



БЕЛОРУССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ЖУРНАЛ
БЕЛОРУССКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

БИОЛОГИЯ

JOURNAL
OF THE BELARUSIAN STATE UNIVERSITY

BIOLOGY

Издается с января 1969 г.
(до 2017 г. – под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»)

Выходит три раза в год

1

2019

МИНСК
БГУ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

- Главный редактор** СИДОРОВ А. В. – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: sidorov@bsu.by
- Заместитель главного редактора** ДЕМИДЧИК В. В. – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: dzemidchik@bsu.by
- Ответственный секретарь** ХРАМЦОВА Е. А. – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры генетики биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь.
E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru
- Гельтман Д. В.* Ботанический институт им. В. Л. Комарова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
- Давыденко О. Г.* Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
- Зинченко А. И.* Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
- Кильчевский А. В.* Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.
- Кульчицкий В. А.* Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
- Медведев С. С.* Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия.
- Решетников В. Н.* Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Беларусь.
- Семак И. В.* Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
- Титок М. А.* Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь.
- Усанов С. А.* Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь.

EDITORIAL BOARD

- Editor-in-chief** SIDOROV A. V., doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: sidorov@bsu.by
- Deputy editor-in-chief** DEMIDCHIK V. V., doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: dzemidchik@bsu.by
- Executive secretary** KHRAMTSOVA E. A., PhD (biology), docent; associate professor at the department of genetics of the faculty of biology of the Belarusian State University, Minsk, Belarus.
E-mail: elena_khramtsova@inbox.ru
- Geltman D. V.* V. L. Komarov Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia.
- Davydenko O. G.* Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
- Zinchenko A. I.* Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
- Kilchevsky A. V.* National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
- Kulchitsky V. A.* Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.
- Medvedev S. S.* Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia.
- Reshetnikov V. N.* Central Botanical Garden, Minsk, Belarus.
- Semak I. V.* Belarusian State University, Minsk, Belarus.
- Titok M. A.* Belarusian State University, Minsk, Belarus.
- Usanov S. A.* National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus.

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 577.3;615.31;616-092

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА РУТИНА С ДВУХВАЛЕНТНЫМ ЖЕЛЕЗОМ

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, Т. О. СУХАН¹⁾, О. А. АНТИПОВА²⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт физиологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Беларусь

В экспериментах, выполненных в бесклеточных системах, показано, что хелатирование двухвалентного железа рутином приводит к появлению у образующегося комплекса (Рут – Fe) сайт-специфической псевдопероксидазной активности в отношении пероксида водорода, но не влияет на способность лиганда взаимодействовать с пероксинитритом. Противовоспалительные свойства рутина и комплекса Рут – Fe оценивали *in vitro* по степени ингибирования воспалительного ответа эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVEC), индуцированного

Образец цитирования:

Потапович АИ, Сухан ТО, Антипова ОА, Костюк ВА. Исследование антиоксидантной и противовоспалительной активности комплекса рутина с двухвалентным железом. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;1:3–12.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-3-12>

For citation:

Potapovich AI, Suhan TO, Antipova OA, Kostyuk VA. Research of antioxidant and anti-inflammatory activity of rutine complex with bivalent iron. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;1:3–12. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-3-12>

Авторы:

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Ольга Александровна Антипова – младший научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

pot-alla@rambler.ru

Tatyana O. Suhan, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

tanyasuhan@mail.ru

Olga A. Antipova, junior researcher at the laboratory of modulation of body functions.

mayuha@yandex.ru

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

kostyuk@bsu.by

бактериальным липополисахаридом (ЛПС). Установлено, что комплекс Рут – Fe в дозе 50 мкмоль/л достоверно снижал уровень ЛПС-индуцированной экспрессии мРНК воспалительных медиаторов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1* и *COX-2* и уровень секреции *IL-6* и *IL-8* в культуральную среду, тогда как Рут при той же концентрации был неэффективным. Эксперименты, выполненные *in vivo*, свидетельствуют, что предварительное введение комплекса Рут – Fe в дозе 12,5 мкмоль/кг существенно уменьшает ЛПС-индуцированную пирогенную реакцию у крыс линии Wistar. На основании полученных данных можно заключить, что связывание с двухвалентным железом усиливает антиоксидантные свойства рутина, приводит к появлению противовоспалительной активности и расширяет область его возможного фармакологического применения.

Ключевые слова: ЛПС; воспаление; цитокины; пероксинитрит; гипертермия; HUVEC; ROS.

RESEARCH OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF RUTINE COMPLEX WITH BIVALENT IRON

A. I. POTAPOVICH^a, T. O. SUHAN^a, O. A. ANTIPOVA^b, V. A. KOSTYUK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInstitute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,
28 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Studies using cell-free systems have shown that chelation of ferrous iron by rutin and formation of the complex (Rt – Fe) resulted in the appearance of site-specific pseudo-peroxidase activity against hydrogen peroxide, but does not affect the ligand's ability to interact with peroxynitrite. Anti-inflammatory properties of rutin (Rt) and its complex with ferrous iron were studied *in vitro* under conditions of bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in endothelial cells of the human umbilical vein (HUVEC). The Rt – Fe complex at a dose of 50 μmol/L was found to significantly reduce the level of LPS-induced mRNA expression of inflammatory mediators *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1* and *COX-2* and the level of secretion of *IL-6* and *IL-8* in the culture medium, while Rt under the same concentration was ineffective. Experiments performed *in vivo* indicate that prior administration of the Rt – Fe complex in a dose of 12.5 μmol/kg dramatically eliminated LPS-induced pyrogenic reaction of in Wistar rats. From the above data, it can be concluded that complexation with bivalent iron enhances of antioxidant properties of Rt, leads to appearance of anti-inflammatory activity and expands the area of its possible pharmacological use.

Key words: LPS; inflammation; cytokines; peroxynitrite; hyperthermia; HUVEC; ROS.

Введение

Септический шок, вызванный инфекционным агентом, представляет собой системный воспалительный ответ, который сопровождается массивным высвобождением медиаторов воспаления, может приводить к развитию синдрома полиорганной недостаточности и является одной из основных причин летальности в отделениях интенсивной терапии. Общепризнано, что повреждение сосудистого эндотелия при сепсисе – ключевой этап в развитии патологического процесса, поскольку именно эндотелий является связующим звеном между кровью и клетками паренхиматозных органов [1]. Под действием медиаторов воспаления эндотелиальные клетки активируются и продуцируют ряд биологически активных веществ, участвующих в реализации патологического процесса. Таким образом, повреждение эндотелия при сепсисе происходит не в результате прямого воздействия микроба и его токсинов, а вследствие гиперактивации систем макроорганизма, первоначально направленных против возбудителя. Окислительный стресс, развивающийся при дисбалансе между гиперобразованием оксидантов и возможностями антиоксидантной защитной системы, может рассматриваться в качестве возможной причины активации и дисфункции эндотелия. Как известно, активные формы кислорода (ROS) и азота (RNS) обладают множеством потенциально опасных эффектов, приводящих к гибели клеток, развитию воспаления и микроциркуляторной недостаточности [2]. По-видимому, при возникновении воспаления может быть эффективной антиоксидантная терапия, нормализующая функцию эндотелия в условиях сепсиса. С этой точки зрения природные полифенольные соединения (ППС) перспективны для противовоспалительной терапии, поскольку являются эффективными радикальными ловушками в отношении широкого спектра ROS и RNS [3]. Помимо прямого антирадикального действия, ППС

способны связывать ионы металлов с переменной валентностью (переходные металлы), образуя стабильные хелатные комплексы, что приводит к ингибированию образования свободных радикалов в реакции Фентона [3]. Комплексообразование с переходными металлами усиливает антирадикальную активность полифенолов в отношении супероксида и повышает их способность защищать клетки от окислительного стресса [4]. Кроме того, характерной особенностью комплексов ППС с переходными металлами является их супероксиддисмутирующая активность [5]. В связи с этим в последнее десятилетие растет интерес к изучению фармакологических эффектов комплексов полифенолов с переходными металлами [6].

В предыдущих работах нами показано, что рутин (Рут) образует устойчивый комплекс с Fe^{2+} , который обладает более сильной цитопротекторной активностью, чем свободный лиганд, и снижает уровень окислительного повреждения и гибели клеток, вызванных тиацетамидом в печени крыс [7].

В данном исследовании изучено влияние комплексообразования с двухвалентным железом на антиоксидантные свойства Рут и его способность оказывать противовоспалительное действие в условиях индуцированного липополисахаридом (ЛПС) воспаления *in vitro* в клетках линии HUVEC и *in vivo* у крыс линии Wistar.

Материалы и методы исследования

Реактивы. В работе применяли ЛПС из *Escherichia coli* 055 : B5, Рут, дигидрородамин 123 (DHR), трипсин, соли и растворители фирмы *Sigma-Aldrich* (Италия), изотонический фосфатный буфер (ИФБ), рН 7,4 (*Lonza*, Бельгия), антибиотики (*Gibco*, США). Комплекс Рут – Fe готовили в ИФБ путем смешивания лиганда и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (молярное соотношение 1 : 1) и стерилизовали фильтрованием через фильтры 0,2 мкм. Кинетику образования комплекса и его устойчивость в культуральной среде оценивали спектрофотометрически.

