода *Citrus* L., культивируемых в оранжереях Центрального ботанического сада, на основе анализа химического состава выделяемых листьями ароматических летучих компонентов натуральных эфирных масел.

Объекты и методы исследования. Исходный генетический материал перечисленных таксонов (черенки) получен из коллекционного фонда цитрусов, выращиваемых в защищенном грунте в Субтропическом научном центре Российской академии наук (г. Сочи, Россия) [10]. К этим растениям относятся сладкий лайм *Citrus limetta* Risso и его сорта – *Citrus limetta* ‘Марокко’ и *Citrus limetta* ‘Кислая оранжевая’, сорта кислого лайма – *Citrus aurantiifolia* ‘Таити’ и *Citrus aurantiifolia* ‘Foro’, а также *Citrus limon* ‘Бесколючий’. Растения репродуцированы и успешно выращиваются в ЦБС в горшечной культуре. Субстратная смесь для выращивания состоит из нейтрализованного торфа, песка и агроперлита в соотношении 2:1:1, pH субстрата – 5,2–6,0; температура выращивания – от +16–18 до +25–35 °C. Эти высокодекоративные плодовые и ароматические растения, хорошо адаптированные к кадочной культуре выращивания, могут быть широко использованы в озеленении интерьеров различного функционального назначения, для создания зимних садов и развития любительского и промышленного цитрусоводства в защищенном грунте.

Методика анализа химического состава выделяемых листьями легколетучих веществ, подробно описанная в работах [1, 2], основана на их экстракции из воздушного пространства над

поверхностью измельченных воздушно-сухих листьев, нагретых до 40°C, с использованием микротвердофазного адсорбента. Последующее хроматографическое разделение их осуществляется на капиллярной колонке HP-5MS длиной 30 м (внутренний диаметр 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм). Регистрацию масс-спектров с анализом хроматограмм, идентификацией компонентов и определением их относительного содержания осуществляли с помощью хроматографа системы Agilent Technologies 6850 Series II (Network GC System /5975B VLMSD), оснащенного компьютерной системой обработки данных, библиотекой масс-спектров NIST и программным обеспечением AMDIS.

Результаты и их обсуждение. Эфирные масла представителей данной группы растений рода *Citrus* L. активно изучаются в медицине и фармакологии в качестве ароматических агентов. При этом оценивается прежде всего их антиоксидантная, антипролиферативная и гипотензивная активность [4, 5]. Предметом наших исследований являлись легколетучие ароматические компоненты газовой фазы натуральных эфирных масел, выделяемые листьями этих растений в воздушную среду оранжерей. Химический состав этих соединений, характерных для редких представителей рода *Citrus* L., представлен в таблице.

Химический состав летучих ароматических компонентов листьев сладких цитрусов, культивируемых в оранжереях

The chemical composition of the volatile aromatic components of sweet citrus leaves cultivated in greenhouses

Время удержания, мин	Название химического соединения, формула	Содержание субстанций, %					
		<i>Citrus limetta</i>	<i>Citrus limetta</i> 'Марокко'	<i>Citrus limetta</i> 'Кислая оранжевая'	<i>Citrus aurantiifolia</i> 'Таити'	<i>Citrus aurantiifolia</i> 'Форс'	<i>Citrus limon</i> 'Бесколючий'
7.00	Trans-3-hexen-1-ol, C ₆ H ₁₂ O	—	—	0,47	—	0,41	—
8.96	α -Pinene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	—	0,53	—
8.96	3-Methyl-apopinene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	—	0,51	0,61
9.59	Benzaldehyde, C ₇ H ₆ O	—	—	—	0,12	0,07	0,05
9.63	Cyclofenchene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	0,13	7,19	0,77
10.01	β -Pinene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	—	10,76	7,44
10.10	β -Phelandrene, C ₁₀ H ₁₆	0,40	—	0,42	0,06	—	—
10.22	β -Myrcene, C ₁₀ H ₁₆	0,98	1,01	0,41	0,88	—	—
10.94	Carene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	—	0,77	0,79
11.27	Eucalyptol, C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	—	—	3,25	2,30
11.33	Limonene, C ₁₀ H ₁₆	—	17,4	—	—	—	—
11.41	D-Limonene, C ₁₀ H ₁₆	21,9	18,4	10,30	15,71	9,20	9,74
11.42	(+)-4-Carene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	—	0,65	—
11.43	β -Ocimene, C ₁₀ H ₁₆	1,17	1,42	—	—	0,84	—
11.70	γ -Terpinene, C ₁₀ H ₁₆	1,14	0,07	—	0,33	0,23	0,72
12.02	Trans-linalool oxide (furanoid), C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0,57	0,49	0,30	0,38	—	—
12.10	4-Thujanol, C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	—	0,01	0,83	0,71
12.29	p-Mentha-2,4(8)-diene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	0,84	—	—
12.31	m-Cymene, C ₁₀ H ₁₂	0,13	0,21	0,47	—	—	—
12.35	Rosefuran, C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	—	—	—	0,59
12.64	Furan, 2-acetyl-5-methyl-, C ₇ H ₈ O ₂	—	—	—	—	—	0,11
12.68	Linalool, C ₁₀ H ₁₈ O	16,00	12,50	19,90	13,41	—	—
12.93	Allo-ocimene, C ₁₀ H ₁₆	—	—	—	—	—	0,47
13.24	(E)-p-Menth-2-en-1-ol, C ₁₀ H ₁₈ O	0,69	0,54	0,57	0,58	—	—
13.62	Isoneral, C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	—	—	—	1,33
13.66	(R)-(+)-Citronellal, C ₁₀ H ₁₈ O	17,10	13,30	16,20	18,34	11,27	—
13.89	Isopulegol, C ₁₀ H ₁₈ O	0,81	0,59	0,69	0,77	—	—
13.94	Isogeranial, C ₁₀ H ₁₆ O	—	—	—	—	—	1,93
14.22	α -Terpineol, C ₁₀ H ₁₈ O	—	—	—	—	3,45	—

Окончание таблицы

Время удержания, мин	Название химического соединения, формула	Содержание субстанций, %					
		<i>Citrus limetta</i>	<i>Citrus limetta</i> 'Марокко'	<i>Citrus limetta</i> 'Кислая оранжевая'	<i>Citrus aurantiifolia</i> 'Таити'	<i>Citrus aurantiifolia</i> 'Форо'	<i>Citrus limon</i> 'Бесколючий'
14.49	Teresantalol, C ₁₀ H ₁₆ O	5,02	2,83	3,33	3,93	—	—
14.55	2,5-Dihydrotoluene, C ₇ H ₁₀	1,11	—	—	0,43	—	—
14.73	Citronellol, C ₁₀ H ₂₀ O	1,37	1,61	1,74	1,32	1,00	—
15.01	Z-Citral (neral), C ₁₀ H ₁₆ O	0,76	0,16	0,45	0,22	0,48	12,00
15.11	Linalyl acetate, C ₁₂ H ₂₀ O ₂	—	0,70	—	—	—	—
15.15	Carvone, C ₁₀ H ₁₄ O	0,65	—	0,58	0,33	0,22	—
15.47	E-Citral (geranial), C ₁₀ H ₁₆ O	0,74	0,52	0,87	0,48	0,86	14,50
15.55	1,7-Octadiene-3,6-diol, 2,6-dimethyl, C ₁₀ H ₁₈ O ₂	—	0,93	0,70	1,09	—	—
15.63	p-Mentha-1,8-dien-3-one, C ₁₀ H ₁₄ O	1,15	0,79	0,99	0,91	—	—
15.78	Thymol, C ₁₀ H ₁₄ O	—	—	—	1,67	—	—
15.99	Undecanal, C ₁₁ H ₂₂ O	0,45	0,42	—	0,32	1,15	0,72
16.58	Citronellyl acetate, C ₁₂ H ₂₂ O ₂	2,08	2,41	2,66	2,36	2,16	—
16.59	Elemene isomer, C ₁₅ H ₂₄	0,55	0,21	0,79	0,28	0,10	1,13
16.68	Citronellyl isobutyrate, C ₁₄ H ₂₆ O ₂	—	—	—	2,03	—	0,33
16.89	Nerol acetate, C ₁₂ H ₂₀ O ₂	—	1,14	1,60	3,06	4,47	10,82
16.93	Cadina-3,5-diene, C ₁₅ H ₂₄	1,20	0,55	0,57	0,78	0,68	—
17.00	α-Cubebene, C ₁₅ H ₂₄	—	0,75	—	—	—	—
17.18	Geranyl acetate, C ₁₂ H ₂₀ O ₂	—	1,97	2,45	—	—	—
17.30	α-Copaene, C ₁₅ H ₂₄	1,34	0,84	0,85	1,02	2,94	0,34
17.53	β-Elemene, C ₁₅ H ₂₄	—	—	1,56	—	—	—
17.88	Cis-α-bergamotene, C ₁₅ H ₂₄	—	—	—	2,08	—	—
18.19	β-Caryophyllene, C ₁₅ H ₂₄	1,34	0,74	0,85	0,90	0,98	—
18.22	Trans-α-bergamotene, C ₁₅ H ₂₄	6,54	4,06	6,07	7,18	8,37	5,64
18.25	(E)-β-Farnesene, C ₁₅ H ₂₄	0,87	—	—	—	—	—
18.44	Geranyl propionate, C ₁₃ H ₂₂ O ₂	—	—	—	—	—	1,19
18.50	γ-Murolene, C ₁₅ H ₂₄	0,91	0,48	—	0,97	0,73	—
18.65	α-Caryophyllene C ₁₅ H ₂₄	2,40	1,95	2,00	2,01	—	2,39
18.83	1,2-Enzenediol, o-cetoxyacetyl-(4-utylbenzoyl)-, C ₂₁ H ₂₂ O ₆	0,01	0,16	0,29	—	0,64	—
18.85	Trans-β-bergamotene, C ₁₅ H ₂₄	0,95	0,68	0,93	0,83	0,58	—
18.90	Cis-murola-4 (15), 5-diene, C ₁₅ H ₂₄	—	0,70	—	—	—	—
19.18	β-Bisabolene, C ₁₅ H ₂₄	—	—	—	4,00	—	2,82
19.75	E-Nerolidol, C ₁₅ H ₂₆ O	0,26	0,38	—	—	0,84	0,20
19.77	(Z)-Nerolidol, C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	—	—	0,75	—
19.86	Hedycaryl, C ₁₅ H ₂₆ O	—	—	0,82	1,14	—	—
19.94	Benzoic acid, 3-hexenyl ester, C ₁₃ H ₁₆ O ₂	0,69	0,38	0,32	0,43	1,00	0,26
20.12	Trans-γ-bisabolene, C ₁₅ H ₂₄	0,57	0,43	0,71	0,64	0,79	0,36
20.38	β-Caryophyllene oxide, C ₁₅ H ₂₄ O	2,31	2,42	2,02	1,57	3,36	2,97
20.41	Spatulenol, C ₁₅ H ₂₄ O	1,49	1,39	1,34	1,27	—	—
20.72	α-Humulene epoxide II, C ₁₅ H ₂₄ O	0,19	0,30	0,23	0,14	0,71	0,46
21.45	α-Bisabolol, C ₁₅ H ₂₆ O	0,39	0,34	0,49	0,44	—	—
21.55	β-Sinensal, C ₁₅ H ₂₂ O	0,26	0,62	0,52	0,19	0,31	—
Содержание в общем объеме, %		96,49	96,79	85,46	95,58	83,08	83,69

Всего в пределах данной группы таксонов выделено 70 летучих ароматических субстанций, в том числе 37 кислородсодержащих и 33 углеводорода. Характерными для всех 6 исследуемых видов и гибридов, подтверждающих их генетическую близость, являются 10 компонентов, а наиболее значимыми среди них по долевого содержанию в общем объеме веществ являются: D-limo-

nene, Z-citral (neral), E-citral (geranial), elemene isomer (изомеры элемена), α -copaene, trans- α -bergamotene, benzoic acid, 3-hexenyl ester, trans- γ -bisabolene, β -caryophyllene oxide, α -humulene epoxide II.

Для гибридов и сортов лайма *Citrus limetta* и *Citrus aurantiifolia* характерными являются также еще 7 летучих соединений, в том числе кислородсодержащие компоненты (citronellal, citronellol, citronellyl, β -sinensal) и сесквитерпены (cadina-3,5-diene, β -caryophyllene, trans- β -bergamotene). Вместе с тем единственным ароматическим компонентом, характерным только для сладкого лайма и его сортов, является монотерпен m-cumene, $C_{10}H_{12}$ – с ароматом петрушки, в то время как общих компонентов только для сортов кислого лайма не выявлено.

Наиболее значимым по объему среди ароматических компонентов, подтверждающих родство сортов кислого лайма (*Citrus aurantiifolia*) с лимоном (*Citrus limon*), исходя из полученных результатов, является *Nerol acetate*. В небольших долях присутствуют 4-thujanol, cyclofenchene, benzaldehyde; у сладкого лайма – *Nerol acetate* и α -caryophyllene. Исходя из представленных в таблице данных, у сорта *C. aurantiifolia* ‘Таити’ выявлено 44 достоверно значимых легколетучих компонента, составляющих в сумме 95,58 % от их общего объема (кислородсодержащих компонентов – 56,51 %, углеводов – 39,07 %). Из кислородсодержащих компонентов преобладают терпеноидный альдегид цитронеллаль (18,34 %) с приятным ароматом, терпеноидный спирт линалоол (13,41 %) и их сложные эфиры, а также нераль и гераниаль и их эфиры. Среди углеводов монотерпены составляют 18,38 % от общего объема ароматических соединений (на D-лимонен приходится 15,71 %). Содержание γ -терпинена составляет всего 0,33 %, а сесквитерпены представлены бергамотенами, сесквитерпеновыми аналогами α - и β -пиненов, их транс- и цис-стереоизомерами (10,11 %), бисаболенами (4,64 %). Большое разнообразие выделяемых листьями летучих компонентов (37) характерно и для сорта *Citrus aurantiifolia* ‘Форго’. Доминантами в аромате листьев являются β -пинен (10,76 %), D-лимонен (9,20 %) и циклофенхен, или изопинен, с ароматом сосны (7,19 %).

Кроме общих компонентов газовой фазы выделяемых листьями соединений, а именно углеводов, в том числе монотерпенов (циклофенхен, β -пинен, D-лимонен, γ -терпинен) и сесквитерпенов (изомеры элемена, α -копаен, транс- α -бергамотен, транс- α -бисаболен), кислородсодержащих компонентов (4-туйенол, Z- и E-цитраль, ундеканаль, нерол ацетат и другие сложные эфиры), в составе исследуемых таксонов выявлены общие для обоих культиваров кислого лайма *C. aurantiifolia* сесквитерпены (β -кариофиллен, кадинен, γ -мууролен, транс- β -бергамотен и α -калокорен), а также один из компонентов аромата листьев, характерный только для сорта *C. aurantiifolia* ‘Форго’ – Z-неролидол.

У исследуемых таксонов сладкого лайма *Citrus limetta* Risso среди ароматических летучих соединений, кроме упомянутых выше, в значимых объемах обнаружено 7 компонентов, подтверждающих их генетическую близость, а именно: linalool, citronellal, citronellol, citronellyl, trans- β -bergamotene, β -caryophyllene. Кроме того, отличительным признаком всех исследованных гибридов лайма (*Citrus aurantiifolia* и *Citrus limetta*) является наличие ациклического сесквитерпеноида альдегида β -синенсаль (β -sinensal) – компонента, который не выявлен у сортов и гибридов лимона *Citrus limon* (L.) Osbeck [1].

По качественному составу и долевого содержанию летучих компонентов листьев *Citrus limon* ‘Бесколючий’ генетически наиболее близок к видам и гибридам лимона, исследованным нами ранее [1, 2]. Почти 83,69 % от их общего объема приходится на кислородсодержащие компоненты, среди которых преобладают E- и Z-изомеры цитраля ($C_{10}H_{16}O_2$) гераниаль и нераль – 26,50 %; терпеноидный спирт эвкалиптол ($C_{10}H_{18}O$) – 2,30; эфиры, оксиды α - и β -изомеров сесквитерпена кариофиллена ($C_{15}H_{24}O$) – 5,40 %. Углеводы в составе ароматических компонентов – это монотерпены ($C_{10}H_{16}$) β -пинен (7,44 %) и D-лимонен (9,74 %), сесквитерпены ($C_{15}H_{24}$) α -бергамотен (5,64 %) и β -бисаболен (2,82 %).

Как показала оценка полезных качеств испытанных в данном исследовании видов, гибридов и сортов лайма, важными, кроме лимонена, являются также такие ароматические субстанции, присутствующие в составе летучих компонентов листьев, как линалоол и эвкалиптол.

Лимонен существует в виде двух оптически активных форм (энантиомеров) и в виде рацемической смеси, которую раньше считали одним веществом (дипентен). Содержится во многих

эфирных маслах (в эфирных маслах цитрусовых до 90 % D-лимонена). D-лимонен (R-энантиомер) обладает цитрусовым запахом и используется в качестве отдушки в парфюмерии и в производстве ароматизаторов. L-лимонен (S-энантиомер) имеет ярко выраженный запах хвои. Этот энантиомер также используется в качестве отдушки, но в настоящее время обсуждаются его возможные канцерогенные свойства. В составе легколетучих компонентов листьев у лимона ‘Бесколючий’ присутствует D-лимонен с цитрусовым ароматом.

Линалоол представляет собой третичный спирт, монотерпеноид. Состоит из двух энантиомеров: (R)-(-)-линалоола (ликареола) и (S)-(+)-линалоола (кориандрола). Рацематная смесь – (±)-линалоол называется мирценолом. Линалоол выделяют из природных эфирных масел: кориандрол – из эфирного масла кориандра, ликареол – из масла мускатного шалфея, лавандового масла. Линалоол является антимикробным агентом и ароматизатором и играет роль метаболита растений. Мирценол в составе косметических средств может вызывать аллергическую реакцию.

Эвкалиптол, или цинеол (1,8-цинеол), – моноциклический терпен. Считается антисептиком. Монотерпеновое соединение, обладающее сильным ароматом. Является одним из доминирующих компонентов эвкалиптового эфирного масла, определяющего его ценность. Входит в состав многих антисептических жидкостей для полоскания рта и средств от кашля, эффективное средство для лечения негнойного риносинусита, астмы, уменьшает воспаление и боль при местном применении. Установлено также, что он убивает лейкозные клетки *in vitro* [11].

К уникальным и индивидуальным ароматическим соединениям газовой фазы натуральных эфирных масел, выделяемых листьями таксонов лайма, следует отнести Z-неролидол и β-синенсаль.

Z-неролидол (Z-nerolidol) – ациклический сесквитерпеноид, альдегид, который встречается в перуанском бальзаме, апельсиновом и померанцевом эфирных маслах. В результате проведенных нами исследований был выявлен в составе летучих компонентов листьев у сорта кислого лайма *C. aurantiifolia* ‘Foro’. Используется в качестве компонента парфюмерных композиций, пищевого ароматизатора и фиксатора ароматов.

Наряду с лимоненом наиболее важными компонентами эфирного масла, влияющими на его аромат, являются цитраль, деканаль, эфиры алифатических и терпеновых спиртов, а также сесквитерпеновые альдегиды – α- и β-синенсали.

Заключение. Таким образом, методом GC/MS-анализа установлен качественный состав ароматических летучих соединений, выделяемых листьями тропических представителей рода *Citrus* L. в условиях оранжерей. Состав компонентов у таксонов варьируется в пределах рода и составляет для каждого из них в сумме следующее число: сладкий лайм (лиметта) (*Citrus limetta* Risso) – 38, его сорта *Citrus limetta* ‘Марокко’ и *Citrus limetta* ‘Кислая оранжевая’ – 41 и 37 соответственно; сорта кислого лайма *Citrus aurantiifolia* ‘Таити’ и *Citrus aurantiifolia* ‘Foro’ – 44 и 37 соответственно; лимон ‘Бесколючий’ (*Citrus limon* ‘Бесколючий’) – 30. В сложном букете цитрусово-хвойного аромата листьев всей группы исследованных растений из всех выделенных компонентов следует отметить 10 субстанций, подтверждающих генетическую близость этих таксонов в пределах рода *Citrus* L. Ряд индивидуальных ароматических компонентов представляют отличительные качественные признаки каждого из сортов и важны для их таксономии. Исследованные таксоны могут быть рекомендованы в составе композиций ароматических растений в интересах различного функционального назначения.

Список использованных источников

1. Состав летучих компонентов листьев гибридов и сортов лимона (*Citrus limon* (L.) Burm F.), культивируемых в оранжерее / Н. В. Гетко [и др.] // Вест. Нац. Акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2014. – № 2. – С. 5–10.
2. Редкие цитрусы в оранжерейной культуре и их оценка по составу выделяемых листьями летучих компонентов / Н. В. Гетко [и др.] // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2019. – Вып. 70. – С. 149–157.
3. Morton, J. F. Fruits of Warm Climates / J. F. Morton. – Brattleboro : Echo Point Books & Media, 2013. – 550 p.
4. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece / E. Sarrou [et al.] // Molecules. – 2013. – Vol. 18, N 9. – P. 10639–10647. <https://doi.org/10.3390/molecules180910639>
5. Volatile composition and biological activity of key lime *Citrus aurantifolia* essential oil / F. Spadaro [et al.] // Nat. Product Communications. – 2012. – Vol. 7, N 11. – P. 1523–1526. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701128>
6. Boussaada, O. Chemical composition of essential oils from flowers, leaves and peel of *Citrus aurantium* L. var. amara from Tunisia / O. Boussaada, R. J. Chemli // Essent. Oil Bear. Plants. – 2006. – Vol. 9, N 2. – P. 133–139. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2006.10643484>

7. Azadi, B. Volatile constituents of the peel and leaf of *Citrus aurantium* L. cultivated in the north of Iran / B. Azadi, B. Nickavar, A. Gholamreza // J. Pharm. Health Sci. – 2012. – Vol. 1, N 3. – P. 37–41.
8. Gautam, Sh. D. GC-MS analysis of *Citrus limetta* Risso (Sweet lime) peel extract / Sh. D. Gautam // Pharma Innov. J. – 2018. – Vol. 7, N 6. – P. 01–04.
9. Characterization of volatile compounds in the essential oil of sweet lime (*Citrus limetta* Risso) / M. C. Colecio-Juárez [et al.] // Chilean J. Agricult. Res. – 2012. – Vol. 72, N 2. – P. 275–280. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392012000200017>
10. Кулян, Р. В. Лайм (*Citrus aurantifolia* Sw.), его сорта и гибриды в коллекции ВНИИЦСК / Р. В. Кулян // Вестн. Мичуринск. аграр. ун-та. – 2016. – № 4. – С. 16–20.
11. Eucalyptol // PubChem [Electronic resource]. – Mode of access: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol>. – Date of access: 07.04.2021.

References

1. Getko N. V., Alekhna A. I., Suboch V. P., Pochitskaya I. M., Titok V. V. Comparative analysis of the volatile components of the leaves of hybrids and varieties of lemon (*Citrus × limon* (L.) Burm. F.) cultivated in greenhouse conditions. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2014, no. 2, pp. 5–10 (in Russian).
2. Getko N. V., Kulyan R. V., Suboch V. P., Ateslenko E. V., Pochitskaya I. M. M. Rare citrus in greenhouse culture and their assessment by the composition of volatile components released by leaves. *Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo [Subtropical and ornamental gardening]*, 2019, no. 70, pp. 149–158 (in Russian).
3. Morton J. F. *Fruits of warm climates*. Brattleboro, Echo Point Books & Media, 2013. 550 p.
4. Sarrou E., Chatzopoulou P., Dimassi-Therios K., Therios I. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules*, 2013, vol. 18, no. 9, pp. 10639–10647. <https://doi.org/10.3390/molecules180910639>
5. Spadaro F., Costa R., Circosta C., Occhiuto F. Volatile composition and biological activity of key lime *Citrus aurantifolia* essential oil. *Natural Product Communications*, 2012, vol. 7, no. 11, pp. 1523–1526. <https://doi.org/10.1177/1934578X1200701128>
6. Boussaada O., Chemli R. Chemical composition of essential oils from flowers, leaves and peel of *Citrus aurantium* L. var. amara from Tunisia. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 2006, vol. 9, no. 2, pp. 133–139. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2006.10643484>
7. Azadi B., Nickavar B., Gholamreza A. Volatile constituents of the peel and leaf of *Citrus aurantium* L. cultivated in the north of Iran. *Journal of Pharmaceutical and Health Science*, 2012, vol. 1, no. 3, pp. 37–41.
8. Gautam Sh. D. GC-MS analysis of *Citrus limetta* Risso (Sweet lime) peel extract. *Pharma Innovation Journal*, 2018, vol. 7, no. 6, pp. 01–04.
9. Colecio-Juárez M. C., Rubio-Núñez R., Botello-Alvarez E., Martínez-González G. M., Navarrete-Bolaños J. L., Jiménez-Islas H. Characterization of volatile compounds in the essential oil of sweet lime (*Citrus limetta* Risso). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 2012, vol. 72, no. 2, pp. 275–280. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392012000200017>
10. Kulyan R. V. Lime (*Citrus aurantifolia* Sw.), Its varieties and hybrids in the collection of VNIITSISK. *Vestnik Michurinskogo agrarnogo universiteta [Bulletin of Michurinsk Agrarian University]*, 2016, no. 4, pp. 16–20 (in Russian).
11. Eucalyptol. *PubChem* (2021). Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eucalyptol> (accessed 07.04.2021).

Информация об авторах

Гетко Нелли Владимировна – д-р биол. наук, доцент, гл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: N.Hetko@cbg.org.by

Атесленко Екатерина Валерьевна – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Ateslenko@cbg.org.by

Кулян Раиса Васильевна – канд. с.-х. наук, заведующий лабораторией. Субтропический научный центр Российской академии наук (ул. Яна Фабрициуса, 2/28, 354002, г. Сочи, Российская Федерация). E-mail: supk-kulyan@vniisubtrop.ru

Субоч Виктор Прокофьевич – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию (ул. Козлова, 29, 220037, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: subochvp@mail.ru

Титок Владимир Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, директор. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Information about the authors

Nelly V. Hetka – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Chief Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: N.Hetko@cbg.org.by

Ekaterina V. Ateslenko – Junior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Ateslenko@cbg.org.by

Raisa V. Kulyan – Ph. D. (Agricult.), Head of the Laboratory. Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (2/28, Jan Fabritius Str., 354002, Sochi, Russian Federation). E-mail: supk-kulyan@vniisubtrop.ru

Victor P. Suboch – Ph. D. (Chem.), Leading Researcher. Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus (29, Kozlov Str., 220037, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: subochvp@mail.ru

Vladimir V. Titok – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Director. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

UDC 630*432:630*587

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-320-332>

Received 15.01.2021

Alexander A. Dvornik¹, Alexander M. Dvornik², Roman S. Kurilenko¹, Alesya V. Bardyukova¹,
Veronica N. Sehlin¹, Natalia V. Shamal¹, Raisa A. Korol¹

¹*Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus*

²*Francisk Skorina Gomel State University, Gomel, Republic of Belarus*

MAPPING OF FOREST FIRE HAZARD DEPENDING ON WEATHER CONDITIONS USING GEOINFORMATION TECHNOLOGIES

Abstract. An important component of forest firefighting strategies is related to the accurate prediction of fire risks. This article describes the development process of special decision support system (ForestFire GIS) – for the analysis of climatic conditions and definition of fire risks in Belarus including radioactively contaminated territory. The application consists of two basic modules: fire danger rating module and module of radionuclides transfer during the fire event. Fire danger rating module uses data on daily temperature, dew point and 24-hour rainfall to calculate weather based fire hazard index (FHI). The program provides recommendations for firefighting officials about efficient wildfires suppression strategy. GIS core (based on the MapWinGIS) performs all basic operations with map layers (scaling, moving, geocoding etc.), load and save changes. The ForestFire GIS was tested for the beginning of fire seasons in Gomel region in Belarus.

Keywords: decision support system, fire hazard, forecasting accuracy, fire management, mapping, radioactive contamination

For citation: Dvornik A. A., Dvornik A. M., Kurilenko R. S., Bardyukova A. V., Sehlin V. N., Shamal N. V., Korol R. A. Mapping of forest fire hazard depending on weather conditions using geoinformation technologies. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 320–332. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-320-332>

А. А. Дворник¹, А. М. Дворник², Р. С. Куриленко¹, А. В. Бардюкова¹, В. Н. Сеглин¹,
Н. В. Шамаль¹, Р. А. Король¹

¹*Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, Республика Беларусь*

²*Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины, Гомель, Республика Беларусь*

КАРТИРОВАНИЕ ПОЖАРНОЙ ОПАСНОСТИ ЛЕСОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОГОДНЫХ УСЛОВИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕОИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Аннотация. Важный компонент стратегии борьбы с лесными пожарами – точное прогнозирование пожарных рисков. В статье описан процесс разработки специальной системы поддержки принятия решений (ForestFire GIS) для анализа климатических условий и определения пожарных рисков в Беларуси, в том числе на радиоактивно загрязненной территории. Приложение состоит из двух основных модулей: модуля оценки пожарной опасности и модуля переноса радионуклидов при пожаре. Модуль оценки пожарной опасности использует данные о дневной температуре, точке росы и суточных осадках для расчета индекса пожарной опасности на основе погодных условий (FHI). Программа содержит рекомендации для сотрудников пожарных служб по эффективной стратегии тушения пожаров. Ядро геоинформационных систем (ГИС) выполняет на основе MapWinGIS все основные операции со слоями карты – масштабирование, перемещение, геокодирование и т. д., загружает и сохраняет изменения. ГИС ForestFire была протестирована на данных начала пожарного сезона в Гомельской области Беларуси.

Ключевые слова: система поддержки принятия решений, пожарная опасность, точность прогнозов, управление пожарами, картографирование, радиоактивное загрязнение

Для цитирования: Картирование пожарной опасности лесов в зависимости от погодных условий с использованием геоинформационных технологий / А. А. Дворник [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 320–332 (на англ. яз.). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-320-332>

Introduction. Among natural emergencies, forest fires are one of the most harmful disasters. During the last decades, vegetation fires in Eastern and Central Europe has become more common, intensive and less controllable as a consequence of land-use, social and economic changes and coupled with the impacts of global and regional climate changes [1]. Large and severe wildfires are occurring more frequently than in the past and are events that seriously affect human health, environmental security and economic losses [2, 3].

Wildland fires on terrains contaminated by chemicals and radionuclides create new nonstandard risks for firefighters, residents and environment. This issue is of special interest for Belarus because of the radioactive contamination in the south-east region. Resuspension of long-lived radionuclides with smoke aerosols during biomass burning can lead to a secondary radioactive contamination of the neighborhood and to additional internal exposure of people in the area of fire [4].

Since 1986 Belarus has a large forested areas contaminated by technogenic radionuclides. The most contaminated territories (up to $59.2 \text{ MBq} \cdot \text{m}^{-2}$ of ^{137}Cs in 1986) are located in 30-km zone around the Chernobyl NPP [5]. An important issue for contaminated territories is related to the distribution of ^{241}Am . The activity of this isotope is slowly growing with time through the beta-decay of ^{241}Pu (half-life 14.4 years). Corresponding studies show that ^{241}Am doubled in concentration of the past 20 years in the areas with Pu contamination [6].

According to the regulations on forest management in contaminated territories, all economic activities in the restricted areas are limited (except environmental activities, scientific and experimental work). Due to the absence of preventative cuttings of trees in restricted areas over the last 3 decades, a significant amount of radioactively contaminated organic matter has been accumulated under the forest canopy. Wrong practice to burn fields in spring and summer often leads to the ignition of contaminated forests and to peat fires. Peats in contaminated territories could smolder within the fire season polluting the neighbourhood with radionuclides deposited in fuel materials [7, 8]. On the other hand, ignitions in contaminated areas of the 30-km zone basically depends on weather conditions as they are restricted for humans to enter. The intensity of the fire and the total area burnt down from a fire are mainly determined by fuel load, topography as well as many other physical parameters which is usually difficult to describe within one model [9].

The seasonal nature of the occurrence of fires is strictly related to the weather conditions. In countries with a temperate climate (Belarus, Ukraine, Poland etc.) the fire season begins in the end of March and usually ends in October. Due to climate anomalies, exceptionally many fires occurred in 1996, 1999, 2002, 2006 and 2015 [10–12]. The latest large forest fire on the territory of the Polesie State Radiation-ecological Reserve (PSRER) occurred in 2015 with the total burnt area over 10 000 ha and greater transboundary impact. Although the measures taken to prevent forest fires in contaminated areas, human

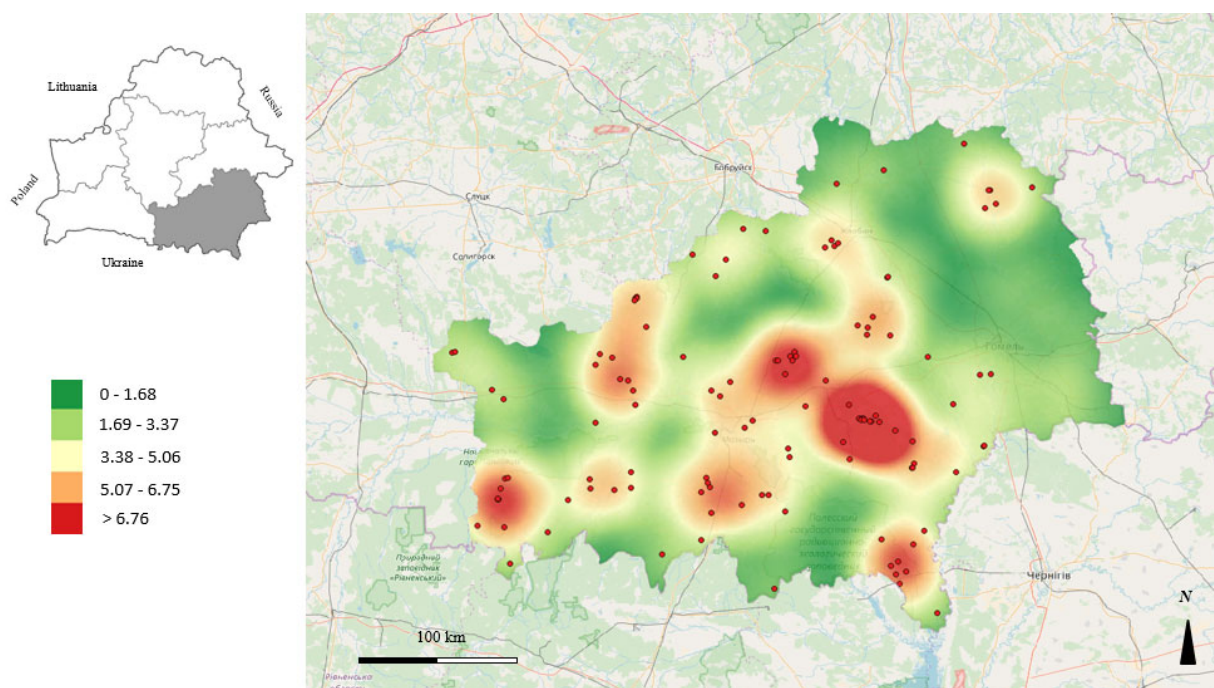


Fig. 1. Map of the ignition point density (number per km^2) in Gomel region (Belarus) in 2018. The ignition point density was calculated using the Point Density tool of QGIS software [13]. The red points indicate the ignition point location

factor remains the main driver of ignition. Belarusian fire statistics show that up to 125 forest fires, leading to burning of areas >220 ha, occurred in Gomel region in 2018, including 9 fire events in hardly accessible areas of PSRER. Fig. 1 highlights the spatial variation of fire event locations and ignition point densities within 2018.

The spatial analysis of fire locations showed that up to 80 % of ignition points are situated near highways and settlements or within a short distance away (a 5-km radius). This is related to the fact that each district has the most frequently visited forest sites.

Fig. 2 shows the relationship between number forest fires and different weather parameters. Moisture and air temperature has significantly less influence on wildfires spreading (Fig. 2, *a*, *b*) than the precipitation level. There is a strong correlation between the number of wildfires and the absence of precipitation ($R^2 = 0.79$, $n = 183$, $p = 0.05$). It should be noted that the summer of 2018 was exceptionally warm and dry in Belarus. Throughout April 2018, there were 27 days with less than 1 mm of rainfall

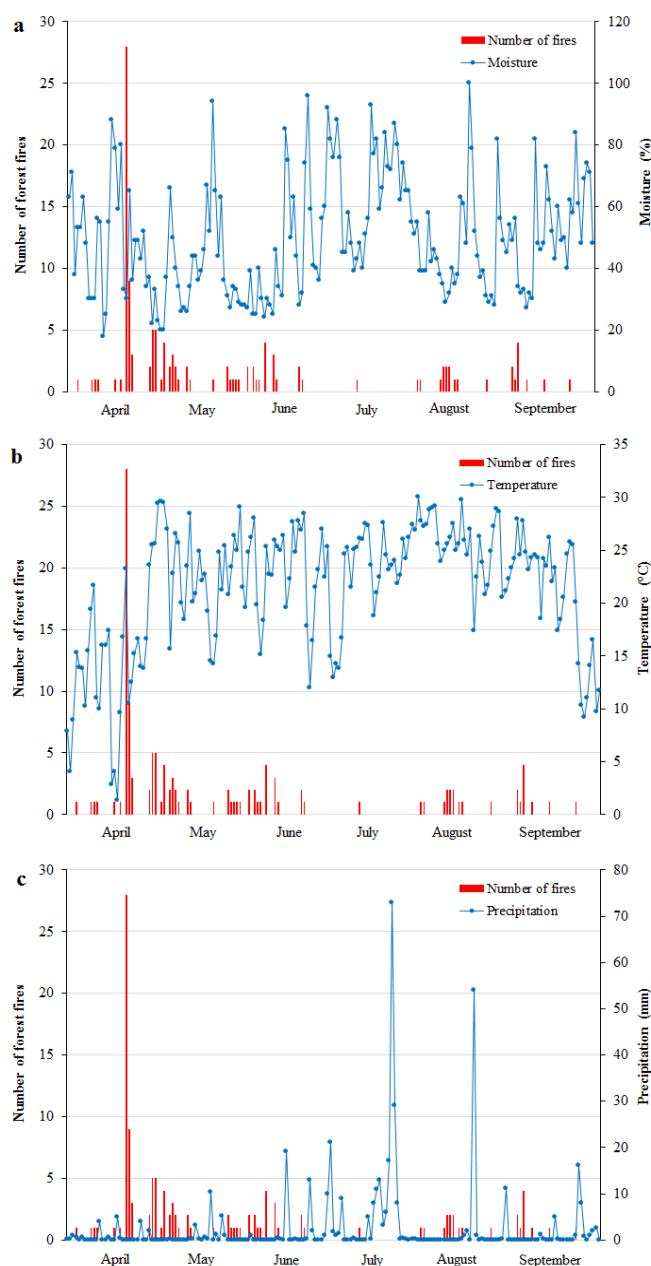


Fig. 2. The relationship between weather parameters (blue dots) and the number of forest fires (red bars) in the Gomel region in 2018 (*a* – moisture; *b* – temperature; *c* – precipitation)

(Fig. 2, c). The average daily precipitation in April is 0.6 mm. In May, the amount of rainfall was also very small and did not exceed 0.7 mm. A significant increasing of precipitation occurring in June and July (although less than the average for the same months in the area). The most abundant rainfall came in July, with a maximum of >70 mm. In August and September, the average precipitation level decreased to 2.2 and 1.2 mm per day, respectively.

According to the current administrative structure of regions and districts, state administrations are responsible for overall environmental security and public health. In addition, they are responsible for proper implementation of fire prevention measures, mobilization of fire suppression forces and evacuation of population in case of fire threat to settlements or infrastructure. However, there is a weaknesses related to manual calculations of fire hazard and records, which did not meet the purpose of the quality control since it depended largely on the knowledge and accountability of the staff members involved.

For the above reasons, the selection of forest firefighting strategies based on accurate forecasting of fire risks, in hardly accessible areas of the 30-km zone, has become one of the current and near future priorities for environmental researchers in Belarus. Managing forest fire risks based on reliable information and forecasts on fuel loads, amount of radionuclides flowing out to the atmosphere through burning of contaminated biomass may be done using geographic information systems (GIS) and remote sensing. Such methods are strongly supported by radioecologists, researchers and public authorities [14, 15].

Our study of fire hazard Chernobyl affected regions has been continued in 2018 with the main aim to develop an automated decision supporting system (DSS) for the analysis of the weather conditions and the definition of fire risks in the forestry enterprises of the Gomel region, including radioactively contaminated territories.

Materials and research methods. Weather-based fire danger. The level of forest fire hazard in the Republic of Belarus is estimated by used a five-graded scale based on the weather conditions, where the fifth degree of fire danger is the highest and the most hazardous (Tab. 1). The weather forecast used in the scale is provided by the “Republican center for hydrometeorology, control of radioactive contamination and environmental monitoring” (Belhydromet), a branch of the Ministry of Environment of Republic of Belarus. This scale is used to estimate fire risks in contaminated areas through calculation of a weather-based fire hazard index (FHI_N , i.e. national index). From year to year, the calculation of fire hazard index begins after the descent of snow cover, and then continues daily until the autumn, when the fire season is over.

Table 1. Weather-based fire hazard index used in Belarus based on weather conditions

Total amount of precipitation for 10 days, mm	Fire danger class				
	I (very low)	II (low)	III (moderate)	IV (high)	V (extreme)
	Weather based fire hazard index				
5–15	<130	131–500	501–4000	4001–10 000	>10 000
16–25	<230	231–600	601–4000	4001–10 000	>10 000
>26	<330	331–700	701–4000	4001–10 000	>10 000

Calculation of FHI_N is based on consecutive daily observations of temperature, dew point and 24-hour rainfall in 7 stations (the total number of meteorological stations and posts in Gomel region is 27) [16]. These stations are aimed to collect daily raw data from each post in the region. After processing the results applies to each corresponding administrative district in the region.

The calculation also takes into account the number of days since precipitation (dry days). Days with precipitation amount less than 5.0 mm, are considered to be dry. If precipitation level exceeds 5.0 mm the FHI_N is reset to zero. In this case, to assess the fire-weather danger class a total amount of precipitation for 10 days is used. FHI_N is estimated by following equation [17]:

$$FHI_N = \sum_1^n t(t - r),$$

where t – is the daily noon temperature, °C; r – dew point, °C; n – the amount of dry days.

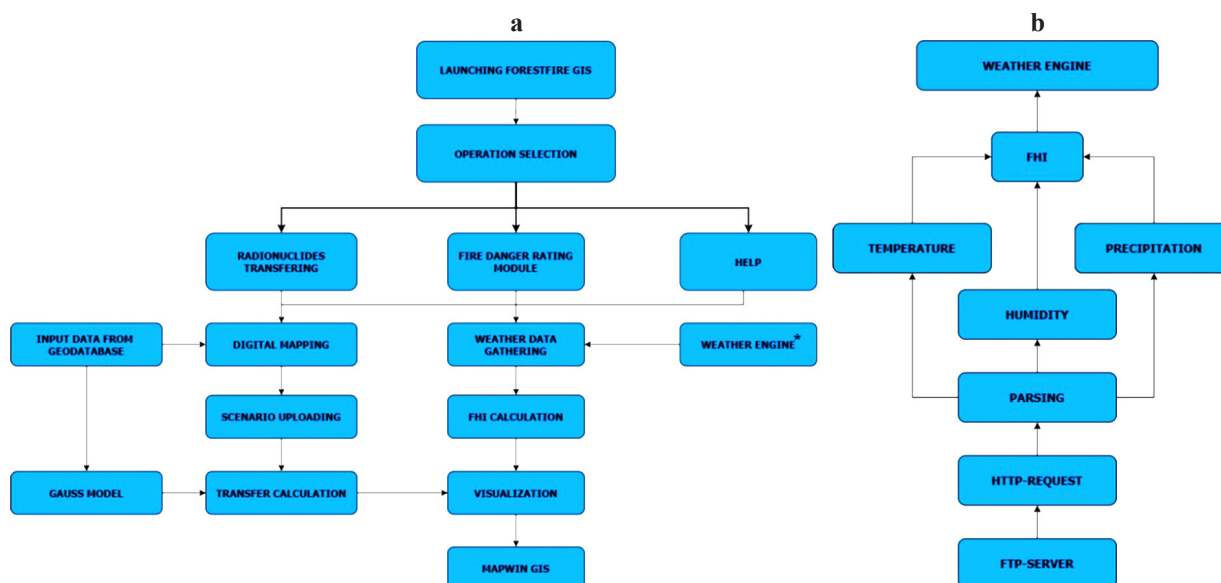


Fig. 3. ForestFire GIS work logic: general structure (a) and weather data gathering (b)

Based on calculated index, the firefighting strategy are determined with regard to governmental regulations [18]. A similar method of calculation was used in DSS algorithm. The FHI is a crucial parameter for the DSS that provides spatial distribution of fire danger classes by districts.

Software development and data integration. A dedicated digital application, ForestFire GIS (FF GIS), was developed based on the MapWinGIS – a free and open source geographic information system programming ActiveX Control and application programmer interface (API) that can be added to a Windows Form in Visual Basic, C#, Delphi, or other languages that support ActiveX [19]. To build the FF GIS application we used Borland Delphi environment, with the MapWinGIS platform integrated into the FF GIS application. It was an optimal solution to build a new DSS instead of customizing the Quantum GIS platform used Python programming language.

The FF GIS is divided into two main modules that represent to the user different kinds of information and perform different tasks (Fig. 3, a). These modules are:

fire danger rating module;

module of radionuclides transfer during the fire event (works for contaminated territories). Within this article, a development and testing of the first module will be reported.

The fire danger rating module incorporate obtaining of weather data (Fig. 3, b), geographical data visualization and fire hazard forecasting. Spatial data used by FF GIS stored in a GIS-compatible format – Shapefile (.shp*). The dbf-files contains database with all sets of feature attributes with one record per feature. A detailed description is reported elsewhere [20]. The database is the source of information used to generate, read, and display maps and layers. It contains:

actual data on vegetation type, age of forest stand and fuel load (an average amount of fuel materials for typical forests of Belarusian Polesye, reported by V. V. Usenya [21];

data on density of radioactive contamination by ^{137}Cs (used with module of radionuclides transfer during the fire event);

actual weather data gathering (from public weather service).

For the development of FF GIS, standard software development milestones (e. g. planning, analysis, design, implementation, testing and maintenance) were applied. The details of this development are described below.

Planning. For better understanding the specific needs and overall feasibility of the project, the structure of forest management and decision-making principles were investigated. Furthermore, Belarusian radiation safety requirements for forestry workers in contaminated areas were studied. One of the main objectives of the planning phase was to study the world experience in terms of development

and implementation of similar decision supporting systems for wildfires management (AUTO-HAZARD PRO [22], FlamMap by Finney [23] etc.).

Analysis. At the current stage, minimal requirements were defined for the software design. For this purpose, two approaches were used:

interviews with stakeholders;

study of technical documentation for similar systems [24, 25].

The interviews are aimed to find out a professional needs of stakeholders regarding wildfires issues on contaminated territories. Overall, 8 specialists, including forestry and fire managers, radiation protection officers, were interviewed.

Design. The development environment was selected on the basis of usability and possibility for optimal integration of MapWinGIS platform. A general principles of UX/UI design were used on this stage. All functions and operations were described in details within specification, including necessary elements, classes, methods and models.

Implementation. This phase aimed at building a stable version of the program and its individual parts. Particularly, all modules of FF GIS were developed separately. The output of this stage was the implementation of 50 different classes and more than 2000 functions and methods, including a set of graphical interface elements, classes for accessing databases, HTTP syntactical analyzer etc.

The raw data required for the application is obtained from different data sources. For example, weather information may be obtained from public weather service using HTTP-requests. The source data for digital maps is obtained from Gomel forestry FTP-servers. Vector layers were created using georeferencer GDAL plugin in the QGIS platform. Each layer corresponds to real geographical coordinates of forestry objects presented in WGS 84/Pseudo-Mercator EPSG: 3857 projection. Custom maps superimposed on the OpenStreetMaps layer – basic layer worked under the Open Database License.

The module for radionuclides transfer assessment is based on the analysis of climatic, environmental and historical data obtained from continuous datasets in Belarus since 2005 (not described within this article). It also includes field data on fuel load and the distribution of long-lived radionuclides under the forest canopy [26]. All data are stored in the database. The output data incorporate volume activity concentration of ^{137}Cs in the air and activity of fallouts due to resuspension after fires on different distance from the source. Upon discovering a high risk of ignition in contaminated territories user might switch to radionuclides transfer module. It can compute the radiation consequences of wildfires using 1 from 4 available scenarios. To confirm the validity of calculated parameters a field data is required. The main output of this phase was a beta-version for testing.

Testing. This stage included individual and inter-module tests, GUI (graphical user interface) tests, common working tests and data validation. More specifically, tests were performed through the following activities: testing of beta-version of service for calculating atmospheric transfer; testing of beta-version for weather based fire danger rating service and corresponding program interface. As a result, some bugs were identified and corrected.

An official data provided by authorities (FHI_N) remain relevant for the day when prognosis was made. An advantage of FF GIS is the possibility to make prediction up to 5 days. Therefore, a national index FHI performed by Belhydromet is an important source to validate calculations made by FF GIS and assist in prediction of the future fire situation.

An analysis of observed and predicted values was performed by using methods of parametric and non-parametric statistics. The difference between groups was tested using the Mann–Whitney U -test (independent samples) and two-sample t -test with the same variance. Data are presented as median, range and mean $\pm$ standard deviation values. To identify one or more outliers, the ROUT method was applied.

Software application. A stable version of the FF GIS provides the following services: cartographic, weather engine, atmospheric transfer of radionuclides and secondary contamination forecasting, forecasting of forest fires hazard based on weather conditions.

The MapWinGIS-core of the application is responsible for the implementation of GIS related functions i.e. mapping, management of map layers, visualizing styles for formatting graphical elements etc. Map data sets used by FF GIS consist of three basic layers (boundaries, forestry, labels). One extra

layer highlighting the density of ^{137}Cs contamination, included to maps working with a module for atmospheric transfer of radionuclides.

In order to calculate FHI for a current day, the application use retrospective data of weather conditions. The “weather engine” is an independent subprogram aimed at continuous gathering weather information (Fig. 3). While working in real time the “weather engine” collects available information on daily temperature, amount of precipitation and air humidity using HTTP-requests. The information gathered is stored in a database in “.dbf” file format, which can be used by FF GIS. Through an appropriate interface, users may choose the forecasting length (up to 10 days).

After the FHI calculation, it is possible to generate predicted fire danger maps. The FHI can be calculated both for a single forestry (selected by the user in the list box) as well as for a whole region. During routine operation, 7 meteorological stations collect relevant data from nearby territories. The FF GIS

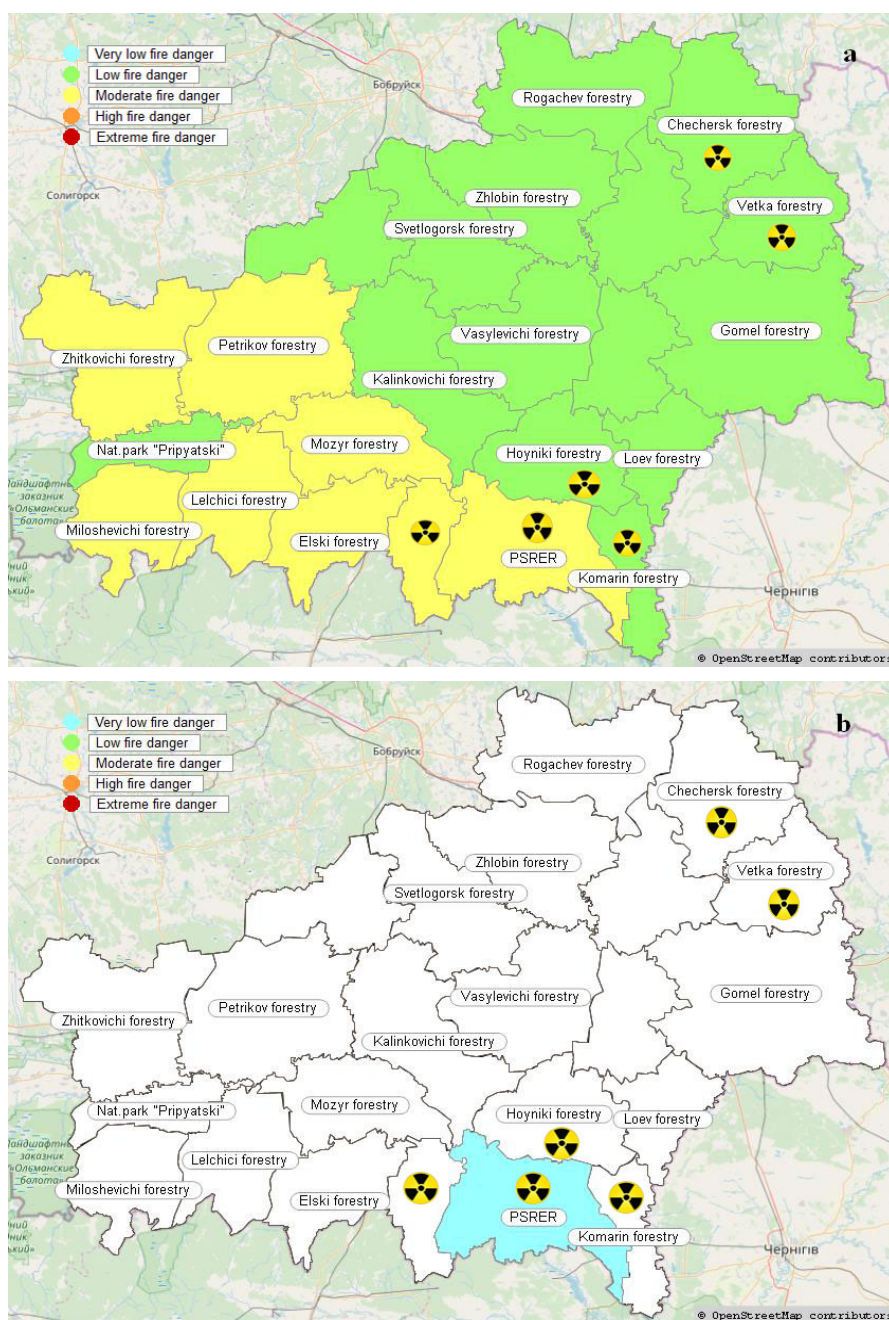


Fig. 4. An example of fire hazard maps created by application for Gomel region (a) and for single forestry (b). Districts with radiation contamination are marked with radiation hazard symbol

compute FHI for all districts in the region. Some forestries incorporate two administrative districts. In this case, the application takes the maximum FHI value. Thus, the application might create two kinds of maps depends on user choice (Fig. 4).

Fig. 4 shows that each fire danger class represents by its own color. Along with the FHI calculation, guidance for stakeholders is given with accordance to the regulations of efficient suppression strategy for wildfires [18]. More specifically, in the case of full absence of fires, ground and single air patrolling are carried out in a recreational facilities and forest areas with low fire probability. On the territories of radioactive contamination and beyond, a daily air dosimetric survey is carrying out. Emergency preparedness also includes information work with the locals through mass media. If the highest level of fire danger (IV–V fire danger class) is reached, entry to forest areas is prohibited.

Evaluation of wildfire danger. The accuracy in the forecasting of FF GIS is highly depends on the prediction length selected by user and spatiotemporal accuracy of weather parameters forecasts. The results calculated by the program were compared with the official data provided by Belhydromet. The results of comparison are presented in Fig. 5.

April monthly data of FHI_N calculation in six observation points was taken for comparison. For “Zhirkovichi” observation point, predicted values of FHI were approximately 45 % higher than official data. For the remaining locations a predicted values were slightly lower than official data. A comparison reveals a good agreement between data ($t_d < t_{st}$, $p = 0.05$). The results of comparison of observed and predicted FHI values are presented in Tab. 2.

Table 2. The statistical parameters of data validation

Parameter	Observation point					
	Gomel	Zhlobyn	October	Brahin	Mozyr	Zhirkovichi
MR_{FHI}^*	0.81	0.81	1.18	0.92	0.61	1.55
$SEMR^{**}$	0.06	1.02	0.09	0.15	0.09	0.30
df	22	24	20	20	24	23
t -test ($p < 0.05$)	0.78	0.53	0.6	0.85	0.85	0.36
U -test ($p < 0.05$)	65	69	50	70	73	56
Significantly different	No	No	No	No	No	No

Note. * – mean ratio between observed and predicted FHI values; ** – standard error of mean ratio.

The data shows no significant difference between observed and predicted FHI values (values for the Mann–Whitney U -test are much higher than table values for corresponding samples with the level of significance $p = 0.05$). The observed-to-predicted ratio is narrowing despite the values from “Mozyr” and “Zhirkovichi” observation points.

Forecasting accuracies varying from 50 to 98 %. The verification shows that the optimal period for forecasts is 3 days with an accuracy up to 95 %, as compared to official data. However, in some cases the accuracy remained high even during the 5 day of forecast. The reason for the deviation, as compared to the official data, for longer forecast periods is not yet determined. Apparently, the more stable weather conditions might provide more accurate forecasting.

The forecasts were also validated from COPERNICUS European Forest Fire Information System (EFFIS) observations. Due to lack of conformity between calculating methods in Europe and Belarus, a comparison of fire danger classes was made. The forecasts might be performed daily, with 5-day predictions. As shown in Fig. 6 the maps of forecasted fire danger level created by EFFIS are in a good agreement with ones created by FF GIS.

Some areas on the FIS GIS maps have a higher fire hazard level than the EFFIS maps. On April 12, some districts show a moderate level of fire danger, while on European maps the moderate level is forecasted beyond the region. The situation has changed on April 24 in most of the Gomel region, except two districts, a moderate level of fire hazard is determined (Fig. 6, *b*). On the other hand, EFFIS maps indicate a moderate level of fire danger only for eastern part of the region (Fig. 6, *a*). It should be noted

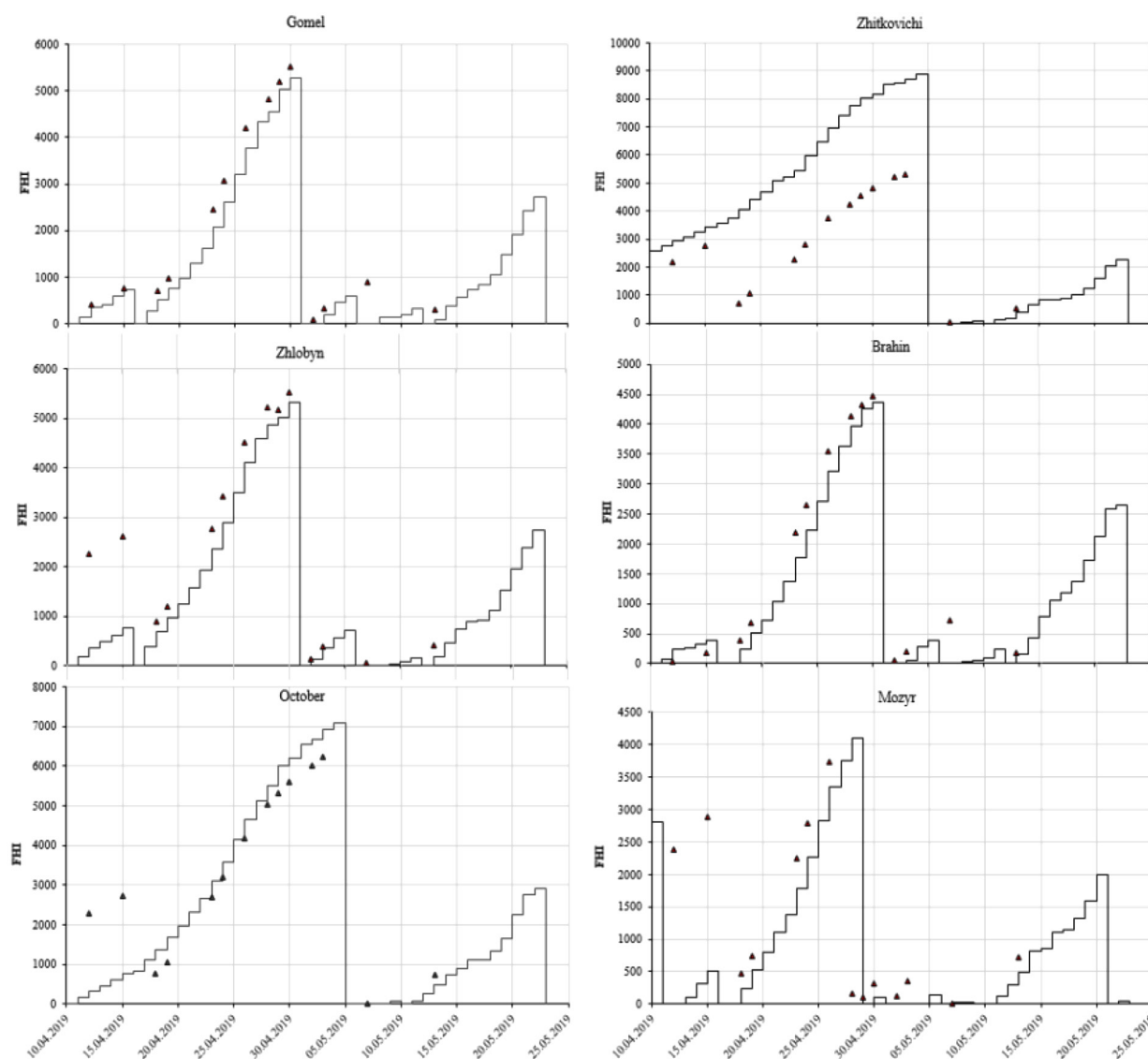


Fig. 5. Comparison of forecasted FHI values with official data. On the graphs: lines highlights FHI values predicted by FF GIS, points represent official data (FHI₀)

that maps created by FF GIS have differences in assigned color code, caused by reduced number of classes.

Results and its discussion. The main output of this work is a modern tool for forest fire risk management, that could be useful not only in contaminated forests but for whole regions. In comparison with other similar systems [22, 23], FF GIS has many significant differences. One of the most important is the special emphasis on radiological consequences of wildland fires. The DSS is providing next services: cartographic, predicting atmospheric transfer of radionuclides and secondary contamination (including transboundary effects), predicting exposure doses for participants of firefighting. The main milestone of implementation is development for Belarus a scientific radiological and firefighting background, base of firefighting knowledge, models and specific thematic maps and system of coordination between forestries and administrative units.

Among the main problems in effective forest fires risk management in Belarus it is important to mention:

lack of reliable and timely spatial information about location of forests with highest fire risk (digital maps for fuel load, infrastructure analysis etc.) and effective data transfer between forestries and smaller administrative units;

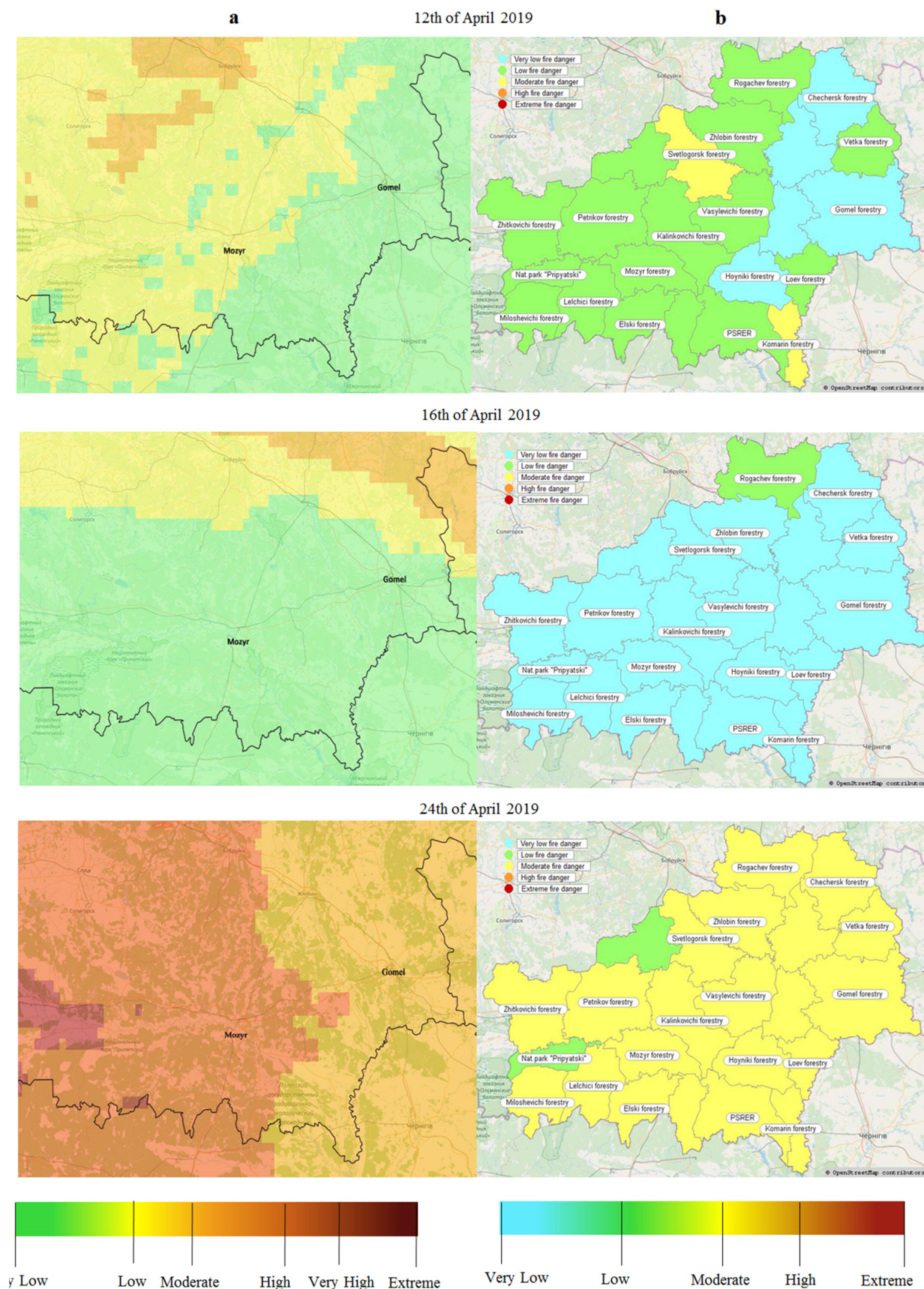


Fig. 6. Comparison of daily maps of forecasted fire danger level from EFFIS (a) and FF GIS (b). The source of meteorological forecast data is the European Centre for Medium-Range Weather Forecast (ECMWF) with 8 km resolution

absence of prediction scenarios of effective doses for firefighters and emitted amount of long-lived radionuclides during the ignition;

lack of reliable information among local communities on environmental consequences of forest fires including radiological impact;

lack of information transparency for local authorities, stakeholders and decision makers.

Launching the DSS on the territory of Gomel region will give an advantage over the national warning system. The main benefit is to fulfil a five-day prediction daily, thereby improving emergency preparedness and response to wildfire events. An additional module for analysis of radionuclides transfer – a feature that distinguishes FF GIS from systems with similar functionality.

In order to further improve and expand the existing functionality of FF GIS it is important to continue to investigating and compare with other similar decision support systems and the world experience in developing and implementation processes. Currently, the FF GIS software provide users with wide range possibilities:

to work with the forest fires parameters based on database;

forecasting of environmental consequences of forest fires in radioactively contaminated territories (emitted amount of radionuclides, secondary contamination of territories);

calculation of FHI using weather data downloaded from FTP-servers;

coloring elements of the vector layer in accordance with requirements [18].

Conclusion. The aim is to further develop the DSS to improve the acquisition of timely information on physical and radiological forest fire risks in contaminated territories, emergency preparedness of firefighting services and optimization of the early warning system for fires. During this year's fire season, Gomel State Production Forestry Association provides pilot-testing and adoption of the system.

Within the dissemination phase, we aim at involving all crucial stakeholders. The main target groups are: public authorities of the territories contaminated by radionuclides;

forest and land managers, public agencies and organizations responsible for fire planning and suppression.

The outputs of this work are the first steps in adoption of automated forecasting system of forest fires and its consequences in Belarus. The DSS allows to highlight the benefits of using IT and GIS technology in wildland fires prevention.

Acknowledgements. Materials were presented at the 7th International on the study of nuclear radiation in various fields of research on the Study of Nuclear Radiation in Various Fields of Research (RAD 2019) held in Herceg Novi, Montenegro, in the period from June 10 to June 14, 2019. The authors would specifically like to thank Mr. Dmitriy Yatchenko from Gomel State Production Forestry Association for its invaluable contribution in testing the ForestFire GIS software and support on spatial analysis.

The work was conducted under the project GR_20190137 “The investigation of the dynamics of radioecological and weather indicators during forest fires and the development of a multifunctional decision support system on prevention of fires in the contaminated by radionuclides territories” with the support of the State Program for Scientific Research of the Republic of Belarus.

Благодарности. Материалы были представлены на 7-й Международной конференции по изучению ядерного излучения в различных областях исследований (RAD 2019), проходившей в Герцег-Нови, Черногория, в период с 10 по 14 июня 2019 г. Авторы выражают особую благодарность г-ну Дмитрию Ятченко из Гомельского государственного производственного лесохозяйственного объединения за неоценимый вклад в тестирование программного обеспечения ForestFire GIS и поддержку пространственного анализа.

Работа проводилась в рамках проекта GR_20190137 «Исследование динамики радиоэкологических и погодных показателей при лесных пожарах и разработка многофункциональной системы поддержки принятия решений по предотвращению пожаров на загрязненных радионуклидами территориях» при поддержке Государственной программы для научных исследований Республики Беларусь.

References

1. Mitsopoulos I., Mallinis G., Zibtsev S., Yavuz M., Saglam B., Kucuk O., Bogomolov V., Borsuk A., Zaimes G. An integrated approach for mapping fire suppression difficulty in three different ecosystems of Eastern Europe. *Journal of Spatial Science*, 2016, no. 62, no. 1, pp. 139–155. <https://doi.org/10.1080/14498596.2016.1169952>
2. Hysa A., Baskaya F. A. T. GIS based method for indexing the broad-leaved forest surfaces by their wildfire ignition probability and wildfire spreading capacity. *Modeling Earth Systems and Environ*, 2019, vol. 5, no. 1, pp. 71–84. <https://doi.org/10.1007/s40808-018-0519-9>

3. Alcasena F. J., Salis M., Ager A. A., Castell R., Vega-García C. Assessing wildland fire risk transmission to communities in northern Spain. *Forests*, 2017, vol. 8, no. 2, p. 30. <https://doi.org/10.3390/f8020030>
4. Kashparov V. A., Lundin S. M., Kadygrib A. M., Protsak V. P., Levtschuk S. E., Yoschenko V. I., Kashpur V. A., Talerko N. M. Forests in the territory contaminated as a result of the Chernobyl accident: radioactive aerosol resuspension and exposure of fire-fighters. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2000, vol. 51, no. 3, pp. 281–298. [https://doi.org/10.1016/s0265-931x\(00\)00082-5](https://doi.org/10.1016/s0265-931x(00)00082-5)
5. Izrael J. A., Bogdevich I. M. (eds.). *Atlas of Contemporary and Forecasting Aspects of the Consequences of the Chernobyl NPP Accident on the Affected Territories in Russia and Belarus*. Minsk, Belkartografiya Publ., Moscow, Fund “Ionosphere” NIA-nature, 2009 (in Russian).
6. Knatko V. A., Asimova V. D., Yanush A. E., Golikov Yu. N., Ivashkevich I. I., Kouzmina L. A., Bondar Yu. I. A prognostic estimation of the area contaminated with alpha-emitting transuranium isotopes in Belarus following the Chernobyl accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2005, vol. 83, no. 1, pp. 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.07.005>
7. Ager A. A., Lasko R., Myroniuk V., Zibtsev S., Day M. A., Usenia U., Bogomolov V., Kovalets I., Evers C. R. The wildfire problem in areas contaminated by the Chernobyl disaster. *Science of the Total Environment*, 2019, vol. 696, p. 133954. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133954>
8. Kashparov V., Zhurba M., Zibtsev S., Mironyuk V., Kireev S. Evaluation of the expected doses of fire brigades at the Chernobyl exclusion zone in April 2015. *Nuclear Physics and Atomic Energy*, 2015, vol. 16, no. 4, pp. 399–407. <https://doi.org/10.15407/jnpae2015.04.399>
9. Keane R. E., Burgan R., Wagtendonk J. V. Mapping wildland fuels for fire management across multiple scales: Integrating remote sensing, GIS, and biophysical modeling. *International Journal of Wildland Fire*, 2001, vol. 10, no. 4, pp. 301–319. <https://doi.org/10.1071/wf01028>
10. Zibtsev S. V., Goldammer J. G., Robinson S., Borsuk O. A. Fires in nuclear forests: silent threats to the environment and human security. *Unasylva*, 2015, vol. 66, no. 1–2, pp. 40–51.
11. Evangeliou N., Zibtsev S., Myroniuk V., Zhurba M., Hamburger T., Stohl A., Balkanski Y., Paugam R., Mousseau T. A., Møller A. P., Kireev S. I. Resuspension and atmospheric transport of radionuclides due to wildfires near the Chernobyl Nuclear Power Plant in 2015: an impact assessment. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no. 1, pp. 26062–26075. <https://doi.org/10.1038/srep26062>
12. Dvornik A. A., Klementeva E. A., Dvornik A. M. Assessment of ^{137}Cs contamination of combustion products and air pollution during the forest fires in zones of radioactive contamination. *Radioprotection*, 2017, vol. 52, no. 1, pp. 29–36. <https://doi.org/10.1051/radiopro/2016085>
13. QGIS Development Team, 2019. *QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project*. Available at: <http://qgis.osgeo.org> (accessed 19 June 2019).
14. Huesca M., Litago J., Merino-de-Miguel S., Cicuendez-López-Ocaña V., Palacios-Orueta A. Modeling and forecasting MODIS-based Fire Potential Index on a pixel basis using time series models. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, 2014, vol. 26, pp. 363–376. <https://doi.org/10.1016/j.jag.2013.09.003>
15. Evangeliou N., Hamburger T., Talerko N., Zibtsev S., Bondar Y., Stohl A., Balkanski Y., Mousseau T. A., Møller A. P. Reconstructing the Chernobyl Nuclear Power Plant (CNPP) accident 30 years after. A unique database of air concentration and deposition measurements over Europe. *Environmental Pollution*, 2016, vol. 216, pp. 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.030>
16. Drozdovitch V., Zhukova O., Germenchuk M., Khrutchinsky A., Kukhta T., Luckyanov N. [et al.]. Database of meteorological and radiation measurements made in Belarus during the first three months following the Chernobyl accident. *Journal of Environmental Radioactivity*, 2013, vol. 116, pp. 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.09.010>
17. Usenya V. V., Gordei N. V., Klimchik G. Ya., Mukhurov L. I. Method for determining the risk of fire forest under weather on the territory of Belarus. *Trudy Belorusskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta [Proceedings of the Belarusian State Technological University]*, 2015, no. 1, pp. 103–106 (in Russian).
18. STB Emergency safety. *Forest fires monitoring and forecasting*. Minsk, State Committee for Standardization of the Republic of Belarus, 2003. 20 p. (in Russian).
19. Ames D. P. *MapWinGIS reference manual: a function guide for the free MapWindow GIS ActiveX map component*. Idaho Falls, Idaho State University, 2012. 194 p.
20. *ESRI Shapefile Technical Description. An ESRI White Paper*. New York, Environmental Systems Research Institute, 1998. 34 p.
21. Usenya V. V. *Forest fires, consequences and suppression*. Gomel, Forest Institute of NAS of Belarus, 2002. 206 p. (in Russian).
22. Kalabokidis K., Xanthopoulos G., Moore P., Caballero D., Kallos G., Llorens J., Roussou O., Vasilakos C. Decision support system for forest fire protection in the Euro-Mediterranean region. *European Journal of Forest Research*, 2012, vol. 131, no. 3, pp. 597–608. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0534-0>
23. Finney M. *An overview of FlamMap modeling capabilities. Fuels Management – How to measure success*. Conference Proceedings. USDA, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, General Technical Report, RMRS-P-41, 2006, pp. 213–219.
24. *Advance EFFIS Report on Forest Fires in Europe, Middle East and North Africa 2018*. Luxembourg, Publications Office, EUR 29722 EN.
25. Stratton R. D. Guidance on spatial wildland fire analysis: models, tools, and techniques. *General Technical Report RMRS-GTR-183*, 2006.
26. Dvornik A. A., Dvornik A. M., Korol R. A., Shamal N. V., Gaponenko S. O., Bardyukova A. V. Potential threat to human health during forest fires in the Belarusian exclusion zone. *Aerosol Science and Technology*, 2018, vol. 52, no. 8, pp. 923–932. <https://doi.org/10.1080/02786826.2018.1482408>

Information about the authors

Alexander A. Dvornik – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: aadvornik@yandex.ru

Alexander M. Dvornik – D. Sc. (Biol.), Professor. Francisk Skorina Gomel State University (104, Sovetskaya Str., 246019, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: advornik@gsu.by

Roman S. Kurilenko – Junior Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: kr.socialmail@gmail.com

Alesya V. Bardyukova – Junior Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: alesya.bardyukova@mail.ru

Veronica N. Seglin – Junior Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: seglinv@mail.ru

Natalia V. Shamal – Senior Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: namahasha@rambler.ru

Raisa A. Korol – Researcher. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninski Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: raisa-korol@mail.ru

Информация об авторах

Дворник Александр Александрович – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246000, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: aadvornik@yandex.ru

Дворник Александр Михайлович – д-р биол. наук, профессор. Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины (ул. Советская, 104, 246019, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: advornik@gsu.by

Куриленко Роман Сергеевич – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: kr.socialmail@gmail.com

Бардюкова Аlesia Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: alesya.bardyukova@mail.ru

Сеглин Вероника Николаевна – мл. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: seglinv@mail.ru

Шамаль Наталья Владимировна – ст. науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: namahasha@rambler.ru

Король Раиса Александровна – науч. сотрудник. Институт радиобиологии НАН Беларуси (ул. Федюнинского, 4, 246007, г. Гомель, Республика Беларусь). E-mail: raisa-korol@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 581.174.1/2:582.572.7

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-333-338>

Поступила в редакцию 28.05.2021

Received 28.05.2021

Е. Н. Карасева

*Институт экспериментальной ботаники имени В. Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

НАКОПЛЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ И ПОКАЗАТЕЛИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЬЯХ *DIOSCOREA ALATA* L. ПРИ ВЕГЕТАТИВНОМ РАЗМНОЖЕНИИ РАСТЕНИЙ НА ИОНООБМЕННЫХ СУБСТРАТАХ

Аннотация. Изучены содержание фотосинтетических пигментов и флуоресценция хлорофиллов (Хл) в листьях растений *Dioscorea alata* L., выращенных на модифицированном ионообменном субстрате. Установлено, что в варианте с добавлением в субстрат гидрогеля мелкой фракции в количестве 1 г/л содержание Хл *a* на 15 % выше по отношению к контролю. Содержание Хл *b* и каротиноидов по сравнению с контролем различались несущественно. При добавлении гидрогеля в концентрации 0,5 г/л содержание Хл *a* во всех изученных вариантах было значительно ниже контроля.