Определение псевдопероксидазной сайт-специфической активности комплекса Рут – Fe. Способность катализировать гомолитическое расщепление H_2O_2 (реакция Фентона) изучалась с использованием спектрофотометрического подхода и выражалась количественно рассчитанной величиной скорости окисления лиганда образующимся гидроксильным радикалом.

Синтез пероксинитрита и анализ эффективности его поглощения. Пероксинитрит синтезировали из нитрита натрия и H_2O_2 [8]. Концентрацию исходного раствора пероксинитрита в 1 моль/л NaOH определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при 302 нм ($\epsilon = 1670$ (моль/л) $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$). Рабочие концентрации готовились в 0,1 моль/л NaOH непосредственно перед применением. Для исследования эффективности поглощения пероксинитрита тестируемыми соединениями (ТС) был разработан конкурентный подход с использованием триптофана в качестве детектора. Реакционная смесь содержала 25 мкмоль/л триптофана, 50 мкмоль/л пероксинитрита и различные концентрации Рут и комплекса Рут – Fe в ИФБ. Окисление триптофана пероксинитритом контролировалось спектрофлуориметрически путем измерения интенсивности флуоресценции (возбуждение 295 нм, эмиссия 350 нм). Процент ингибирования окисления триптофана ТС рассчитывали по формуле

$$\frac{(TFx - TFpx) - (TFx - TFxp)}{TFx - TFpx} \cdot 100,$$

где TFx – флуоресценция триптофана в присутствии ТС; $TFpx$ – флуоресценция триптофана после добавления пероксинитрита и ТС (последний добавляли через 1 мин после пероксинитрита); $TFxp$ – флуоресценция триптофана после добавления ТС и пероксинитрита (последний добавляли через 1 мин после ТС).

Эффективность поглощения пероксинитрита исследуемыми соединениями оценивалась рассчитанными значениями эффективной дозы ($ЭД_{50}$) ТС, ингибирующей на 50 % пероксинитрит-индуцируемое окисление триптофана.

Общая схема проведения экспериментов *in vitro*. Культивировали эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (HUVEC) (*Lonza*, Бельгия) в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2) в полной ростовой среде ЭРС (EGM-2 Bullet Kit, *Lonza*, Бельгия). Эксперименты проводились в 6-луночных планшетах на клетках четвертого – седьмого пересева. Исследуемые соединения Рут и Рут – Fe в дозе 10 или 50 мкмоль/л добавляли к клеткам одновременно с ЛПС (1 мкг/мл). Через 6 ч образцы среды и адгезивные клетки (на планшетах) замораживали при –80 °С.

Определение внутриклеточной продукции пероксинитрита. Внутриклеточную продукцию пероксинитрита определяли, используя флуоресцентный зонд DHR [9]. Высевали HUVEC в 96-луночные планшеты и после достижения полного монослоя к клеткам добавляли ЛПС (1 мкг/мл), DHR (10 мкмоль/л) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе (37 °С, 5 % CO_2) в течение 60 мин. Взаимодействуя с пероксинитритом, DHR превращается во флуоресцентный продукт родамин 123 [10]. Флуоресценцию клеточного слоя (возбуждение 485 нм, эмиссия 535 нм) измеряли планшетным флуориметром.

Анализ экспрессии мРНК. Общая РНК была выделена из замороженных образцов HUVEC с помощью набора GenElute Mammalian Total RNA Kit (*Sigma-Aldrich*, Италия) в соответствии с инструкциями. Количество РНК в образцах определяли по поглощению при 260 нм. Реакция обратной транскрипции, в результате которой происходит перевод последовательности РНК в комплементарную ДНК (кДНК), проведена с использованием набора iScript cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad*, США) при 42 °С в течение 30 мин. Анализ экспрессии мРНК выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени детектором Real-Time PCR Detector Chromo4 Four-Color (*Bio-Rad*, США). Реакционная смесь включала в себя интеркалирующий краситель SYBR Green (*Fermentas*, Литва), пассивный краситель ROX, термостабильную реакционную смесь Riality™, содержащую Taq-полимеразу, дНТФ, MgCl₂, ПЦР-буфер, праймеры и кДНК в количестве, эквивалентном 100 нг общей РНК. Реакции проводили в объеме 25 мкл в стандартных 96-луночных оптических планшетах (*Sarstedt AG*, Германия). Температурный профиль реакции: 95 °С – 15 с, 60 °С – 1 мин; 36 циклов. Специфичность амплификации определяли по кривой плавления. Результаты ПЦР оценивали с помощью сравнительного Ct-метода ($\Delta\Delta C_t$) согласно [11]. Экспрессию генов-мишеней нормализовали по стабильным генам β -актину и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) и представляли как относительное увеличение экспрессии в опытных клетках по сравнению с контрольными. Все праймеры были разработаны при помощи интернет-ресурса Primer-BLAST (NCBI): <http://ncbi.nlm.nih.gov> и синтезированы в Eurofins MWG Operon (Германия).

Анализ уровня секреции цитокинов. Уровень секреции цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP1 оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью коммерческих наборов фирмы SABiosciences – Qiagen SpA (Италия) в соответствии с инструкцией. Для анализа использовали культуральную среду, которая была собрана через 6 ч после добавления ЛПС и хранилась при –80 °С.

Влияние комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную лихорадку у крыс *in vivo*. Эксперименты проведены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 210–250 г. В течение недели животных приучали к условиям эксперимента во избежание изменений температуры, вызванных стрессом. В ходе эксперимента боксы с животными помещали в температурную камеру Heater Scanner LE 5650 (*Panlab*, Испания) с поддерживаемой температурой 29–30 °С, что соответствует диапазону термонейтральности для крыс. Для измерения глубокой температуры в толстой кишке животных использовали медьконстантановые термодатчики (*World Precision Instruments, Inc.*, США). Рабочий спай одной термодатчики, смазанный вазелиновым маслом, через прямую кишку вводили в толстый кишечник на глубину 7 см от ануса [12]. Регистрацию глубокой температуры тела проводили с помощью аппаратно-программного комплекса Pico (Англия). Для моделирования лихорадочного ответа в эксперименте использовали ЛПС, который вводили внутривенно (в хвостовую вену) в дозе 100 мкг/кг в стерильном ИФБ. Для тестирования влияния Рут – Fe на ЛПС-индуцированную лихорадку у крыс за 20 мин до введения пирогена животным внутрибрюшинно вводили исследуемый комплекс в дозе 12,5 мкмоль/кг (7,6 мг/кг). Контрольным крысам вводили эквивалентные объемы стерильного ИФБ вместо исследуемого комплекса и ЛПС. Каждая экспериментальная группа состояла из 6 животных. Все эксперименты с крысами проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты обрабатывали с помощью стандартной компьютерной программы Excel. Статистические данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение. Для оценки разницы между экспериментальными группами применяли t -критерий Стьюдента, значения $P < 0,05$ считались достоверными.

Результаты исследования

Способность комплекса Рут – Fe сайт-специфически катализировать разложение пероксида водорода, проявляя псевдопероксидазную активность. В настоящее время установлено, что комплексы двухвалентного железа с рядом низкомолекулярных лигандов, например ЭДТА, или нуклеотидами, катализируют реакцию Хабера – Вейса более эффективно, чем свободное железо. Образующиеся в результате данной реакции чрезвычайно реакционно-способные гидроксильные радикалы способны окислять практически все органические молекулы. Когда ионы металла связаны с лигандом, последний может стать ловушкой гидроксильных радикалов, т. е. имеет место биологически незначительная, сайт-специфическая реакция. В этом случае лиганд можно использовать как молекулу-индикатор для определения образующихся гидроксильных радикалов. Путем такого подхода было установлено, что ионы Fe²⁺ в комплексе с рутином катализируют гомолитическое разложение H₂O₂ (реакция Фентона) с образованием $\cdot\text{OH}$, которые, в свою очередь, окисляют молекулу рутина (рис. 1, а). Кинетика изменения спектров поглощения Рут при 385 нм приведена на рис. 1, б. На основании линейного участка кинетической кривой и дифференциального коэффициента экстинкции между восстановленной и окисленной формами ($\epsilon = 7,2 \cdot 10^3 \text{ (моль/л)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [13] рассчитана скорость окисления Рут, равная $(7,2 \pm 0,3) \text{ мкмоль/л} \cdot \text{мин}$ в условиях эксперимента, описанных в табл. 1.

Таблица 1

Влияние маннитола на скорость v окисления лиганда (Рут, 50 мкмоль/л) в результате разложения H_2O_2 связанными с рутином ионами Fe^{2+}

Table 1

The effect of mannitol on the rate v of ligand (Rt, 50 $\mu\text{mol/L}$) oxidation as a result of H_2O_2 decomposition by bound Fe^{2+} ions

Концентрация маннитола, ммоль/л	0,0	0,2	1,0	5,0
v , мкмоль/л · мин	$7,20 \pm 0,3$	$6,85 \pm 0,2$	$4,46 \pm 0,3$	$3,11 \pm 0,3$

Примечание. Начальная концентрация H_2O_2 равна 40 ммоль/л.

Маннитол, являющийся классической ловушкой $\cdot\text{OH}$, в концентрации, в 100 раз превышающей концентрацию Рут, ингибировал окисление последнего только в два раза (см. табл. 1). Эти данные свидетельствуют, что окисление лиганда, возникающее в результате разложения H_2O_2 связанными с рутином ионами Fe^{2+} , является сайт-специфической реакцией.