Исходя из исследованных параметров флуоресценции Хл, наиболее благоприятные для продуктивности фотосинтеза условия были в варианте с добавлением с 1 г мелкой фракции и при освещении ДНАТ-400.

Ключевые слова: гидрогель, ионообменный субстрат, фотосинтетические пигменты, *Dioscorea alata* L.

Для цитирования: Карасева, Е. Н. Накопление фотосинтетических пигментов и показатели флуоресценции хлорофилла в листьях *Dioscorea alata* L. при вегетативном размножении растений на ионообменных субстратах / Е. Н. Карасева // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 333–338. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-333-338>

Alena N. Karasiova

*V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

ACCUMULATION OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS AND INDICATORS OF FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLL IN LEAVES OF *DIOSCOREA ALATA* L. DURING VEGETATIVE REPRODUCTION OF PLANTS ON ION-EXCHANGE SUBSTRATES

Abstract. The content of photosynthetic pigments and fluorescence of chlorophylls in leaves of *Dioscorea alata* L. plants grown on a modified ion-exchange substrate were studied. It was found that in the variant with the addition of a fine fraction to the hydrogel substrate in an amount of 1 g/l, the Chl *a* content is 15 % higher than in the control. The content of Chl *b* and carotenoids in comparison with the control differed insignificantly. When the hydrogel was added at a concentration of 0.5 g/l, the Chl *a* content in all studied variants was significantly lower than the control.

Based on the investigated parameters of chlorophyll fluorescence, the most favorable conditions for the productivity of photosynthesis were in the variant with the addition of 1 g of a fine fraction and illumination of DNaT-400.

Keywords: hydrogel, ion exchange substrate, photosynthetic pigments, *Dioscorea alata* L.

For citation: Karasiova A. N. Accumulation of photosynthetic pigments and indicators of fluorescence of chlorophyll in leaves of *Dioscorea alata* L. during vegetative reproduction of plants on ion-exchange substrates. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 333–338 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-333-338>

Введение. Адаптация растений к условиям выращивания представляет собой интегральный процесс, зависящий от ряда факторов. Для нормального роста и развития растений необходимо оптимальное сочетание элементов питания, теплового и светового режимов, влажности почвы и воздуха. В растениеводстве защищенного грунта существует проблема адаптации микроклонов при перенесении их из условий *in vitro* или гидропонной культуры на корнеобитаемую среду *in vivo* [1].

Рис. 1. Внешний вид растений *Dioscorea alata* L.Fig. 1. Appearance of *Dioscorea alata* L.

В настоящей работе изучены особенности адаптации интродуцента *Dioscorea alata* L. в условиях защищенного грунта при ускоренном микрорепродуцировании *in vivo*.

Диоскорея крылатая представляет интерес для интродукции как высокодекоративное растение для озеленения офисов, холлов гостиниц, торговых сетей, оранжерей, а также для вертикального озеленения с использованием горшечных культур. *Dioscorea alata* L. – многолетняя травянистая лиана, формирующая богатые биологически активными веществами крупные клубни (рис. 1). Растение культивируется в Юго-Восточной Азии. Стебли четырехугольные, с 4 продольно крылатыми, волнистыми, зелеными или красноватыми выростами. Листья, как правило, супротивные, иногда чередуются на быстрорастущих ветвях, кожистые, широкояйцевидные. Соцветия пазушные, цветки однополые. Благодаря фиолетовой окраске листьев может быть ценным естественным источником пищевого красителя [2].

Учитывая, что объект исследования – лиана тропического происхождения, требующая достаточного водообеспечения и минерального питания в процессе вегетативного роста, необходимо было решить ряд задач. Во-первых, разработать условия ускоренного размножения путем черенкования. Во-вторых, оптимизировать ионообменный субстрат по агрохимическому составу и агрофизическим свойствам для успешного роста интродуцируемой лианы.

Ранее нами разработаны ионообменные субстраты, состоящие из новых катионо- и анионообменных материалов и инертного материала – агроперлита [3]. Такой ионообменный субстрат способен поглощать и удерживать до 120 % воды относительно своей массы. Этих влажностных параметров достаточно при выращивании большинства растений с периодическим поливом, не вызывающим стрессовых изменений в листьях. Однако при выращивании тропических интродуцентов, требующих высокой влажности для своего роста, необходимо создать более влагоемкий субстрат [4].

Для ускорения процессов ризогенеза и начального роста в условиях *in vivo* целесообразно также использование биологически активных веществ (БАВ), в частности новых соединений на основе адсорбционного геля – Есофлос (КНР), ковалентно удерживающего ионы макро- и микроэлементов, гуминовые кислоты, бентонит и другие вещества. С помощью этого геля и был модифицирован ионообменный субстрат Триона® для потребностей лианы [5].

Одним из показателей адаптации растений к условиям выращивания *in vivo* является содержание в листьях растений фотосинтетических пигментов. Содержание зеленых и желтых пигментов в листьях растений – один из существенных признаков их фотосинтетической активности и в определенной степени интенсивности снабжения растений ассимилятами. При этом содержание хлорофилла (Хл) в листьях служит свидетельством и возрастного состояния растений, так как при их старении уровень Хл значительно снижается [1].

Важным параметром оптимальности условий для роста растений является изменение флуоресценции Хл. Анализ изменения параметров флуоресценции Хл представляет собой мощный

инструмент при изучении воздействия самых разнообразных экологических факторов на растительные организмы. Химические факторы и климатические условия, часто являясь ингибиторами или активаторами биоэнергетических процессов, протекающих в тилакоидах хлоропластов растительных клеток, способны оказывать выраженное влияние на параметры кинетики и спектральные особенности флуоресценции, а также на ее стационарный уровень. Исследования кинетики флуоресценции могут дать важную информацию о влиянии внешней среды на параметры фотосинтеза как при осуществлении экологического мониторинга, так и при оценке устойчивости растений. Объективные данные получают на основе анализа таких кинетических параметров, как фоновая флуоресценция (F_0), максимальная флуоресценция (F_m) и стационарная флуоресценция (F_s) [6].

Цель исследования – изучение пигментного комплекса растений *Dioscorea alata* L., выращенных на модифицированном ионообменном субстрате с добавлением гидрогелей, для оптимизации условий их адаптации.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили растения диоскорей крылатой (*Dioscorea alata* L.), что было обусловлено их ценными хозяйственными, фармакологическими и декоративными свойствами.

Черенки *Dioscorea alata* L. укореняли на биотехнических комплексах, установленных в закрытом помещении с искусственным освещением, на которых размещали пластиковые контейнеры размером 20×20 см² с вариантами модифицированного субстрата. Объем субстрата в контейнере составлял 1,6 л. Густота посадки – 5 черенков в контейнере. В качестве источника света использовали натриевые лампы ДНаТ-400, температуру поддерживали на уровне 20 ± 2 °C [3].

Для повышения влагоемкости корнеобитаемой среды использовали разного состава и размера гранулы гидрогелей. Модификацию субстрата осуществляли путем внесения определенного количества гидрогеля марки ECOFLOC A-07 (КНР) в следующих вариантах: гидрогель без удобрений крупной и мелкой фракции, гидрогель с бентонитом, гидрогель с гуматом, гидрогель K⁺ (вариант представляет собой полиакриламид на основе калия). Гель в дозах 1,0 и 0,5 г/л вносили в субстрат ТРИОНА® после предварительного его набухания [4].

Определение фотосинтетических пигментов осуществляли согласно методике, приведенной в работе [7].

Флуоресценцию Хл исследовали с помощью флуориметра СМ 2203. В качестве источника света использовали натриевые лампы ДНаТ-400. Спектры излучения (фотоиндукционные кривые) записывали в диапазоне 600–780 нм, при возбуждающем свете 450 нм, щели 5 нм и с шагом 2 нм. По кривым флуоресценции вычисляли коэффициенты спада флуоресценции Rfd.

Для количественной характеристики формы спектра флуоресценции Хл использовали параметр ω , равный отношению максимальных значений интенсивности флуоресценции в области 730–750 и 685 нм [8]: $\omega = F_{740}/F_{685}$.

Другой информативный показатель, коэффициент спада флуоресценции (Rfd), характеризующий квантовую эффективность фотосинтеза, вычисляли по формуле $Rfd = (F_m - F_s)/F_s$, где F_m и F_s – соответственно максимальный и стационарный уровни флуоресценции, получаемые из фотоиндукционных кривых. Величина Rfd получила также название индекса жизнеспособности [9, 10].

Чтобы определить значения стационарного уровня флуоресценции, записывали исходные фотоиндукционные кривые Хл сегментов листьев опытных растений площадью 3–4 см². Для получения максимального уровня флуоресценции Хл данные сегменты листьев помещали в 0,01 %-ный раствор диурона на 50 мин, затем повторно записывали кривые флуоресценции.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали прикладные пакеты программ STATISTICA 6.0 и статистические методы, применяемые для биологических исследований [11].

Результаты и их обсуждение. Содержание пигментов в листьях укорененных черенков *Dioscorea alata* L. было изучено в вариантах с добавлением в субстрат разного количества гидрогеля.

Показатели содержания Хл *a*, Хл *b*, каротиноидов (car) и их соотношений в листьях *Dioscorea alata* L. в зависимости от композиционного состава ионообменного субстрата Триона® представлены в табл. 1, 2.

Т а б л и ц а 1. Содержание Хл *a*, Хл *b*, *car* и их соотношение в листьях *Dioscorea alata* L. при добавлении 1 г/л гидрогеля в состав ионообменного субстрата

Table 1. The content of Chl *a*, Chl *b*, *car* and their ratio in the leaves of *Dioscorea alata* L. with the addition of 1 g/l hydrogel to the composition of the ion-exchange substrate

Вариант гидрогеля	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	<i>car</i>	Хл <i>a</i> + Хл <i>b</i>	Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>	Хл <i>a</i> + Хл <i>b</i> / <i>car</i>
Мелкая фракция	0,867 ± 0,025	0,289 ± 0,016	0,413 ± 0,034	1,156 ± 0,009	3,001 ± 0,264	2,807 ± 0,193
Крупная фракция	0,587 ± 0,037	0,251 ± 0,005	0,267 ± 0,004	0,837 ± 0,041	2,336 ± 0,112	3,128 ± 0,113
С добавлением:						
калия	0,583 ± 0,026	0,297 ± 0,037	0,400 ± 0,011	0,880 ± 0,023	1,980 ± 0,327	2,190 ± 0,071
бентонита	0,569 ± 0,051	0,290 ± 0,052	0,413 ± 0,062	0,859 ± 0,103	1,970 ± 0,186	2,086 ± 0,063
гумата	0,711 ± 0,005	0,297 ± 0,065	0,453 ± 0,039	1,007 ± 0,060	2,473 ± 0,448	2,224 ± 0,055
Контроль	0,749 ± 0,023	0,247 ± 0,005	0,437 ± 0,008	0,996 ± 0,028	3,034 ± 0,028	2,281 ± 0,019

Пр и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: $p = 0,05$.

Т а б л и ц а 2. Содержание Хл *a*, Хл *b*, *car* и их соотношение в листьях *Dioscorea alata* L. при добавлении 0,5 г/л гидрогеля в состав ионообменного субстрата

Table 2. The content of Chl *a*, Chl *b*, *car* and their ratio in the leaves of *Dioscorea alata* L. with the addition of 0.5 g/L hydrogel to the composition of the ion-exchange substrate

Вариант гидрогеля	Хл <i>a</i>	Хл <i>b</i>	<i>car</i>	Хл <i>a</i> + Хл <i>b</i>	Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>	Хл <i>a</i> + Хл <i>b</i> / <i>car</i>
Мелкая фракция	0,514 ± 0,027	0,204 ± 0,012	0,228 ± 0,013	0,718 ± 0,016	2,558 ± 0,252	3,160 ± 0,106
Крупная фракция	0,405 ± 0,031	0,187 ± 0,034	0,231 ± 0,019	0,593 ± 0,017	2,210 ± 0,510	2,575 ± 0,246
С добавлением:						
калия	0,613 ± 0,022	0,268 ± 0,029	0,401 ± 0,005	0,882 ± 0,008	2,315 ± 0,361	2,195 ± 0,039
бентонита	0,524 ± 0,01	0,252 ± 0,016	0,330 ± 0,002	0,776 ± 0,027	2,078 ± 0,097	2,351 ± 0,097
гумата	0,531 ± 0,016	0,216 ± 0,125	0,369 ± 0,044	0,747 ± 0,109	2,643 ± 1,322	2,024 ± 0,058
Контроль	0,749 ± 0,023	0,247 ± 0,005	0,437 ± 0,008	0,996 ± 0,028	3,034 ± 0,028	2,281 ± 0,019

Как видно из приведенных данных, в условиях *in vivo* с искусственным освещением на ионообменном субстрате как оптимальной среде корнеобитания все изученные варианты имеют достаточно высокие показатели фотосинтетической активности.

Исходя из полученных данных (табл. 1), содержание Хл *a* значительно выше в варианте с добавлением гидрогеля мелкой фракции (на 15 % по отношению к контролю), а в вариантах с калием, бентонитом и крупной фракцией гидрогеля – ниже относительно контроля на 24–25 %. Содержание Хл *b* и *car* по сравнению с контролем различалось несущественно. Обращает на себя внимание тот факт, что содержание *car* в варианте с гидрогелем крупной фракции почти в 2 раза ниже контроля.

В табл. 2 представлены значения содержания Хл *a*, Хл *b*, *car* и их соотношений с использованием различных модификаций композиционного состава ионообменного субстрата Триона® за счет добавления гидрогеля в дозе 0,5 г/л. Согласно полученным данным (табл. 2), уровень Хл *a* во всех изученных вариантах значительно ниже контроля и несущественно отличается от содержания Хл *b* и *car*.

Поскольку условия выращивания исследуемого объекта были одинаковые (гидротермический режим, освещенность), наблюдаемые различия в содержании фотосинтетических пигментов, на наш взгляд, обусловлены введением в состав ионообменного субстрата гидрогелей.

Следует отметить, что наиболее стабилизированным по влажности является вариант ионообменного субстрата марки Триона® с добавлением гидрогеля мелкой фракции в концентрации 1 г/л.

Известно, что на коэффициент флуоресценции Хл (ω) влияют уровень и сбалансированность минерального питания, концентрация CO_2 , освещенность и длительность светового дня, влажность почвы и воздуха. Показано, что величина ω и скорость прироста биомассы определяются одними и теми же факторами, причем оптимальным условиям развития растения соответствует максимальное значение параметра ω [8].

Коэффициенты флуоресценции представлены по вариантам на диаграммах (рис. 2, 3).

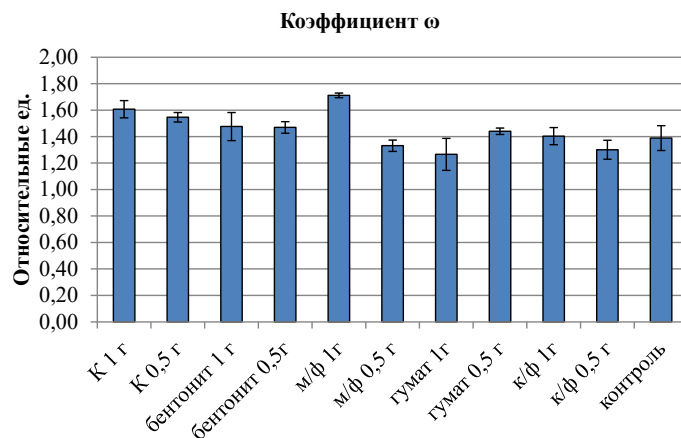


Рис. 2. Коэффициент флуоресценции хлорофилла в листьях *Dioscorea alata* L. (ω) по вариантам модифицированного субстрата при освещении лампами ДНаТ-400

Fig. 2. Chlorophyll fluorescence coefficient in the leaves of *Dioscorea alata* L. (ω) by variants of the modified substrate under illumination with DNaT-400 lamps

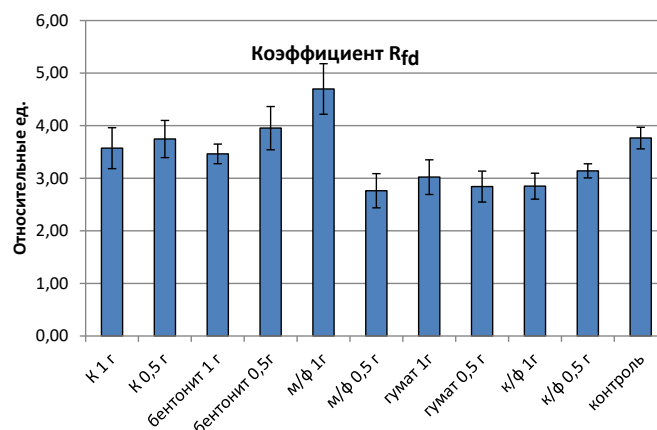


Рис. 3. Индекс жизнеспособности растений *Dioscorea alata* L. (Rfd)

по вариантам модифицированного субстрата при освещении лампами ДНаТ-400

Fig. 3. Viability index of *Dioscorea alata* L. plants (Rfd) by variants of the modified substrate under illumination with DNaT-400 lamps

Согласно нашим данным, при освещении лампами ДНаТ-400 максимальный коэффициент ω наблюдался в варианте с добавлением 1 г мелкой фракции (на 23 % выше, чем в контроле). Также более высокий, чем в контроле, коэффициент был в вариантах с добавлением 0,5 и 1 г гидрогеля с калием (на 11 и 15 % соответственно). Остальные варианты отличались от контроля несущественно.

Максимальная квантовая эффективность фотосинтеза Rfd наблюдалась также в варианте с добавлением 1 г мелкой фракции (на 25 % выше, чем в контроле). В вариантах с добавлением гидрогеля крупной фракции, гумата (в обеих концентрациях) и 1 г мелкой фракции отмечались наиболее низкие значения индекса жизнеспособности Rfd (на 20–27 % ниже контрольного). В остальных вариантах индекс жизнеспособности несущественно отличался от контроля.

Исходя из исследованных параметров флуоресценции Хл, наиболее благоприятные для продуктивности фотосинтеза условия были в варианте с добавлением 1 г/л мелкой фракции и освещении ДНаТ-400.

Заключение. Согласно результатам исследований, различия в содержании фотосинтетических пигментов в листьях *Dioscorea alata* L. связаны с введением в состав ионообменного субстрата Триона® гидрогелей, так как все другие условия выращивания исследуемого объекта были одинаковы.

Список использованных источников

1. Кузнецов, В. В. Физиология растений : учебник / В. В. Кузнецов, Г. А. Дмитриева. – М. : Высш. школа, 2005. – 735 с.
2. Bouman, F. Seed structure and systematics in Dioscoreales / F. Bouman // *Monocotyledons: systematics and evolution: papers presented at the Intern. symp., The Roy. Bot. Gardens, Kew, 18–23 July 1993* : in 2 vol. / ed. : P. J. Rudall [et al.]. – Richmond, 1995. – Vol. 1. – P. 139–156.
3. Янчевская, Т. Г. Оптимизация содержания катионов и анионов в среде корнеобитания для максимального коэффициента размножения картофеля *in vivo* / Т. Г. Янчевская, В. А. Бобров // *Ботаника : исследования*. – 2008. – Т. 35. – С. 495–506.
4. Янчевская, Т. Г. Ионообменные питательные субстраты – их уникальные свойства и области применения / Т. Г. Янчевская, К. В. Бахнова, А. Л. Ольшаникова // *Ботаника: исследования*. – 2005. – Вып. 33. – С. 361–366.
5. Изучение гелеобразования в водных растворах цистеина и нитрата серебра / М. В. Лавриенко [и др.] // *Физико-химия полимеров: синтез, свойства и применение*. – 2003. – Вып. 9. – С. 125–130.
6. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применения метода / В. С. Лысенко [и др.] // *Фунд. исслед.* – 2013. – № 4-1. – С. 112–120.
7. Шлык, А. А. О спектрофотометрическом определении хлорофиллов *a* и *b* / А. А. Шлык // *Биохимия*. – 1968. – Т. 33, № 2. – С. 275–285.
8. Метод определения функционального состояния растений по спектрам флуоресценции хлорофилла: техника биомониторинга : метод. рекомендации / К. Б. Асланиди [и др.]. – Пушино : Науч. центр биол. исслед., 1988. – 42 с.
9. Lichtenthaler, H. K. Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity / H. K. Lichtenthaler, K. Babani // *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis* / ed. : G. C. Papageorgiou, Govindjee. – Dordrecht ; London, 2004. – P. 713–736.
10. Lichtenthaler, H. K. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer / H. K. Lichtenthaler, C. Buschmann, M. Knapp // *Photosynthetica*. – 2005. – Vol. 43, N 3. – P. 379–393. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0062-6>
11. Рокицкий, П. Ф. Биологическая статистика : учеб. пособие / П. Ф. Рокицкий. – Изд. 3-е, испр. – Минск : Высш. школа, 1973. – 318 с.

References

1. Kuznetsov V. V., Dmitrieva G. A. *Plant physiology*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2005. 735 p. (in Russian).
2. Bouman F. Seed structure and systematics in Dioscoreales. *Monocotyledons: systematics and evolution: papers presented at the Intern. symp., The Roy. Bot. Gardens, Kew, 18–23 July 1993*. Vol. 2. Richmond, 1995, pp. 139–156.
3. Yanchevskaya T. G., Bobrov V. A. Optimizing the content of cations and anions in the environment corneometry for maximum multiplication factor of potato *in vivo*. *Botanika: issledovaniya* [Botany: research], 2008, vol. 35, pp. 495–506 (in Russian).
4. Yanchevskaya T. G., Bakhnova K. V., Ol'shanikova A. L. Ion exchange nutrient substrates – their unique properties and applications. *Botanika: issledovaniya* [Botany: research], 2005, vol. 33, pp. 361–366 (in Russian).
5. Lavrienko M. V., Ovchinnikov M. M., Khizhnyak S. D., Pakhomov P. M. Study of gelation in aqueous solutions of cysteine and silver nitrate. *Fiziko-khimiya polimerov: sintez, svoistva i primeneniye* [Physicochemistry of polymers: synthesis, properties and application], 2003, no. 9, pp. 125–130 (in Russian).
6. Lysenko V. S., Varduni T. V., Soier V. G., Krasnov V. P. Plant chlorophyll fluorescence as an environmental stress characteristic: a theoretical basis of the method application. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental research], 2013, no. 4-1, pp. 112–120 (in Russian).
7. Shlyk A. A. About spectrometric determination of chlorophylls *a* and *b*. *Biokhimiya* [Biochemistry], 1968, vol. 33, no. 2, pp. 275–285 (in Russian).
8. Aslanidi K. B., Shalapenok A. A., Karnaukhov V. N., Berestovskaya N. G., Shavkin V. I. *Method for determining the functional state of plants by chlorophyll fluorescence spectra: biomonitoring technique*. Pushchino, Scientific Center for Biological Research, 1988. 42 p. (in Russian).
9. Lichtenthaler H. K., Babani K. Light adaptation and senescence of the photosynthetic apparatus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. *Chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthesis*. Dordrecht, London, 2004, pp. 713–736.
10. Lichtenthaler H. K., Buschmann C. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{fd} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 2005, vol. 43, no. 3, pp. 379–393. <https://doi.org/10.1007/s11099-005-0062-6>
11. Rokitskii P. F. *Biological statistics*. 3rd ed., rev. Minsk, Vysshaya shkola Publ., 1973. 318 p. (in Russian).

Информация об авторе

Карасева Елена Николаевна – науч. сотрудник. Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ledymc_net@mail.ru

Information about the author

Alena N. Karasiova – Researcher. V. F. Kuprevich Institute of Experimental Botany of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ledymc_net@mail.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 582.991.14:631.52(476)

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-339-344>

Поступила в редакцию 16.10.2020

Received 16.10.2020

Н. А. Базылева¹, Н. Л. Гулис², В. А. Бейня¹, С. В. Цеханович²

¹Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений, Минск, Республика Беларусь

²Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

МОРФОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛОРУССКИХ СОРТОВ ХРИЗАНТЕМЫ КОРЕЙСКОЙ (*CHRYSANTHEMUM COREANUM*)

Аннотация. Ассортимент цветочно-декоративных растений ежегодно пополняется новыми сортами многолетних цветочных растений. Особенно востребована в озеленении группа позднелетних и осеннецветущих многолетников. Хризантема корейская (*Chrysanthemum coreanum*) – одна из наиболее перспективных культур для озеленения населенных пунктов Республики Беларусь, поэтому селекционерами Центрального ботанического сада НАН Беларуси была начата работа с данной группой мелкоцветковых хризантем.

В статье изложены результаты селекционной работы, целью которой являлось создание местных высокодекоративных сортов для нашей климатической зоны. С помощью метода свободного переопыления получены гибридные сеянцы и произведен последующий отбор наиболее перспективных их форм. При отборе учитывали такие наиболее значимые признаки, как сроки цветения, зимостойкость, устойчивость к болезням и вредителям, а также хорошее вегетативное размножение. В итоге 4 отечественных сорта хризантемы корейской успешно прошли государственное сортоиспытание и были включены с 2020 г. в Государственный реестр сортов. Приведены описания этих новых сортов, их биометрические параметры, декоративные показатели и сроки цветения.

Ключевые слова: декоративность, период цветения, селекция, сорт, соцветие, хризантема корейская

Для цитирования: Морфобиологические особенности белорусских сортов хризантемы корейской (*Chrysanthemum coreanum*) / Н. А. Базылева [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 339–344. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-339-344>

Natallia A. Bazyleva¹, Anastasiya L. Gulis², Vladimir A. Beinina¹, Sviatlana V. Tsekhanovich²

¹State Inspection for Testing and Protection of Plant Varieties, Minsk, Republic of Belarus

²Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

MORPHOBIOLOGICAL PROPERTIES OF BELARUSIAN VARIETIES OF KOREAN CHRYSANTHEMUM (*CHRYSANTHEMUM COREANUM*)

Abstract. The assortment of floral and ornamental plants is annually replenished with new varieties of perennial floral plants. The group of late summer and autumn flowering perennials is one of the most popular in landscaping. Korean chrysanthemum (*Chrysanthemum coreanum*) is one of the most promising crops for landscaping settlements in the Republic of Belarus, therefore, breeders of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus began to work with this group of small-flowered chrysanthemums.

The article describes the results of breeding work, the purpose of which was to create local highly decorative varieties for our climatic zone. The method of free cross-pollination and subsequent selection from the obtained hybrid seedlings of the most promising forms were used in the work. The most significant features in the selection were the following: flowering time, winter hardiness, resistance to diseases and pests, as well as good vegetative reproduction. As a result, 4 domestic varieties of Korean chrysanthemum have successfully passed state variety testing and have been registered in the National List since 2020. Descriptions of these new varieties, their biometric parameters, decorative parameters and flowering times are provided.

Keywords: decorativeness, flowering period, breeding, variety, inflorescence, Korean chrysanthemum

For citation: Bazyleva N. A., Gulis A. L., Beinina V. A., Tsekhanovich S. V. Morphobiological properties of Belarusian varieties of Korean chrysanthemum (*Chrysanthemum coreanum*). *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 339–344 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-339-344>

Введение. Род хризантема (*Chrysanthemum*) семейства Астровые (Asteraceae) включает как однолетние, так и многолетние виды, ряд из которых используется в культуре более тысячи лет. Еще в трудах китайского философа Конфуция, жившего за 550 лет до н. э., упоминается о них как о декоративных растениях. Наибольшую популярность получил такой осеннецветущий

многолетник, как хризантема шелковицелистная (*Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl.) – вид сложного гибридного происхождения, среди предков которого были хризантема индийская, хризантема корейская и др. Первые сорта были получены в Китае, а затем вместе с многочисленными китайскими культурными традициями этот вид получил распространение и в Японии. Здесь этот цветок стал не только символом императора, но и получил всенародное признание. В Европу, а именно в Англию, хризантемы различной формы и окраски были завезены в середине XVIII в. И с этого времени началась их активная гибридизация с целью выведения новых сортов, устойчивых к местным климатическим условиям [1, 2].

Долгое время селекция хризантем была направлена прежде всего на создание крупноцветковых сортов. В дальнейшей селекционной работе важное значение придавали не только размеру (крупноцветковые, декоративные, мелкоцветковые), но и форме соцветий. Современная классификация формы соцветий хризантем включает следующие группы: простые немахровые, полумахровые, анемоновидные, махровые, шаровидные, лучевидные, помпонные. Очень разнообразна окраска хризантем – от белой до темно-пурпуровой, различных оттенков желтого, сиреневого, а также их сочетание в пределах одного соцветия. Отсутствуют лишь синяя и голубая окраска. В настоящее время, по литературным данным, выведено более 100 000 сортов хризантем. Это разнообразие не оставит без выбора ни одного увлеченного цветовода. И за последние 40–50 лет в садах, парках, на приусадебных и дачных участках хризантемы уверенно лидируют в декоративном озеленении.

К группе хризантема корейская (лат. *Chrysanthemum coreanum*, англ. *hardy chrysanthemums*) относятся многолетние сорта гибридного происхождения, которые отличаются неприхотливостью при выращивании, легкостью размножения, широким сортовым разнообразием, высокой декоративностью соцветий, хорошей зимостойкостью в умеренном климате. Они пригодны для оформления осенних ландшафтных композиций и получения прекрасной срезки, устойчивой при транспортировке [3].

Хризантема является растением короткого дня и традиционно считается осенним цветком. Однако селекционерами получены сорта, которые начинают цвести уже с середины лета. Так, по срокам цветения в климатических условиях Беларуси выделяют следующие группы хризантем: ранние (начало цветения приходится на третью декаду июля), средние (зацветающие во второй половине августа), среднепоздние (соцветия начинают открываться во второй декаде сентября) и позднецветущие (зацветают с начала октября). К сожалению, цветение позднецветущих сортов в климатических условиях Беларуси наблюдается нечасто, поскольку возможно лишь в годы с теплой продолжительной осенью без заморозков [3]. Для нас представляли интерес сорта, успевающие достигнуть фазы полного цветения в наших условиях, так как при переносе сортов в иные почвенно-климатические условия часто наблюдается смещение фенофаз, снижается декоративность растения. Поэтому при оценке селекционного материала был учтен и данный критерий отбора [3].

В Центральном ботаническом саду (ЦБС) НАН Беларуси содержится основной генофонд хризантемы корейской. Работа по накоплению и поддержанию коллекционного фонда проводится более четырех десятилетий, с 1980-х годов. За эти годы изучено более 300 сортов зарубежной селекции, полученных из разных климатических зон. Многие сорта оказались неперспективными из-за снижения их декоративности в климатических условиях республики, очень поздних сроков цветения, неустойчивости к болезням [4, 5]. В настоящее время в коллекции ЦБС НАН Беларуси представлено около 200 интродуцированных сортов хризантемы, большинство из которых могут служить исходным материалом для селекционной работы.

Появление в коллекции сравнительно большого количества новых сортов с ранним сроком цветения позволило начать работу по созданию белорусских сортов. Селекция новых отечественных сортов хризантемы корейской началась в 2012 г. на базе лаборатории интродукции и селекции орнаментальных растений ЦБС НАН Беларуси. Здесь проводится работа по многостороннему изучению селекционного материала, испытанию и отбору новых сортов культуры для промышленного озеленения, а также для любительского садоводства [3–5].

Цель нашей селекционной работы – создание зимостойких, с хорошим вегетативным размножением, устойчивых к болезням и вредителям высокодекоративных сортов, сроки цветения которых соответствуют вегетационному периоду в Республике Беларусь.

Материалы и методы исследования. Хризантемы корейские размножаются семенами, делением кустов и черенкованием. Для размножения сортов применяют два последних способа, поскольку при семенном размножении родительские признаки не сохраняются и происходит сильное расщепление потомства. Однако семенное размножение с селекционной целью является оптимальным, поскольку имеет ряд преимуществ. Местные сеянцы часто более приспособлены к пониженным температурам и другим условиям данной зоны, могут сочетать в себе желательные признаки разных сортов, а также проявлять новые качества, отсутствующие у родителей. Семена чаще завязывают растения с немахровой, анемовидной или полумахровой ромашковидной формой соцветий, которые хорошо опыляются насекомыми, но искусственное опыление с пространственной изоляцией родительских пар значительно повышает получение ценных декоративных форм [1].

В период с 2012 по 2017 г. в результате свободного опыления из сортов хризантемы корейской раннего и среднераннего срока цветения были получены первые гибриды. Среди гибридного потомства был произведен отбор по таким признакам, как стабильная декоративность, устойчивость к болезням и вредителям, оптимальные сроки цветения, хорошая зимостойкость. Для оценки перспективных сеянцев использовали методику государственного сортоиспытания и пакет документов ГУ «Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений [6, 7]. Общие принципы испытания изложены в TG/1/3 «Общее введение в испытание на отличимость, однородность и стабильность и составление согласованных описаний новых сортов растений» [5].

Испытание цветочных и декоративных растений на ООС, хозяйственно-ценные и биологические свойства проводят в условиях, обеспечивающих нормальное развитие растений, как правило, в одном месте в течение не менее 2 лет. При необходимости испытание продолжают и на 3-й год.

Методикой проведения испытаний на ООС сортов хризантемы предусмотрено следующее [7]:

испытания проводят, как правило, в одном месте, но если в этом месте не могут быть определены какие-либо существенные признаки сорта, растения могут быть испытаны в другом месте;

испытание выполняют в агроклиматических условиях, обеспечивающих нормальный рост и развитие растений для проявления характерных и отличительных признаков сорта;

планируют размер участков, с тем чтобы изъятие растений или их частей для подсчетов и измерений не наносило ущерба наблюдениям, которые будут осуществляться на более поздних стадиях развития растений.

Для облегчения оценки на отличимость испытываемый сорт и сорта коллекции, имеющие схожие характерные и отличительные признаки, разбивают на группы. Группирование сортов проводят по признакам, которые, исходя из практического опыта, не варьируются в пределах сорта или варьируются незначительно. Эти признаки можно учитывать как отдельно, так и вместе с другими признаками.

Рекомендуется использовать следующие признаки для группировки сортов хризантемы:

растение: тип (признак 2);

корзинка: тип (признак 30), исключая махровые и ромашковидные махровые сорта;

диск: тип (признак 31);

язычковый цветок: число окрасок внутренней стороны (признак 62), включая основную (признак 63) и вторичную (признак 64) окраску.

Результаты и их обсуждение. В настоящее время 4 сорта хризантемы корейской, выведенные в ЦБС НАН Беларуси, успешно прошли государственное сортоиспытание и с 2020 г. включены в Государственный реестр сортов.

Приводим описание новых отечественных сортов хризантемы корейской.

Сорт Вязинская Зорка. Многолетнее светолюбивое, раннецветущее, зимостойкое растение высотой около 50–60 см. Куст прямостоячий, полусферической формы, компактный, хорошо ветвящийся. Стебли зеленые, прочные. Листья зеленые, среднего размера, с тупым основанием, имеют мало надрезов средней глубины. Сорт раннего срока цветения. Период бутонизации –

с 25.06 по 20.07, окрашивание бутонов – с 05.07 по 15.07, начало массового цветения – с 18.07 по 22.07. Продолжительность цветения составляет 40–50 дней. Период основной декоративности длится примерно с 10.07 по 01.09.