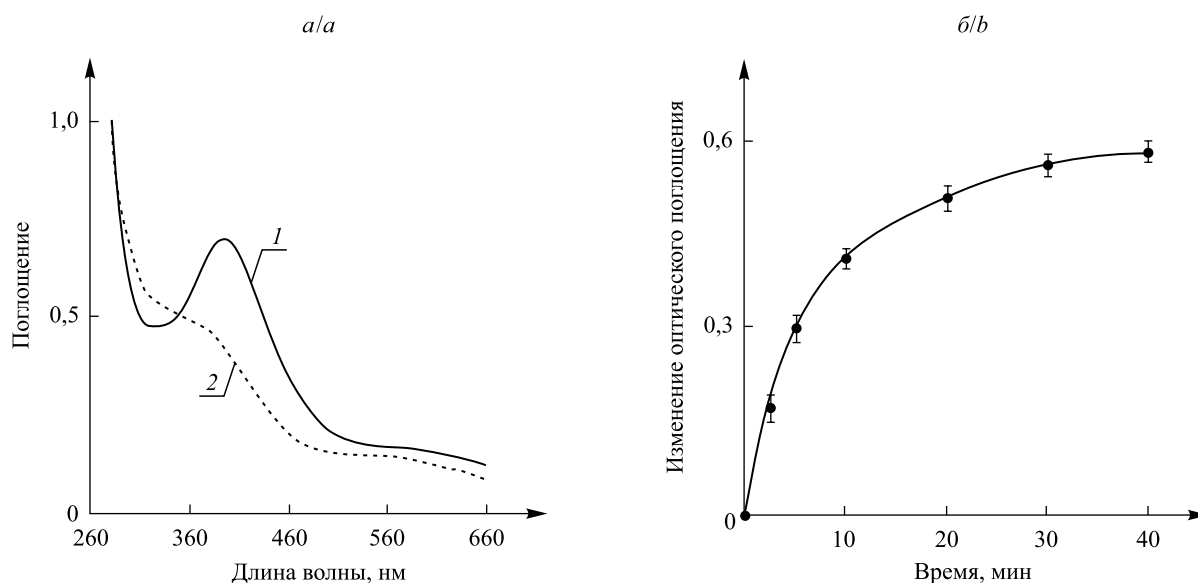


Рис. 1. Псевдопероксидазная активность комплекса Рут – Fe:
а – спектры поглощения Рут – Fe (40 мкмоль/л) до (1) и через 5 мин после (2) добавления H_2O_2 (40 ммоль/л); б – кинетика изменения поглощения при 385 нм в ходе инкубации 40 мкмоль/л Рут – Fe с 40 ммоль/л H_2O_2 ($M \pm SD$)

Fig. 1. Pseudo-peroxidase activity of Rt – Fe complex:
а – absorption spectra of Rt – Fe (40 $\mu\text{mol/L}$) recorded prior to (1) and 5 min after (2) addition of H_2O_2 (40 mmol/L); б – time course of absorption changes at 385 nm during incubation 40 $\mu\text{mol/L}$ Rt – Fe with 40 mmol/L H_2O_2 (Mean $\pm SD$)

Способность комплекса Рут – Fe взаимодействовать с пероксинитритом. Спектральными методами изучено окисление Рут и комплекса Рут – Fe пероксинитритом. Регистрировали спектры поглощения анализируемых соединений в УФ и видимой области (250–600 нм) до и через 2 мин после добавления пероксинитрита. Полученные спектральные изменения свидетельствуют, что при указанном добавлении как в молекуле Рут (рис. 2, б), так и в комплексе Рут – Fe (рис. 2, а) происходило практически полное разрушение хромофора с максимумом поглощения при 385 нм.

В последующих экспериментах для количественной оценки способности Рут и Рут – Fe взаимодействовать с пероксинитритом использовалась реакция пероксинитрит-инициируемого окисления триптофана (вещество-детектор). Как известно, данная аминокислота легко вовлекается в пероксинитрит-инициируемое окисление (гидроксилирование, нитрирование), что приводит к снижению при ней флуоресценции [14]. Установлено, что степень ингибирования Рут и комплексом Рут – Fe пероксинитрит-инициируемого окисления триптофана находится в прямой зависимости от концентрации исследуемых соединений. На основании полученных данных были построены графики зависимости степени ингибирования окислительной модификации свободного триптофана (25 мкмоль/л)

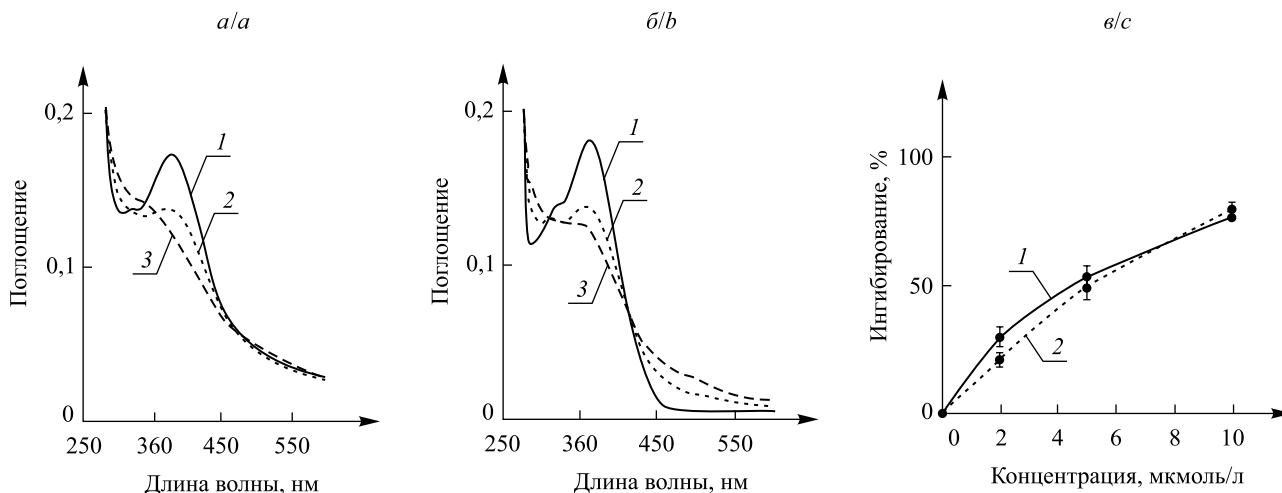


Рис. 2. Рут и комплекс Рут – Fe – scavенджеры пероксинитрита:
а, б – спектры поглощения 10 мкмоль/л Рут – Fe и Рут соответственно до (1) и через 2 мин после добавления 50 мкмоль/л (2) и 100 мкмоль/л (3) пероксинитрита;
в – концентрационные зависимости ингибирования Рут (1) и Рут – Fe (2) окисления триптофана (25 мкмоль/л) пероксинитритом (50 мкмоль/л) ($M \pm SD$)

Fig. 2. Rt and Rt – Fe complex are scavengers of peroxynitrite:
а, б – absorption spectra of 10 $\mu\text{mol/L}$ Rt – Fe and Rt respectively recorded prior to (1) and 2 min after addition 50 $\mu\text{mol/L}$ (2) and 100 $\mu\text{mol/L}$ (3) peroxynitrite;
с – concentration dependences of Rt (1) and Rt – Fe (2) inhibition of tryptophan (25 $\mu\text{mol/L}$) oxidation by peroxynitrite (50 $\mu\text{mol/L}$) (Mean $\pm SD$)

пероксинитритом (50 мкмоль/л) от концентрации Рут и его комплекса с железом (рис. 2, в) и рассчитаны значения ЭД₅₀ (эффективная доза, ингибирующая реакцию на 50 %), равные ($4,7 \pm 0,2$) мкмоль/л и ($5,0 \pm 0,2$) мкмоль/л соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что Рут является эффективной ловушкой пероксинитрита, а образование комплекса Рут – Fe не влияет на его способность связывать пероксинитрит.

Влияние Рут и Рут – Fe на ЛПС-индуцированную продукцию внутриклеточного пероксинитрита в клетках линии HUVEC. Для определения внутриклеточного уровня пероксинитрита использовался флуоресцентный зонд DHR (10 мкмоль/л). Рост уровня флуоресценции клеток после добавления ЛПС указывает на увеличение внутриклеточного содержания пероксинитрита. Последнее определяли в условных единицах и выражали в процентах по отношению к уровню в контрольных клетках, принятому за 100 %. Как видно из рис. 3, инкубация HUVEC с ЛПС в течение 1 ч приводит к небольшому, но статистически значимому увеличению уровня внутриклеточного пероксинитрита. Рут и комплекс Рут – Fe в концентрации 10 мкмоль/л, добавленные одновременно с ЛПС, полностью отменяют эффект ЛПС, снижая флуоресцентный сигнал, связанный с пероксинитритом, ниже базального уровня.

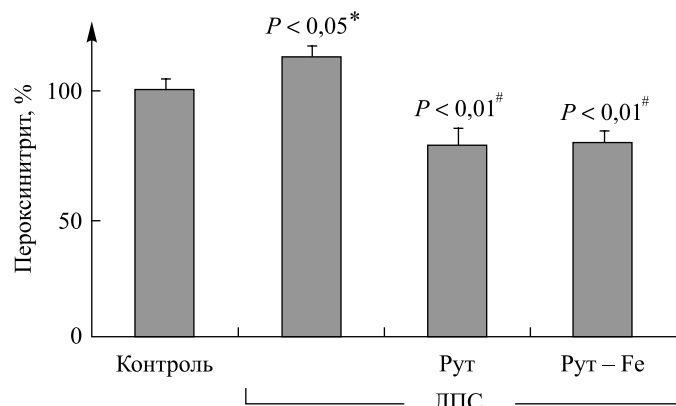


Рис. 3. Влияние 10 мкмоль/л Рут и комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную (1 мкг/мл) внутриклеточную продукцию пероксинитрита в HUVEC через 1 ч после добавления ($M \pm SD$):
* – относительно контрольной группы; # – относительно группы животных с ЛПС

Fig. 3. The effect 10 $\mu\text{mol/L}$ of Rt and Rt – Fe complex on LPS-induced intracellular peroxynitrite production in HUVEC at 1 h after addition (Mean $\pm SD$):
* – relative to the control group; # – regarding a group of animals with LPS

Способность Рут и комплекса Рут – Fe ингибировать ЛПС-индуцированные воспалительные ответы эндотелиальных клеток. Инкубация HUVEC с ЛПС (1 мкг/мл среды) в течение 6 ч приводит к существенному (до 450 раз) увеличению экспрессии мРНК (воспалительный ответ) таких провоспалительных медиаторов, как интерлейкины *TNF α* , *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1*, белки адгезии сосудистого эндотелия (*ICAM-1*, *VCAM-1*), а также мРНК индуцибельного фермента циклооксигеназы-2 (*COX2*), катализирующего образование простагландина E2 (*PGE2*) – важнейшего медиатора воспаления (табл. 2).

Установлено, что Рут в дозах 10 и 50 мкмоль/л не оказывал противовоспалительного эффекта на ЛПС-индуцированное увеличение экспрессии мРНК большинства воспалительных генов, за исключением экспрессии мРНК *TNF α* (снижение на 23,6 %). В то же время при добавлении комплекса Рут – Fe в дозе 50 мкмоль/л к ЛПС-активированным HUVEC был выявлен достоверный противовоспалительный эффект препарата в отношении экспрессии генов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1*, *COX-2* и отмечено незначительное увеличение экспрессии мРНК *TNF α* . Установлено, что как Рут, так и комплекс Рут – Fe не оказывают влияния на ЛПС-индуцированную экспрессию мРНК белков адгезии (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние Рут и комплекса Рут – Fe в дозах 50 мкмоль/л на ЛПС-индуцированную (1 мкг/мл) экспрессию мРНК воспалительных медиаторов в HUVEC через 6 ч после воздействия

Table 2

Effects of Rt and Rut – Fe in doses of 50 μ mol/L on LPS-induced (1 μ g/mL) expression of inflammatory gene (mRNA) in HUVEC in 6 h after addition

мРНК	Контроль	Рут – Fe	ЛПС	ЛПС + Рут	ЛПС + Рут – Fe
<i>TNFα</i>	1,0 \pm 0,04	1,3 \pm 0,04*	21,5 \pm 0,9*	16,5 \pm 2,3 ^π	26,6 \pm 0,9 ^π
<i>IL-6</i>	1,0 \pm 0,10	0,7 \pm 0,11 ^ε	47,6 \pm 2,2*	43,5 \pm 5,6	28,7 \pm 1,9 [#]
<i>IL-1B</i>	1,0 \pm 0,10	1,0 \pm 0,15	571,6 \pm 30,4*	494,6 \pm 68,7	367,2 \pm 39,9 [#]
<i>IL-8</i>	1,0 \pm 0,001	0,6 \pm 0,04*	457,6 \pm 19,4*	434,6 \pm 56,4	380,9 \pm 15,8 [#]
<i>MCP1</i>	1,0 \pm 0,001	0,7 \pm 0,03*	82,1 \pm 4,4*	79,0 \pm 10,3	73,9 \pm 2,4 ^π
<i>ICAM-1</i>	1,0 \pm 0,04	0,8 \pm 0,08	49,1 \pm 3,1*	54,1 \pm 7,0	53,0 \pm 5,1
<i>VCAM-1</i>	1,0 \pm 0,01	0,4 \pm 0,01*	241,9 \pm 11,8*	260,1 \pm 39,4	252,9 \pm 7,9
<i>COX2</i>	1,0 \pm 0,002	0,9 \pm 0,06 ^ε	8,2 \pm 0,7*	8,7 \pm 1,2	4,9 \pm 0,3 [#]
<i>eNOS</i>	1,0 \pm 0,001	1,5 \pm 0,07*	0,29 \pm 0,1 ^ψ	0,44 \pm 0,06 [§]	0,40 \pm 0,01 [#]
<i>NOX1</i>	1,0 \pm 0,001	1,0 \pm 0,08	0,8 \pm 0,15*	1,1 \pm 0,18	1,1 \pm 0,24

^ψ – $P < 0,05$, ^ε – $P < 0,01$, * – $P < 0,001$ относительно контрольной группы; ^π – $P < 0,05$, [§] – $P < 0,01$, [#] – $P < 0,001$ относительно группы с ЛПС.

Выявлено сильное снижение экспрессии мРНК *eNOS* в HUVEC, инкубируемых с ЛПС (1 мкг/мл) в течение 6 ч (см. табл. 2). Рут и комплекс Рут – Fe в дозах 50 мкмоль/л, добавленные к HUVEC одновременно с ЛПС, частично, но статистически достоверно восстанавливают экспрессию *eNOS*. Однако этот эффект был практически одинаков для обоих исследуемых препаратов.

Представляет интерес влияние ЛПС и изучаемых препаратов не только на уровень экспрессии мРНК воспалительных медиаторов, но и на их секрецию клеткой. Установлено, что инкубация HUVEC с ЛПС значительно повышала секрецию белков IL-6, IL-8 и MCP-1 в культуральную среду. Рут оказывал слабый эффект на ЛПС-индуцированную секрецию воспалительных цитокинов, тогда как комплекс Рут – Fe статистически достоверно снижал секрецию IL-6 и IL-8 (табл. 3).

Таким образом, комплекс Рут – Fe эффективно подавляет ЛПС-индуцированный воспалительный ответ эндотелиальных клеток, воздействуя на клеточные процессы, которые ведут к повышению продукции и секреции медиаторов воспаления.

Влияние комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную гипертермию у крыс *in vivo*. Проведена термометрия в первые 120 мин после введения крысам пирогена. Как видно из рис. 4, внутривенное введение ЛПС в дозе 100 мкг/кг вызвало значительное повышение ректальной температуры тела у крыс сразу после инъекции. В ответ на введение ЛПС зарегистрировано развитие характерного двухфазного лихорадочного ответа: пик гипертермии приходится на 30 и 90 мин наблюдения. Гипертермия,

развивающаяся при пирогенном воздействии, не является следствием стрессования животного самой процедурой инъекции, так как введение физиологического раствора не влияло на ректальную температуру тела у крыс. Предварительное (за 20 мин до введения ЛПС) внутрибрюшинное введение комплекса Рут – Fe в дозе 12,5 мкмоль/кг полностью исключало низкоамплитудную пирогенную реакцию первой фазы и сильно понижало ЛПС-индуцированное увеличение глубокой температуры тела у крыс во время второй фазы (см. рис. 4).

Таблица 3

Влияние Рут и комплекса Рут – Fe (50 мкмоль/л) на ЛПС-индуцированную (1 мкг/мл) секрецию HUVEC воспалительных медиаторов через 6 ч после воздействия

Table 3

Effects of Rt and Rut – Fe (50 μmol/L) on the LPS-induced (1 μg/mL) secretion of inflammatory cytokines by HUVEC in 6 h after addition

Цитокин, нг/мл	Контроль	Рут – Fe	ЛПС	ЛПС + Рут	ЛПС + Рут – Fe
IL-6	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,003	2,0 ± 0,3*	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,3 [§]
IL-8	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,01 [¥]	11,8 ± 1,1*	10,7 ± 0,7	8,2 ± 0,9 [§]
МСР1	0,2 ± 0,03	0,11 ± 0,02 [¥]	7,8 ± 0,4*	6,4 ± 0,2	6,6 ± 0,6

[¥] – $P < 0,05$, * – $P < 0,001$ относительно контрольной группы; [§] – $P < 0,01$ относительно группы с ЛПС.