Соцветия сорта полумахровые, ромашковидные, большие (около 7 см в диаметре), корзинки – на цветоножках средней длины. В среднем на цветоносе 7–14 соцветий, на растении – 150–250. Аромат цветов слабый, листьев – специфический. Язычковые цветки лопатовидные, гладкие, узкие, средней длины, сильновогнутые, с соприкасающимися краями в поперечном сечении, с округлым кончиком. Базальная часть язычковых цветков восходящая, а продольная ось прямая. Их основная окраска сиренево-розовая (186 D по цветовой шкале RHS). Диск маленький, слегка куполообразный в поперечном сечении, желтый.

Сорт Дзівачка. Многолетнее светолюбивое растение высотой 50–60 см. Куст полувертикальной формы, густо ветвящийся. Стебли зеленые, прочные. Листья зеленые, среднего размера, с тупым основанием, имеют среднее количество надрезов средней глубины. Период бутонизации – с 15.07 по 17.08, окрашивание бутонов – с 20.08 по 01.09, начало массового цветения – с 01.09 по 15.09. Продолжительность цветения составляет 40–50 дней. Период основной декоративности длится примерно с 01.09 по 18.10. Ежегодная продуктивность цветения увеличивается.

Соцветия сорта махровые, большие (7–9 см), корзинки – на цветоножках средней длины. В среднем на цветоносе 13–18 соцветий, на растении – от 100 до 280. Аромат цветов слабый, листьев – специфический. Язычковые цветки гладкие, длинные, средней ширины, слабоогнутые в поперечном сечении. Продольная ось язычковых цветков прямая. Их основная окраска желто-оранжевая (21 B по цветовой шкале RHS), вторичная окраска оранжевая (25 A по цветовой шкале RHS), распределена в краевой зоне лепестка.

Сорт Свіцязянка. Многолетнее светолюбивое, зимостойкое растение высотой 70–80 см. Куст растущий вертикально, хорошо ветвящийся, слегка раскидистый. Стебли зеленые, прочные. Листья темно-зеленые, среднего размера, с округлым основанием, имеют мало мелких надрезов. Период бутонизации – с 01.07 по 20.07, начало цветения – с 27.07 по 05.08. Продолжительность цветения составляет около 40–55 дней. Период основной декоративности длится примерно с 15.08 по 25.09.

Соцветия сорта полумахровые, ромашковидные, большие (8–9 см в диаметре), корзинки – на коротких цветоножках. В среднем на цветоносе 12–20 соцветий. На второй год вегетации до 100–150 штук корзинок на растении, на третий и четвертый год выращивания – до 400–450 соцветий. Аромат цветов слабый, листьев – специфический. Язычковые цветки лопатовидные, гладкие, узкие, длинные, сильновогнутые, с соприкасающимися краями в поперечном сечении, с округлым кончиком. Базальная часть язычковых цветков восходящая, а продольная ось прямая. Их основная окраска насыщенная пурпурно-красная (187 D по цветовой шкале RHS). Диск маленький, слегка куполообразный в поперечном сечении, желтый.

Сорт Спадчына. Многолетнее светолюбивое растение высотой 50–60 см. Куст прямостоячий, полусферической формы, компактный, хорошо ветвящийся. Стебли зеленые, прочные. Листья зеленые, среднего размера, с тупым основанием, имеют мало мелких надрезов. Период бутонизации – с 05.07 по 17.07, окрашивание бутонов – с 22.07 по 05.08, начало массового цветения – с 15.08 по 25.08. Продолжительность цветения составляет 40–55 дней. Период основной декоративности длится примерно с 05.08 по 25.09. Ежегодная продуктивность цветения увеличивается.

Соцветия сорта полумахровые, корзинки ромашковидные, на коротких цветоножках, диаметром 4–5,5 см. В среднем на цветоносе 18–25 соцветий одновременно, на растении – от 250 до 600. Аромат цветов слабый, листьев – специфический. Язычковые цветки гладкие, ровные, среднего размера, слабоогнутые в поперечном сечении, с округлым кончиком. Базальная часть язычковых цветков горизонтальная, а продольная ось прямая. Основная окраска язычковых цветков яркая желто-оранжевая (21 A по цветовой шкале RHS). Вторичная окраска оранжевая (25 A по цветовой шкале RHS), распределена в дистальной части лепестка в виде румянца. Диск среднего размера, слегка куполообразный в поперечном сечении, желто-оранжевый. Сорт относительно устойчив к фузариозу, зимостойкий.

Полученные сорта отличаются относительной устойчивостью к фузариозу и к неблагоприятным климатическим условиям, хорошо переносят бесснежные и сильно влажные зимы. У них высокий коэффициент размножения черенкованием и они хорошо размножаются путем деления куста в открытом грунте. Данные сорта ежегодно обильно и продолжительно цветут (от 40 до 55 дней), их соцветия устойчивы к выгоранию. Рекомендуются для декоративного использования на клумбах в любительском садоводстве.

На основании основных фенологических фаз развития сорта Дзівачка, Свіцязянка, Спадчына были объединены в группу со средним сроком цветения, а сорт Вязинская Зорка – с ранним сроком цветения. Также была проведена первичная комплексная сортооценка, на основании которой сорт Спадчына был оценен как перспективный для промышленного озеленения.

Заключение. Сорта, полученные в Центральном ботаническом саду, приспособлены к климатическим условиям Беларуси, успевают пройти все вегетативные фазы развития – от бутонизации до массового цветения, устойчивы к болезням и вредителям, рекомендуются для более широкого их применения в условиях Республики Беларусь.

Список использованных источников

1. Дьяченко, Н. Г. Хризантемы корейские / Н. Г. Дьяченко. – М. : Изд. дом МСП, 2011. – 32 с.
2. Шмыгун, В. Н. Хризантемы / В. Н. Шмыгун. – М. : Наука, 1972. – 115 с.
3. Цеханович, С. В. Корейская хризантема (*Chrysanthemum coreanum* Nakai) в коллекции Центрального ботанического сада НАН Беларуси / С. В. Цеханович // Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов : материалы III Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 110-летию со дня рождения акад. Н. В. Смольского (7–9 окт. 2015 г., Минск) : в 2 ч. / ред.: В. В. Титок [и др.]. – Минск, 2015. – Ч. 1. – С. 497–499.
4. Гулис, А. Л. Интродукция сортов хризантем селекции НБС им. Н. Н. Гришко в ЦБС НАН Беларуси // Интродукція, збереження та моніторинг рослинного різноманіття : матеріали міжнар. наук. конф. (20–24 травня 2014 р., Київ). – Київ, 2014. – С. 37.
5. TG/1/3. Общее введение в испытание на отличимость, однородность и стабильность и составление согласованных описаний новых сортов растений [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://gossortrf.ru/upov/metodmat/Doc_TGP/TGP_01_3.doc. – Дата доступа: 24.07.2020.
6. Государственный реестр сортов [Электронный ресурс] / Гос. инспекция по испытанию и охране сортов растений. – Минск, 2011. – Режим доступа: <http://sorttest.by>. – Дата доступа: 24.07.2020.
7. Методика проведения испытания сортов на отличимость, однородность и стабильность: цветочные культуры / отв. ред. В. А. Бейня. – Минск : б. и., 2015. – 241 с.

References

1. D'yachenko N. G. *Chrysanthemum korean*. Moscow, Izdatel'skii Dom MSP Publ., 2003. 32 p. (in Russian).
2. Shmygun V. N. *Chrysanthemum*. Moscow, Nauka Publ., 1972. 115 p. (in Russian).
3. Tsekhonovich S. V. Korean chrysanthemum (*Chrysanthemum coreanum* Nakai) in the collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. *Problemy sokhraneniya biologicheskogo raznoobraziya i ispol'zovaniya biologicheskikh resursov: materialy III Mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchennoi 110-letiyu so dnya rozhdeniya akademika N. V. Smol'skogo (7–9 oktyabrya 2015 goda, Minsk, Belarus)*. Chast' I [Problems of biodiversity conservation and use of biological resources: proceedings of the III International conference dedicated to the 110th anniversary of the birth of Academician N. V. Smolsky (October 7–9, 2015, Minsk, Belarus). Pt. 1]. Minsk, 2015, pp. 497–499 (in Russian).
4. Gulis A. L. Introduction of varieties of chrysanthemums selection of the NBG of N. N. Grishko. *Introduktsiya, zberezheniyya ta monitorynh roslynnoho riznomanittya: materyaly mizhnarodnoi naukovoï konferentsii (20–24 travnya 2014 r., Kyiv)* [Introduction, conservation and monitoring of plant diversity: proceedings of the International scientific conference (May 20–24, 2014, Kyiv)]. Kyiv, 2014, p. 37 (in Russian).
5. TG/1/3. *General introduction to the testing of distinctness, uniformity and stability and the drafting of consistent descriptions of new plant varieties*. Available at: https://gossortrf.ru/upov/metodmat/Doc_TGP/TGP_01_3.doc (accessed 24.07.2020) (in Russian).
6. *State register of varieties*. Available at: <http://sorttest.by> (accessed 24.07.2020) (in Russian).
7. Beinya V. A. (ed.). *Methodology for testing varieties for distinctness, uniformity and stability: flower crops*. Minsk, s. n., 2015. 241 p. (in Russian).

Информация об авторах

Базылева Наталья Александровна – канд. с/х наук, вед. специалист. Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений (ул. Казинца, 62, 222108, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: belsort@sorttest.by

Гулис Анастасия Леонидовна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: gulis@cbg.org.by

Бейня Владимир Александрович – канд. биол. наук, директор. Государственная инспекция по испытанию и охране сортов растений (ул. Казинца, 62, 222108, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: belsort@sorttest.by

Цеханович Светлана Витальевна – науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: S.Tsekhanovich@cbg.org.by

Information about the authors

Natallia A. Bazyleva – Ph. D. (Agricult.), Leading specialist. State Inspection for Testing and Protection of Plant Varieties (62, Kazintsa Str., 222108, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: belsort@sorttest.by

Anastasiya L. Gulis – Researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gulis@cbg.org.by

Vladimir A. Beinia – Ph. D. (Biol.), Director. State Inspection for Testing and Protection of Plant Varieties (62, Kazinets Str., 222108, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: belsort@sorttest.by

Sviatlana V. Tsekhanovich – Researcher. Central Botanic Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: S.Tsekhanovich@cbg.org.by

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)

АГЛЯДЫ REVIEWS

УДК 577.241
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-345-356>

Поступила в редакцию 05.04.2021
Received 05.04.2021

О. И. Тишук, А. Г. Полешко, И. Д. Волотовский

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ. ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Аннотация. Настоящий обзор посвящен индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам (ИПСК), открытие которых стало одним из выдающихся достижений медико-биологической науки начала XXI в. ИПСК являются, по сути, искусственно созданным в лабораторных условиях аналогом эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), пул которых формируется в оплодотворенной яйцеклетке и затем вовлекается в чрезвычайно сложные процессы онтогенеза. Рассматривается место стволовых клеток вообще и ИПСК в частности в иерархии клеток организма.

Описаны основные свойства этих клеток, сходство и различия между ИПСК и ЭСК, перспективы их практического применения в биологии и медицине, в том числе при лечении заболеваний человека, а также механизмы индуцированной дедифференцировки как в унипотентных клетках (фибробласты, кератиноциты и др.), так и в мультипотентных гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) и мезенхимальных стромальных клетках (МСК).

В обзоре представлена информация об используемых в мире способах получения ИПСК, описываются протоколы репрограммирования, которые различаются по способу доставки генетического материала в клетку, условиям культивирования клеток в процессе их дедифференцировки и эффективности. В качестве примера приводится описание всего цикла дедифференцировки фибробластов человека в ИПСК. Кроме того, представлены данные об уникальных свойствах ИПСК, которые позволяют изучать *in vitro* процессы онтогенеза, патофизиологические процессы, имеющие место при различных заболеваниях, а также использовать данный тип клеток при разработке потенциальных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: стволовые клетки, плюрипотентность, репрограммирование, дедифференцировка, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, эмбриональные стволовые клетки

Для цитирования: Тишук, О. И. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Получение, свойства и перспективы применения в биологии и медицине / О. И. Тишук, А. Г. Полешко, И. Д. Волотовский // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 345–356. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-345-356>

Olga I. Tishuk, Anna G. Poleshko, Igor D. Volotovskiy

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

INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS. OBTAINING, PROPERTIES AND APPLICATION PROSPECTS IN BIOLOGY AND MEDICINE

Abstract. This review dedicated to induced pluripotent stem cells discovery of which became one of the outstanding achievements of biomedical science at the beginning of 21st century. These cells are in fact a artificially induced analogue of embryonic stem cells. They are the progenitors of all cells contained in organism of animals and human. The pool of embryonic stem cells forms in fertilized cell and they are involved in extremely complex processes of organogenesis. The position of these cells in general and of induced pluripotent stem cells in particular in hierarchy of cells in organism is described.

The main properties of these cells, similarities and differences between embryonic and induced pluripotent stem cells, prospects for their practical use in biology and medicine including treatment of human diseases are considered.

The mechanisms of induced dedifferentiation in both unipotent cells, for example fibroblasts and keratinocytes, and multipotent cells as hemopoietic or mesenchymal stromal stem cells are described.

In this review the information on used in the world approaches for obtaining of induced pluripotent stem cells is presented, the ways of reprogramming different in the methods of delivery of genetic material into the cells and conditions of their cultivation during dedifferentiation process and efficacy. As an example, description of all dedifferentiation cycle of human fibroblasts in induced pluripotent stem cells is provided. Besides, the data on unique properties of induced pluripotent stem cells what allowed to study ontogenesis processes, pathophysiology of various diseases both *in vitro* and in animals' models to be obtained using induced pluripotent stem cells and also on approaches of these cells application for medicine screening when they are synthesized and tested are given.

Keywords: stem cells, pluripotency, reprogramming, dedifferentiation, induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells

For citation: Tishuk O. I., Poleshko A. G., Volotovskiy I. D. Induced pluripotent stem cells. Obtaining, properties and application prospects in biology and medicine. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalogichnykh nauk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 345–356 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-345-356>

Введение. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – это стволовые клетки, полученные из иных (соматических, репродуктивных) клеток путем репрограммирования, основанного на изменении эпигенома клетки. Получение ИПСК человека и изучение их биологии является актуальной задачей современной клеточной биологии и регенеративной медицины. ИПСК, получаемые с помощью репрограммирования, открывают широкие перспективы для фундаментальных и прикладных исследований, направленных на изучение процессов, лежащих в основе онтогенеза человека [1, 2]. С использованием ИПСК стали возможными изучение молекулярно-генетических механизмов развития в первую очередь наследственных заболеваний человека, создание моделей генетических заболеваний, разработка новых протоколов их лечения, а также использование ИПСК для тестирования лекарственных препаратов. Акцент на наследственных заболеваниях оказался не случайным. По разным данным, порядка 800–900 заболеваний человека прямо или косвенно связаны с модификациями на уровне генома.

Большой интерес к ИПСК обусловлен еще одним важным обстоятельством. С открытием ИПСК возникла возможность придать любой клетке нашего организма свойства эмбриональной стволовой клетки (ЭСК), являющейся, как известно, прародительницей порядка 200 типов клеток, из которых построен человеческий организм. Иными словами, из ИПСК, как и из ЭСК, можно получить в лабораторных условиях практически все типы специализированных клеток, присутствующих во взрослом организме [3]. Открытие ИПСК поставило перед исследователями фундаментальный вопрос о том, какие генетические и эпигенетические механизмы отвечают за превращение генома соматической клетки в геном клетки, идентичной раннему эмбриональному состоянию. В отличие от ЭСК, аутологичный материал которых, как правило, недоступен, ИПСК, созданные с помощью генно-инженерных методик из аутологических соматических клеток, лишены недостатков, связанных с иммунологической несовместимостью и этическими моментами [1].

В настоящее время детальные события процесса получения ИПСК широко исследуются во многих лабораториях в разных странах, апробировано большое количество протоколов репрограммирования, которые различаются как по способу доставки индуцирующих факторов или генетического материала в клетку, так и по условиям культивирования клеток в процессе их дедифференцировки. Однако следует отметить, что до сих пор не существует универсальных высокоэффективных подходов получения ИПСК.

Для репрограммирования чаще всего используют такие соматические клетки человека, как фибробласты, кератиноциты и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК). Их главным преимуществом является доступность, простота получения и высокая пролиферативная активность.

Один из успешных и часто используемых в лабораторной практике протоколов репрограммирования основан на введении в геном клетки четырех кодирующих транскрипционных факторов плюрипотентности генов, таких как *oct-4* (octamer-4), *sox2* (sry-sex 4determining region Y-box 2), *klf4* (Kruppel-like factor 4) и *c-myc* (cellular myelocytomatosis oncogene) – так называемый «коктейль Яманаки». В литературе эту четверку факторов маркируют как факторы OSKM. Индуцированная экспрессия данных генов переключает метаболические пути клетки, что приводит к ее дедифференцировке [4]. Одним из важных этапов репрограммирования является подбор протокола введения целевого гена в клетку с целью поддержания его экспрессии.

Несмотря на имеющиеся перспективы использования вирусного метода репрограммирования соматических клеток, последний потенциально способен вызывать генетическую нестабильность клеток, что исключает возможность применения полученных таким образом ИПСК в регенеративной медицине [1]. Поскольку, согласно литературным данным, существующие методики все еще являются низкоэффективными, в настоящее время разрабатываются альтернативные методы получения ИПСК, которые помимо минимизации рисков их использования в клинической практике позволят увеличить выход репрограммированных клеток.

Место стволовых клеток в клеточной иерархии организма. Основным свойством любой клетки является ее потентность, определяемая степенью дифференцировки и способностью превращаться в другие клетки. Иными словами, потентность – это способность любой клетки дифференцироваться в определенные виды клеток различных органов. Чем большее количество видов клеток может образовываться из исходной клетки, тем выше ее потентность. Исходя из этого, выделяют следующие разновидности стволовых клеток [3]:

тотипотентные клетки характеризуются наибольшим потенциалом дифференцировки и способны превращаться в любую клетку, в том числе в эмбриональную и везародышевую клетку; тотипотентностью характеризуются зигота и бластомер;

плюрипотентные клетки обладают неограниченной пролиферацией и могут дифференцироваться в производные трех первичных зародышевых листков энтодермы, мезодермы и эктодермы;

мультипотентные и олигопотентные клетки – взрослые стволовые клетки, находящиеся во всех тканях и органах, способны превращаться в клетки одной линии, например ГСК, мезенхимальные стволовые клетки;

унипотентные клетки – предшественники клеток одного типа, образуются из мультипотентных и олигопотентных стволовых клеток.

В рассматриваемом контексте с потентностью клеток связаны еще два термина: **репрограммирование** (расширение потентности и дифференцировочного потенциала клеток), достигаемое тремя способами – переносом ядер, слиянием клеток и генетическими манипуляциями, и **трансдифференцировка** (расширение потенции клеток и возникновение клеток других линий), под которой понимают индукцию транскрипционными факторами взаимопревращения между различными дифференцированными клеточными типами.

Открытие ИПСК произошло благодаря синтезу научных фундаментальных результатов и технологий, получивших распространение в течение нескольких последних десятилетий [5]. Это было обусловлено следующим:

демонстрацией переноса ядер между соматическими клетками и тем фактом, что дифференцированные клетки сохраняют в своем генетическом аппарате ту же информацию, что и эмбриональные клетки;

развитием технических возможностей, позволяющих выделять, культивировать и исследовать плюрипотентные стволовые клетки;

установлением того, что транскрипционные факторы являются ключевыми регуляторными структурами, принудительная экспрессия которых запускает процесс превращения одного типа зрелых клеток в другие.

История получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Идентификация природы ключевых транскрипционных факторов. Первые линии плюрипотентных стволовых клеток были получены из внутренней клеточной массы бластоцисты мыши в 1981 г. [5], а первое репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния было проведено в 2006 г. группой японских исследователей, возглавляемых С. Яманака. Ими было установлено, что использование комбинации четырех транскрипционных факторов – Oct3/4, Sox2, Klf4 и с-Мус (OSKM) – достаточно для перехода мышинных фибробластов в плюрипотентное состояние при репрограммировании [4]. Также было доказано, что указанная комбинация факторов эффективно работает и в отношении клеток человека. С. Яманака с сотр. [4] обнаружили, что такие факторы транскрипции, как Oct3/4, Sox2 и Nanog, поддерживают состояние плюрипотентности как у ранних эмбрионов, так и у ЭСК, а онкогены *Stat3* (signal transducer and activator of transcription 3, кодирует сигнальный белок и активатор транскрипции), *E-Ras* (expressed ras, кодирует малые ГТФазы), с-Мус и *Klf4* способствуют долгосрочному сохранению фенотипа и усиливают пролиферацию ЭСК в культуре. Для эксперимента было отобрано 24 гена в качестве кандидатов на кодирование транскрипционных факторов, которые вызывают плюрипотентность в соматических клетках. В результате были получены данные, которые свидетельствуют о том, что фактор Nanog не является критичным для получения ИПСК, а факторы с-Мус и Klf4 не могут быть заменены другими онкогенами, в том числе E-Ras, Tcl1 (T-cell leukemia/lymphoma 1), β -катенин и Stat3.

Кроме того, исследователи из той же лаборатории под руководством С. Яманака сообщили об успешной дедифференцировке фибробластов взрослого человека и получении ИПСК с помощью идентичных пептидных факторов [4]. Этот процесс получил название прямого генетического репрограммирования, т. е. репрограммирования путем прямого воздействия на эпигенетическое состояние взрослой клетки в отличие от переноса ядра соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) и слияния клеток. Технология репрограммирования позволила получать плюрипотентные стволовые клетки из разных типов клеток (фибробласты кожи, клетки крови, нервные клетки, эндотелиальные клетки и др.) различных организмов.

В то же время Дж. Томсон с соавт. [6], которые использовали для репрограммирования клеток гены факторов Oct3/4, Sox2, Nanog и Lin28, показали, что при репрограммировании возможна замена с-Мус, так как была установлена его роль в индукции апоптоза ЭСК человека, а также в стимуляции 20 % случаев опухолевой трансформации ИПСК мышей при реактивации соответствующей области ретровирусного вектора [4]. Во многих работах по репрограммированию соматических клеток для индукции плюрипотентности приведены данные о значительном увеличении эффективности репрограммирования при добавлении гена *Lin28* в набор факторов репрограммирования. Основной вклад транскрипционного фактора *Lin28* в этот процесс связывают с его участием в процессинге микроРНК. Предполагается, что в ЭСК *Lin28* ингибирует процессинг микроРНК *let7*, известного супрессора опухолевого роста. Он участвует в подавлении активности с-Мус [7]. Кроме того, было показано, что ключевые факторы репрограммирования Oct3/4, Sox2 и Nanog могут запускать синтез семейства микроРНК miR-290, члены которого экспрессируются в ЭСК в норме, принимая участие в регуляции пролиферации и стабилизации этих клеток. С участием miR-290 происходит ремоделирование хроматина с помощью с-Мус [7]. Одной из мишеней транскрипционных факторов плюрипотентности Oct3/4, Sox2, Nanog и Rex1 является промотор кластера микроРНК miR-302–367. Его продукты могут опосредованно индуцировать сигнальные пути TGF- β (transforming growth factor β)/Nodal (протеины суперсемейства TGF- β)/Activin (представитель надсемейства лигандов TGF- β). Этот сигнальный путь играет существенную роль в поддержании плюрипотентного статуса ЭСК и в подавлении их дифференцировки, ингибируя некоторые регуляторы этого пути, что в свою очередь положительно сказывается на поддержании клеток в недифференцированном состоянии [8]. Позже С. Яманака с соавт. [4] на 60 % повысили эффективность введения векторов с *oct3/4*, *sox2*, *с-мус*, *klf4* в клетки, используя для этого лентивирусные векторы, которые содержали гены мышиных рецепторов для ретровирусов – Slc7a1 (solute carrier family 7 member 1) и среды для культивирования, обогащенные bFGF (basic fibroblast growth factor), что стимулировало пролиферацию ЭСК человека.

Уникальность компонентов «коктейля Яманака» состоит не только в том, что входящие в его состав факторы участвуют в поддержании плюрипотентного состояния, но и в том, что некоторые компоненты этого «коктейля» играют большую роль в регуляции клеточного цикла, пролиферации и эпигенетического статуса клеток.

Уже в первых работах по изучению технологии репрограммирования было показано негативное влияние процесса старения на эффективность индукции плюрипотентного состояния. Одним из важных моментов при репрограммировании явился выбор исходного клеточного материала – он должен быть легкодоступным и не иметь в геноме накопленных повреждений ДНК (например, от УФ-излучения и других факторов внешней среды). Эффективность репрограммирования, как оказалось, сильно зависела и от так называемого эффекта положения, т. е. места, куда внедрялся вирусный вектор, влияющий на экспрессию закодированных в нем генов. Кроме того, снижению эффективности данного способа способствовал естественный клеточный иммунитет, защищающий клетку от внедрения чужеродных генов [6].

Основной же проблемой использования интеграционных методов является высокий риск канцерогенеза. Существуют эпигенетические механизмы, подавляющие активность генов плюрипотентности, что обеспечивает дальнейшую нормальную дифференцировку клеток. Эти же механизмы действуют и на гены, внедренные вирусными векторами. Однако существует вероятность того, что внедренные гены, которые по природе являются онкогенами для соматических клеток и клеток, вступивших на путь дифференцировки, будут продолжать экспрессироваться. В таком случае это приведет к развитию из ИПСК злокачественных опухолей [3].

Сравнение эмбриональных и индуцированных стволовых клеток. На сегодняшний день известно два типа плюрипотентных клеток, имеющих широкий потенциал применения в биомедицине: ЭСК и ИПСК. ЭСК представляют собой практически неисчерпаемый источник недифференцированных клеток с нормальным диплоидным кариотипом, которые могут быть дифференцированы по самым разным направлениям. До недавнего времени практически единственным их источником была внутренняя масса бластоцисты, которую получали в лабораторных условиях через несколько дней после процедуры экстракорпорального оплодотворения. Следует отметить, что манипуляции с ЭСК сопровождаются высоким риском их злокачественной трансформации, а также значительными проблемами этического характера, связанными с необходимостью забора клеток из человеческих эмбрионов [3].

Альтернативой ЭСК служат ИПСК. Этот тип плюрипотентных клеток получают, как упоминалось выше, из соматических клеток взрослого организма путем репрограммирования с помощью эктопической экспрессии определенного набора транскрипционных факторов [4]. Главной характеристикой плюрипотентных стволовых клеток является их способность к неограниченной пролиферации и дифференцировке в производные трех первичных зародышевых листков. Важный момент состоит в том, что ИПСК теряют эту способность в ходе дифференцировки [4].

ИПСК по своим свойствам аналогичны ЭСК. В них работают каскады сигнальных путей, которые блокируют индукцию дифференцировки и способствуют поддержанию в активном состоянии транскрипционных факторов, ответственных за состояние плюрипотентности [4]. Доказано, что в ЭСК существуют две подсистемы регуляторов плюрипотентности: внешняя и внутренняя. Подсистема «внешних регуляторов плюрипотентности» включает в себя несколько сигнальных путей, основными из которых являются каскады, запускаемые белками LIF (leukemia inhibitory factor), BMP4 (bone morphogenetic protein), TGF β , активином A, NODAL и bFGF [9]. Подсистема «внутренних регуляторов плюрипотентности» – это подсистема транскрипционных факторов, действующих в ядрах клеток. К числу ключевых регуляторов в данной подсистеме относятся транскрипционные факторы Oct-4, Nanog и Sox2 [4].

ЭСК и ИПСК имеют сходные морфологические (компактность колоний, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, четкая визуализация ядер), молекулярно-биологические, иммуноцитохимические (экспрессируют гликолипиды SSEA-3, SSEA-4 (stage-specific embryonic 8 antigen) и протогликаны Tга-1-60 и Tга-1-81) данные и функциональные характеристики, теломеразную активность и способность дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков [1].

Установлено также, что ИПСК и ЭСК экспрессируют сходный спектр генов, формируют тератомы, содержащие производные всех трех зародышевых листков [4]. При сравнении ИПСК и ЭСК руководствуются такими критериями, как способность к дифференцировке и профиль экспрессии генов, эпигенетические характеристики и др. Для ИПСК мыши в качестве основного теста на способность к дифференцировке обычно используется тест на формирование жизнеспособных химер [10]. Инъекция диплоидных ИПСК в тетраплоидную бластоцисту мыши (тетраплоидная комплементация) позволила полностью развить организм из ИПСК, что указывает на эквивалентность некоторых линий ИПСК, в плане их способности к дифференцировке, ЭСК. В отношении клеток человека по этическим причинам для исследования доступны тесты, основанные на дифференцировке *in vitro*, формировании тератома-подобных новообразований при введении стволовых клеток иммунодефицитным мышам и способности к образованию эмбрионидных тел, что характеризует клетки как плюрипотентные [7]. В таблице приведены сравнительные характеристики ЭСК, взрослых МСК и ИПСК.

Сравнительные свойства эмбриональных (ЭСК), взрослых мезенхимальных стволовых клеток (ВМСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) [11]

Comparative properties of embryonic, adult mesenchymal stem cells and induced pluripotent stem cells [11]

Свойства клеток	ЭСК	ВМСК	ИПСК
Природа (локализация)	Находятся во внутренней клеточной массе бластоцисты	Входят в состав тканей и органов	Получают при репрограммировании соматических клеток с различным дифференцировочным потенциалом <i>in vitro</i>
Способность к самообновлению	Высокая	Ограниченная	Высокая
Потентность	Плюрипотентность	Мультипотентность	Плюрипотентность
Дифференцировка	Дифференцируются в клетки трех зародышевых листков	Обладают ограниченной дифференцировочной способностью	Дифференцируются в клетки трех зародышевых листков
Маркеры	OCT-3/4, SOX-2, NANOG, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81	CD90+, CD73+, CD105+, CD15–, CD3–, CD19–, CD11–, CD79–, HLA–DR–	OCT-3/4, SOX-2, NANOG, SSEA-4, KLF-4, TRA-1-60, TRA-1-81
Спонтанная онкотрансформация	Возможна	Отсутствует	Возможна
Иммунный ответ	Сильный	Присутствует для аллогенных клеток, отсутствует для аутологичных клеток	Сильный для ИПСК аллогенного происхождения, отсутствует для аутологичных клеток
Этические моменты	Присутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют

ИПСК по сравнению с ЭСК имеют ряд преимуществ, два из которых являются основными: получение клеток не требует использования человеческих бластоцист, которые остаются невостребованными после процедуры экстракорпорального оплодотворения, что снимает этические вопросы; перспектива получения ИПСК рутинными методами из клеток любого пациента снимает проблемы иммунологической совместимости.

В настоящее время исследование свойств и характеристик ИПСК, а также разработка протоколов их получения особо актуальны. Резюмируя вышесказанное, ИПСК можно получить из различных соматических клеток взрослого организма, репрограммируя их до плюрипотентного состояния с помощью набора определенных генов (например, *oct3/4*, *sox2*, *klf4*, *c-myc*, *nanog* и *lin28*), большинство из которых кодируют транскрипционные факторы [10]. Кроме того, показано, что ИПСК мыши и человека можно получить путем введения в клетку микроРНК, рекомбинантных белков, матричных РНК, эписомных плазмид [12].

Получение ИПСК. В литературе имеется большое количество протоколов получения ИПСК, которые различаются по способу доставки трансгенов в клетки и условиям их культивирования в процессе репрограммирования [13]. Все существующие методы получения ИПСК условно можно разделить на две группы: вирусные и невирусные. При этом вирусные методы получения ИПСК подразделяются на методы с интеграцией трансгена в геном клетки реципиента и без интеграции. Первыми были разработаны вирусные системы доставки генетического материала в клетку на основе ретро- и лентивирусов.

Ретро- и лентивирусы интегрируют трансген в геном хозяина, что обеспечивает его высокий уровень экспрессии и эффективное заражение делящихся клеток. Однако существует опасность инсерционного мутагенеза и активации протоонкогенов, что может увеличить риск образования опухолей [10]. Первое получение ИПСК было осуществлено благодаря одновременной трансдукции четырьмя ретровирусами, несущими гены *oct3/4*, *sox2*, *klf4* и *c-myc* [4].

Для решения проблемы инсерционного мутагенеза и снижения риска канцерогенеза были разработаны неинтеграционные методы, использующие векторы на основе аденовирусов и вируса Сендай. Неинтеграционный метод получения ИПСК был использован в 2008 г. группой ученых во главе с С. Дунканом. В качестве вектора для доставки репрограммирующих факторов (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*) был применен аденовирус. Аденовирусы способны переносить генетический материал как в делящиеся, так и в не делящиеся клетки и обеспечивают достаточно высокую экспрессию генов, как правило, не встраиваясь в геном. Риск канцерогенеза был сведен к минимуму, но эффективность данного метода оказалась более низкой, чем эффективность при использовании интеграционных векторов. В 2009 г. Н. Фузакки с соавт. получили ИПСК, используя вектор на основе вируса Сендай. Этот вирус содержит РНК, а следовательно, не может встроиться в геном клетки. Несмотря на способность вируса спонтанно элиминироваться в процессе деления клеток, данный подход требовал применения либо дополнительных процедур по селекции ИПСК, либо модификации векторов. Основным препятствием для использования таких векторов остается низкая эффективность репрограммирования.

Еще одним неинтеграционным методом доставки репрограммирующих факторов является использование плазмид. Это довольно простой, доступный метод, при котором исключается интеграция плазмиды в геном. В то же время в первых экспериментах К. Окита такая интеграция плазмидного вектора в геном клетки имела место, однако оптимизация протокола позволила избежать впоследствии интеграции экзогенной ДНК и в 2010 г. были получены ИПСК без внедренной в геном стволовой клетки плазмидной ДНК. Недостатком использования плазмид является низкая эффективность репрограммирования [14].

Альтернативный способ репрограммирования – использование искусственных хромосом, которые обладают большой вместимостью и сохраняются при делении клетки. Экспрессия генов, внедренных с помощью этих хромосом, гораздо более стабильна и менее зависима от эффекта положения [14].

М. Хирацука с соавт. разработали искусственную хромосому, содержащую ДНК, в которой были закодированы 4 репрограммирующих фактора (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) и ген, «выключающий» белок p53, который является опухолевым супрессором, а также выполняет множество других функций, например принимает участие в дифференцировке и регуляции клеточного цикла (в данном случае подавление его активности позволяет повысить эффективность репрограммирования). Недостатками этого метода являются опасность интеграции экзогенного генетического материала в геном клетки, довольно низкая эффективность метода и возможные отрицательные последствия, связанные с подавлением активности белка p53 в процессе репрограммирования [15].

Л. Варреном с соавт. разработан также метод, заключающийся в периодическом введении в культуру соматических клеток синтетической мРНК, кодирующей 5 транскрипционных факторов (*Klf4*, *c-Myc*, *Oct4*, *Sox2*, *Lin28*). Основной проблемой использования экзогенной мРНК является слишком быстрая ее деградация и необходимость периодического введения в клетку синтетической мРНК, что может привести к повреждению клеток.

Х. Чжоу с коллегами разработали метод получения ИПСК с помощью введения в клетки рекомбинантных белков, в которых полиаргинин (выполняющий транспортную функцию) был связан с С-концевыми доменами 4 факторов – *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*. Доставка белков в клетку осуществлялась как инвазивными методами (микроинъекция, электропорация), так и неинвазивным методом (введение рекомбинантного белка, связанного с коротким катионным пептидом, способным проникать через клеточную

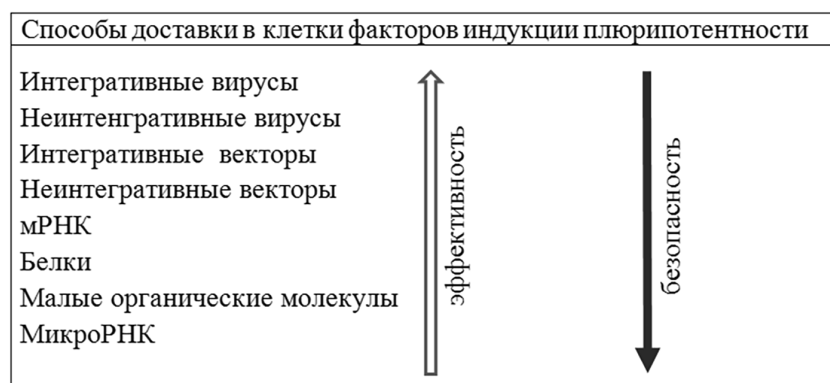


Рис. 1. Способы доставки индукторов дедифференцировки в клетки

Fig. 1. The methods of delivery of dedifferentiation inducers into cells

мембрану) [14]. Несмотря на то что при использовании неинвазивного метода клетки не повреждаются, не требуется специального оборудования, а риск инсерционного мутагенеза отсутствует, его эффективность низкая. Сам процесс репрограммирования довольно длительный и включает несколько циклов, а кроме того, использование данного метода требует достаточного количества хорошо очищенного рекомбинантного белка [14].

Важно отметить, что некоторые низкомолекулярные соединения (например, оксистерол, пурморфамин и другие метаболиты, аскорбиновая кислота, бутират натрия, форсколин) повышают эффективность репрограммирования. Самостоятельно они, к сожалению, не эффективны. Правда, считается, что некоторые из них либо их комбинации могут функционально заменить транскрипционные факторы. Основным недостатком такого подхода является сложная процедура обработки клеток комбинациями из малых молекул. Вероятно, из-за большей сложности молекулярных процессов, происходящих при репрограммировании клеток у человека, пока не удастся подобрать состав «коктейля» из малых молекул для получения человеческих ИПСК.

Следует отметить, что в ряду интеграционных вирусов – микроРНК безопасность по отношению к стабильности генома растёт, т. е. снижается вероятность нежелательных событий на его уровне (например, нежелательной активности транскрипционных факторов или образования в нем мутаций), приводящих к нарушению его структурно-функциональной целостности. В то же время в данном ряду эффективность индукции плюрипотентности снижается (рис. 1) [16].

Стадии репрограммирования. Превращение соматических клеток в ИПСК. На сегодня имеется опыт получения ИПСК из различных типов клеток взрослого организма, например из нейтральных стволовых клеток, клеток эндотелия, кератиноцитов, клеток периферической крови, гепатоцитов и эпителиальных клеток желудка, волосных фолликулов, клеток слизистых оболочек глаза, фибробластов, МСК и др. Однако по причине простоты получения наиболее популярными объектами для репрограммирования являются фибробласты, кератиноциты кожи и мононуклеарных клеток периферической крови.