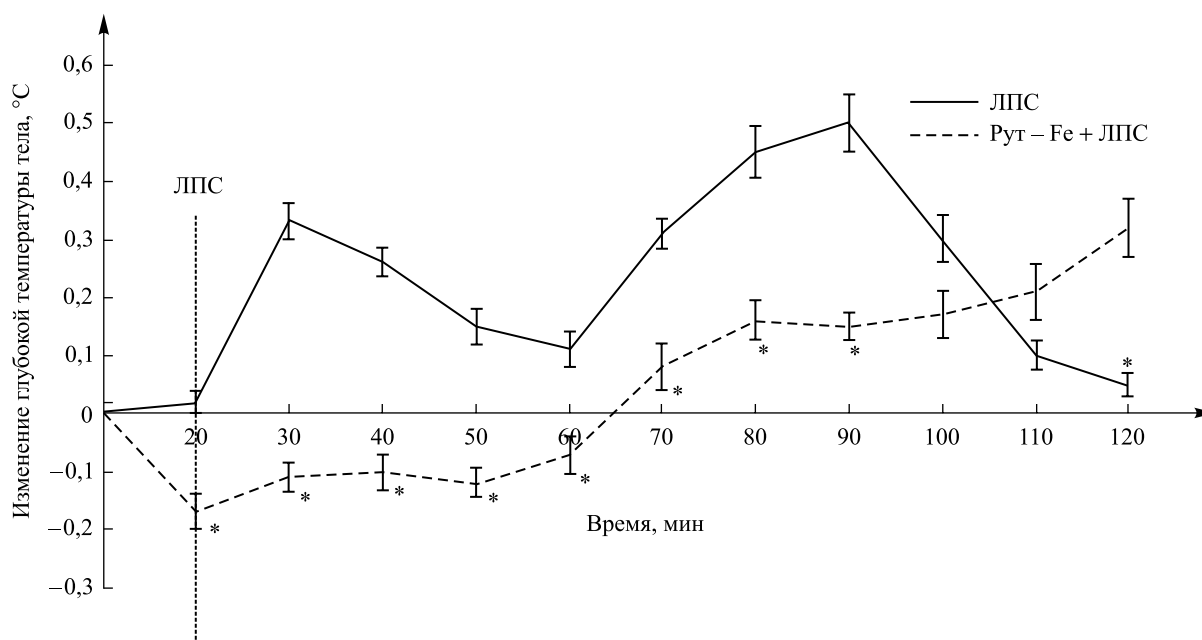


Рис. 4. Влияние предварительного введения комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную (100 мкг/кг, внутривенно) гипертермию у крыс. Рут – Fe вводили внутрибрюшинно за 20 мин до ЛПС; $n = 6$ (животных в каждой группе); * – $P < 0,05$ относительно группы животных с ЛПС

Fig. 4. Effect of previously injection of Rt – Fe complex on the rise in deep body temperature of the rats induced by LPS (100 μg/kg, intravenously). Rt – Fe was injected intraperitoneally 20 min before treatment with LPS; $n = 6$ (animals in each group); * – $P < 0.05$ regarding a group of animals with LPS

Результаты и их обсуждение

В предыдущих исследованиях показано, что рутин с Fe^{2+} образует устойчивый комплекс, обладающий более сильным цитопротекторным действием, чем исходный лиганд [7]. Эти данные послужили основанием для изучения влияния комплексообразования с Fe^{2+} на противовоспалительные свойства рутина. В качестве клеточной модели воспаления использовали ЛПС-индуцированный воспалительный ответ

HUVEC, который характеризовался существенным (до 450 раз) увеличением экспрессии мРНК провоспалительных медиаторов. В ходе исследования выявлено, что Рут не оказывал противовоспалительного эффекта на ЛПС-индуцированное увеличение экспрессии мРНК большинства провоспалительных генов, тогда как комплекс Рут – Fe достоверно снижал экспрессию генов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1*, *COX-2*. Рядом авторов показано, что IL-6 подавляет продукцию TNF- α мононуклеарными клетками крови человека [15]. Исходя из этого, можно предположить, что увеличение экспрессии мРНК *TNF α* в HUVEC, инкубируемых совместно с ЛПС и Рут – Fe, по сравнению с клетками, обработанными только ЛПС, обусловлено наличием обратной отрицательной связи между IL-6 и TNF α .

Согласно данным работы [16], ЛПС-индуцированная секреция воспалительных медиаторов может быть опосредована ROS и RNS. Наша оценка антирадикальных и антиоксидантных свойств комплекса Рут – Fe свидетельствует, что он обладает псевдопероксидазной активностью и может сайт-специфически разлагать H₂O₂: лиганд служит ловушкой образующихся гидроксильных радикалов. Кроме того, как следует из предыдущих исследований [4], комплекс Рут – Fe является гораздо более эффективной ловушкой супероксиданион-радикала, чем исходное соединение. Поэтому можно предположить, что Рут – Fe способен снижать ЛПС-индуцированную экспрессию провоспалительных генов в результате антирадикальной и антиоксидантной активности в отношении ROS. Повышение внутриклеточного уровня NO ведет к образованию целого ряда токсичных интермедиатов, одним из которых является пероксинитрит, образующийся в результате взаимодействия монооксида азота и анион-радикала кислорода. Полученные результаты свидетельствуют, что добавление ЛПС вызывало достоверное снижение экспрессии мРНК *eNOS* в HUVEC, что согласуется с данными [17]. Принимая во внимание, что ЛПС-индуцируемое снижение экспрессии мРНК *eNOS*, по-видимому, опосредовано пероксинитритом, мы предполагаем, что частичное восстановление экспрессии *eNOS* в HUVEC при добавлении Рут и комплекса Рут – Fe может быть связано с их способностью удалять внутриклеточный пероксинитрит.

В экспериментах *in vivo* изучены антипиретические эффекты Рут – Fe на фоне внутривенного введения крысам линии Wistar бактериального эндотоксина ЛПС. В ответ на такое введение зарегистрировано развитие характерного двухфазного лихорадочного ответа, что совпадает с результатами других авторов [12]. Как свидетельствуют полученные данные, предварительное введение Рут – Fe в дозе 12,5 мкмоль/кг оказывало существенное антипиретическое действие на ЛПС-индуцированную лихорадку у крыс.

Заключение

На основании данных, полученных на моделях ЛПС-индуцированного воспаления *in vitro* и *in vivo*, можно заключить, что комплекс Рут – Fe, но несвободный лиганд обладает выраженными противовоспалительными свойствами, которые могут быть обусловлены высокой антирадикальной и сайт-специфической псевдопероксидазной активностью комплекса в отношении ROS. Таким образом, комплексообразование с двухвалентным железом расширяет область возможного фармакологического применения рутина.

Библиографические ссылки / References

1. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. The endothelium in sepsis. *Shock*. 2016;45(3): 259–270. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000473.
2. Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Frontiers in Bioscience*. 2011;16(5):1986–1995. DOI: 10.2741/3835.
3. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*. 1989;38(11):1763–1769. DOI: 10.1016/0006-2952(89)90410-3.
4. Kostyuk VA, Potapovich AI, Vladykovskaya EN, Korkina LG, Afanas'ev IBA. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 2001;385(1):129–137. DOI: 10.1006/abbi.2000.2118.
5. Kostyuk VA, Potapovich AI, Strigunova EN, Kostyuk TV, Afanas'ev IB. Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 2004;428(2):204–208. DOI: 10.1016/j.abi.2004.06.008.
6. Tarahovsky YS, Kim YA, Yagolnik EA, Muzafarov EN. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2014;1838(5):1235–1246. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.01.021.
7. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kostyuk TV, Cherian MG. Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress *in vivo*. *Cellular and Molecular Biology*. 2007;53(1):61–68. DOI: 10.1170/T774.
8. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(4):1620–1624. DOI: 10.1073/pnas.87.4.1620.

9. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;16(2):149–156. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90138-4.
10. Paxinou E, Chen Q, Weisse M, Giasson BI, Norris EH, Rueter SM, et al. Induction of α -synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(20):8053–8061. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-20-08053.2001.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
12. Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005;289(5):R1244–1252. DOI: 10.1152/ajpregu.00370.2005.
13. Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1984;799(3):313–317.
14. Rebrin I, Breger C, Gallaher TK, Sohal RS. Detection and characterization of peroxynitrite-induced modifications of tyrosine, tryptophan, and methionine residues by tandem mass spectrometry. *Methods in Enzymology*. 2008;441:283–294. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)01215-9.
15. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990;75(1):40–47.
16. Gao J, Zhao WX, Zhou LJ, Zeng BX, Yao SL, Liu D, et al. Protective effects of propofol on lipopolysaccharide-activated endothelial cell barrier dysfunction. *Inflammation Research*. 2006;55(9):385–392. DOI: 10.1007/s00011-006-5116-0.
17. Lu JL, Schmiede LM, Kuo L, Liao JC. Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;225(1):1–5. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1121.

Статья поступила в редколлегию 16.11.2018.
Received by editorial board 16.11.2018.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ОРИГИНАЛЬНЫХ ЖЕВАТЕЛЬНЫХ КОМПОЗИЦИЙ В ОТНОШЕНИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ НИКОТИНСОДЕРЖАЩИХ СУБСТАНЦИЙ ТАБАКА НА НЕПОЛОВОЗРЕЛЫЙ ОРГАНИЗМ

А. В. АДАМОВИЧ¹⁾, В. В. ШЕВЛЯКОВ¹⁾, Т. М. ЮРАГА²⁾

¹⁾Научно-практический центр гигиены, ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусская медицинская академия последипломного образования,
ул. Петруся Бровки, 3, корп. 3, 220013, г. Минск, Беларусь

На экспериментальной модели субхронической оральной алкалоидизации неполовозрелых белых крыс при 59-суточном потреблении ими водного экстракта из табачных изделий в циклически возрастающих концентрациях по суммарному содержанию алкалоидов изучены потенциальные протекторные свойства разработанных оригинальных профилактических жевательных композиций (на основе мексидола, глицина, комплекса витаминов и фитоконпонентов) в отношении токсического действия комплекса растворимых субстанций табака. Результаты исследования свидетельствуют о защитном действии профилактических жевательных композиций при их двухнедельном потреблении алкалоидизированными животными на моделях продолжающегося потребления водного экстракта из табачных изделий и его прекращения, что отражалось в нормализации либо существенном улучшении нарушенных у алкалоидизированных животных морфофункциональных показателей организма интоксикационного генеза. Разработанные рецептуры профилактических жевательных композиций перспективны для медикаментозной поддержки при профилактике табакопотребления и отказе от него молодых людей и рекомендуются для дальнейшего изучения с этой целью.

Ключевые слова: табакопотребление подростками; водный экстракт из табачных изделий; профилактические жевательные композиции; протекторное действие; неполовозрелые крысы.

Образец цитирования:

Адамович АВ, Шевляков ВВ, Юрага ТМ. Экспериментальная оценка протекторных свойств оригинальных жевательных композиций в отношении токсического действия водорастворимых никотинсодержащих субстанций табака на неполовозрелый организм. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:13–24. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-13-24>

For citation:

Adamovich AV, Shevlyakov VV, Yuraha TM. Experimental evaluation of the protective properties of the original chewing compositions in relation to the toxic effect of water soluble nicotines-containing substances of the tobacco on an immature organism. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:13–24. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-13-24>

Авторы:

Анна Валерьевна Адамович – младший научный сотрудник лаборатории микробиологии.

Виталий Васильевич Шевляков – доктор медицинских наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории промышленной токсикологии.

Тамара Михайловна Юрага – старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории.

Authors:

Anna V. Adamovich, junior researcher at the laboratory of microbiology.

sona_seg@mail.ru

Vitalii V. Shevlyakov, doctor of science (medicine), full professor; chief researcher at the laboratory of industrial toxicology. shev-vitaliy@mail.ru

Tamara M. Yuraha, senior researcher at the research laboratory.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE PROTECTIVE PROPERTIES OF THE ORIGINAL CHEWING COMPOSITIONS IN RELATION TO THE TOXIC EFFECT OF WATER SOLUBLE NICOTOS-CONTAINING SUBSTANCES OF THE TOBACCO ON AN IMMATURE ORGANISM

A. V. ADAMOVICH^a, V. V. SHEVLYAKOV^a, T. M. YURAHА^b

^aScientific Practical Centre of Hygiene, 8 Akademičnaja Street, Minsk 220012, Belarus

^bBelarusian Medical Academy of Postgraduate Education,
3 Petrusia Broŭki Street, 3 building, Minsk 220013, Belarus

Corresponding author: A. V. Adamovich (sona_seg@mail.ru)

On the experimental model of subchronic oral alkaloidization of immature white rats with their 59-daily consumption of aqueous extract from tobacco products in cyclically increasing concentrations of the total alkaloids, the potential protective properties of the developed original prophylactic chewable compositions (based on mexidol, glycine, vitamin complex and phytocomponents) in relation to toxic effect of the complex of soluble substances of tobacco were studied. The results of the study testify to the protective effect of prophylactic chewable compositions with their 2-week consumption of alkaloidized animals on models of continuing consumption of aqueous extract from tobacco products and its termination, which was reflected in the normalization or significant improvement of morphofunctional indicators of the organism of intoxication genesis in alkaloidized animals. The developed formulations of prophylactic chewable compositions are promising for drug support in the prevention and cessation of tobacco use by young people and are recommended for further study for this purpose.

Key words: tobacco consumption by adolescents; water extract from tobacco products; prophylactic chewing compositions; protective effect; immature rats.

Введение

Одной из наиболее острых проблем общественного здоровья для всех стран, включая Беларусь, является увеличение доли табакопотребителей среди подростков и молодежи, снижение возраста начала употребления психоактивных веществ, в первую очередь никотина [1–4]. Серьезную озабоченность в настоящее время вызывает возрастание среди несовершеннолетней молодежи употребления некурительных видов табачных изделий (далее – НТИ): жевательного и нюхательного табака, насвая и подобных смесей (в основном кустарно изготавливаемые смеси веществ, содержащие табак или табачную пыль, часто и легкие наркотики), которые позиционируются как заменители сигарет либо даже как средства отвыкания от курения. Однако употребление НТИ характеризуется еще более быстрым формированием аддикции, что обусловлено наличием в их составе не только никотина, но и биологически активных веществ, способствующих его лучшему усвоению [5].

Табакопотребление в подростковом и молодом возрасте, как правило, характеризуется эпизодичностью, небольшим стажем, интенсивностью и зачастую – отсутствием физической никотинозависимости. Тем не менее даже у подростков с небольшим стажем табакопотребления (0,5–2,0 года) имеют место физиологические нарушения [6; 7]. Большинство из них являются обратимыми, что определяет особую важность своевременной медицинской профилактики нарушений в растущем и развивающемся молодом организме, обусловленных табакопотреблением.

Современная медицина располагает достаточно широким арсеналом методов и средств лечения никотиновой зависимости. Однако большинство из них ориентировано преимущественно на взрослый контингент курильщиков с большим стажем и интенсивностью курения, а также, как правило, выраженной физической зависимостью, что делает их нежелательными или неприемлемыми для применения у лиц молодого возраста. Поэтому актуальна разработка лечебно-профилактических средств, способствующих нормализации нарушений интоксикационного генеза и повышению резистентности организма и перспективных для медикаментозной поддержки при профилактике табакопотребления и отказе от него молодых людей.

Путем аналитического подбора компонентов с необходимыми позитивными свойствами разработаны рецептуры профилактических жевательных композиций (далее – ПЖК), основой которых являются лекарственные средства мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат) и глицин, предназначенные для коррекции основных патогенетических механизмов (гипоксия и гипоксэргоз) токсического действия субстанций табака на неполовозрелый организм, комплекс витаминов (В₁, В₂, В₉, С, Е) и лекарственных растений (кипрей узколистный, тимьян, мята перечная) для повышения микронутриентной

обеспеченности и адаптационной способности организма. Кроме того, с учетом субъективной мотивации релаксирующего либо стимулирующего эффекта табакопотребления молодежью в рецептуру ПЖК-1 с преимущественно седативным действием включены шалфей и Melissa лекарственные, пустырник, а в рецептуру ПЖК-2 с преимущественно стимулирующим (адаптогенным) эффектом – плоды лимонника, корни родиолы розовой¹.

В острых, подострых и хронических экспериментах лабораторные образцы ПЖК-1 и ПЖК-2 даже в высоких суточных дозировках (в 2, 3, 5 и 10 раз выше предполагаемой терапевтической нормы по мексидолу) не оказывали раздражающего кожу и слизистые оболочки, а также существенного токсического и кумулятивного действия. Выявленные у опытных животных сдвиги отдельных функциональных показателей были сходны с таковыми на воздействие мексидола и отражали его фармакологическую активность в составе ПЖК [8–11]. В модифицированном тесте Эймса – планшетном FAT-тесте – водные экстракты фитокомпозиций, входящих в рецептуры ПЖК-1 и ПЖК-2, показали выраженный антимуtagenный эффект, проявляющийся в снижении частоты обратных мутаций как по отношению к уровню индуцированных мутаций водного экстракта из табачных изделий (далее – ВЭТИ), так и к стандартному мутагену азиду натрия, опосредовали умеренную антимуtagenную активность фармкомпозиций и выраженное антимуtagenное действие экстракта из ПЖК-2 в отношении экстракта из табака.

Следующим необходимым этапом доклинических исследований являлось экспериментальное определение потенциальных протекторных свойств ПЖК в отношении токсического действия комплекса растворимых субстанций табака.

Цель работы – оценить возможные протекторные свойства оригинальных профилактических жевательных композиций в отношении токсического действия комплекса растворимых субстанций табака на экспериментальной модели субхронической оральной алкалоидизации неполовозрелых белых крыс.

Материалы и методы исследования

Изучение антиинтоксикационных свойств оригинальных ПЖК осуществляли на разработанной экспериментальной модели субхронической оральной алкалоидизации неполовозрелых белых крыс (модификация метода [12]), которая заключается в замене питьевой воды ВЭТИ, к которому животные имели неограниченный доступ в течение 45-суточного эксперимента. Для моделирования возрастающей толерантности к никотину и с учетом режима доступа животных к питью *ad libitum* проводили корректировку алкалоидной нагрузки, используя ВЭТИ в циклически нарастающих (каждые 6–7 дней эксперимента) концентрациях никотинсодержащих субстанций, которые увеличивали от 0,24 мг/см³ (на первой неделе) до 2,81 мг/см³ (на седьмой неделе) по суммарному содержанию алкалоидов (далее – ССА) [13; 14].

Данная методика имитирует естественный алиментарный путь поступления в организм комплекса растворимых никотинсодержащих субстанций табака в результате их всасывания через слизистую ротовой полости и желудочно-кишечного тракта (как при потреблении НТИ или частично при табакокурении). Увеличение суммарной алкалоидной нагрузки в течение эксперимента воспроизводит процесс формирования начальной стадии измененной реактивности и никотиновой аддикции (интоксикация, повышение толерантности, обсессивно-компульсивное влечение).

Метод приготовления ВЭТИ следующий: из разных упаковочных единиц сигаретных изделий с содержанием никотина 1 мг и смолистых веществ в количестве 11–14 мг на сигарету отбирали 20 г табака, из которых готовили навески от 0,6 до 9,2 г в зависимости от необходимой концентрации ССА в ВЭТИ. Навеску помещали в плотно закрывающуюся мерную емкость и заливали горячей дистиллированной водой ($t = 95–100\text{ }^{\circ}\text{C}$) в объеме 200 см³. Емкость закрывали и помещали в термостат при температуре 40 °C на 1 ч при периодическом встряхивании. ВЭТИ подвергали фильтрации, до использования хранили в холодильнике. Приготовление экстракта проводили не реже одного раза в три дня.