Процесс репрограммирования клеток состоит из трех стадий: инициации, созревания и стабилизации. На **первой стадии (инициации)** после трансфекции клеток факторами Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc происходит метилирование промоторов генов, экспрессия которых характерна для соматических клеток. Далее число быстро пролиферирующих клеток увеличивается и в них происходит метаболическое переключение с окислительного фосфорилирования на гликолиз, что характерно для ЭСК, которые адаптируются к условиям гипоксии на ранних стадиях эмбриогенеза [11].

Переключение метаболического пути с окислительного фосфорилирования на гликолиз происходит через 7 дней после начала процесса репрограммирования. Ключевым сигнальным каскадом на данной стадии является фосфатидил-инозитол-3-киназный (PI3K/AKT) путь. Во время репрограммирования компоненты данного пути, такие как киназы PI3 (phosphoinositide 3-kinases), Pdk1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) и Akt (alpha serine/threonine-protein kinase), активируются, а гены, кодирующие белки гликолиза, экспрессируются [10].

Запускается процесс мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), что приводит к потере клетками подвижности вследствие реорганизации цитоскелета, приобретению клеточной полярности и индукции экспрессии E-кадгерина, который относится к семейству белков плотных контактов. МЭП является обратимым по причине непродолжительной экспрессии генов, кодирующих факторы (Oct3/4, Sox2, Klf4

и *c-Myc*) [17]. Поэтому экзогенные Oct3/4, Sox2, Klf4 и *c-Myc* должны присутствовать в клетках достаточно продолжительное время.

Ключевым геном в МЭП в течение репрограммирования является Sox2, продукт которого супрессирует фактор Snail, в норме обеспечивающий обратный процесс – эпителиально-мезенхимальный переход. Klf4 отвечает за индукцию гена, кодирующего E-кадгерин [17], в поддержание экспрессии которого затем вступают факторы семейства белков BMP. В отсутствие Klf4 его может функционально заменять один из эндогенных белков семейства BMP, что у мышей приводит к возможности репрограммирования фибробластов только при внесении экзогенного Oct3/4 [18]. Но конститутивная сверхэкспрессия генов, кодирующих семейство факторов BMP, препятствует получению ИПСК из фибробластов человека [18]. Подобное различие в механизмах, лежащих в основе репрограммирования, характерна для клеток человека и мыши.

Через 3 дня после одновременной трансфекции транскрипционными факторами OSKM наблюдается увеличение пролиферативной активности клеток, обусловленное сверхэкспрессией гена *c-Myc* [18]. Также на данном этапе происходит усиление экспрессии гена *lin28*, что приводит к регуляции пролиферации за счет взаимодействия с циклинами A, B и циклин-зависимой киназой Cdk4 (cyclin-dependent kinase 4) [19]. Во время стадии инициации минимальное число клеток становятся устойчивыми к апоптозу и старению.

После инициации следует **вторая стадия созревания** ИПСК. Только небольшое число клеток проходит стадию созревания успешно, что проявляется в низкой эффективности репрограммирования в целом [20]. На данном этапе эпигенетические модификации позволяют активировать экспрессию генов, кодирующих такие эндогенные факторы плюрипотентности, как Oct3/4, Nanog, Sall4 (Sal-like protein 4) и др.

Важную роль в созревании ИПСК играет LIF-STAT сигнальный путь. При культивировании клеток на среде без добавления LIF, который служит активирующим агентом данного сигнального пути, формирующиеся колонии, схожие по морфологии с колониями ЭСК, открепляются от адгезивной поверхности флакона, в котором культивируются. Активация LIF-STAT-пути приводит к деметилированию промоторов генов, обеспечивающих поддержание плюрипотентного состояния. Было показано, что транскрипционный фактор Stat3 напрямую блокирует ДНК-метилтрансферазу DNMT1 и гистоновые деацетилазы HDAC2, HDAC3 и HDAC8 [21].

WNT-сигнальный путь участвует в созревании ИПСК, так как добавление Wnt3a-активирующего лиганда между 6-м и 9-м днем после начала репрограммирования увеличивает количество сформированных ИПСК колоний [22].

До **третьей стадии стабилизации** доходит лишь 1 % клеток, вступивших на путь репрограммирования. Данная стадия характеризуется наличием эндогенной экспрессии факторов поддержания плюрипотентности. Было показано, что при элиминации экзогенных факторов на 9-й день репрограммирования фенотипической реверсии клеток не происходит, т. е. на этой стадии процесс необратим.

На стадии стабилизации наиболее четко прослеживаются различия между ИПСК мыши и человека. При репрограммировании соматических клеток мышей имеет место реактивация X-хромосомы, которая в норме у особей женского пола инактивирована. В клетках человека реактивации X-хромосомы не происходит.

Ниже представлен примерный протокол получения ИПСК человека из фибробластов дермы человека, используемый в настоящее время в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

1. **Получение стока вирусных частиц.** Клетки HEK 293T/Phoenix одновременно трансфецируются плазмидами, экспрессирующими упаковочные вирусные белки (например, Gag, Pol и VSV-G), а также плазмидами, экспрессирующими целевые гены белков плюрипотентности OSKM, в соответствии с протоколом производителя трансфекционного реагента. Через 24 ч после трансфекции среда меняется. Затем каждые 24 ч проводится сбор среды, содержащей вирусные частицы. До завершения сбора эта среда хранится при +4 °C. После этого накопленный объем пропускается через целлюлозно-ацетатный фильтр с размерами пор 0,45 мкм и концентрируется путем центрифугирования при 70 000 g в течение 1 ч при +4 °C. По окончании этой процедуры материал закладывается на хранение при –80 °C.

2. **Подготовка культуры фибробластов дермы человека к репрограммированию.** Для получения более высокой эффективности репрограммирования используются фибробласты ранних пассажей (2–5-й). В концентрации 3000–5000 кл/см² фибробласты дермы человека высаживаются в питательную среду для культивирования и инкубируются при +37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Каждые 2 дня среда (2 мл) меняется на свежую. По достижении культурой 80 % монослоя фибробласты пассируются в соотношении от 1:4 до 1:6 и инкубируются при +37 °C в атмосфере 5 % CO₂ до готовности к репрограммированию. Перед началом работы в каждую лунку 6-луночного планшета, в которой проводится трансфекция/трансдукция, добавляется субстрат для культивирования ЭСК и ИПСК, повышающий адгезию клеток и оказывающий трофический эффект. Затем фибробласты ресуспендируются в 2 мл питательной среды для культивирования в конечной концентрации 5·10⁴ клеток в 1 мл и добавляются в каждую лунку 6-луночного планшета,

содержащую субстрат для культивирования ЭСК и ИПСК и инкубируются при +37 °C и 5 % CO₂ в течение 12 ч.

3. *Репрограммирование.* При вирусной индукции плюрипотентности к клеткам добавляется реагент, повышающий эффективность трансфекции (например, Polybrene в концентрации до 8 мкг/мл). Затем определяется титр полученных вирусных частиц, т. е. их концентрация при добавлении к клеткам. Через 2 дня после посева клетки инфицируются четырьмя собранными вирусными векторами. На первых этапах дедифференцировки в течение первой недели после инфицирования в среду культивирования клеток добавляются такие демителирующие агенты, как вальпроевая кислота и BIX-01294. В данной среде фибробласты культивируются в течение недели, после чего пассируются в соотношении 1 к 10 на 35-миллиметровые пластиковые культуральные чашки. На следующий день после пересева среда меняется на среду для культивирования ЭСК человека. В этой среде клетки культивируются в течение 10–12 дней, среда меняется через каждые 2 дня до появления ЭСК-подобных колоний. С помощью стеклянного микрокапилляра образовавшиеся колонии механически пересаживаются в новые покрытые фидерным субстратом пластиковые чашки Петри с питательной ростовой средой для ИПСК (например, mTeSR 1 или TeSR E8 (Stem Cell Technologies, Канада)). Для повышения адгезии фрагментов колоний ИПСК в поддерживающую среду добавляется ингибитор Rho-киназы. Колонии ИПСК культивируются при +37 °C в атмосфере 5 % CO₂ с заменой каждые 2 дня кондиционированной ростовой среды и проведением мониторинга морфологии клеток под микроскопом.

Перспективы применения ИПСК в регенеративной медицине и биологии. На сегодняшний день недифференцированные ИПСК нашли практическое применение в сфере биомедицинских исследований. Создаются банки ИПСК, которые в дальнейшем могут быть использованы при проведении фундаментальных исследований, а в перспективе – при персонализированной клеточной терапии.

ИПСК, созданные с помощью безвирусных методов репрограммирования, потенциально могут применяться при персонифицированной клеточной терапии различных тяжелых заболеваний человека, когда необходимо восстановить поврежденные в результате патологического процесса или травмы клетки, ткани и органы пациента. В частности, при макулярной дистрофии с помощью ИПСК удастся частично восстановить поврежденный слой клеток пигментного эпителия сетчатки [11]. Особенно перспективно их использование при лечении заболеваний органов. Ведь с помощью ИПСК можно получить собственные кардиомиоциты и гепатиты и выйти на лечение инфаркта миокарда и дистрофии печени. В настоящее время с использованием направленно дифференцированных *in vitro* ИПСК проводятся доклинические исследования возможности лечения серповидно-клеточной анемии [23], сердечно-сосудистых заболеваний [24], болезни Паркинсона, заболеваний глаз [11] и др., созданы линии ИПСК человека от пациентов с такими заболеваниями, как муковисцидоз, болезнь Гоше, мышечная дистрофия, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, а также активно ведутся исследования в направлении генетической модификации различных линий ИПСК [25]. Приведенный выше перечень заболеваний далеко не полный, но очевидно, что в ближайшем будущем появятся новые клеточные технологии с использованием ИПСК, позволяющие лечить заболевания, трудно поддающиеся обычной терапии. К ним относятся нейродегенеративные заболевания центральной нервной системы, инфаркт миокарда, диабет, заболевания печени, почек и легких. При этом следует иметь в виду, что получение аутологичных ИПСК с использованием биологического материала пациента позволит исключить отторжение трансплантированных клеток вследствие возможных иммунных конфликтов при использовании чужеродного клеточного материала, т. е. аллогенных ИПСК.

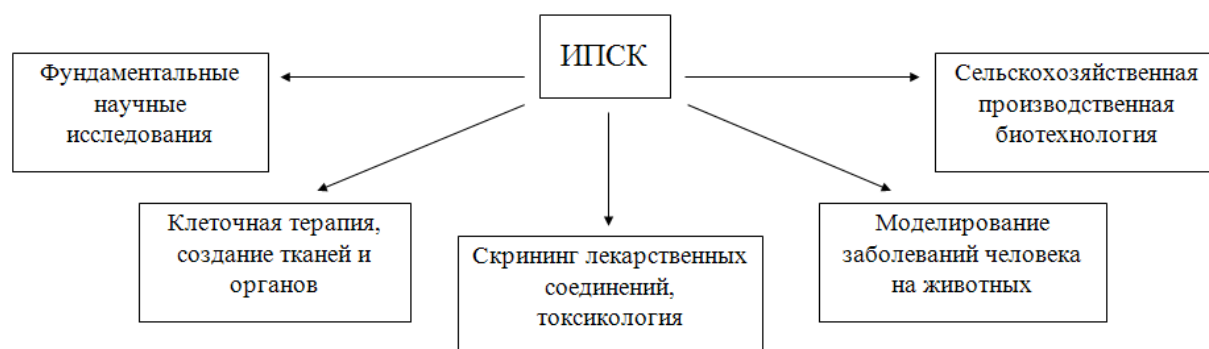


Рис. 2. Варианты использования ИПСК на практике

Fig. 2. Use cases of iPSC in practice

Следует отметить, что использование ИПСК в тандеме с технологией редактирования генома является перспективным в плане исправления мутаций в генах, ответственных за развитие того или иного генетически детерминированного заболевания. К перечисленным лечебным подходам с использованием ИПСК тесно примыкает еще одна важная проблема. Речь идет о создании органов человека не с помощью 3D печати, а на основе аутологичных ИПСК с их введением в биоинкубатор – эмбрион животного, в организме которого, в конечном счете, сформируется персонифицированный орган человека. Подобного рода опыты начали проводиться на уровне пары животных мышь–крыса. Кроме того, еще одной прикладной задачей, которую позволяет решить технология получения ИПСК *in vitro*, является восстановление и сохранение генофонда исчезающих видов животных, увеличение их популяций и генетического разнообразия [26].

ИПСК имеют большой потенциал не только в регенеративной медицине, но и в фармакологии и токсикологии. ИПСК являются оптимальной тест-системой для апробации новых лекарственных препаратов, позволяют изучать патогенез болезней на клеточном и субклеточном уровне, осуществлять поиск новых лекарственных средств, тестирование эффективности лекарственных препаратов, оценку их токсичности, подбор протоколов лечения и т. д. Получение ИПСК путем репрограммирования соматических клеток больных и здоровых пациентов определяет их преимущество перед ЭСК, открывается перспектива персонифицированного подхода в подборе протоколов лечения заболеваний различного генеза. Ввиду способности ИПСК к дифференцировке в различных направлениях возможно проведение точных доклинических испытаний лекарственных препаратов на клетках человека, без использования животных [27].

Однако широкое использование ИПСК в клеточной терапии пока ограничивается рядом проблем, которые предстоит решить в ближайшем будущем. Это полный отказ от вирусных конструкций; повышение эффективности репрограммирования (на сегодня при дедифференцировке удалось достигнуть репрограммирования в среднем у 1 % популяции клеток); снижение или полное подавление иммуногенности ИПСК; решение проблемы высокой вероятности злокачественной трансформации ИПСК *in vivo* при использовании их в терапии.

Во многих лабораториях активно ведется разработка протоколов экспрессного получения ИПСК с высоким выходом из соматических клеток и протоколов последующей модификации ИПСК с целью минимизации риска их злокачественной трансформации при попадании в организм человека.

Список использованных источников

1. Zhu, Z. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology / Z. Zhu, D. Huangfu // Development. – 2013. – Vol. 140, N 4. – P. 705–717. <https://doi.org/10.1242/dev.086165>
2. Волотовский, И. Д. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, CRISPR-Cas9 (Криспер) система редактирования геномов и перспективы решения проблемы генной терапии наследственных заболеваний человека / И. Д. Волотовский, А. Г. Полешко // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 113–125.
3. Kolios, G. Introduction to stem cells and regenerative medicine / G. Kolios, Y. Moodley // Respir. Int. Rev. Thorac. Dis. – 2013. – Vol. 85, N 1. – P. 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
4. Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future / S. Yamanaka // Cell Stem Cell. – 2012. – Vol. 10, N 6. – P. 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>
5. Stadtfeld, M. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications / M. Stadtfeld, K. Hochedlinger // Genes Dev. – 2010. – Vol. 24, N 20. – P. 2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>
6. Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования / А. Н. Богомазова [и др.] // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 4. – С. 466–478.
7. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки / А. И. Шевченко [и др.] // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 2. – С. 160–168.
8. Молекулярные механизмы индуцированной плюрипотентности / И.А. Мучкаева [и др.] // Acta Naturae (русскоязычная версия). – 2012. – Т. 4, № 1 (12). – С. 12–23.
9. Boiani, M. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells / M. Boiani, H. R. Schöler // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2005. – Vol. 6, N 11. – P. 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm1744>
10. Regenerative medicine and stem cells biology / ed. El-Badri Nagwa. – Cham : Springer, 2020. – 374 p.
11. Hanna, J. H. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues / J. H. Hanna, K. Saha, R. Jaenisch // Cell. – 2010. – Vol. 143, N 4. – P. 508–525. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>
12. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency / F. Anokye-Danso [et al.] // Cell Stem Cell. – 2011. – Vol. 8, N 4. – P. 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001>
13. Maherali, N. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells / N. Maherali, K. Hochedlinger // Cell Stem Cell. – 2008. – Vol. 3, N 6. – P. 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.008>
14. Malik, N. A review of the methods for human iPSC derivation / N. Malik, M. S. Rao // Meth. Mol. Biol. – New York, 2013. – Vol. 997 : Pluripotent Stem Cells. Methods and Protocols / ed. : U. Lakshmipathy, M. C. Vemuri. – P. 23–33.

15. Lin, T. p53 switches off pluripotency on differentiation / T. Lin, Y. Lin // *Stem Cell Res. Ther.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 44. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0498-1>
16. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations / M. Sharif [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* – 2019. – Vol. 10, N 1. – Art. 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>
17. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts / R. Li [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 7, N 2. – P. 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.014>
18. BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone / J. Chen [et al.] // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21, N 1. – P. 205–212. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.172>
19. Apostolou, E. Chromatin dynamics during cellular reprogramming / E. Apostolou, K. Hochedlinger // *Nature.* – 2013. – Vol. 502, N 7472. – P. 462–471. <https://doi.org/10.1038/nature12749>
20. Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts / K. Tanabe [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2013. – Vol. 110, N 30. – P. 12172–12179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310291110>
21. Tang, Y. JAK-STAT3 and somatic cell reprogramming / Y. Tang, X. C. Tian // *JAK-STAT.* – 2013. – Vol. 2, N 4. – P. e24935. <https://doi.org/10.4161/jkst.24935>
22. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins / R. Ho [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 3, N 6. – P. 2113–2126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.015>
23. iPSC modeling of severe aplastic anemia reveals impaired differentiation and telomere shortening in blood progenitors / D. Melguizo-Sanchis [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2018. – Vol. 9, N 2. – P. 128. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0141-1>
24. Generating patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases / D. Jeziorowska [et al.] // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2015. – Vol. 15, N 10. – P. 1399–1409. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1064109>
25. Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine / B. Walia [et al.] // *Stem Cell Rev.* – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. 100–115. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9279-x>
26. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species / Inbar Friedrich Ben-Nun [et al.] // *Nat. Meth.* – 2011. – Vol. 8, N 10. – P. 829–831. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1706>
27. Некрасов, Е. Д. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки как модель для изучения болезней человека / Е. Д. Некрасов, М. А. Лагарькова, С. Л. Киселев // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 32–37.

References

1. Zhu Z., Huangfu D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development*, 2013, vol. 140, no. 4, pp. 705–717. <https://doi.org/10.1242/dev.086165>
2. Volotovskii I. D., Poleshko A. G. Induced pluripotent stem cells, CRISPR-Cas9 (Krisper) genome editing system and perspectives of solving the problem of gene therapy of human hereditary diseases. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 1, pp. 113–125 (in Russian).
3. Kolios G., Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration. International Journal of Thoracic Medicine*, 2013, vol. 85, no. 1, pp. 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
4. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 10, no. 6, pp. 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005>
5. Stadtfeld M., Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes and Development*, 2010, vol. 24, no. 20, pp. 2239–2263. <https://doi.org/10.1101/gad.1963910>
6. Bogomazova A. N., Vassina E. M., Kiselev S. L., Lagarkova M. A., Lebedeva O. S., Nekrasov E. D. [et al.]. Genetic cell reprogramming: a new technology for basic research and applied usage. *Russian Journal of Genetics*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 386–396. <https://doi.org/10.1134/S102279541504002X>
7. Shevchenko A. I., Medvedev S. P., Mazurok N. A., Zakian S. M. *Russian Journal of Genetics*, 2009, vol. 45, no. 2, pp. 139–146. <https://doi.org/10.1134/S1022795409020021>
8. Muchkaeva I. A., Dashinimaev E. B., Terskikh V. V., Sukhanov Yu. V., Vasil'ev A. V. Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Acta Naturae*, 2012, vol. 4, no. 1 (12), pp. 12–23 (in Russian).
9. Boiani M., Schöler H. R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, vol. 6, no. 11, pp. 872–884. <https://doi.org/10.1038/nrm1744>
10. Nagwa El-Badri (ed.). *Regenerative medicine and stem cells biology*. Cham, Springer, 2020. 374 p.
11. Hanna J. H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 2010, vol. 143, no. 4, pp. 508–525. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>
12. Anokye-Danso F., Trivedi C. M., Jühr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y. [et al.]. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 2011, vol. 8, no. 4, pp. 376–388. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.001>
13. Maherali N., Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2008, vol. 3, no. 6, pp. 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.008>
14. Malik N., Rao M. S. A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods in Molecular Biology. Vol. 997. Pluripotent Stem Cells. Methods and Protocols*. New York, 2013, pp. 23–33.

15. Lin T., Lin Y. p53 switches off pluripotency on differentiation. *Stem Cell Research and Therapy*, 2017, vol. 8, no. 1, p. 44. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0498-1>
16. Moradi Sh., Mahdizadeh H., Šarić T., Kim J., Harati J., Shahsavarani H., Greber B., Moore J. B. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Research and Therapy*, 2019, vol. 10, no. 1, art. 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>
17. Li R., Liang J., Ni S., Zhou T., Qing X., Li H. [et al.]. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2010, vol. 7, no. 2, pp. 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.014>
18. Chen J., Liu J., Yang J., Chen Y., Chen J., Ni S., Song H., Zeng L., Ding K., Pei D. BMPs functionally replace Klf4 and support efficient reprogramming of mouse fibroblasts by Oct4 alone. *Cell Research*, 2011, vol. 21, no. 1, pp. 205–212. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.172>
19. Apostolou E., Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*, 2013, vol. 502, no. 7472, pp. 462–471. <https://doi.org/10.1038/nature12749>
20. Tanabe K., Nakamura M., Narita M., Takahashi K., Yamanaka S. Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, vol. 110, no. 30, pp. 12172–12179. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310291110>
21. Tang Y., Tian X.C. JAK-STAT3 and somatic cell. *JAK-STAT*, 2013, vol. 2, no. 4, p. e24935. <https://doi.org/10.4161/jkst.24935>
22. Ho R., Papp B., Hoffman J. A., Merrill B. J., Plath K. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. *Cell Reports*, 2013, vol. 3, no. 6, pp. 2113–2126. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.015>
23. Melguizo-Sanchis D., Xu Y., Taheem D., Yu M., Tilgner K., Barta T. [et al.]. iPSC modeling of severe aplastic anemia reveals impaired differentiation and telomere shortening in blood progenitors. *Cell Death & Disease*, 2018, vol. 9, no. 2, p. 128. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0141-1>
24. Jeziorowska D., Korniat A., Salem J.-E., Fish K., Hulot J.-S. Generating patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2015, vol. 15, no. 10, pp. 1399–1409. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1064109>
25. Walia B., Satija N., Tripathi R. P., Gangenahalli G. U. Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2012, vol. 8, no. 1, pp. 100–115. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9279-x>
26. Ben-Nun I. F., Montague S. C., Houck M. L., Tran H. T., Garitaonandia I., Leonardo T. R. [et al.]. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature Methods*, 2011, vol. 8, no. 10, pp. 829–831. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1706>
27. Nekrasov E. D., Lagar'kova M. A., Kiselev S. L. Induced pluripotent stem cells as a model for the study of human diseases. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya* [Cell transplantation and tissue engineering], 2011, vol. 6, no. 2, pp. 32–37 (in Russian).

Информация об авторах

Тишук Ольга Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tishukoi@gmail.com

Полешко Анна Григорьевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: renovacio888@yandex.ru

Волотовский Игорь Дмитриевич – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: volotovski@yahoo.com

Information about the authors

Olga I. Tishuk – 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: tishukoi@gmail.com

Anna G. Poleshko – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: renovacio888@yandex.ru

Igor D. Volotovskiy – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, 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: volotovski@yahoo.com

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.66:578.7+616.9:615.03

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-357-369>

Поступила в редакцию 01.04.2021

Received 01.04.2021

А. И. Зинченко, Л. Л. Биричевская, И. С. Казловский, А. Б. Булатовский

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ВОЗМОЖНЫЙ ОТВЕТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ НА ВЫЗОВ SARS-COV-2

Аннотация. Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, затронула практически все стороны жизнедеятельности большинства стран и народов. В течение 2020 г. заболели COVID-19 порядка 100 млн жителей Земли, из которых 2 млн человек умерли. Поэтому фармацевтические компании многих стран включились в гонку по скорейшему созданию профилактических противовирусных вакцин. Однако не исключена вероятность, что парентеральные вакцины против быстро мутирующего пандемического коронавируса могут оказаться недостаточно эффективными, поскольку создаются без должной проверки на отдаленные побочные эффекты.

В качестве возможной альтернативы традиционному парентеральному вакцинированию в настоящей мини-обзорной статье рассматривается подход, предусматривающий кроме интраназальной адъювантной вакцинации фармакологическую инактивацию коронавируса с помощью рибо-фавипиравира, рекомбинантных аргининдеиминазы, РНКазы L и лактоферрина, а также биогенных наночастиц серебра или меди – препаратов, полученных с использованием современных молекулярно-биотехнологических методов.

Ключевые слова: пандемия COVID-19, вакцинация, химиотерапия, модифицированный нуклеозид, лактоферрин, рибонуклеаза, аргининдеиминаза, наночастицы серебра и меди

Для цитирования: Возможный ответ молекулярной биотехнологии на вызов SARS-CoV-2 / А. И. Зинченко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 357–369. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-357-369>

Anatoli I. Zinchenko, Larisa L. Birichevskaya, Illia S. Kazlouski, Aleksei B. Bulatovski

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

POSSIBLE RESPONSE OF MOLECULAR BIOTECHNOLOGY TO CALL SARS-COV-2

Abstract. COVID-19 pandemic caused by coronavirus SARS-CoV-2 affected virtually all life aspects in most countries and nations. During 2020 around 100 mln of Earth inhabitants contracted this morbid infection and 2 mln people died thereafter. It is natural therefore that many pharmaceutical companies around the globe have joined into the race aimed at elaboration of prophylactic antiviral vaccines. However, the option can not be ruled out that parenteral vaccines to counter rapidly mutating pandemic coronavirus may be designed hastily, neglecting due tests of remote side effects, so that in the long run they risk to be expelled from the market due to doubtful safety and efficiency.

As a real alternative to traditional vaccination techniques the present mini-review has proposed application of intranasal adjuvant nano-vaccine. If necessary, this approach may be complemented with pharmacological inactivation of coronavirus under the impact of ribo-favipiravir, recombinant arginine deiminase, RNase L or lactoferrin, as well as biogenic silver or copper nanoparticles – the preparations derived from up-to-date molecular biotechnological processes.

Keywords: COVID-19 pandemic, vaccination, chemotherapy, modified nucleoside, lactoferrin, ribonuclease, arginine deiminase, silver and copper nanoparticles

For citation: Zinchenko A. I., Birichevskaya L. L., Kazlouski I. S., Bulatovski A. B. Possible response of molecular biotechnology to call SARS-CoV-2. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 357–369 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-357-369>

Введение. В конце 2019 г. человечество постигло потрясение, которое с полной уверенностью можно отнести к категории бедствий, сравнимых с мировыми войнами. Пандемия инфекционного заболевания COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, затронула практически все стороны жизнедеятельности большинства стран и народов.

Согласно статистическим данным, в течение 2020 г. во всем мире COVID-19 заболели более 100 млн жителей Земли, из которых умерли порядка 2 млн человек [1].

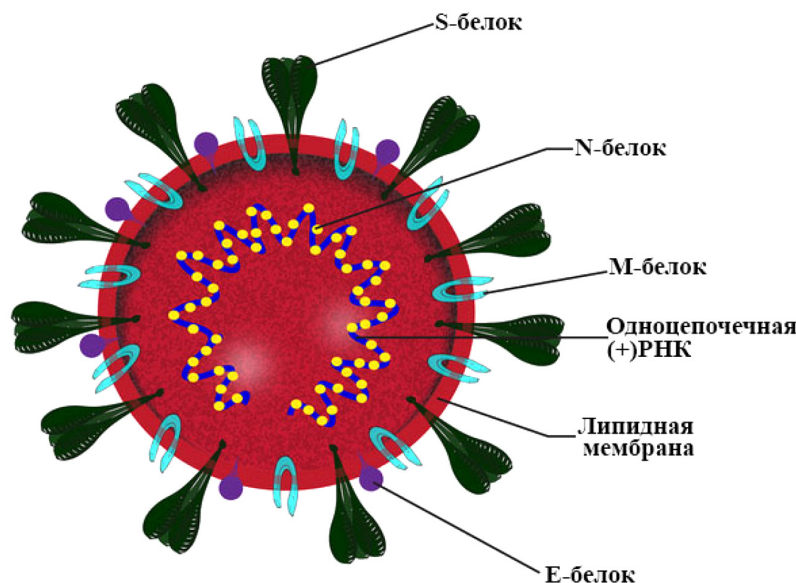


Рис. 1. Схема строения коронавируса SARS-CoV-2 [7]

Fig. 1. Structure of the coronavirus SARS-CoV-2 [7]

Следует отметить, что, «к счастью», вирус SARS-CoV-2 оказался намного менее губительным, чем, например, вызвавший в 2012 г. вспышку коронавируса MERS-CoV, летальность которого составила 34 % [2], или вирус Nipah – еще один недавно активизировавшийся вирус, поражающий дыхательные пути и мозг с летальностью от 40 до 75 % [3]. Невозможно даже представить, что бы сейчас творилось в мире, если бы SARS-CoV-2 оказался таким же летальным.

Коронавирусы известны с 1966 г., когда D. Tyrrell и M. Вупое первыми выделили и описали такой вирус у пациентов, страдающих простудой [4].

Коронавирусы представляют собой большое семейство сложных сферических (размером от 60 до 140 нм) вирусов с несегментированной одноцепочечной (+)РНК и с шипами из белка на поверхности (S), которые под электронным микроскопом имеют вид короны [5] (рис. 1).

Природным резервуаром коронавирусов служат дикие животные, преимущественно летучие мыши. Но иногда эти вирусы преодолевают межвидовой барьер между животными и людьми, вызывая целый спектр заболеваний – от инфекций, напоминающих простуду, до поражений нижних дыхательных путей, таких как бронхит, пневмония и тяжелый острый респираторный синдром (SARS). Подобно другим коронавирусам, SARS-CoV-2 несет четыре основных структурных гена, кодирующих основные структурные белки, известные как белок-шип (S), белок оболочки (E), белок мембраны (M) и белок нуклеокапсид (N). Белок N защищает геномную РНК (30 000 нуклеотидов), а белки S, E и M составляют оболочку вируса. Белок S позволяет вирусу связываться и сливаться с мембраной клетки-хозяина. Это ключевой иммуногенный антиген, который играет решающую роль в определении вирулентности вируса и круга его хозяев [6].

При атаке человека коронавирусом предполагается следующая последовательность развития событий [8] (рис. 2):

1) вирус находит клетки, несущие на своей поверхности белки-рецепторы, которые по структуре (как ключ к замку) подходят к белку-антирецептору, находящемуся на поверхности вируса. В случае SARS-CoV-2 антирецептором является гликопротеин шипа (S), а рецептором служит трансмембранный фермент ACE2;

2) происходит слияние мембраны клетки с оболочкой вируса, а нуклеокапсид, содержащий геномную РНК, оказывается в цитоплазме клетки;

3) согласно дизъюнктивному способу размножения, свойственному всем вирусам без исключения, коронавирус после проникновения в клетку диссоциирует на составные части, чтобы высвободить свой геном в цитоплазму для осуществления процессов репликация РНК, ее трансляции и синтеза белков;

4) на завершающих стадиях процесса происходит сборка вирионов потомства и выход их из клетки-хозяина.

Из анализа рис. 2 следует, что наиболее уязвимыми местами в системе внутриклеточного размножения вируса является целостность самой главной молекулы вируса – РНК и механизм ее репликации.

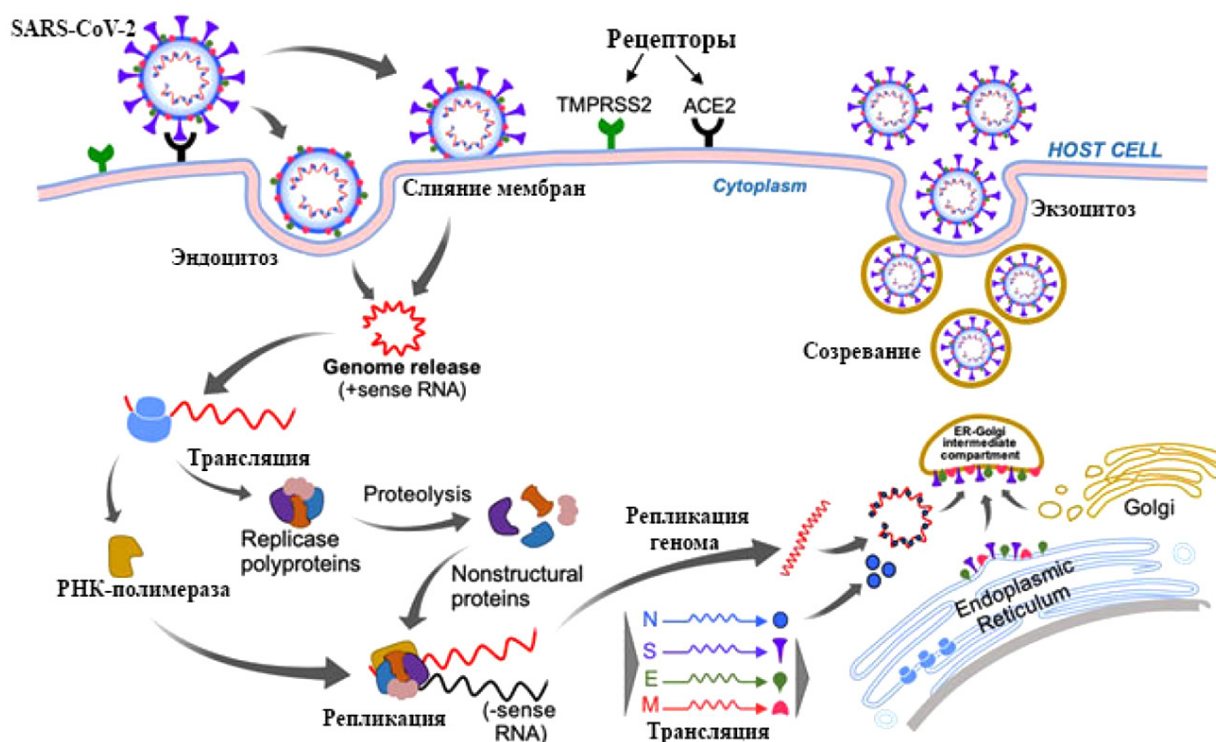


Рис. 2. Цикл репликации SARS-CoV-2 [7]

Fig. 2. Replication cycle of SARS-CoV-2 [7]

Профилактика COVID-19. История медицины свидетельствует о том, что самым эффективным способом борьбы с инфекционными заболеваниями является вакцинация, поэтому с самого начала пандемии фармацевтические компании многих стран включились в гонку по скорейшему созданию профилактических вакцин против SARS-CoV-2. При этом разрабатываемые в настоящее время вакцины против этого вируса используют технологические платформы на основе нуклеиновых кислот, пептидов, рекомбинантных белков, вирусных векторов, инактивированных и живых аттенуированных вирусов [9].

К настоящему времени несколько кандидатных вакцин против SARS-CoV-2 прошли проверку на безопасность по сокращенной программе и поступили на фармацевтический рынок. Они включают иРНК, кодирующие S-белок; нереплицирующиеся аденовирусные векторы, содержащие ген S-белка; наночастицы, несущие фрагменты S-белка; ДНК-вакцины, содержащие ген S-белка, и вирусоподобные частицы на основе S-белка [10]. Впрочем, для многих вакцин подробности, касающиеся конкретных антигенов, и адьюванты-усилители иммунитета не разглашаются.

По нашему мнению, в качестве вакцины наиболее целесообразно использовать фрагмент вирусной РНК, кодирующий не весь S-белок, а его наиболее иммуногенный участок, ответственный за синтез так называемого минимального рецептор-связывающего домена, состоящего из аминокислот в положениях 318–510 [6].

Известно, что большинство вакцин, одобренных для использования человеком, вводятся в организм парентерально и только в незначительной степени обеспечивают защиту слизистых оболочек. В то же время следует согласиться с некоторыми авторами, которые считают, что для индукции мощных иммунных ответов против респираторных инфекций необходима как раз интраназальная иммунизация [11]. Это важно, поскольку слизистые оболочки дыхательных путей, глаз и рта являются основными «входными воротами» для вируса SARS-CoV-2.

По нашему мнению, эффективность интраназальной вакцины может быть значительно повышена с помощью одного из мукозальных адьювантов нового поколения – циклического диаденозин-5'-монофосфата (цикло-диАМФ) [12, 13] (рис. 3).

Важно отметить, что ферментативная технология получения этого циклического динуклеотида недавно разработана нами в лаборатории молекулярной биотехнологии Института микробиологии НАН Беларуси [14].

Еще одно возможное нововведение может заключаться в использовании в качестве носителя для интраназальной иРНК-вакцины наночастиц, состоящих из Mg,Al-слоистых двойных гидроксидов (рис. 4)

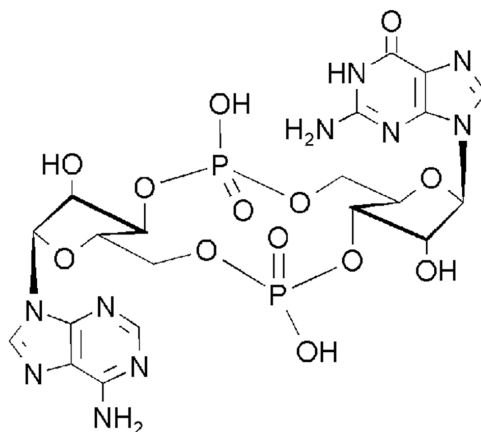


Рис. 3. Структура молекулы мукозального адъюванта цикло-диАМФ

Fig. 3. Structure of mucosal adjuvant cyclic diAMP molecule

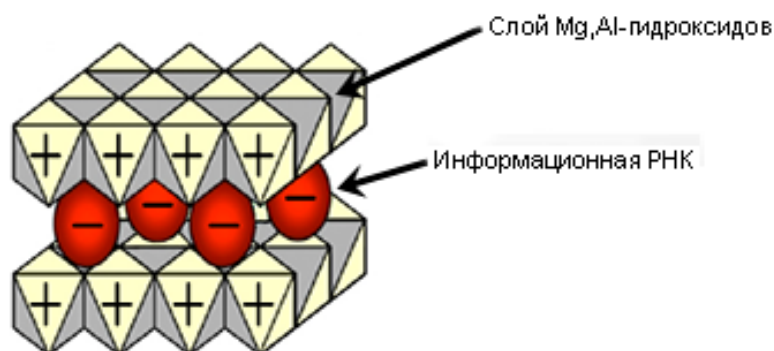


Рис. 4. Схематическое изображение РНК-вакцины, включенной в наночастицы, состоящие из Mg,Al-слоистых двойных гидроксидов

Fig. 4. Schematic image of an RNA vaccine included in nanoparticles consisting of Mg, Al-layered double hydroxides

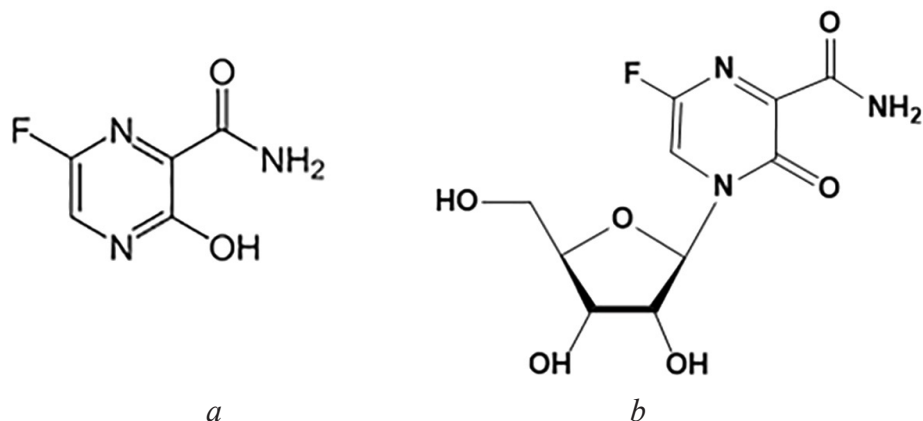
[15]. Получение таких наноразмерных (100–200 нм) частиц, интеркаляция и высвобождение из них различных нуклеиновых соединений продемонстрировано нами в 2016 г. [16].