Возможность минимизации негативных эффектов, обусловленных длительным воздействием комплекса токсикантов табачных изделий, с помощью разработанных ПЖК была исследована в экспериментах с использованием неполовозрелых белых крыс, алкалоидизированных по стандартной методике в течение 45-суточного и дополнительного 14-суточного орального потребления ВЭТИ (опытная группа 2).

Согласно дизайну эксперимента после завершения 45-суточной алкалоидизации или на фоне ее продолжения опытным белым крысам ежедневно в течение двух недель скармливали ПЖК с кормом в дозах, соответствующих предполагаемой суточной терапевтической дозе (исходя из 3–4 единиц ПЖК в сутки на 50 кг массы тела подростка при курсе лечения длительностью 2 недели). Суточная доза

¹ Жевательная композиция с антеникотинным эффектом : пат. 10681 С1 Респ. Беларусь, МПК (2006) А 61 К 9/68, А 61 Р 25/00 / Е. А. Римжа, А. В. Бокач, И. В. Тарасюк ; заявитель ГУО «БелМАПО». № 20061110 ; заявл. 09.11.06 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. 2008. № 3. С. 59 ; Антеникотинная жевательная композиция : пат. 10682 С1 Респ. Беларусь, МПК (2006) А 61 К 9/68, А 61 Р 25/00 / Е. А. Римжа, А. В. Бокач, И. В. Тарасюк ; заявитель ГУО «БелМАПО». № 20061111 ; заявл. 09.11.06 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. 2008. № 3. С. 61.

ПЖК, рассчитанная с учетом общей массы опытных животных в каждой клетке, составила в среднем 10 мг/кг массы опытной крысы (в пересчете по 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинату – мексидолу).

Протекторное действие композиций исследовали на модели продолжающегося табакопотребления (опытные группы 3 и 4 – потребление композиций опытными животными на фоне продолжающегося орального воздействия ВЭТИ), а также дополнительно оценивали защитное действие ПЖК на модели прекращения табакопотребления (опытные группы 5 и 6 – потребление композиций опытными животными после завершения 45-суточной экспериментальной алкалоидизации) в сравнении с аггравированными условиями пролонгированной алкалоидизации животных опытной группы 2 (табл. 1).

Таблица 1

Схема исследования протекторного действия композиций

Table 1

Scheme of the study of the protective action of the compositions

Группы сравнения	Характеристика экспериментальных групп	
	Питьевой режим	Испытуемая ПЖК
Контрольная 1: интактные животные	Вода	–
Опытная 2: алкалоидизированные животные + двухнедельное потребление ВЭТИ	ВЭТИ	–
Опытная 3: алкалоидизированные животные + двухнедельное потребление ПЖК-1 и ВЭТИ	ВЭТИ	ПЖК-1
Опытная 4: алкалоидизированные животные + двухнедельное потребление ПЖК-2 и ВЭТИ	ВЭТИ	ПЖК-2
Опытная 5: алкалоидизированные животные + двухнедельное потребление ПЖК-1	Вода	ПЖК-1
Опытная 6: алкалоидизированные животные + двухнедельное потребление ПЖК-2	Вода	ПЖК-2

Из здоровых неполовозрелых белых крыс (массой 70–90 г), содержащихся на стандартном рационе питания вивария, активных, хорошо поедающих корм, с гладким и блестящим шерстным покровом, нормальной окраской видимых слизистых оболочек, формировали однородные по массе (разница не более 10 %), полу, поведению и состоянию группы из 7–8 животных в каждой. Наблюдение за экспериментальными животными и контроль их состояния проводили в течение всего срока, предусмотренного экспериментом. Условия обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных из опыта соответствовали этическим принципам надлежащей лабораторной практики², гуманистическим принципам и требованиям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, принятой в Страсбурге 18 марта 1986 г.

На различных этапах эксперимента исследовали динамику массы тела, мочу и этологические индексы животных. Последние изучали в тесте «Открытое поле», регистрируя в течение 5 мин показатели горизонтальной и вертикальной двигательной активности, исследовательской активности, эмоциональную составляющую поведения, а также продолжительность неактивного времени [15; 16]. Индивидуальные поведенческие реакции оценивали по двум интегральным показателям: исследовательской активности (далее – ИА) и интегральному уровню тревожности (далее – ИУТ).

Для оценки ИА учитывали суммарный вклад таких показателей, как латентный период выхода из центра (ЛП, секунды), время общей двигательной активности (ДА, секунды), число обследованных норок (НР), число вертикальных стоек с опорой (ВСУ), без опоры (ВС) и вертикальных стоек с заглядыванием (ВСЗ), число выходов в центр поля (ВЦ). Сумма баллов рассчитывалась по формуле [16]

$$IA = -0,5ЛП + 0,1ДА + 1,5НР + 2ВСУ + 3ВС + 3,5ВСЗ + 5ВЦ.$$

При расчете интегрального уровня тревожности принимали во внимание число коротких грумингов (Г), актов урикации (У) и дефекации (Д), наличие нетипичных форм поведения (НП): издаваемые звуки, попытки выбраться из установки и др. Сумма баллов рассчитывалась по формуле [16]

$$ИУТ = 1Г + 1,5Д + 2У + 4НП.$$

²Надлежащая лабораторная практика : техн. кодекс установленной практики 125-2008 (02040).

Из эксперимента животных выводили путем одномоментной декапитации на фоне тиопенталового наркоза, после чего отбирали биоматериал для дальнейших исследований (кровь, образцы внутренних органов). После вскрытия внутренние органы экспериментальных животных взвешивали с последующим расчетом относительных коэффициентов масс органов (ОКМ = (масса органа / масса животного) × 100).

Биохимический анализ сыворотки крови проводили на автоматическом биохимическом анализаторе Dialab Autolyzer (*Dialab*, Австрия) с использованием готовых диагностических биохимических наборов фирмы *Cormay* (Польша) с количественным определением показателей общего белка, мочевины, креатинина, активности ферментов аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), содержания малонового диальдегида (МДА). Соотношение белковых фракций сыворотки крови (альбумина, α_1 -глобулина, α_2 -глобулина, β -глобулина, γ -глобулина) определяли электрофоретически в геле агарозы с последующей количественной оценкой на денситометре DMT-2120 (ЗАО «Спектроскопия, оптика и лазеры – авангардные разработки», Беларусь).

Биохимические показатели мочи определяли с использованием экспресс-теста EM-COMBINA 10 (*Empol*, Польша).

Полученные результаты опытов подвергали анализу общеизвестными методами вариационной статистики. Исходя из характера и численности выборок, в работе использован непараметрический критерий Крускала – Уоллиса с последующим использованием критерия Ньюмена – Кейлса в качестве анализа *post-hoc*.

Экспериментальные данные выражали в когерентных единицах СИ. Количественные параметры представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (LQ; UQ). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез был принят $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Пролонгированное (59-суточное) воздействие растворимых субстанций табака сопровождалось усилением системного токсического действия на организм по сравнению с данными, полученными в предыдущих исследованиях при стандартной 45-суточной алкалоидизации неполовозрелых белых крыс [13; 14; 17]. Оно проявлялось более выраженным снижением у опытных животных массы тела и ее прироста, а также снижением отдельных ОКМ внутренних органов – печени, селезенки, почек и желудка (табл. 2), статистически значимыми изменениями большинства из изученных биохимических показателей крови и мочи по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Так, снижение массы тела наблюдалось уже у половины дополнительно алкалоидизированных животных, причем отрицательный прирост достигал 26,0 %.

В сыворотке крови алкалоидизированных животных по сравнению с контрольной группой статистически значимо были повышены уровни креатинина, малонового диальдегида, активности лактатдегидрогеназы, относительное содержание фракции α_1 -глобулинов, снижено относительное содержание фракций β - и γ -глобулинов. Кроме того, более длительное воздействие компонентов ВЭТИ привело к выраженной тенденции снижения (на 24,6 %) концентрации мочевины в сыворотке крови опытных крыс группы 2.

Таблица 2

Интегральные показатели у интактных
и дополнительно алкалоидизированных белых крыс

Table 2

Integral indicators in intact and additionally alkaloidized white rats

Показатели	Группы сравнения (Me (LQ; UQ))	
	Контрольная 1 (n = 8)	Опытная 2 (n = 7)
Прирост массы тела, %	8,8 (7,9; 10,8)	3,5 (-18,5; 11,5)**
ОКМ внутренних органов		
Печени	4,21 (3,88; 4,66)	2,99 (2,86; 3,20)**
Сердца	0,35 (0,34; 0,36)	0,31 (0,3; 0,32)
Селезенки	0,58 (0,46; 0,67)	0,19 (0,16; 0,2)**
Почек	0,66 (0,63; 0,82)	0,58 (0,57; 0,61)*
Надпочечников	0,04 (0,04; 0,04)	0,04 (0,03; 0,04)
Желудка	0,97 (0,85; 1,06)	0,51 (0,49; 0,55)**

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$; ** при $p \leq 0,01$.