Следует отметить, что, несмотря на то что благодаря простоте проведения, отказу от специально обученного персонала и отсутствию болезненных ощущений во время вакцинирования, интраназальная вакцинация является весьма привлекательной манипуляцией. На сегодняшний день единственная лицензированная вакцина, которая производится в форме спрея, – это вакцина против вируса гриппа для людей в возрасте от 2 до 50 лет [17].

Весьма вероятно, что в гонке за разработкой наиболее эффективной вакцины против SARS-CoV-2 именно стимулирование иммунитета слизистых оболочек приведет к созданию такого препарата, который поможет человечеству справиться с этим патогеном.

Терапия COVID-19. Несмотря на неоспоримые успехи вакцинологии в прошлом, так и не удалось создать эффективных вакцин против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса гепатита С, вируса ящура, вируса африканской чумы свиней и даже вируса гриппа. Поэтому не исключена вероятность, что и вакцины против быстро мутирующего пандемического коронавируса, которые создаются в недопустимо ускоренном режиме [18], могут оказаться неэффективными [9]. Это обстоятельство оправдывает усилия, направленные на создание лекарств прямого противовирусного действия.

Следует особо подчеркнуть значительные методические успехи в обнаружении SARS-CoV-2, однако в настоящее время не существует официально одобренного средства для терапии COVID-19 с клинически доказанной эффективностью и безопасностью [19]. Пока лечение в основном направлено на облегчение симптомов заболевания. Кроме того, принимаются строгие меры для ограничения передачи инфекции от

Рис. 5. Структура молекул фавипиравира (*a*) и рибо-фавипиравира (*b*)Fig. 5. Structure of the molecules favipiravir (*a*) and ribo-favipiravir (*b*)

человека к человеку. Таким образом, существует насущная потребность в создании терапевтических агентов, непосредственно нацеленных на SARS-CoV-2.

Материалы, представленные в текущей научной периодике, свидетельствуют о том, что в арсенале исследователей имеется ряд препаратов, которые потенциально могут угнетать размножение вируса SARS-CoV-2 в организме человека. Это предположение основано на опыте применения таких препаратов при отмечавшихся ранее вспышках коронавирусных инфекций – тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома (SARS) и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [20, 21].

Фавипиравир. Одним из препаратов, имеющих перспективу применения в терапии COVID-19, является модифицированный аналог гуанина – фавипиравир (favipiravir; T-705) (рис. 5, *a*) [22, 23], который разработан и одобрен в 2014 г. в Японии для лечения гриппа.

Фавипиравир может эффективно ингибировать РНК-транскриптазу таких РНК-содержащих вирусов, как вирус гриппа, вирус лихорадки Эбола, вирус желтой лихорадки, энтеровирусы, вирус чикунгунья [24].

В Японии, России, Индии и Китае фавипиравир применяется и в качестве лекарства для лечения COVID-19. Сообщается также, что прием этого средства вызывает более быстрое выздоровление у инфицированных пациентов с легкой и средней степенью тяжести заболевания [23]. При этом выявлен ряд побочных эффектов, в том числе повышение уровня мочевины и трансаминаз в крови [25]. Повышение уровня мочевины особенно опасно для пациентов с больными почками. Кроме того, препарат противопоказан беременным и кормящим матерям.

Фавипиравир является пролекарством, т. е. предшественником действующего вещества – рибо-фавипиравир-5'-трифосфата. После введения в организм препарат попадает в клетку, где подвергается ферментативной трансформации в указанное выше действующее вещество. Кроме того, в кровяном русле нерибозилированный фавипиравир подвергается деградации ферментами катаболизма (альдегидоксидазой и ксантиноксидазой), превращаясь в неактивные соединения, обуславливающие, по-видимому, побочные эффекты [22, 23].

Нам представляется, что указанных побочных эффектов можно избежать, а заодно и повысить эффективность этого средства, если использовать в качестве вводимой в организм лекарственной субстанции не фавипиравир (азотистое основание), а его нуклеозид (рибо-фавипиравир) (рис. 5, *b*), что сократит путь его метаболической трансформации в действующее вещество.

В качестве предварительного эксперимента нами предпринята попытка трансформации фавипиравира в его рибонуклеозид (с выходом реакции синтеза порядка 40 мол%) с помощью рекомбинантного фермента (пурииннуклеозидфосфорилазы), аналогично ранее проведенной нами трансформации кинетина в рибо-кинетин [26].

Рибонуклеазы. В середине прошлого века Р. И. Салгаником было высказано предположение, что РНКазы принимают непосредственное участие в биологических механизмах противовирусной защиты [27]. К настоящему времени накоплен значительный массив данных, позволяющих рассматривать РНКазы не только как компоненты иммунной защиты, но и как основу для разработки новых противовирусных препаратов [28].

Первый препарат РНКазы (из крупного рогатого скота) был зарегистрирован в СССР еще в 1968 г. Теперь такой препарат выпускается в виде таблеток и лиофилизата для приготовления растворов для

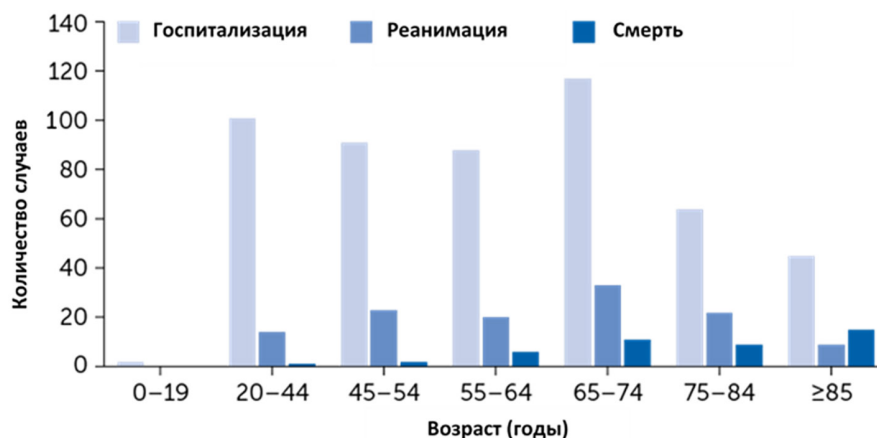


Рис. 6. Смертность от COVID-19 в США с 12 февраля по 16 марта 2020 г.

Fig. 6. Mortality from COVID-19 in USA from February 12 to March 16, 2020

инъекций и местного применения. Препарат рекомендован при воспалительных заболеваниях дыхательных путей (трахеит, бронхит, пневмония, синусит), при пародонтозе, остеомиелите, тромбозе, вирусном менингите и клещевом энцефалите [28].

Здесь следует отметить, что клиническое применение РНКаз млекопитающих (в отличие от РНКаз бактериального происхождения) не всегда эффективно, поскольку их активность может блокироваться специфическим ингибитором, представленным практически во всех тканях и необходимым для защиты клетки от собственных РНКаз [29].

Побудительным мотивом, заставившим нас обратить внимание на РНКазы как средство против конкретного вируса SARS-CoV-2, явилась информация в сообщении [30] об очень слабой уязвимости детей и подростков в отношении этого патогена (рис. 6).

Известно, что в клетках человека и всех позвоночных животных под действием вирусов в считанные часы и даже минуты начинает синтезироваться особый гормоноподобный белок – интерферон. В свою очередь интерферон через цепь биохимических событий активирует латентную РНКазу-L, которая эффективно разрушает вирусные РНК [31], прерывая цикл размножения вирусов.

Нам представляется логичным допустить, что причиной сравнительной безвредности SARS-CoV-2 для детей и подростков является то, что у этой возрастной группы описанная выше система универсальной экстренной противовирусной защиты срабатывает на полную «проектную мощность», а у пожилых людей эта система, по-видимому, уже в той или иной степени истощена. Отсюда закономерно возникает предложение использовать в качестве лекарственного средства против SARS-CoV-2 человеческую РНКазу-L, источником которой может стать рекомбинантный бактериальный штамм *E. coli*.

Предпосылкой успеха такого начинания может служить успешная гетерологичная экспрессия человеческих генов в клетках *E. coli*, продемонстрированная некоторыми научными группами, в том числе нашей лабораторией [32].

Аргининдеиминаза. При создании фармакологического препарата прямого противовирусного действия в качестве мишени предлагается использовать аминокислоту аргинин, дефицит которой приводит к инактивации всех до сих пор изученных в этом отношении вирусов [33].

Как и другие вирусы, SARS-CoV-2 зависит от исправности молекулярных механизмов жизнедеятельности клетки-хозяина и доступности питательных веществ, необходимых для синтеза вирусных макромолекул. Таким образом, лишение основных питательных веществ – подход, используемый в области онкологии для лечения опухолей – может препятствовать репликации вируса. Хотя этот подход к метаболическому голоданию еще не применялся в клинической практике для борьбы с вирусами, доклинические исследования подтверждают эту концепцию [33].

Аминокислота аргинин является ключевым питательным веществом, которое, как было показано, играет важную роль в жизненном цикле многих ДНК- и РНК-содержащих вирусов [34]. Некоторые ферменты, разрушающие аргинин, уже находятся в стадии клинической разработки. Так, согласно результатам недавнего клинического исследования, посвященного раку, пегилированная бактериальная аргининдеиминаза (ADI-PEG 20), которая расщепляет аргинин на цитруллин и аммиак, проявила противовирусную активность у онкологических пациентов с инфекцией вируса гепатита С [33].

Следует отметить, что на сегодняшний день исследований по истощению аргинина в клетках, зараженных коронавирусами, не проводилось, однако в литературе высказано уверенное мнение, что «расщепляющие аргинин терапевтические ферменты могут быть легко доступными средствами лечения COVID-19» [33].

Лактоферрин. У человека и млекопитающих животных помимо универсальной противовирусной защиты в виде системы интерферона имеется еще одна универсальная система защиты против вирусов (правда, действующая только в первые месяцы жизни) – система лактоферрина [35]. Забегая вперед, отметим, что, возможно, именно этим можно объяснить тот факт, что случаи COVID-19 у новорожденных и младенцев встречаются чрезвычайно редко и никогда не прогрессируют до инфекции нижних дыхательных путей [36].

По заверениям ряда исследователей, основным фактором патогенеза SARS-CoV-2 является перегрузка организма пациентов свободным (несвязанным) железом [37]. Как установлено, вирус атакует и разрушает гемоглобин, что приводит к выбросу железа в кровоток. Действительно, хотя железо необходимо для всех живых клеток, несвязанное железо, возникающее, как правило, в результате нарушения регуляции его обмена, является очень реактивным и токсичным, поскольку способствует гиперкоагуляции тромбоцитов (обнаруживаемой у пациентов с тяжелой формой COVID-19) и генерирует активные формы кислорода (АФК). В свою очередь АФК реагируют с клеточными липидами, нуклеиновыми кислотами и белками и повреждают их с последующей индукцией острых или хронических воспалительных процессов.

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что увеличение концентрации железа в легких связано с повышенным риском повреждения этого особо уязвимого при коронавирусных инфекциях органа [38].

Более того, катализируемое железом повреждение липидов вызывает, как недавно обнаружено, неапоптотическую гибель клеток, названную ферроптозом [39]. Принципиально важно, что, в отличие от апоптоза, ферроптоз является иммуногенным и не только приводит к гибели клеток, но и способствует ряду воспалительных процессов, вызывающих полиорганную недостаточность, повреждение и значительное снижение емкости легких.

Поскольку перегрузка железом способствует развитию COVID-19, были предприняты поиски хелаторов, которые привели исследователей к обнаружению эффективного природного железосвязывающего гликопротеина – лактоферрина [40].

Лактоферрин – это белок, который обычно содержится в грудном молоке и различных секреторных жидкостях, таких как слезы, слюна и носовые выделения различных видов млекопитающих, включая людей [41]. Этот гликопротеин представляет собой важнейшую врожденную линию защиты от патогенов, особенно на начальных стадиях инфекции. Он проявляет широкий спектр профилактической, терапевтической и биологической активности, включая противогрибковую, антибактериальную, противовирусную, противоопухолевую, антиоксидантную и иммуномодулирующую активность.

Отдельного внимания заслуживают противовирусные свойства лактоферрина. Так, было обнаружено, что он препятствует активности как простых, так и покрытых оболочкой ДНК- и РНК-содержащих вирусов, таких как цитомегаловирус, вирус простого герпеса, ВИЧ, ротавирус, полиовирус, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы гепатита В и С, аденовирус, энтеровирус, вирус гриппа А и вирус японского энцефалита [37].

Кроме того, природный лактоферрин оказывает иммуномодулирующее, а также противовоспалительное действие и может связываться с рецепторами, используемыми коронавирусами, тем самым блокируя их проникновение в клетки-хозяева. Следовательно, благодаря уже только этому свойству лактоферрин может иметь высокую терапевтическую ценность во время нынешней пандемии COVID-19 [42]. При этом в качестве субстанции лекарственного препарата против SARS-CoV-2 может выступать человеческий лактоферрин, выделяемый из молока трансгенных коз [43], который биохимически эквивалентен белку человеческого молока [44].

Наночастицы серебра. Наночастицы (НЧ) из металлического серебра (AgНЧ) обладают широким спектром антимикробного действия против различных бактерий, микроскопических грибов и вирусов. Благодаря своей универсальности AgНЧ в настоящее время нашли применение в качестве микробиоцидов для перевязочных материалов, медицинских инструментов, дезодорантов и разнообразных тканей [45]. Ряд исследователей выявили мощное противовирусное действие AgНЧ против различных патогенных вирусов человека и животных, таких как респираторно-синцитиальный вирус, вирус гриппа, вирус гепатита В, ВИЧ, вирус оспы обезьян [46, 47].

Поскольку в дополнение к указанным выше вирусам было продемонстрировано, что Ag убивает SARS-CoV [48], S. Jeremiah с соавт. [49] выдвинули предположение о том, что AgНЧ способны ингибировать и пандемический SARS-CoV-2.

Точный механизм, посредством которого AgНЧ убивают вирусы, все еще неясен. Однако S. Nati и S. Bhattacharyya продемонстрировали важность дисульфидных связей в связывании спайкового S-белка SARS-CoV-2 с рецептором ACE2, нарушение которого приводит к предотвращению связывания вируса с клеткой [50]. Принимая во внимание механизм действия AgНЧ, показанный другими авторами, можно предположить, что AgНЧ оказывают свое противовирусное действие на SARS-CoV-2, разрушая дисульфидные связи на белке (S) и рецепторе ACE2.

Противовирусный эффект AgНЧ зависит от их размера, поскольку S. Jeremiah с соавт. [49] наблюдали, что AgНЧ активны против SARS-CoV-2 только при диаметре меньше 15 нм. Для борьбы с продолжающейся пандемией COVID-19 AgНЧ можно помещать на различные поверхности. Так, было обнаружено, что маски с покрытием из AgНЧ эффективно инактивируют SARS-CoV-2 и потенциально могут быть также эффективны при нанесении на воздушные фильтры кондиционеров и медицинские инструменты [51].

Что касается способа получения AgНЧ, то наметилась тенденция к переходу от химического способа их синтеза к их получению с использованием микробиологических и биохимических процессов [52].

Кроме того, в последнее время исследователей привлекает возможность получения НЧ на основе менее изученных, но более доступных элементов, таких как медь, цинк, железо и др. В связи с этим в качестве альтернативы НЧ из более дорогостоящего серебра нами осуществлен «зеленый синтез» медных НЧ [53], также обладающих антимикробной активностью [54].

Анализ приведенных выше и других литературных данных по результатам «зеленого синтеза» металлических НЧ позволяет сделать вывод об актуальности использования таких нанообъектов для создания лекарственных препаратов, которые бы уничтожали пандемический SARS-CoV-2 и другие коронавирусы с минимальными побочными эффектами.

Закключение. Пандемия COVID-19 высветила удручающую научно-техническую беспомощность мировой медико-биологической науки в отношении атаки далеко не самого вредоносного из известных возбудителей инфекционных заболеваний. Трудно себе представить последствия пандемии, вызванной не SARS-CoV-2 с уровнем летальности 2–4 %, а известным по вспышке 2012 г. вирусом MERS-CoV с летальностью 34,3 % [7] или недавно начавшим активизироваться вирусом Nipah с летальностью 40–75 % [3]. А ведь не исключена вероятность появления в любой момент еще гораздо более губительной инфекции. При этом нельзя недооценивать и опасность биотерроризма. Ведь пандемия показала, что, в принципе, можно без гигантских затрат на разработку ядерного оружия и средств его доставки, «выпустив на волю» инфекционный патоген, поставить на колени все развитые страны.

Принимая во внимание ускоренный мутагенез вирусов вообще и особенно вирусов, содержащих РНК, вариант обуздания SARS-CoV-2 с помощью вакцин, даже интраназальных, может оказаться тупиковым. В этой связи представляются оправданными (хотя бы в плане расширения арсенала противовирусных средств) попытки создания противовирусных препаратов прямого действия на основе модифицированного нуклеозида, рекомбинантных лактоферрина и ферментов (особенно РНКазы, разрушающей главную молекулу вируса) и биогенных металлических наночастиц из серебра или более дешевой меди.

Список использованных источников

1. COVID-19 data repository by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University [Electronic resource]. – 2021. – Mode of access: <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19>. – Date of access: 07.03.2021.
2. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses / E. de Wit [et al.] // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. – Vol. 14, N 8. – P. 523–534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
3. Nano-based approach to combat emerging viral (NIPAH virus) infection / R. G. Kerry [et al.] // *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* – 2019. – Vol. 18. – P. 196–220. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.03.004>
4. Tyrrell, D. A. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds / D. A. Tyrrell, M. L. Bynoe // *Lancet.* – 1966. – Vol. 289, N 7428. – P. 76–77. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)92364-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)92364-6)
5. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2 / S. Prasad [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 2020. – Vol. 151, N 2–3. – P. 241–243. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_577_20
6. The proximal origin of SARS-CoV-2 / K. G. Andersen [et al.] // *Nat. Med.* – 2020. – Vol. 26, N 4. – P. 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
7. Repurposed drugs, molecular vaccines, immune-modulators, and nanotherapeutics to treat and prevent COVID-19 associated with SARS-CoV-2, a deadly nanovector / T. Dube [et al.] // *Adv. Ther.* – 2020. – Vol. 4, N 2. – Art. 2000172. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000172>
8. SARS-CoV-2 life cycle: stages and inhibition targets [Electronic resource]. – 2020. – Mode of access: <https://www.antibodies-online.com/resources/18/5410/sars-cov-2-life-cycle-stages-and-inhibition-targets>. – Date of access: 07.03.2021
9. The COVID-19 vaccine development landscape / T. T. Le [et al.] // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2020. – Vol. 19, N 5. – P. 305–306. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00073-5>

10. The SARS-CoV-2 vaccine pipeline : an overview / W. H. Chen [et al.] // Curr. Trop. Med. Rep. – 2020. – Vol. 7, N 2. – P. 61–64. <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00201-6>
11. The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter / S. R. Allie [et al.] // Nat. Immunol. – 2019. – Vol. 20, N 1. – P. 97–108. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0260-6>
12. Superior immunogenicity of HCV envelope glycoproteins when adjuvanted with cyclic-di-AMP, a STING activator or archaeosomes / A. Landi [et al.] // Vaccine. – 2017. – Vol. 35, N 50. – P. 6949–6956. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.072>
13. Viromimetic STING agonist-loaded hollow polymeric nanoparticles for safe and effective vaccination against Middle East respiratory syndrome coronavirus / L. C. Lin [et al.] // Adv. Func. Mat. – 2019. – Vol. 29, N 28. – Art. 1807616. <https://doi.org/10.1002/adfm.201807616>
14. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента диаденилатциклазы и ее использование для синтеза цикло-ди-АМФ / И. С. Казловский [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2015. – № 4. – С. 51–55.
15. Optimization of formulations consisting of layered double hydroxide nanoparticles and small interfering RNA for efficient knockdown of the target gene / Y. Wu [et al.] // ACS Omega. – 2018. – Vol. 3, N 5. – P. 4871–4877. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00397>
16. Intercalation and release of dinucleotides from a nanodimensional layered double hydroxide / A. S. Shchokolova [et al.] // Chemical and Biochemical Physics: A Systematic Approach to Experiments, Evaluation, and Modeling. – Oakville (Canada), 2016. – P. 317–327.
17. Shedding and immunogenicity of live attenuated influenza vaccine virus in subjects 5–49 years of age / S. L. Block [et al.] // Vaccine. – 2008. – Vol. 26, N 38. – P. 4940–4946. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.013>
18. Risk in vaccine research and development quantified / E. S. Pronker [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, N 3. – Art. e57755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057755>
19. Immune response and possible therapeutics in COVID-19 / A. Dutta [et al.] // RSC Adv. – 2021. – Vol. 11. – P. 960–977. <https://doi.org/10.1039/D0RA08901J>
20. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial / Y. Wang [et al.] // Lancet. – 2020. – Vol. 395, N 10263. – P. 1569–1578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31022-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31022-9)
21. Elfiky, A. A. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): a molecular docking study / A. A. Elfiky // Life Sci. – 2020. – Vol. 253. – Art. 117592. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117592>
22. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor / Y. Furuta [et al.] // Antiviral Res. – 2013. – Vol. 100, N 2. – P. 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>
23. Experimental treatment with Favipiravir for COVID-19: an open-label control study / Q. Cai [et al.] // Engineering. – 2020. – Vol. 6, N 10. – P. 1192–1198. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.007>
24. de Clercq, E. New nucleoside analogues for the treatment of hemorrhagic fever virus infections / E. de Clercq // Chem. Asian J. – 2019. – Vol. 14. – P. 3962–3968. <https://doi.org/10.1002/asia.201900841>
25. Uric acid elevation by favipiravir, an antiviral drug / E. Mishima [et al.] // Tohoku J. Exp. Med. – 2020. – Vol. 251, N 2. – P. 87–90. <https://doi.org/10.1620/tjem.251.87>
26. Способ получения кинетинрибозидов : пат. 20102 Респ. Беларусь / А. И. Береснев, С. В. Квач, Л. А. Ерошевская, А. И. Зинченко; заявитель Институт микробиологии НАН Беларуси. – № а20130261; заявл. 04.03.2013; опубл. 30.06.2016.
27. Ингибирование синтеза РНК и репродукции вируса клещевого энцефалита под действием рибонуклеазы / Р. И. Салганик [и др.] // Докл. АН СССР. – 1968. – Т. 180, № 6. – С. 1473–1475.
28. Ильинская, О. Н. Рибонуклеазы как противовирусные агенты / О. Н. Ильинская, Р. Шах Махмуд // Молекуляр. биология. – 2014. – Т. 48, № 5. – С. 707–717.
29. Makarov, A. A. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets / A. A. Makarov, O. N. Ilinskaya // FEBS Lett. – 2003. – Vol. 540, N 1–3. – P. 15–20. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00225-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00225-4)
30. Severe outcomes among patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) United States, February 12–March 16, 2020 / S. Bialek [et al.] // MMWR. – 2020. – Vol. 69, N 12. – P. 343–346. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6912e2>
31. Molecular mechanisms for the adaptive switching between the OAS/RNase L and OASL/RIG-I pathways in birds and mammals / E. Rong [et al.] // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9. – Art. 1398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01398>
32. Engineering of bacterial strain-producer of chimeric protein containing human annexin A5 and *Escherichia coli* adenosine deaminase / A. I. Zinchenko [et al.] // East. Eur. Sci. J. (Dusseldorf). – 2017. – N 4. – P. 5–11.
33. Arginine depletion as a therapeutic approach for patients with COVID-19 / J. M. Grimes [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2021. – Vol. 102. – P. 566–570. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.100>
34. Izzo, F. Pegylated arginine deiminase lowers hepatitis C viral titers and inhibits nitric oxide synthesis / F. Izzo, M. Montella, A. P. Orlando // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2007. – Vol. 22, N 1. – P. 86–91. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04463.x>
35. Lactoferrin: a glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes / Q. Rascon-Cruz [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, N 1. – Art. 205. <https://doi.org/10.3390/molecules26010205>
36. Novel coronavirus infection in hospitalized infants under 1 year of age in China / M. Wei [et al.] // JAMA. – 2020. – Vol. 323, N 13. – P. 1313–1314. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2131>

37. The role of iron in the pathogenesis of COVID-19 and possible treatment with lactoferrin and other iron chelators / H. M. Habib [et al.] // *Biomed. Pharmacother.* – 2021. – Vol. 136. – Art. 111228. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111228>
38. Kim, J. The role of Iron metabolism in lung inflammation and injury / J. Kim, M. Wessling-Resnick // *J. Allergy Ther.* – 2012. – Vol. 3, N 4. <https://doi.org/10.4172/2155-6121.S4-004> [Abstract].
39. Cavezzi, A. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review / A. Cavezzi, E. Troiani, S. Corrao // *Clin. Pract.* – 2020. – Vol. 10, N 2. – Art. 1271. <https://doi.org/10.4081/cp.2020.1271>
40. The antiviral properties of human milk: a multitude of defence tools from mother nature / D. Morniroli [et al.] // *Nutrients.* – 2021. – Vol. 13, N 2. – Art. 694. <https://doi.org/10.3390/nu13020694>
41. Krupinka, A. M. Clinical aspects of the use of lactoferrin in dentistry / A. M. Krupinka, Z. Bogucki // *J. Oral Biosci.* – 2021. <https://doi.org/10.1016/j.job.2021.02.005>
42. Chang, R. Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19 / R. Chang, T. B. Ng, W. Z. Sun // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2020. – Vol. 56, N 3. – Art. 106118. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106118>
43. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin / I. Semak [et al.] // *Transgen. Res.* – 2019. – Vol. 28. – P. 465–478. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00165-y>
44. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты / В. С. Лукашевич [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* – 2016. – Т. 60, № 1. – С. 72–81.
45. All that glitters is not silver-a new look at microbiological and medical applications of silver nanoparticles / P. Kowalczyk [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 2. <https://doi.org/10.3390/ijms22020854>
46. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds / H. H. Lara [et al.] // *J. Nanobiotechnol.* – 2011. – Vol. 9. – Art. 30. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-30>
47. Antiviral and immunomodulatory activity of silver nanoparticles in experimental RSV infection / D. Morris [et al.] // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11, N 8. – Art. 732. <https://doi.org/10.3390/v11080732>
48. Efficient and quick inactivation of SARS coronavirus and other microbes exposed to the surfaces of some metal catalysts / J. Han [et al.] // *Biomed. Environ. Sci.* – 2005. – Vol. 18, N 3. – P. 176–180.
49. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2 / S. S. Jeremiah [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2020. – Vol. 533, N 1. – P. 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.018>
50. Hati, S. Impact of thiol-disulfide balance on the binding of Covid-19 spike protein with angiotensin-converting enzyme 2 receptor / S. Hati, S. Bhattacharyya // *ACS Omega.* – 2020. – Vol. 5, N 26. – P. 16292–16298. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02125>
51. Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating / C. Balagna [et al.] // *Open Ceram.* – 2020. – Vol. 1. – Art. 100006. <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2020.100006>
52. Green synthesis of metallic nanoparticles and their potential applications to treat cancer / D. Zhang [et al.] // *Front. Chem.* – 2020. – Vol. 8. – Art. 799. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00799>
53. Синенюк, Д. Н. Биохимическое получение наночастиц меди / Д. Н. Синенюк, Л. Л. Биричевская, А. И. Зинченко // *Сахаровские чтения 2017 г.: экол. проблемы XXI века : материалы 17-й Междунар. науч. конф., Минск, 18–19 мая 2017 г. / МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ. – С. 219–220.*
54. Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles / T. Kruk [et al.] // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* – 2015. – Vol. 128. – P. 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.009>

References

1. *COVID-19 data repository by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University, 2021.* Available at: <https://github.com/CSSEGISandData/COVID-19> (accessed 07.03.2021).
2. de Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, vol. 14, no. 8, pp. 523–534. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.81>
3. Kerry R. G., Malik S., Redda Y. T., Sahoo S., Patra J. K., Majhi S. Nano-based approach to combat emerging viral (NIPAH virus) infection. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2019, vol. 18, pp. 196–220. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.03.004>
4. Tyrrell D. A., Bynoe M. L. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*, 1966, vol. 289, no. 7428, pp. 76–77. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)92364-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)92364-6)
5. Prasad S., Potdar V., Cherian S., Abraham P., Basu A. Transmission electron microscopy imaging of SARS-CoV-2. *Indian Journal of Medical Research*, 2020, vol. 151, no. 2–3, pp. 241–243. https://doi.org/10.4103/ijmr.ijmr_577_20
6. Andersen K. G., Holmes E. C., Garry R. F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 2020, vol. 26, no. 4, pp. 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
7. Dube T., Ghosh A., Mishra J., Kompella U. B., Panda J. J. Repurposed drugs, molecular vaccines, immune-modulators, and nanotherapeutics to treat and prevent COVID-19 associated with SARS-CoV-2, a deadly nanovector. *Advanced Therapy*, 2020, vol. 4, no. 2, art. 2000172. <https://doi.org/10.1002/adtp.202000172>
8. *SARS-CoV-2 life cycle: stages and inhibition targets, 2020.* Available at: <https://www.antibodies-online.com/resources/18/5410/sars-cov-2-life-cycle-stages-and-inhibition-targets> (accessed 07.03.2021).
9. Le T. T., Andreadakis Z., Kumar A., Roman R. G., Tollefsen S., Saville M., Mayhew S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, vol. 19, no. 5, pp. 305–306. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00073-5>

10. Chen W. H., Strych U., Hotez P. J., Bottazzi M. E. The SARS-CoV-2 vaccine pipeline: an overview. *Current Tropical Medicine Reports*, 2020, vol. 7, no. 2, pp. 61–64. <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00201-6>
11. Allie S. R., Bradley J. E., Mudunuru U., Schultz M. D., Graf B. A., Lund F. E., Randall T. D. The establishment of resident memory B cells in the lung requires local antigen encounter. *Nature Immunology*, 2019, vol. 20, no. 1, pp. 97–108. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0260-6>
12. Landi A., Law J., Hockman D., Logan M., Crawford K., Chen C. [et al.]. Superior immunogenicity of HCV envelope glycoproteins when adjuvanted with cyclic-di-AMP, a STING activator or archaosomes. *Vaccine*, 2017, vol. 35, no. 50, pp. 6949–6956. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.072>
13. Lin L. C., Huang C. Y., Yao B. Y., Lin J. C., Agrawal A., Algaissi A. [et al.]. Viromimetic STING agonist-loaded hollow polymeric nanoparticles for safe and effective vaccination against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Advanced Functional Materials*, 2019, vol. 29, no. 28, art. 1807616. <https://doi.org/10.1002/adfm.201807616>
14. Kazlovskii I. S., Zinchenko A. I., Solov'eva A. V., Novikova O. N., Lomako Yu. V. Construction of *Escherichia coli* strain, producing di-adenylate cyclase and its application for cyclic di-AMP synthesis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2015, no. 4, pp. 51–55 (in Russian).
15. Wu Y., Gu W., Chen C., Do S. T., Xu Z. P. Optimization of formulations consisting of layered double hydroxide nanoparticles and small interfering RNA for efficient knockdown of the target gene. *ACS Omega*, 2018, vol. 3, no. 5, pp. 4871–4877. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00397>
16. Shchokolova A. S., Rymko A. N., Burko D. V., Kvach S. V., Zinchenko A. I. Intercalation and release of dinucleotides from a nanodimensional layered double hydroxide. *Chemical and Biochemical Physics: A Systematic Approach to Experiments, Evaluation, and Modeling*. Oakville (Canada), 2016, pp. 317–327.
17. Block S. L., Yogev R., Hayden F. G., Ambrose C. S., Zeng W., Walker R. E. Shedding and immunogenicity of live attenuated influenza vaccine virus in subjects 5–49 years of age. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 38, pp. 4940–4946. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.013>
18. Pronker E. S., Weenen T. C., Commandeur H., Claassen E., Osterhaus A. Risk in vaccine research and development quantified. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 3, e57755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057755>
19. Dutta A., Roy A., Roy L., Chattopadhyay S., Chatterjee S. Immune response and possible therapeutics in COVID-19. *RSC Advances*, 2021, vol. 11, pp. 960–977. <https://doi.org/10.1039/D0RA08901J>
20. Wang Y., Zhang D., Du G. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*, 2020, vol. 395, no. 10263, pp. 1569–1578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31022-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31022-9)
21. Elfiky A. A. Ribavirin, Remdesivir, Sofosbuvir, Galidesivir, and Tenofovir against SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp): a molecular docking study. *Life Sciences*, 2020, vol. 253, art. 117592. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117592>
22. Furuta Y., Gowen B. B., Takahashi K., Shiraki K., Smee D. F., Barnard D. L. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Research*, 2013, vol. 100, no. 2, pp. 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>
23. Cai Q., Yang M., Liu D., Chen J., Shu D., Xia J., Liao X., Gu Y., Cai Q., Yang Y. Experimental treatment with Favipiravir for COVID-19: an open-label control study. *Engineering*, 2020, vol. 6, no. 10, pp. 1192–1198. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.007>
24. de Clercq E. New nucleoside analogues for the treatment of hemorrhagic fever virus infections. *Chemical Asian Journal*, 2019, vol. 14, pp. 3962–3968. <https://doi.org/10.1002/asia.201900841>
25. Mishima E., Anzai N., Miyazaki M., Abe T. Uric acid elevation by favipiravir, an antiviral drug. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2020, vol. 251, no. 2, pp. 87–90. <https://doi.org/10.1620/tjem.251.87>
26. Beresnev A. I., Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Zinchenko A. I. *Method of producing kinetinriboside: patent of the Republic of Belarus, no. 20102*, 2016 (in Russian).
27. Salganik R. I., Batalina T. A., Berdishevskaya L. S., Mosolov A. N. Inhibition of RNA synthesis and re production of tickencephalitis virus under the influence of ribonuclease. *Doklady Akademii nauk SSSR [Scientific reports of the Academy of Sciences of USSR]*, 1968, vol. 180, no. 6, pp. 1473–1475 (in Russian).
28. Il'inskaya O. N., Shakh Makhmud R. Ribonucleases as antiviral agents. *Molekularnaya biologiya [Molecular biology]*, 2014, vol. 48, no. 5, pp. 707–717 (in Russian).
29. Makarov A. A., Ilinskaya O. N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Letters*, 2003, vol. 540, no. 1–3, pp. 15–20. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00225-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00225-4)
30. Bialek S., Boundy E., Bowen V., Chow N., Cohn A., Dowling N., Ellington S., Gierke R., Hall A., MacNeil J. Severe outcomes among patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) United States, February 12–March 16, 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2020, vol. 69, no. 12, pp. 343–346. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6912e2>
31. Rong E., Wang X., Chen H., Yang C., Hu J., Liu W., Wang Z., Chen X., Zheng H., Pu J. Molecular mechanisms for the adaptive switching between the OAS/RNase L and OASL/RIG-I pathways in birds and mammals. *Frontiers in Immunology*, 2018, vol. 9, art. 1398. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01398>
32. Zinchenko A. I., Kvach S. V., Eroshevskaya L. A., Bulatovski A. B. Engineering of bacterial strain-producer of chimeric protein containing human annexin A5 and *Escherichia coli* adenosine deaminase. *Eastern European Scientific Journal (Dusseldorf)*, 2017, no. 4, pp. 5–11.

33. Grimes J. M., Khan S., Badeaux M., Rao R. M., Rowlinson S. W., Carvajal R. D. Arginine depletion as a therapeutic approach for patients with COVID-19. *International Journal of Infectious Diseases*, 2021, vol. 102, pp. 566–570. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.100>
34. Izzo F., Montella M., Orlando A. P. Pegylated arginine deiminase lowers hepatitis C viral titers and inhibits nitric oxide synthesis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2007, vol. 22, no. 1, pp. 86–91. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04463.x>
35. Rascon-Cruz Q., Espinoza-Sanchez E. A., Siqueiros-Cendon T. S., Nakamura-Bencomo S. I., Arevalo-Gallegos S., Iglesias-Figueroa B. F. Lactoferrin: a glycoprotein involved in immunomodulation, anticancer, and antimicrobial processes. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 1, art. 205. <https://doi.org/10.3390/molecules26010205>
36. Wei M., Yuan J., Liu Y., Fu T., Yu X., Zhang Z. J. Novel coronavirus infection in hospitalized infants under 1 year of age in China. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 13, pp. 1313–1314. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2131>
37. Habib H. M., Ibrahim S., Zaim A., Ibrahim W. H. The role of iron in the pathogenesis of COVID-19 and possible treatment with lactoferrin and other iron chelators. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2021, vol. 136, art. 111228. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111228>
38. Kim J., Wessling-Resnick M. The role of Iron metabolism in lung inflammation and injury. *Journal of Allergy and Therapy*, 2012, vol. 3, no. 4. <https://doi.org/10.4172/2155-6121.S4-004>
39. Cavezzi A., Troiani E., Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clinics and Practice*, 2020, vol. 10, no. 2, art. 1271. <https://doi.org/10.4081/cp.2020.1271>
40. Morniroli D., Consales A., Crippa B. L., Vizzari G., Ceroni F., Cerasani J., Colombo L., Mosca F., Gianni M. L. The antiviral properties of human milk: a multitude of defense tools from mother nature. *Nutrients*, 2021, vol. 13, no. 2, art. 694. <https://doi.org/10.3390/nu13020694>
41. Krupinka A. M., Bogucki Z. Clinical aspects of the use of lactoferrin in dentistry. *Journal of Oral Biosciences*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.job.2021.02.005>
42. Chang R., Ng T. B., Sun W. Z. Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, vol. 56, no. 3, art. 106118. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106118>
43. Semak I., Budzevich A., Maliushkova E., Kuzniatsova V., Popkov N., Zalutsky I., Ivashkevich O. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin. *Transgenic Research*, 2019, vol. 28, pp. 465–478. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00165-y>
44. Lukashovich V. S., Budevich A. I., Semak I. V., Kuznetsova V. N., Malyushkova E. V., Pyzh A. E. [et al.]. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat-producers and its physiological effects. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Reports of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72–81 (in Russian).
45. Kowalczyk P., Szymczak M., Maciejewska M., Laskowski L., Laskowska M., Ostaszewski R., Skiba G., Franiak-Pietryga I. All that glitters is not silver – a new look at microbiological and medical applications of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, vol. 22, no. 2, art. 854. <https://doi.org/10.3390/ijms22020854>
46. Lara H. H., Garza-Trevino E. N., Ixtapan-Turrent L., Singh D. K. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 2011, vol. 9, art. 30. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-30>
47. Morris D., Ansar M., Speshock J., Ivanciuc T., Qu Y., Casola A., Garofalo R. P. Antiviral and immunomodulatory activity of silver nanoparticles in experimental RSV infection. *Viruses*, 2019, vol. 11, no. 8, art. 732. <https://doi.org/10.3390/v11080732>
48. Han J., Chen L., Duan S. M., Yang Q. X., Yang M., Gao C., Zhang B. Y., He H., Dong X. P. Efficient and quick inactivation of SARS coronavirus and other microbes exposed to the surfaces of some metal catalysts. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2005, vol. 18, no. 3, pp. 176–180.
49. Jeremiah S. S., Miyakawa K., Morita T., Yamaoka Y., Ryo A. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, vol. 533, no. 1, pp. 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.018>
50. Hati S., Bhattacharyya S. Impact of thiol-disulfide balance on the binding of Covid-19 spike protein with angiotensin-converting enzyme 2 receptor. *ACS Omega*, 2020, vol. 5, no. 26, pp. 16292–16298. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02125>
51. Balagna C., Perero S., Percivalle E., Nepita E. V., Ferraris M. Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating. *Open Ceramics*, 2020, vol. 1, art. 100006. <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2020.100006>
52. Zhang D., Ma X. I., Gu Y., Huang H., Zhang G. W. Green synthesis of metallic nanoparticles and their potential applications to treat cancer. *Frontiers in Chemistry*, 2020, vol. 8, art. 799. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00799>
53. Sinenok D. N., Birichevskaya L. L., Zinchenko A. I. Biochemical preparation of copper nanoparticles. *Sakharovskie chteniya 2017 goda: ekologicheskie problemy XXI veka: materialy 17-i mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (Minsk, 18–19 maya 2017 goda)* [Sakharov Readings 2017: environmental problems of the 21st century: proceedings of the 17th International scientific conference (Minsk, May 18–19, 2017)]. Minsk, 2017, pp. 219–220 (in Russian).
54. Kruk T., Szczepanowicz K., Stefanska J., Socha R. P., Warszynski P. Synthesis and antimicrobial activity of monodisperse copper nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, vol. 128, pp. 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.02.009>

Информация об авторах

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Биричевская Лариса Леонидовна – канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: l.birichevskaya@mbio.bas-net.by

Казловский Илья Сергеевич – магистр биол. наук, науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com

Булатовский Алексей Борисович – магистр биол. наук, мл. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.bulatovski@yandex.ru

Information about the authors

Anatoli I. Zinchenko – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by

Larisa L. Birichevskaya – Ph. D. (Biol.), Associate Professor, Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: l.birichevskaya@mbio.bas-net.by

Illia S. Kazlouski – Master of Biol. Sci., Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com

Aleksei B. Bulatovski – Master of Biol. Sci., Junior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.bulatovski@yandex.ru

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 616-006+116-006.04+577.29

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-370-384>

Поступила в редакцию 22.04.2021

Received 22.04.2021

Т. А. Позняк¹, А. Е. Гончаров¹, В. М. Абашкин¹, А. И. Становая¹,
А. В. Прохоров², Д. Г. Щербин¹

¹Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ И ЦИРКУЛИРУЮЩИЕ РАКОВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И ИХ ДЕТЕКЦИЯ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИИ

Аннотация. В обзоре приведено описание циркулирующих раковых стволовых клеток (цРСК) и циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) в крови человека и методов их определения. цРСК являются одними из главных инициаторов рецидива онкологических заболеваний, что делает их основной мишенью для разработки новых методов лечения. ЦОК являются относительно новыми биомаркерами для ранней диагностики метастазирования, мониторинг содержания которых дает ценную информацию на всех этапах ведения онкопациентов, включая раннюю диагностику заболевания, оценку риска рецидива болезни, определение эффективности химиотерапии с возможностью последующей ее коррекции.

Ключевые слова: циркулирующие опухолевые клетки, циркулирующие раковые стволовые клетки, маркеры, клональная и иерархическая модели образования опухоли, многоцветная проточная цитофлуориметрия

Для цитирования: Циркулирующие опухолевые клетки и циркулирующие раковые стволовые клетки и их детекция методом проточной цитофлуориметрии / Т. А. Позняк [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2021. – Т. 66, № 3. – С. 370–384. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-370-384>

Tatyana A. Pozniak¹, Andrei Y. Hancharou¹, Viktor M. Abashkin¹, Alesia I. Stanovaya¹,
Alexander V. Prokhorov², Dzmitry G. Shcharbin¹

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

²Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

CIRCULATING TUMOR CELLS AND CIRCULATING CANCER STEM CELLS AND THEIR DETECTION BY THE METHOD OF FLOW CYTOMETRY

Abstract. This review describes the circulating cancer stem cells (CCSCs) and circulating tumor cells (CTCs). CCSCs are one of the main initiators of recurrent cancer and thus make them an important target for the development of new treatment methods. CTCs are relatively new biomarkers for the early diagnosis of metastasis. CTCs provide doctors with valuable information about each stages of cancer treatments: diagnostic of early-stage disease, early detection of recurrent cancer, the efficiency of chemotherapy, and makes it possible to select an individual sensitive drug.

The most informative and frequently used markers for the detection of CSCs and CCSCs were described. The mechanism of two models of tumor formation is considered: clonal and hierarchical. The known mechanisms of epithelial-mesenchymal transition of tumor cells are described. The most widely used specific cell surface markers for the detection and isolation of CTCs and CCSCs are described. The efficiency of a sensitive high-precision method of multicolor flow cytometry using specific fluorescent dye-labeled monoclonal antibodies for the detection of CCSCs and CTCs in the blood of cancer patients is analyzed. Detection of CTCs and CCSCs provides important information for the early diagnosis of metastasis and open a possibility to personalized treatment, and to monitoring of all stages cancers.

Keywords: circulating tumor cells, circulating cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, markers, clonal and hierarchical models of tumor formation, multicolor flow cytometry

For citation: Pozniak T. A., Hancharou A. Y., Abashkin V. M., Stanovaya A. I., Prokhorov A. V., Shcharbin D. G. Circulating tumor cells and circulating cancer stem cells and their detection by the method of flow cytometry. *Vestsi Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 3, pp. 370–384 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-3-370-384>

Введение. Согласно статистике ВОЗ, злокачественные новообразования десятки лет занимают лидирующие позиции среди причин человеческой смертности. Так, в начале 2019 г. онкологические заболевания обогнали сердечно-сосудистые, став основной причиной смерти в развитых странах. По предварительным оценкам Международного агентства изучения рака (IARC), к 2030 г. число ежегодно регистрируемых

в мире случаев онкозаболеваний превысит 22,2 млн [1]. В то же время в лечении рака за последнее время достигнуты значительные успехи, доказательством чего служат статистические данные о существенном увеличении числа людей, проживших более 5 лет после постановки первичного диагноза. На сегодняшний день предотвратить возникновение около 30 % раковых заболеваний можно при условии исключения факторов риска (химического, физического, канцерогенного воздействия и др.) и осуществления стратегии их профилактики. А одним из главных факторов успешного лечения рака является ранняя диагностика и мониторинг всех этапов лечения, в том числе послеоперационного.

Основной причиной смерти пациентов с онкологическими заболеваниями является появление отдаленных метастазов, а также рецидивы в пораженных органах. Метастатические поражения трудно поддаются лечению, поскольку часто проявляют повышенную устойчивость к химиотерапии. Одним из главных условий эффективного выбора лечения является глубокое понимание механизмов процесса образования первичных и вторичных злокачественных опухолей, закономерностей метастазирования, возможных фенотипических изменений злокачественных раковых клеток.

Предполагается, что существует несколько моделей образования опухолей (рис. 1). Клональная (стохастическая) модель [2, 3] подразумевает, что любая опухолевая клетка способна инициировать образование опухоли, и это может происходить одновременно во многих клетках организма (рис. 1, *b*). При достижении мутациями определенного порогового значения в соматических клетках происходит злокачественное их перерождение. Каждая из клеток с мутациями при благоприятных условиях обладает потенциалом для восстановления до нормального состояния путем генетической репарации [4]. В этой модели гетерогенность опухоли объясняется геномной нестабильностью, различным уровнем и скоростью мутаций (рис. 1). Злокачественные клетки начинают различаться не только числом, но и качеством накопленных мутаций, а следовательно, и степенью их злокачественности. В результате образуются более злокачественные клоны, которые отвечают за рост опухоли. Согласно стохастической модели, излечение возможно лишь при условии гибели подавляющей части популяции опухолевых клеток, ответственных за ее прогрессирование.

Иерархическая модель (рис. 1, *a*) объясняет гетерогенность опухоли наличием пула раковых стволовых клеток (РСК), которые способны образовывать множество опухолевых клеток, ответственных за инициирование, рост и рецидив опухоли.

Первые доказательства существования РСК встречаются еще в работах Бонета [5], который обнаружил способность такой клетки инициировать острый миелоидный лейкоз человека у мышей, не страдающих такими заболеваниями, как диабет, ожирение и иммунодефицит.

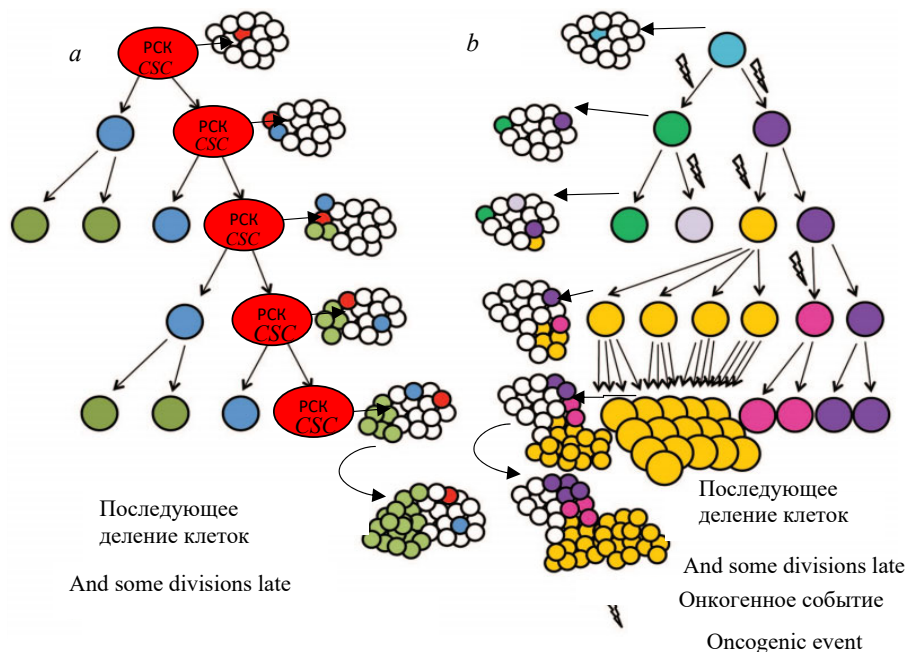


Рис. 1. Схемы возможных моделей образования опухоли: иерархическая (*a*), клональная (*b*).
РСК – раковые стволовые клетки (рисунок модифицирован [3])

Fig. 1. Schemes of possible models of tumor formation: hierarchical (*a*), clonal (*b*).
CSC – cancer stem cells (according to ref. [3])

Клетки, инициирующие лейкоз, обладают дифференцирующей, пролиферативной способностью и имеют потенциал для самообновления. Результаты все большего числа научных исследований подтверждают иерархическую модель большинства солидных опухолей, которая объясняет наличие пула РСК [6]. Гипотеза о наличии РСК и модель клональной эволюции не исключают друг друга. Напротив, многие авторы склоняются к версии одновременного задействования механизмов клональной и иерархической моделей [7]. Предположительно сами РСК могут подвергаться клональной эволюции с образованием более злокачественных субпопуляций, что способствует опухолевой прогрессии. Обе модели предполагают существование субпопуляции клеток с повышенной онкогенностью при образовании солидных опухолей.

Раковые стволовые клетки (*англ.* cancer stem cells (CSCs)). РСК представляют собой небольшую популяцию неопластических клеток, способных в течение продолжительного времени размножаться для поддержания инвазивной солидной опухоли или лейкоза, а также обладают способностью к самообновлению и дают начало гетерогенным линиям раковых клеток опухоли [3, 8]. Эти свойства определяют РСК как одни из главных инициаторов рецидива, что делает их важной мишенью для разработки новых методов лечения. РСК названы по аналогии с нормальными стволовыми клетками, поскольку также обладают способностью к самообновлению и дифференцировке. Они могут давать начало фенотипически отличной популяции, состоящей из злокачественно трансформированных клеток с разным потенциалом пролиферации. РСК способны к асимметричному делению, в результате которого возникает одна клетка-реплика исходной клетки и одна клетка, утратившая способность делиться асимметрично, но обладающая неконтролируемым пролиферативным потенциалом (обычно с высокой инвазивностью) и часто проявляющая признаки дифференцировки. Считается, что РСК возникают не только в результате ряда мутаций стволовых клеток, но могут происходить и из дифференцированных эпителиальных клеток в процессе их эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), приобретая миграционные и опухолевые свойства [9, 10].

Важным фактом является то, что РСК, как и опухолевые клетки, характеризуются повышенной гетерогенностью и, следовательно, образуют внутри опухоли субклоны, отличающиеся по структуре генома клеток, характеру протеома и т. п. Субклоны имеют разную злокачественность, поскольку РСК внутри опухоли оказываются в разном микроокружении и по-разному с ним взаимодействуют [11]. Одним из фенотипических отличий РСК от основного пула опухолевых клеток является экспрессия на их поверхности специфических маркеров. Для выделения или идентификации РСК при разных видах опухоли уже наработана определенная линейка маркеров (см. таблицу), наиболее известными из которых являются CD133, CD44, ALDH, CD34, CD24, EpCAM [10]. Как показывает практика, для лучшего охвата всей популяции РСК необходимо использовать не меньше двух белковых маркеров.

Наиболее значимые маркеры РСК, экспрессируемые при различных онкозаболеваниях человека

The most important CSC markers expressed in various human cancers

Онкозаболевание	РСК маркеры
Рак шейки матки	CD133 ⁺ , CD49f ⁺ , CK-17 ⁺
Рак пищевода	CD44 ⁺ , ALDH1 ⁺ , Integrin α 7 ⁺
Рак почек	CD24 ⁻ , CD44 ⁺ , CD105 ⁺ , CD133 ⁺
Рак легких	CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD133 ⁺ , ABCG2 ⁺ , ALDH ⁺
Рак толстой кишки	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , EpCAM ⁺ , ALDH ⁺
Рак печени	CD24 ⁺ , CD44 ⁺ , CD90 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH ⁺ , ABCG2 ⁺
Рак поджелудочной железы	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ABCG2 ⁺ , ALDH ⁺ , EpCAM ⁺
Рак яичников	CD44 ⁺ , CD117 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH1 ⁺
Рак простаты	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , α 2 β 1 ⁺ , ALDH ⁺
Рак области головы и шеи	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH ⁺ , CD34 ⁺
Рак молочной железы	CD24 ⁻ , CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , ALDH-1 ⁺
Рак желудка	CD44 ⁺ , CD133 ⁺
Глиома	CD44 ⁺ , CD133 ⁺ , A2B5 ⁺ , BCRP1 ⁺ , SSEA-1 ⁺
Миелоидный лейкоз: острый хронический	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD123 ⁺ CD25 ⁺ , CD26 ⁺ , CD44 ⁺ , CD93 ⁺ , IL1RAP ⁺
Меланома	ABCB5 ⁺ , CD20 ⁺
Саркома	CD29 ⁺ , CD117 ⁺ , CD133 ⁺ , Nestin ⁺ , Stro-1 ⁺

Используя панель перевиваемых линий клеток рака молочной железы (РМЖ), Филмор и Купервассер показали, что клеточные линии РМЖ действительно содержат РСК. Они также обнаружили, что комбинация маркеров CD24–(low)/CD44+(high) идентифицирует клетки с фенотипом РСК только в подгруппе клеток РМЖ и не коррелирует с онкогенностью линий клеток РМЖ с базальноклеточным фенотипом [12].

Еще одним маркером РСК служит альдегиддегидрогеназа 1 (ALDH1). ALDH представляет собой семейство из 19 изоферментов человека. Гинестьер и его коллеги идентифицировали активность и экспрессию ALDH1 как маркера РСК при РМЖ и показали, что CD24–(low)/CD44+(high)/ALDH1+ раковые клетки могут образовывать опухоли всего из 20 клеток [13], а высокий уровень экспрессии ALDH1 коррелирует с плохим клиническим прогнозом. ALDH1 в качестве маркера РСК широко используется не только при РМЖ, но и при других солидных опухолях, включая плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легких и др.

Одной из главных проблем на сегодняшний день является резистентность раковых клеток к известным методам лечения и их способность вызывать рецидив. Устойчивость РСК к терапевтическим агентам может быть причиной активации сигнальных путей, которые приводят к самообновлению, повышенной экспрессии мембранных переносчиков АТФ-связывающих кластеров, уклонению от реакций иммунной системы, увеличению экспрессии ABC-транспортных белков, отвечающих за выведение лекарственных препаратов [14]. В частности, при анализе сверхэкспрессии апоптотических белков при лимфоидном онкозаболевании установлено, что к выживаемости раковых клеток и РСК причастны некоторые белки, участвующие в апоптозе [15]. Рецидив онкозаболеваний происходит либо в первичном очаге, либо во вторичных органах за счет миграции РСК. Это происходит вследствие ЭМП популяции раковых клеток с приобретением фенотипических признаков, которые позволяют им ослаблять контакт между клетками и открепляться от опухолевой ткани, разрушать базальную мембрану и диссоциировать из опухолевой массы в кровеносную или лимфатическую систему. Далее они могут попадать в отдаленные органы и инициировать появление вторичной опухоли и/или метастазов. В процессе ЭМП клетки частично теряют свои маркеры адгезии и, таким образом, становятся «неуловимыми» при применении ранее используемых методов. В работе [16] авторы рассматривают ЭМП в качестве отличительного признака метастазирования, связывающего образование как ЦОК, так и клеток с фенотипами РСК.

Эпителиально-мезенхимальный переход (англ. epithelial-mesenchymal transition (EMT)). ЭМП – это многоступенчатый процесс, включающий молекулярные и клеточные изменения в эпителиальных клетках. Неподвижные эпителиальные клетки приобретают мезенхимальный фенотип, характеризующийся повышением клеточной подвижности и способностью разрушать внеклеточный матрикс [17, 18]. Во время этого перехода происходит полное или частичное подавление активности эпителиальных адгезивных белков, например Е-кадгерина, цитокератина (СК), клаудина, окклюдина. Одновременно отмечается экспрессия белков, характерных для мезенхимальных клеток: N-кадгерина, фибронектина, виментина, тенасцина С, коллагена VI и ламинина-I [16]. ЭМП играет важную роль при ряде физиологических и патофизиологических состояний. В зависимости от механизма ЭМП различают три типа: I – эмбриональный, II – фиброзный (или ранозаживляющий), III – онкопрогрессирующий [17, 19].

Классический ЭМП (тип I) встречается в период эмбрионального развития и постнатального роста. Индукторы ЭМП подавляют экспрессию адгезивных и контактных белков, что приводит к разрушению базальной мембраны и дальнейшему приобретению клетками миграционных свойств. Первичные мезенхимальные клетки образованы таким образом, что они имеют потенциал для последующего прохождения мезенхимально-эпителиального перехода (МЭП), обратного ЭМП, генерируя таким образом вторичный эпителий [20]. Образование почти всех органов у взрослых – результат одного или нескольких ЭМП, за которыми следует МЭП. Такая способность клеток называется эпителиальной пластичностью, уникальным примером чего служит постнатальное развитие молочной железы. Во время цикла развития этого органа эпителиальные клетки проходят несколько этапов пролиферации, инвазии и гибели.

ЭМП типа II (фиброзный ЭМП) вызывается травмой, что провоцирует образование фибробластов, необходимых для реконструкции поврежденных тканей [19]. В физиологических условиях фибробласты и иммунные клетки выделяют факторы воспалительного процесса (например, разные цитокины) и внеклеточные матриксные белки, которые являются стимуляторами клеток к ЭМП. Когда воспаление стихает, процесс прекращается. Патологические состояния воспаления и непрерывные ЭМП нормальных эпителиальных клеток могут привести к фиброзу и поражению органов (легких, печени, почек) [7].

Онкогенный процесс может нарушать гомеостаз в клетках и вызывать ЭМП III типа. ЭМП I и III типов очень схожи, однако последний менее упорядочен. Факт гистопатологического сходства вторичных опухолей с клетками первичной объясняется процессом МЭП, следующим после достижения клетками отдаленных органов. Имеется большое количество публикаций, описывающих переключения между ЭМП и МЭП при раке мочевого пузыря, раке яичников и колоректального рака [20], а также влияние микро-

окружения вторичного органа на способность индуцировать процесс МЭП путем возобновления экспрессии Е-кадгерина [21]. Такие ЭМП клеток, ведущие к изменению фенотипа, способствуют возникновению гибридных фенотипов, которые «накапливают» особенности обоих типов клеток [22]. Существует мнение, что для успешного метастазирования нет необходимости полного ЭМП всех клеток. Они могут морфологически оставаться дифференцированными и участвовать в метастазирующих процессах, что называется «коллективной» миграцией. Цуджи с соавт. [23] описали модель коллективной миграции при раковом заболевании, когда только «сотрудничество» между клетками ЭМП и раковыми клетками обеспечивает процесс метастазирования (рис. 2, модель В). Такая модель предполагает, что опухолевые клетки перемещаются не по отдельности, а как кластеры, в которых лишь некоторые клетки подверглись ЭМП. Эти клетки, имея инвазивный фенотип, способствуют деградации матрикса, помогая тем самым клеткам без ЭМП, с адгезивным фенотипом, проникать в локальные ткани и сосуды и прикрепляться к их стенке, создавая метастазы. Возможно, что в кластере мигрирующих клеток сосуществует много промежуточных типов клеток между эпителиальным и мезенхимальным фенотипами. Однако очевидным является наличие более чем одного клеточного механизма инвазии в ткани, что делает более трудоемким процесс исследования эпителиальных опухолей.

Циркулирующие опухолевые клетки (англ. circulating tumor cells (CTCs)). Процесс метастазирования является сложным многоступенчатым механизмом, в котором задействовано большое количество клеток и факторов, поэтому при его изучении появляются все новые и новые данные.

Известно, что метастатическое распространение опосредствуется в гетерогенной первичной опухоли редкими ЦОК, которые способны проникать в кровоток [24] и оттуда перемещаться во вторичные органы, инициируя там образование метастазов, либо снова поражать первичный орган, приводя к повышенной агрессивности опухоли. В первичной опухоли отмечается стремительный рост клеток, который вызывает нехватку кислорода, активируя ангиогенез. Кроме того, происходит подавление эпителиальных белков,

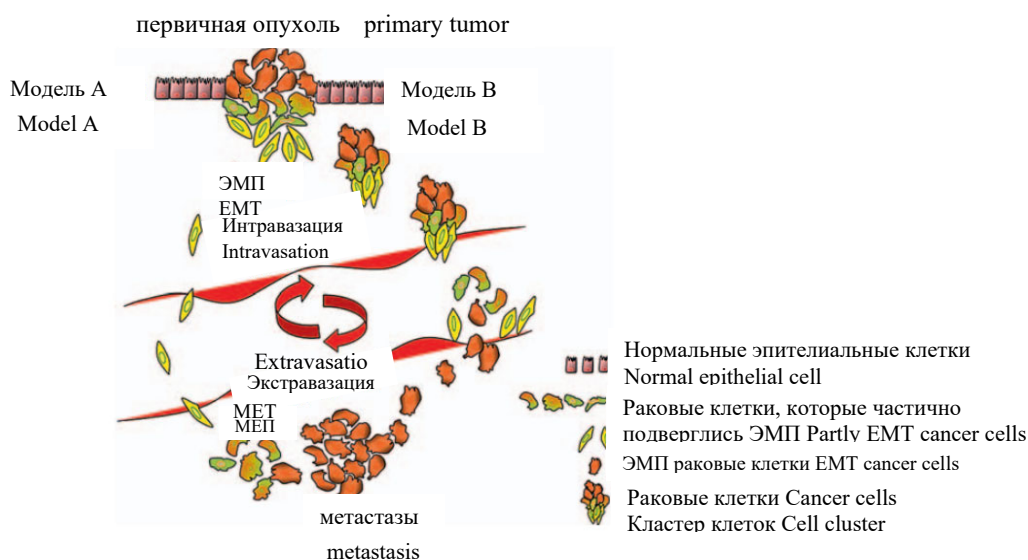


Рис. 2. Две возможные модели (А, В) метастазирования в процессе ЭМП раковых клеток. После стимуляции у опухолевых клеток происходит изменение фенотипа (либо на фенотип мезенхимальных клеток, либо на клетки с «гибридными» фенотипами) и они приобретают способность к ЭМП. Модель А: эпителиальные опухолевые клетки подвергаются процессу ЭМП, а далее уже мезенхимально-подобные раковые клетки мигрируют по кровеносной системе. Как только они достигают вторичного органа, они подвергаются МЭП и образуют метастазы [19]. Модель Б: раковые клетки мигрируют как кластеры клеток с разными фенотипами (раковые клетки, которые проходят полный и частичный ЭМП, и клетки, не относящиеся к ЭМП). Все типы клеток попадают в кровоток, но только раковые клетки, не относящиеся к EMT, способны экстравазировать и создавать метастазы [23]. (Рисунок модифицирован [16])

Fig. 2. Two possible models of cancer cell metastasis (A, B) during EMT. Two models have been proposed for EMT involvement in cancer metastasis. After stimulation, carcinoma cells activate a program of EMT and phenotypical changes occur, leading to the formation of either a pure population of highly invasive mesenchymal-like cells or sets of cell clusters with 'hybrid' phenotypes. Model A: after undergoing full EMT, mesenchymal-like cancer cells disseminate from the tumor mass and reach the circulatory system. Once they extravasate in a distant organ, they undergo MET and create metastases [19]. Model B: cancer cells disseminate and migrate as clusters of cells with different phenotypes; cancer cells that pass through full EMT lead the partial EMT and non-EMT cells. All cell types enter the circulation, but only non-EMT cancer cells are able to extravasate and create metastases [23] (according to ref. [16])

что приводит к снижению адгезии клеток и ранней инвазивности опухолевых клеток, устойчивых к апоптозу. В целом происходит смена эпителиального фенотипа клеток на мезенхимальный. После попадания в кровеносные сосуды (интравасация) ЦОК подвергаются апоптозу или циркулируют как изолированные клетки. В кровеносном русле ЦОК находятся в фазе покоя и не размножаются. Затем те ЦОК, которые не подверглись апоптозу, экстравазируются в отдаленные органы, после чего либо остаются в виде спящих одиночных клеток (диссеминированные опухолевые клетки), либо подвергаются ограниченной пролиферации с дальнейшим образованием очагов опухолевого роста (метастазов). Неконтролируемая пролиферация ЦОК приводит к формированию метастазов за счет реверсии фенотипа в процессе МЭП и ангиогенеза. Циркулирующие микроэмболы опухоли (ЦМО) представляют собой «коллективную миграцию» опухолевых клеток с высоким метастатическим потенциалом, поскольку они устойчивы к апоптозу и сохраняют способность к пролиферации. ЦМО не может экстравазировать, но способны задерживаться в капиллярах и разрастаться, разрывая стенки капилляров и инициируя образование метастазов.

Идентификация ЦОК позволяет определить один из первых этапов метастатического каскада, а также имеет большой потенциал для прогноза и мониторинга ответа на лечение онкозаболеваний. Прогностическое значение ЦОК было подтверждено у пациентов с неметастатическим РМЖ [24, 25], при метастатическом колоректальном раке, при злокачественных новообразованиях эпителия, в том числе при раке простаты [26], яичников, легких, толстого кишечника. Клетки с фенотипом ЦОК у здоровых людей либо у пациентов с незлокачественными заболеваниями встречаются крайне редко. Многочисленные исследования показали, что количественное определение ЦОК является надежным независимым прогностическим фактором общей выживаемости пациентов с ранним и метастатическим РМЖ [24, 27]. Таким образом, детекция и молекулярная характеристика ЦОК считаются ключом к ранней клинической оценке метастазирования, что дает важную информацию для своевременного выбора верного профиля терапии. Техническая задача в этой области состоит в обнаружении «редких» опухолевых клеток (всего несколько ЦОК среди примерно 10 млн лейкоцитов и 5 млрд эритроцитов в 1 мл крови) и в возможности отличить их от эпителиальных неопухолевых клеток и лейкоцитов.

По своей природе ЦОК гетерогенны и представляют собой популяцию клеток опухоли, которые попали в кровеносное русло либо из первичных очагов, либо из метастазов. Часть популяции ЦОК представлена ЦСК, часть – ЭМП клетками (находящиеся в состоянии ЭМП), а большая часть не имеют признаков ЭМП и ЦСК. Предполагается, что именно стволовые ЦОК и клетки, прошедшие эпителиально-мезенхимальную трансформацию, инициируют рост метастазов.

В экспериментальных моделях на мышах было показано, что всего 1 из 40 ЦОК может создать очаги метастазирования и лишь 1 из 100 таких очагов может образовать опухоль [28]. Такая «неэффективность» метастазирования является результатом апоптоза (формы программируемой клеточной смерти путем апоптоза) и объясняет низкую выживаемость ЦОК после выхода из опухолевой массы [29], а также неспособностью ранних микрометастазов в отдаленных органах стимулировать ангиогенез и продолжить рост. И одиночные клетки, и микрометастазы могут оставаться в состоянии покоя в течение многих лет и не подвергаться апоптозу.

Неоваскуляризация, индуцированная опухолью, происходит параллельно с инвазией опухолевых клеток, что обеспечивает их распространение по сосудам и может предшествовать явному разрастанию первичной опухоли в течение многих лет. Таким образом, распространение опухолевых клеток может начаться на ранних этапах онкогенеза, т. е. задолго до постановки диагноза [30]. Подтверждением этого служат результаты клинических исследований пациентов с РМЖ, раком толстой кишки и др., среди которых значительная часть (20–30 %) имели макрометастазы на момент постановки диагноза [31].

На сегодняшний день для выделения и определения ЦОК используют следующие параметры, которые отличают ЦОК от других популяций клеток: наличие специфических белков-маркеров и транскриптов генов, несколько больший размер, плотность, электрический заряд, инвазивные свойства. Наиболее эффективный и часто используемый подход для детекции и выделения ЦОК основан на применении антител против эпителиально-специфических или опухолеспецифических маркеров, присутствующих на поверхности клеток, таких как ЕpCAM (молекула адгезии эпителиальных клеток), СК 8, 18, 19, ЕpHB4 (рецептор эфрина), EGFR (эпидермальный фактор роста), СЕА (карциноэмбриональный антиген), FGFR (рецептор фактора роста фибробластов), HER2, эпителиальный муцин (MUC1 и MUC2), эпителиальный фактор роста 2 (Her2/neu), маммоглобин и др. [32]. Каждый из них имеет как преимущества, так и недостатки.

Наиболее часто применяемым маркером для обнаружения и выделения ЦОК является ЕpCAM [33]. Впервые ЕpCAM был обнаружен на эпителиальных клетках карциномы. Установлено также, что он экспрессируется на большинстве первичных и метастатических опухолей. При использовании этого маркера ЦОК в количестве больше 2 клеток на 7,5 мл крови были обнаружены у пациентов с метастатическим

РМЖ [34], метастатическим раком толстой кишки и раком простаты в 70, 60 и 70,8 % случаев соответственно [35]. Во многих работах по изучению различных видов солидных опухолей была подтверждена информативность ЕрСAМ и доказано, что он является исключительным маркером отбора для выделения ЦОК. Однако следует учитывать, что при ЭМП экспрессия ЕрСAМ может подавляться, а наиболее инвазивные опухолевые клетки при этом не детектируются. Более того, экспрессия данного маркера варьируется в зависимости от типа опухоли. Наблюдается сильная экспрессия ЕрСAМ при РМЖ, раке легких, толстой кишки, предстательной железы, тогда как он не обнаруживается при мезенхимальных раковых образованиях (саркоме, лимфоме и нейрогенных опухолях).

Среди разработанных многочисленных методов выделения ЦОК система CellSearch® (Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, США) на сегодняшний день является единственной платформой, которая одобрена FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) для клинического использования при раке груди, толстой кишки и простаты [36]. Первый этап данного метода – иммуномагнитное обогащение с использованием антител против молекулы ЕрСAМ, второй – окрашивание выделенных клеток специфическими флуоресцентными конъюгатами антител против CD45 и СК 8, 18, 19. На следующем этапе образец сканируется на анализаторе. В этой системе ЦОК определяются как ядродержащие клетки, лишенные лейкоцитарного маркера CD45, так и экспрессирующие СК.

Однако платформа CellSearch® имеет некоторые недостатки, что связано с использованием маркера эпителиальности клеток ЕрСAМ. Есть вероятность ложноположительных результатов, поскольку эпителиальные неопухолевые клетки могут циркулировать в крови также во время воспаления, регенерации органов, при повреждении ткани (например, после хирургических вмешательств, биопсии). Данная система может давать и ложноотрицательные результаты в случае ЭМП, что ведет к потере эпителиальных и СК-маркеров и экспрессии новых мезенхимальных маркеров, в частности виментина, N-кадгерина [16]. После установления факта изменения эпителиальных маркеров на мезенхимальные после химиотерапии группой ученых сделано предположение, что причиной химиорезистентности является ЭМП [37]. Также известно, что более агрессивные СК-отрицательные ЦОК появляются после ЭМП или нейроэндокринной дифференциации [38]. Однако эти клетки не выделяются системой CellSearch®. Кроме того, наиболее злокачественные циркулирующие мезенхимальные и стволовые опухолевые клетки не обнаруживаются этой системой.

Анализ полученных результатов методом CellSearch® показывает, что ЦОК обнаруживается лишь у 40–50 % пациентов с диссеминированными карциномами и не детектируется при других видах опухолей [39]. Например, большое количество ЦОК (ЕрСAМ+) часто обнаруживается в образцах крови пациентов с РМЖ, раком простаты и мелкоклеточным раком легкого. И наоборот, низкое количество ЦОК у пациентов с панкреатическим, колоректальным и немелкоклеточным раком легкого [40]. Это объясняется тем, что во время диссеминации для преодоления интравазации и образования вторичных опухолей в эпителиальных опухолевых клетках изменяется паттерн экспрессии ЕрСAМ. Обнаружено, что наиболее злокачественные ЦОК теряют эпителиальные маркеры, что показано в работе Sieuwerts, где широко используемый маркер ЕрСAМ, экспрессия которого наблюдается в 60–100 % случаев РМЖ, не распознается на клетках РМЖ, характеризующегося агрессивным поведением [41]. Runnouse в своих исследованиях показал, что клеточные линии с низким уровнем экспрессии ЕрСAМ проявляют и низкую экспрессию других эпителиальных маркеров – СК 8, 18 и 19 или Е-кадгерина и высокую экспрессию виментина [42]. Кроме того, иногда наблюдаются снижение межклеточной адгезии и потеря апикально-базолатеральной полярности. В связи с этим при использовании только маркеров ЕрСAМ и СК иногда невозможно обнаружить ЦОК [43]. С учетом перечисленных проблем, которые встречаются на сегодняшний день при детекции ЦОК системой CellSearch, очевидно, что этот вопрос требует дальнейшего исследования и расширения линейки специфических маркеров.

Кроме системы CellSearch® существуют и другие методы количественного определения и выделения ЦОК, основанные на применении ЕрСAМ как маркера: MagSweeper (иммуномагнитный метод), GILPUI CellCollector® (выделение ЦОК *in vivo* из вены руки с помощью нанопроволоки), IsoFlux® (использование покрытых антителами к ЕрСAМ магнитных микрофлюидных шариков) и др. Однако все эти методы по-прежнему требуют аналитической и клинической проверки, поскольку на сегодняшний день ни один из них не получил одобрения FDA.

Существует также независимый от ЕрСAМ метод выделения ЦОК, основанный на физических характеристиках клеток – ISET® (изоляция эпителиальных опухолевых клеток по размеру). Принцип действия этого метода заключается в фильтрации крови через специальный фильтр ISET® с порами размером 8 мкм, задерживающий опухолевые клетки, которые намного крупнее лейкоцитов (24 мкм и более).

Одним из подходов, устраняющим недостатки системы CellSearch®, является использование дополнительных к ЕрСAМ маркеров ЦОК. Так, например, разработана методика выделения ЦОК из образцов

крови онкопациентов с использованием индивидуальных магнитных микрочастиц, конъюгированных с антителами к EpCAM и EGFR [44]. Комбинация этих двух маркеров показала оптимальную комплементарность для эффективного охвата различных фенотипов опухолевых клеток. Авторами установлено, что общее количество ЦОК в 68,18 % исследованных образцов было выше по сравнению с числом клеток, обнаруженных с помощью метода CellSearch®. Этот новый подход устраняет недостаток использования только маркера EpCAM и охватывает широкий спектр фенотипов, включая мезенхимальные клетки.

EGFR принадлежит к семейству рецепторов тирозинкиназ HER/ErbB, отвечающих за регулирование сигнальных путей во время роста, выживания и подвижности клеток. Активация EGFR нарушает межклеточную адгезию вследствие дестабилизации комплекса E-кадгерин/ β -катенин, способствует ЭМП и приобретению подвижного фенотипа. Функция EGFR часто нарушается при эпителиальных опухолях, а передача сигналов через EGFR играет важную роль как при прогрессировании рака, так и при ЭМП. Однако чувствительность данного маркера невысока.

Еще одним маркером, используемым для детекции ЦОК, является EphB4 (рецептор эфрина) – представитель рецепторных протеинкиназ, активность которого повышается при некоторых видах рака. Этот комплекс лиганд с рецептором опосредствует передачу сигнала межклеточного контакта и является регулятором миграции клеток и формирования тканевого паттерна, которые часто используются раковыми клетками при прогрессировании опухоли. Сверхэкспрессия EphB4 наблюдается при раке головы и шеи [45], раке желудка, РМЖ и др. При этом у здоровых доноров не обнаружена экспрессия данного маркера. Однако поскольку этот маркер присутствует и на неопухолевых эпителиальных клетках, он может давать ложноположительные результаты.

Недавно был разработан метод детекции ЦОК у пациентов с немелкоклеточной карциномой легких с применением технологий ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени [46]. Была изучена вероятность содержания внеклеточной РНК в периферической крови как потенциального биомаркера для обнаружения ЦОК у онкологических больных путем определения уровня экспрессии мРНК генов *CK7*, *EphB4*, *EGFR*, *ELF3*. Авторы показали, что экспрессия *CK7* и *EphB4* в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) коррелирует с возрастом и гистопатологическим типом соответственно. Экспрессия *CK7* и *ELF3* в опухолевых тканях и *EGFR* в МКПК была связана с метастазами в лимфатических узлах. Экспрессия всех четырех генов в опухолевых тканях и МКПК достоверно коррелировала с клинической стадией. Анализ выживаемости показал, что пациенты с повышенной экспрессией мРНК генов *CK7*, *ELF3*, *EGFR* и *EphB4* в МКПК имели более низкую безрецидивную и общую выживаемость. Таким образом, исследование показало, что изменение содержания внеклеточной РНК в периферической крови может иметь важное клиническое значение для диагностики и лечения пациентов с немелкоклеточной карциномой легких.

Маркер HER2 – мембранный белок, тирозиновая протеинкиназа семейства рецепторов эпидермального фактора роста EGFR/ErbB. Амплификация или повышенная экспрессия гена этого белка играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определенных агрессивных типов РМЖ, а также является важным биомаркером и терапевтической мишенью этого вида рака. В настоящее время определение данной молекулы широко используется для иммунохимической диагностики и таргетной терапии РМЖ. Однако при использовании его для детекции ЦОК HER2 зарекомендовал себя хуже, чем EpCAM. Из 66 пациентов с прогрессирующим РМЖ у 40 были EpCAM-положительные ЦОК, из которых лишь 15 имели HER2+ статус [47]. Чен с соавт. [48] для детекции HER2-позитивных клеток ЦОК в цельной крови использовали систему LiquidBiopsy. HER2 были обнаружены на всех стадиях РМЖ, включая раннюю, но уровень обнаружения был выше при метастатическом процессе. Анализ экспрессии HER2 используется при РМЖ и является эффективной терапевтической мишенью для лечения РМЖ, а также может быть применен в комплексе с другими маркерами для подсчета ЦОК.

MUC-1 – мембранный белок, протеогликан из группы муцинов. Синтезируется апикальной поверхностью эпителиальных клеток и обеспечивает их защиту от бактерий и ферментов. Экспрессия данного белка значительно повышена в большинстве карцином, что способствует снижению адгезивных свойств клетки и, следовательно, их миграции. Результаты исследования показали, что пациенты с MUC-1+ метастатической аденокарциномой поджелудочной железы ЦОК имели более короткую медианную общую выживаемость по сравнению с пациентами с MUC-1-отрицательными ЦОК [49]. Высокая экспрессия MUC-1 наблюдалась также при эпителиальных опухолях яичников и метастатическом РМЖ, аденокарциноме поджелудочной железы, колоректальном раковом образовании, раке простаты [50]. Однако MUC-1 не является специфическим маркером опухолевых клеток, он экспрессируется также на нормальных и доброкачественных клетках РМЖ, что приводит к ложноположительным результатам.

Исследования показали, что хирургические вмешательства инициируют массовый выброс опухолевых клеток в кровотоки [51], а дальнейшее снижение ЦОК до исходного уровня после операции происходит

за счет процессов апоптоза и повторного метастазирования во вторичные органы [52]. Обнаружение одной клетки ЦОК в 1 мл крови является клинически важным и означает, что в организме присутствуют 5000 ЦОК. Количественные определения ЦОК в цельной крови больных раком легких до базовой терапии и после первого курса (при использовании технологии ISET) показали отрицательную корреляцию количества этих клеток с продолжительностью жизни без прогрессирования болезни и общей выживаемостью [53]. Кроме того, по результатам многих клинических исследований, при РМЖ отмечается положительная корреляция между количеством ЦОК и снижением свободной прогрессии и общей выживаемостью при операбельной болезни до и после химиотерапии [53].

Поскольку ЦОК можно получать повторно неинвазивным способом, их можно использовать для исследования и подбора оптимальной терапии, наблюдая за их количественным изменением. Результаты исследований показали снижение количества ЦОК у онкопациентов после начала эффективной терапии рака груди, простаты, колоректального и других видов рака [36, 54, 55], что свидетельствует о применимости этого маркера при изучении ответа на лечение. Кроме того, исследование молекулярных характеристик ЦОК является перспективным, поскольку может стать инструментом для изучения молекулярной эволюции опухолевых клеток в процессе курса лечения, что особенно важно для мониторинга развития лекарственной устойчивости.

Определение ЦОК, как и других циркулирующих опухолевых маркеров, обладает явными преимуществами перед биопсией ткани за счет простоты сбора материала и возможности серийной оценки. Кроме того, наблюдение за изменением молекулярного профиля ЦОК в процессе лечения может служить инструментом фармакодинамического мониторинга, способствующим лучшему пониманию причин резистентности применяемой терапии [36]. Обнаружено, что ЦОК могут генетически отличаться от первичной опухоли, от которой они происходят, и эти различия могут влиять на реакцию организма пациента на терапию, которую назначают, основываясь лишь на первичной характеристике опухоли. Следовательно, ЦОК можно рассматривать как «жидкую биопсию», предоставляющую прогностическую и прогностически-клиническую информацию [24].

На сегодняшний день неизвестны поверхностные или внутриклеточные маркеры для 100 %-ной детекции ЦОК у онкобольных. Это связано с геномной нестабильностью злокачественных клеток, которая приводит к гетерогенности популяции ЦОК. Линейка ЦОК-специфических маркеров в будущем может быть дополнена мезенхимальными маркерами и маркерами стволовости, однако для эффективного подбора подобных антигенов необходимо проведение дополнительных исследований. Таким образом, одним из способов преодоления трудностей количественного определения ЦОК является одновременное использование нескольких маркеров, что дает возможность наибольшего охвата популяции ЦОК.

Многоцветная проточная цитофлуориметрия (*англ.* multicolor flow cytometry). Многоцветная проточная цитометрия (МПЦ) – чувствительный высокоточный мультиинформативный метод, позволяющий идентифицировать и охарактеризовать любую клеточную субпопуляцию среди десятков тысяч клеток не только благодаря ее морфологическим особенностям, но и за счет отслеживания уровня экспрессии белков, что дает возможность диагностики множества заболеваний и мониторинга их лечения [56].

Метод МПЦ основан на анализе параметров светорассеяния и интенсивности флуоресценции отдельных клеток. В проточной камере прибора суспензия анализируемых клеток попадает в поток обжимающей жидкости так, что клетки выстраиваются в очередь и проходят через лазерный луч. Рассеивание света и флуоресценция от каждого события регистрируются при помощи разных детекторов. Информация от детекторов представляется в наглядной форме, что дает возможность разделить клетки на отдельные популяции, отличающиеся друг от друга по заданным параметрам.

Для многопараметрового исследования клеток образца используют одновременно несколько флуорохромов с разными длинами волн испускания и эмиссии. Современные цитофлуориметры содержат минимум 3 лазера и не менее 10 каналов детекции (фильтров) для анализа испускаемого свечения. Такой подход существенно экономит время, расход образца и при этом дает широкую линейку результатов. Использование в современной практике специфических моноклональных антител (монАТ), меченных флуорохромами, позволяет проводить как качественный, так и количественный анализ поверхностных и внутриклеточных антигенов. Флуоресцентный сигнал появляется в случае связывания монАТ, меченного флуорохромным красителем, со специфической белковой структурой клетки. В настоящее время в клинической практике можно использовать одновременно до 12 меченых антител в одной пробирке [57], что дает возможность контролировать функциональное состояние многих клеточных популяций.

Преимущество метода состоит также в высокой производительности, возможности анализа большого массива клеток, высокой точности и чувствительности при одновременном анализе порядка 30 параметров флуоресценции.

Учитывая широкие возможности метода проточной цитофлуориметрии, ученые уже десятки лет успешно применяют его для иммунофенотипирования лейкоцитов и диагностики лимфопролиферативных заболеваний [58, 59]. Использование данного метода позволяет наиболее точно детектировать гетерогенные клеточные популяции и редкие события (одиночные клетки), т. е. встречающиеся с частотой 10^{-5} – 10^{-7} , и охарактеризовать их одновременно по нескольким фенотипическим признакам, подобрав нужную линейку специфических флуорохром-меченых моноклональных антител. Так, применение МПЦ позволяет обнаруживать минимальную остаточную болезнь с чувствительностью от 10^{-5} до 10^{-6} [60]. Метод проточной цитофлуориметрии является наиболее точным, быстрым и удобным для количественного определения минимальной остаточной болезни и выявления ЦОК в крови пациентов с онкозаболеваниями и часто используется в медицинской практике [58, 59]. Lianyuan Tao с соавт. [58] применяли этот метод для обнаружения ЦОК в крови с целью прогнозирования послеоперационных метастазов у пациентов с новообразованиями поджелудочной железы, проведя анализ 39 образцов крови. Также Юшэн Лу с соавт. [59] с помощью данного метода в комплексе с отрицательной иммуномагнитной сепарацией по CD45 детектировали ЦОК в крови пациентов с колоректальной карциномой. Авторами установлено, что количество ЦОК положительно коррелирует со стадией онкозаболевания пациента, является надежным предиктором общей выживаемости и имеет решающее значение для принятия клинических решений.

На основе метода проточной цитофлуориметрии в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси разработан метод определения содержания циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови у пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями эпителиальной природы. Для детекции ЦОК в качестве основного маркера использовали ЕрСАМ (CD326). Лейкоциты и другие клетки гемопоэтического происхождения идентифицировали при помощи панлейкоцитарного маркера CD45. В качестве интеркалирующего красителя для исключения мертвых клеток применяли To-Pro3. Конгломераты клеток выявляли путем гейтирования событий на цитограмме SSC-H против SSC-A.

Данный метод успешно используется в комплексе медицинских услуг для ранней диагностики процессов метастазирования и контроля лечения пациентов, страдающими онкозаболеваниями [61].

Заключение. В настоящее время применение современных подходов и методов лечения онкопациентов часто приводит к полной ремиссии. Однако у части таких пациентов в конечном итоге случаются рецидивы, что объясняется тем, что при использовании методов диагностики, основанных лишь на морфологической оценке клеточной популяции, не удается обнаружить остаточное количество опухолевых клеток после терапии [60]. МПЦ в сочетании с молекулярными и цитогенетическими исследованиями является наиболее часто используемым методом диагностики минимальной остаточной болезни.

Что касается злокачественных новообразований эпителиальной природы, то определение циркулирующих опухолевых и раковых стволовых клеток методом многоцветной проточной цитофлуориметрии позволяет провести раннюю диагностику процессов метастазирования, а также мониторинг и коррекцию всех этапов этого процесса.

Список использованных источников

1. Пак (онкологические заболевания) [Electronic resource] // Zdrav. Expert. – Mode of access: [http://zdrav.expert/index.php/Статья:Пак_\(онкологические_заболевания\)](http://zdrav.expert/index.php/Статья:Пак_(онкологические_заболевания)). – Date of access: 14.03.2021.
2. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in *BRAF*-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406) / S. Kopetz [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2017. – Vol. 35, N 4. – P. 285–294. <https://doi.org/10.1200/jco.20.01994>
3. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? / A. Antoniou [et al.] // Cell Cycle. – 2013. – Vol. 12, N 24. – P. 3743–3748. <https://doi.org/10.4161/cc.27305>
4. Understanding the cancer stem cell / S. Bomken [et al.] // Br. J. Cancer. – 2010. – Vol. 103, N 4. – P. 439–445. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605821>
5. Bonnet, D. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell / D. Bonnet, J. E. Dick // Nat. Med. – 1997. – Vol. 3, N 7. – P. 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
6. Eun, K. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting / K. Eun, S. W. Ham, H. Kim // BMB Rep. – 2017. – Vol. 50, N 3. – P. 117–125. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.3.222>
7. Lang, F. Stem Cell Hierarchy and Clonal Evolution in Acute Lymphoblastic Leukemia / F. Lang, B. Wojcik, M. A. Rieger // Stem Cells Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/137164>
8. Visvader, J. E. Cancer stem cells: current status and evolving complexities / J. E. Visvader, G. J. Lindeman // Cell Stem Cell. – 2012. – Vol. 10, N 6. – P. 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>
9. Hollier, B. G. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies / B. G. Hollier, K. Evans, S. A. Mani // J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. – 2009. – Vol. 14, N 1. – P. 29–43. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9110-3>
10. Молекулярные маркеры раковых стволовых клеток, верифицированные *in vivo* / Я. С. Ким [и др.] // Биомед. химия. – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 228–238.

11. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells and their microenvironment / H. R. Sun [et al.] // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9, N 9. – P. 1104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01104>
12. Fillmore, C. M. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that selfrenew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy / C. M. Fillmore, C. Kuperwasser // *Breast Cancer Res.* – 2008. – Vol. 10, N 2. – Art. R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
13. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome / C. Ginestier [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2007. – Vol. 1, N 5. – P. 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
14. Begicevic, R. R. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance / R. R. Begicevic, M. Falasca // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – P. 2362. <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>
15. Hanahan D. Hallmarks of cancer: the next generation / D. Hanahan, R. A. Weinberg // *Cell.* – 2011. – Vol. 144, N 5. – P. 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
16. Książkiewicz, M. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells / M. Książkiewicz, A. Markiewicz, A. J. Zaczek // *Pathobiology.* – 2012. – Vol. 79, N 4. – P. 195–208. <https://doi.org/10.1159/000337106>
17. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells / A. Bonnomet [et al.] // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* – 2010. – Vol. 15, N 2. – P. 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9174-0>
18. Kalluri, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells / R. Kalluri // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, N 6. – P. 1417–1419. <https://doi.org/10.1172/jci39675>
19. Kalluri, R. The basics of epithelial-mesenchymal transition / R. Kalluri, R. A. Weinberg // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, N 6. – P. 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/jci39104>
20. Chaffer, C. L. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease / C. L. Chaffer, E. W. Thompson, E. D. Williams // *Cells Tissues Organs.* – 2007. – Vol. 185, N 1–3. – P. 7–19. <https://doi.org/10.1159/000101298>
21. Chao, Y. L. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition / Y. L. Chao, C. R. Shepard, A. Wells // *Mol. Cancer.* – 2010. – Vol. 9, N 1. – Art. 179. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
22. Klymkowsky, M. W. Epithelialmesenchymal transition: a cancer researcher’s conceptual friend and foe / M. W. Klymkowsky, P. Savagner // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 174, N 5. – P. 1588–1593. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>
23. Tsuji, T. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis / T. Tsuji, S. Ibaragi, G. F. Hu // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 18. – P. 7135–7139. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1618>
24. Hall, C. Circulating tumor cells in breast cancer patients / C. Hall, L. Valad, A. Lucci // *Crit. Rev. Oncog.* – 2016. – Vol. 21, N 1–2. – P. 125–139. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2016016120>
25. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) при раке молочной железы: прогностическая значимость и методы выделения / Д. А. Зубцов [и др.] // *Тр. МФТИ.* – 2012. – Т. 4, № 3. – С. 18–26.
26. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data / H. I. Scher // *Lancet Oncol.* – 2009. – Vol. 10, N 3. – P. 233–239. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70340-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70340-1)
27. Bidard, F. C. Circulating tumor cells in breast cancer / F. C. Bidard, C. Proudhon, J. Y. Pierga // *Mol. Oncol.* – 2016. – Vol. 10, N 3. – P. 418–430. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.001>
28. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases / K. J. Luzzi [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1998. – Vol. 153, N 3. – P. 865–873. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65628-3)
29. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells / O. Berezovskaya [et al.] // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 6. – P. 2378–2386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-2649>
30. Gray, J. W. / Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors / J. W. Gray // *Cancer Cell.* – 2003. – Vol. 4, N 1. – P. 4–6. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00167-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00167-3)
31. Spread of human cancer cells occurs with probabilities indicative of a nongenetic mechanism / J. S. Michaelson [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2005. – Vol. 93, N 11. – P. 1244–1249. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602848>
32. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells / T. Fehm [et al.] // *Cytotherapy.* – 2005. – Vol. 7, N 2. – P. 171–185. <https://doi.org/10.1080/14653240510027082>
33. Man, Y. Currently Used markers for CTC isolation – advantages, limitations and impact on cancer prognosis / Y. Man, Q. Wang, W. Kemmner // *J. Clin. Exp. Pathol.* – 2011. – Vol. 1, N 1. – Art. 102. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000102>
34. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system / S. Riethdorf [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, N 3. – P. 920–928. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1695>
35. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages / L. M. Maestro [et al.] // *Anticancer Res.* – 2009. – Vol. 29, N 11. – P. 4839–4843.
36. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents / J. Tol [et al.] // *Ann. Oncol.* – 2010. – Vol. 21, N 5. – P. 1006–1012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp463>
37. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance / K. R. Fischer [et al.] // *Nature.* – 2015. – Vol. 527, N 7579. – P. 472–476. <https://doi.org/10.1038/nature15748>
38. The initial detection and partial characterization of circulating tumor cells in neuroendocrine prostate cancer / H. Beltran [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 22, N 6. – P. 1510–1519. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-0137>

39. Lianidou, E. S. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer / E. S. Lianidou, A. Markou // Clin. Chem. Lab. Med. – 2011. – Vol. 49, N 10. – P. 1579–1590. <https://doi.org/10.1515/ccm.2011.628>
40. Eslami, S. Z. Circulating tumor cells: moving forward into clinical applications / S. Z. Eslami, L. E. Cortés-Hernández, C. Alix-Panabières // Precis Cancer Med. March. – 2020. – Vol. 3, N 4. – P. 781–791. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31377345/>
41. Antiepitheial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normallike breast tumor cells / A. M. Sieuwerts [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 2009. – Vol. 101, N 1. – P. 61–66. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn419>
42. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells / E. A. Punnoose [et al.] // PLoS ONE. – 2010. – Vol. 5, N 9. – P. e12517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012517>
43. Detection of EpCAM negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood / S. D. Mikolajczyk [et al.] // J. Oncol. – 2011. – Vol. 2011. – P. 252361. <https://doi.org/10.1155/2011/252361>
44. EGFR-based immunoisolation as a recovery target for low-EpCAM CTC subpopulation / A. Vila [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 10. – P. e0163705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163705>
45. Long term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma / S. C. Winter [et al.] // BMC Cancer. – 2009. – Vol. 9, N 1. – Art. 424. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-424>
46. Cell-free RNA content in peripheral blood as potential biomarkers for detecting circulating tumor cells in non-small cell lung carcinoma / X. M. Yu [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – Vol. 17, N 11. – P. 1845. <https://doi.org/10.3390/ijms17111845>
47. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients / M. Pestrin [et al.] // Breast Cancer Res. Treat. – 2009. – Vol. 118, N 3. – P. 523–530. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0461-7>
48. Detection of HER2-positive circulating tumor cells using the LiquidBiopsy System in breast cancer / W. Chen [et al.] // Clin. Breast Cancer. – 2019. – Vol. 19, N 1. – P. 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.10.009>
49. Prognostic significance of MUC-1 in circulating tumor cells in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma / E. Dotan [et al.] // Pancreas. – 2016. – Vol. 45, N 8. – P. 1131–1135. <https://doi.org/10.1097/mpa.0000000000000619>
50. MUC1-positive circulating tumor cells and MUC1 protein predict chemotherapeutic efficacy in the treatment of metastatic breast cancer / J.-P. Cheng [et al.] // J. Cancer. – 2011. – Vol. 30, N 1. – P. 54–61. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10239>
51. Influence of surgical manipulation and surgical modality on the molecular detection of circulating tumor cells from colorectal cancer / Soo Yeun Park [et al.] // J. Korean Surg. Soc. – 2012. – Vol. 82, N 6. – P. 356–364. <https://doi.org/10.4174/jkss.2012.82.6.356>
52. Circulating tumour cells: molecular properties and anti-cancer treatment monitoring / A. Baigenzhin [et al.] // J. Clin. Med. Kazakhstan. – 2013. – Vol. 4, N 30. – P. 9–13.
53. Paterlini-Brechot, P. // Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions / P. Paterlini-Brechot, N. L. Benali // Cancer Lett. – 2007. – Vol. 253, N 2. – P. 180–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.014>
54. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study / J. Sastre [et al.] // Oncologist. – 2012. – Vol. 17, N 7. – P. 947–955. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0048>
55. Paoletti, C. Circulating tumor cells / C. Paoletti, D. F. Hayes // Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer / ed. V. Stearns. – Cham, 2016. – Vol. 882. – P. 235–258. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22909-6_10
56. Gwatkin, R. B. L. Practical flow cytometry, by H. M. Shapiro, Wiley-Liss, New York, 3rd ed., 1994, 542 p. / R. B. L. Gwatkin // Mol. Rep. Dev. – 1995. – Vol. 41, N 4. – P. 540. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410419>
57. Ten-color 15-antibody flow cytometry panel for immunophenotyping of lymphocyte population / A. Rajab [et al.] // Int. J. Lab. Hematol. – 2017. – Vol. 39, suppl. 1. – P. 76–85. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12678>
58. Postoperative metastasis prediction based on portal vein circulating tumor cells detected by flow cytometry in periampullary or pancreatic cancer / L. Tao [et al.] // Cancer Manag. Res. – 2019. – Vol. 11. – P. 7405–7425. <https://doi.org/10.2147/cmar.s210332>
59. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry / Y. Lu [et al.] // Cancer. – 2015. – Vol. 121, N 17. – P. 3036–3045 <https://doi.org/10.1002/cncr.29444>
60. Xu, J. How do we use multicolor flow cytometry to detect minimal residual disease in acute myeloid leukemia? / J. Xu, J. L. Jorgensen, S. A. Wang // Clin. Lab. Med. – 2017. – Vol. 37, N 4. – P. 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2017.07.004>
61. Способ определения циркулирующих опухолевых клеток : пат. BY 23371 / А. Е. Гончаров, О. В. Тимохина. – Опубл. 30.04.2021.

References

1. Cancer (oncological diseases). *Zdrav. Expert*. Available at: [http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_\(онкологические_заболевания\)](http://zdrav.expert/index.php/Статья:Рак_(онкологические_заболевания)) (accessed 14.03.2021).
2. Kopetz S., Guthrie K. A., Morris V. K., Lenz H.-J., Magliocco A. M., Maru D. [et al.]. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in *BRAF*-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). *Journal of Clinical Oncology*, 2017, vol. 35, no. 4, pp. 285–294. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.01994>
3. Antoniou A., Hebrant A., Dom G., Dumont J., Maenhaut C. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? *Cell Cycle*, 2013, vol. 12, no. 24, pp. 3743–3748. <https://doi.org/10.4161/cc.27305>
4. Bomken S., Fišer K., Heidenreich O., Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. *British Journal of Cancer*, 2010, vol. 103, no. 4, pp. 439–445. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605821>

5. Bonnet D., Dick J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 1997, vol. 3, no. 7, pp. 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm.0797-730>
6. Eun K., Ham S. W., Kim H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Reports*, 2017, vol. 50, no. 3, pp. 117–125. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2017.50.3.222>
7. Lang F., Wojcik B., Rieger M. A. Stem cell hierarchy and clonal evolution in acute lymphoblastic leukemia. *Stem Cells International*, 2015, vol. 2015, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/137164>
8. Visvader J. E., Lindeman G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*, 2012, vol. 10, no. 6, pp. 717–728. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.007>
17. Mani S. A. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008, vol. 133, pp. 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
9. Hollier B. G., Evans K., Mani S. A. The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2009, vol. 14, no. 1, pp. 29–43. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9110-3>
10. Kim Ya. S., Kaidina A. M., Chang Yu. Kh., Yarygin K. N., Lupatov A. Yu. Molecular markers of cancer stem cells verified *in vivo*. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical chemistry], 2016, vol. 62, no. 3, pp. 228–238 (in Russian).
11. Sun H., Wang S., Yan S., Zhang Yu., Nelson P., Jia H., Qin L., Dong Q. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells and their microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 2019, vol. 9, no. 9, p. 1104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01104>
12. Fillmore C. M., Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that selfrenew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research*, 2008, vol. 10, no. 2, art. R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
13. Ginestier C., Hur M., Charafe-Jauffret E., Birnbaum D., Wicha M., Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 2007, vol. 1, no. 5, pp. 555–567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
14. Begicevic R. R., Falasca M. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, p. 2362. <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>
15. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, vol. 144, no. 5, pp. 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
16. Książkiewicz M., Markiewicz A., Zaczek A. J. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology*, 2012, vol. 79, no. 4, pp. 195–208. <https://doi.org/10.1159/000337106>
17. Bonnomet A., Brysse A., Tachsidis A., Waltham M., Thompson E., Polette M., Gilles C. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2010, vol. 15, no. 2, pp. 261–273. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9174-0>
18. Kalluri R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, vol. 119, no. 6, pp. 1417–1419. <https://doi.org/10.1172/jci39675>
19. Kalluri R., Weinberg R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, vol. 119, no. 6, pp. 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/jci39104>
20. Chaffer C. L., Thompson E. W., Williams E. D. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*, 2007, vol. 185, no. 1–3, pp. 7–19. <https://doi.org/10.1159/000101298>
21. Chao Y. L., Shepard C. R., Wells A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. *Molecular Cancer*, 2010, vol. 9, art. 179. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-179>
22. Klymkowsky M. W., Savagner P. Epithelialmesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *American Journal of Pathology*, 2009, vol. 174, no. 5, pp. 1588–1593. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080545>
23. Tsuji T., Ibaragi S., Hu G. F. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Research*, 2009, vol. 69, no. 18, pp. 7135–7139. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-1618>
24. Hall C., Valad L., Lucci A. Circulating tumor cells in breast cancer patients. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 2016, vol. 21, no. 1–2, pp. 125–139. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2016016120>
25. Zubtsov D. A., Zubtsova Zh. I., Lavrov A. V., Legchenko E. V., Aladinskii V. A., Poteryakhina A. V., Gol'dshtein D. V. Circulating tumor cells (CTCs) in breast cancer: prognostic significance and methods for isolation. *Trudy MFTI. Trudy Moskovskogo fiziko-tekhnicheskogo instituta (natsional'nogo issledovatel'skogo universiteta)* [Proceedings of MIPT. Proceedings of the Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)], 2012, vol. 4, no. 3, pp. 18–26 (in Russian).
26. Scher H. I. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncology*, 2009, vol. 10, no. 3, pp. 233–239. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(08\)70340-1](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(08)70340-1)
27. Bidard F. C., Proudhon C., Pierga J. Y. Circulating tumor cells in breast cancer. *Molecular Oncoogy*, 2016, vol. 10, no. 3, pp. 418–430. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.001>
28. Luzzi K., MacDonald I., Schmidt E., Morris V., Chambers A. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *American Journal of Pathology*, 1998, vol. 153, no. 3, pp. 865–873. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65628-3)
29. Berezovskaya O., Schimmer A. D., Glinskii A. B., Pinilla C., Hoffman R. M., Reed J. C., Glinsky G. V. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Research*, 2005, vol. 65, no. 6, pp. 2378–2386. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-2649>

30. Gray J. W. Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors. *Cancer Cell*, 2003, vol. 4, no. 6, pp. 4–6. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00167-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00167-3)
31. Michaelson J. S., Cheongsatmoy J. A., Dewey F., Silverstein M. J., Sgroi D., Smith B., Tanabe K. K. Spread of human cancer cells occurs with probabilities indicative of a nongenetic mechanism. *British Journal of Cancer*, 2005, vol. 93, no. 11, pp. 1244–1249. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602848>
32. Fehm T., Solomayer E. F., Meng S., Tucker T., Lane N., Wang J., Gebauer G. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*, 2005, vol. 7, no. 2, pp. 171–185. <https://doi.org/10.1080/14653240510027082>
33. Man Y., Wang Q., Kemmner W. Currently Used Markers for CTC Isolation – Advantages, Limitations and Impact on Cancer Prognosis. *Journal of Clinic and Experimental Pathology*, 2011, vol. 1, no. 1, art. 102. <https://doi.org/10.4172/2161-0681.1000102>
34. Riethdorf S., Fritsche H., Müller V., Rau T., Schindlbeck C., Rack B. [et al.]. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clinical Cancer Research*, 2007, vol. 13, no. 3, pp. 920–928. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1695>
35. Maestro L., Sastre J., Rafael S., Vezanzones S., Vidaurreta M., Martín M. [et al.]. Circulating tumor cells in solid tumor in metastatic and localized stages. *Anticancer Research*, 2009, vol. 29, no. 11, pp. 4839–4843. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20032444/>
36. Tol J., Koopman M. C., Miller M. C., Tibbe A., Cats A., Creemers G. J. M., Vos A. H., Nagtegaal I. D., Terstappen L. W. M. M., Punt C. J. A. Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Annals of Oncology*, 2010, vol. 21, no. 5, pp. 1006–1012. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp463>
37. Fischer K., Durrans A., Lee S., Sheng J., Li F., Wong S. [et al.]. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 2015, vol. 527, no. 7579, pp. 472–476. <https://doi.org/10.1038/nature15748>
38. Beltran H., Jendrisak A., Landers M., Mosquera J., Kossa M., Louw J. [et al.]. The initial detection and partial characterization of circulating tumor cells in neuroendocrine prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 2016, vol. 22, no. 6, pp. 1510–1519. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-0137>
39. Lianidou E. S., Markou A. Circulating tumor cells as emerging tumor biomarkers in breast cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, vol. 49, no. 10, pp. 1579–1590. <https://doi.org/10.1515/cclm.2011.628>
40. Eslami S. Z., Cortés-Hernández L. E., Alix-Panabières C. Circulating tumor cells: moving forward into clinical applications. *Precision Cancer Medicine*, 2020, vol. 3, no. 4, pp. 781–791. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.07.008>
41. Sieuwerts A. M., Kraan J., Bolt J., van der Spoel P., Elstrodt F., Schutte M., Martens J. W. M., Gratama J. W., Sleijfer S., Foekens J. A. Antiepitheial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normallike breast tumor cells. *Journal of the Nature Cancer Institute*, 2009, vol. 101, no. 1, pp. 61–66. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn419>
42. Punnoose E. A., Atwal S. K., Spoerke J. M., Savage H., Pandita A., Yeh R. [et al.]. Molecular biomarker analyses using circulating tumor cells. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5, no. 9, p. e12517. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012517>
43. Mikolajczyk S. D., Millar L. S., Tsinberg P., Coutts S. M., Zomorodi M., Pham T., Bischoff F. Z., Pircher T. J. Detection of EpCAM negative and cytokeratin-negative circulating tumor cells in peripheral blood. *Journal of Oncology*, 2011, vol. 2011, pp. 252–361. <https://doi.org/10.1155/2011/252361>
44. Vila A., Abal M., Muinelo-Romay L., Rodriguez-Abreu C., Rivas J., López-López R., Costa C. EGFR-based immunoisolation as a recovery target for Low-EpCAM CTC subpopulation. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 10, p. e0163705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163705>
45. Winter S. A., Stephenson S. A., Subramaniam S. K., Paleri V., Ha K., Marnane C., Krishnan S., Rees G. Long-term survival following the detection of circulating tumour cells in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 2009, vol. 9, no. 1, art. 424. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-424>
46. Yu X. M., Yi-Chen Wu, Xiang Liu, Xian-Cong Huang, Xiu-Xiu Hou, Jiu-Li Wang, Xiang-Liu Cheng, Wei-Min Mao, Zhi-Qiang Ling. Cell-free RNA content in peripheral blood as potential biomarkers for detecting circulating tumor cells in non-small cell lung carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 11, p. 1845. <https://doi.org/10.3390/ijms17111845>
47. Pestrin M., Bessi S., Galardi F., Truglia M., Biggeri A., Biagioni C., Cappadona S., Biganzoli L., Giannini A., Di Leo A. Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2009, vol. 118, no. 3, pp. 523–530. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0461-7>
48. Chen W., Zhang J., Huang L., Chen L., Zhou Y., Tang D., Xie Y., Wang H., Huang C. Detection of HER2-positive circulating tumor cells using the LiquidBiopsy System in breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, 2019, vol. 19, no. 1, pp. 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2018.10.009>
49. Dotan E., Alpaugh K., Ruth K., Negin B. P., Denlinger C. S., Hall M. J., Astsaturov I., McAleer, C., Fittipaldi P., Thrash-Bingham C., Meropol N., Cohen S. J. *Pancreas*, 2016, vol. 45, no. 8, pp. 1131–1135. <https://doi.org/10.1097/mpa.0000000000000619>
50. Cheng J.-P., Yan Y., Wang X.-Y., Lu Y.-L., Lu Y.-L., Jia J., Ren J. MUC1-positive circulating tumor cells and MUC1 protein predict chemotherapeutic efficacy in the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Communications*, 2011, vol. 30, no. 1, pp. 54–61. <https://doi.org/10.5732/cjc.010.10239>
51. Park S. Y., Choi G. S., Park J. S., Kim H. J., Ryuk J. P., Choi W. H. Influence of surgical manipulation and surgical modality on the molecular detection of circulating tumor cells from colorectal cancer. *Journal of Korean Surgical Society*, 2012, vol. 82, no. 6, pp. 356–364. <https://doi.org/10.4174/jkss.2012.82.6.356>

52. Baigenzhin A., Shaimardanova G., Popova N., Zhussipova B., Ismailova G. Circulating tumour cells: molecular properties and anti-cancer treatment monitoring. *Journal of Clinical Medicine of Kazakhstan*, 2013, vol. 4, no. 30, pp. 9–13.
53. Paterlini-Brechot P., Benali N. L. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Letters*, 2007, vol. 253, no. 2, pp. 180–204. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.12.014>
54. Sastre J., Maestro M. L., Gómez-España A., Rivera F., Valladares M., Massuti B. [et al.]. Circulating tumor cell count is a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line chemotherapy plus bevacizumab: a Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors study. *Oncologist*, 2012, vol. 17, no. 7, pp. 947–955. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0048>
55. Paoletti C., Hayes D. F. Circulating tumor cells. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer. Vol. 882*. Cham, 2016, pp. 235–258.
56. Gwatkin R. B. L. Practical flow cytometry, by H. M. Shapiro, Wiley-Liss, New York, 3rd ed., 1994, 542 p. *Molecular Reproduction and Development*, 1995, vol. 41, no. 4, p. 530. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410419>
57. Rajab A., Axler O., Leung J., Wozniak M., Porwit A. Ten-color 15-antibody flow cytometry panel for immunophenotyping of lymphocyte population. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2017, vol. 39, suppl. 1, pp. 76–85. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12678>
58. Tao L., Su L., Yuan C., Ma Z., Zhang L., Bo S., Niu Y., Lu S., Xiu D. Postoperative metastasis prediction based on portal vein circulating tumor cells detected by flow cytometry in periampullary or pancreatic cancer. *Cancer Management and Research*, 2019, vol. 11, pp. 7405–7425. <https://doi.org/10.2147/cmar.s210332>
59. Lu Y., Liang H., Yu T., Xie J., Chen S., Dong H. [et al.]. Isolation and characterization of living circulating tumor cells in patients by immunomagnetic negative enrichment coupled with flow cytometry. *Cancer*, 2015, vol. 121, no. 17, pp. 3036–3045. <https://doi.org/10.1002/cncr.29444>
60. Xu J., Jorgensen J. L., Wang S. A. How do we use multicolor flow cytometry to detect minimal residual disease in acute myeloid leukemia? *Clinics in Laboratory Medicine*, 2017, vol. 37, no. 4, pp. 787–802. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.07.004>
61. Goncharov A. E., Timokhina O. B. *Method for determining circulating tumor cells. Patent BY 23371, 2021* (in Russian).

Информация об авторах

Позняк Татьяна Анатольевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatyana.pozniak@gmail.com

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

Абашкин Виктор Михайлович – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: viktar.abashkin@gmail.com

Становая Аlesia Игоревна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: alesiastanovaya@gmail.com

Прохоров Александр Викторович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: aprokharau@gmail.com

Шербин Дмитрий Григорьевич – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shcharbin@gmail.com

Information about the authors

Tatyana A. Pozniak – Ph. D. (Biol.), 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: tatyana.pozniak@gmail.com

Andrei E. Hancharou – Ph. D. (Med.), 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

Viktar M. Abashkin – 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: viktar.abashkin@gmail.com

Alesia I. Stanovaya – 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: alesiastanovaya@gmail.com

Alexander V. Prokhorov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aprokharau@gmail.com

Dmitry G. Shcharbin – D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shcharbin@gmail.com