Таблица 3

Биохимические показатели сыворотки крови и мочи интактных
и дополнительно алкалоидизированных животных

Table 3

Biochemical parameters of blood serum and urine of intact
and additionally alkaloidized animals

Показатели	Группы сравнения (Me (LQ; UQ))	
	Контрольная 1 (n = 21)	Опытная 2 (n = 6)
Биохимическое исследование сыворотки крови		
Общий белок, г/л	66,7 (60,8; 70,2)	66,9 (66,7; 69,7)
Мочевина, ммоль/л	7,7 (5,9; 8,8)	5,8 (5,2; 6,1)
Креатинин, мкмоль/л	46,4 (43,4; 51,5)	68,2 (67,2; 71,7)**
АлАТ, Е/л	76,8 (72,1; 95,5)	74,8 (71,3; 82,1)
АсАТ, Е/л	243,6 (187,7; 281,7)	260,8 (256,0; 279,0)
ЛДГ, Е/л	2642,0 (2033,4; 2897,7)	4808,4 (4806,3; 5408,2)**
МДА, мкмоль/л	7,5 (7,2; 7,8)	9,9 (8,9; 10,1)**
Альбумин, %	38,4 (34,2; 41,6)	36,7 (36,6; 36,9)
α_1 -Глобулин, %	8,8 (7,0; 10,4)	21,8 (21,6; 22,0)**
α_2 -Глобулин, %	6,4 (5,1; 9,4)	7,8 (7,6; 8,0)
β -Глобулин, %	24,2 (22,4; 26,6)	18,3 (18,2; 19,2)**
γ -Глобулин, %	20,2 (16,5; 25,0)	15,2 (13,5; 16,3)*
Биохимическое исследование мочи		
Уробилиноген, мкмоль/л	1,6 (0,0; 8,80)	16,0 (16,0; 16,0)**
Кетоны, мкмоль/л	0,0 (0,0; 0,0)	0,5 (0,5; 0,5)*
Белок, г/л	0,0 (0,0; 0,30)	3,0 (1,0; 3,0)**
Плотность, г/мл	1,025 (1,025; 1,03)	1,03 (1,03; 1,03)
pH	6,0 (6,0; 6,5)	5,75 (5,5; 6,0)
Суточный диурез, мл	8,5 (6,0; 12,5)	2,25 (2,0; 2,5)**

*Различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$; ** при $p \leq 0,01$.

В моче опытных животных группы 2 обнаружены кетоны, высокое содержание белка, повышенное количество уробилиногена. Также можно отметить тенденцию к некоторому изменению pH мочи алкалоидизированных животных в сторону закисления на фоне значительного снижения суточного диуреза. Присутствия глюкозы, билирубина, эритроцитов и лейкоцитов в моче животных всех групп выявлено не было.

Данные биохимического исследования в совокупности с установленными изменениями массы тела и ОКМ внутренних органов свидетельствуют о морфофункциональных нарушениях печени, почек, активации перекисного окисления липидов и возможном негативном влиянии субстанций табака на систему иммунитета. В то же время, учитывая длительность воздействия ВЭТИ и характер вышеописанных изменений, можно предположить, что подобная системная реакция организма не является проявлением критических метаболических нарушений либо необратимых патологических изменений в органах и тканях. Это, в свою очередь, создает предпосылки для их фармакологической коррекции.

Анализ динамики прироста массы тела опытных животных групп 3–6 (табл. 4) показал, что потребление композиций, независимо от питьевого режима, увеличивало прирост массы тела животных этих групп по сравнению с алкалоидизированными. Так, темп прибавки массы тела у опытных животных со стандартным питьевым режимом (группы 5 и 6) составлял 7,3–24,0 %, а у животных, получавших в качестве питья ВЭТИ (группы 3 и 4), был 1,4–19,6 %, но также достоверно превышал таковой показатель у животных опытной группы 2. При этом отрицательного прироста массы тела опытных животных, потреблявших ПЖК, зафиксировано не было.

Таблица 4

**Интегральные показатели у белых крыс опытных групп
при исследовании протекторного действия ПЖК**

Table 4

**Integral indicators in white rats of experimental groups
in the study of the protective effect of prophylactic chewable compositions**

Показатели	Группы сравнения (Ме (LQ; UQ))			
	Группа 3 (n = 7)	Группа 4 (n = 7)	Группа 5 (n = 7)	Группа 6 (n = 7)
Прирост массы тела, %	8,7 (3,8; 16,7) [•]	10,1 (7,7; 11,8) [•]	15,7 (13,7; 17,2) ^{••}	9,5 (8,6; 13,1) [•]
ОКМ внутренних органов				
Печени	3,24 ^{**} (2,94; 3,57)	3,60 (3,29; 3,87)	3,71 (3,65; 3,81)	3,55 (2,7; 4,77)
Сердца	0,36 (0,32; 0,37)	0,32 (0,32; 0,37)	0,37 (0,35; 0,38)	0,34 (0,31; 0,39)
Селезенки	0,22 ^{**} (0,21; 0,27)	0,23 ^{**} (0,17; 0,3)	0,27 ^{**} (0,24; 0,3)	0,31 ^{**} (0,21; 0,32)
Почек	0,66 (0,61; 0,74)	0,61 (0,58; 0,65)	0,61 (0,59; 0,62)	0,68 (0,61; 0,71)
Надпочечников	0,03 (0,03; 0,03)	0,02 (0,02; 0,03)	0,03 (0,02; 0,03)	0,03 (0,03; 0,04)
Желудка	0,60 ^{**} (0,51; 0,65)	0,55 ^{**} (0,49; 0,63)	0,68 ^{**} (0,65; 0,72) [•]	0,67 ^{**} (0,55; 0,71)

Примечание. Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой: * – при $p \leq 0,05$, ** – при $p \leq 0,01$; с опытной группой 2: [•] – при $p \leq 0,05$, ^{••} – при $p \leq 0,01$.

Кроме того, после двухнедельного курса ПЖК у опытных животных ОКМ печени (группа 3), селезенки и желудка (группы 3–6) хоть и оставались достоверно ниже таковых показателей в контрольной группе, но наблюдалась тенденция к их увеличению по сравнению с аналогичными показателями у крыс группы 2 в среднем на 16,2–39,5 %, более выраженная на фоне отсутствия дополнительной алкалоидной нагрузки (группы 5 и 6). Величины ОКМ других внутренних органов не имели статистических отличий от аналогичных показателей в группе интактного контроля.

Как видно из представленных в табл. 5 результатов, применение ПЖК привело к динамическим сдвигам ряда анализируемых биохимических показателей различной степени выраженности.

Таблица 5

**Биохимические показатели сыворотки крови и мочи белых крыс
опытных групп при исследовании протекторного действия ПЖК**

Table 5

**Biochemical parameters of blood serum and urine of white rats of the experimental groups
in the study of the protective effect of prophylactic chewable compositions**

Показатели	Опытные группы (Ме (LQ; UQ))			
	Группа 3 (n = 6)	Группа 4 (n = 6)	Группа 5 (n = 6)	Группа 6 (n = 6)
Биохимическое исследование сыворотки крови				
Общий белок, г/л	68,0 (64,8; 68,7)	66,0 (63,8; 75,9)	70,8 (66,4; 71,1)	70,2 (68,5; 71,1)
Мочевина, ммоль/л	6,9 (6,3; 7,2)	6,8 (6,7; 7,0)	6,4 (6,3; 6,8)	6,8 (6,1; 7,2)
Креатинин, мкмоль/л	57,9 [*] (54,9; 61,5) [•]	59,9 [*] (58,0; 63,1)	56,3 [*] (54,8; 61,2) [•]	56,0 [*] (52,0; 60,8) [•]
АлАТ, Е/л	84,6 (84,4; 88,1)	82,8 (77,9; 100,5)	78,9 (74,3; 83,9)	72,9 (54,9; 73,9)

Показатели	Опытные группы (Ме (LQ; UQ))			
	Группа 3 (n = 6)	Группа 4 (n = 6)	Группа 5 (n = 6)	Группа 6 (n = 6)
Биохимическое исследование сыворотки крови				
АсАТ, Е/л	276,2 (265,5; 290,8)	311,3 (238,2; 361,3)	277,3 (256,4; 311,3)	245,9 (216,4; 308,4)
ЛДГ, Е/л	4529,1** (4331,0; 4712,0)	3736,7 (3443,8; 4600,0)	4695,7** (4525,0; 5218,9)	4292,3* (3980,6; 5319,1)
МДА, мкмоль/л	7,4 (7,0; 7,7)**	7,0 (6,8; 7,5)**	9,2** (7,9; 9,4)*	7,7 (7,4; 8,2)**
Альбумин, %	41,8 (40,8; 42,8)	37,4 (37,1; 37,8)	40,2 (39,8; 43,6)	41,1 (38,2; 41,6)
α ₁ -Глобулин, %	18,0** (17,3; 19,0)*	19,7** (18,6; 21,0)	16,2** (16,0; 16,5)**	15,9** (15,6; 16,4)**
α ₂ -Глобулин, %	8,3 (7,3; 9,8)	9,8 (9,6; 10,0)	8,0 (7,6; 8,2)	7,7 (7,6; 8,0)
β-Глобулин, %	20,8* (18,6; 21,5)	20,2* (19,7; 21,3)	18,3* (17,6; 18,8)	22,3 (21,6; 23,0)*
γ-Глобулин, %	11,5** (11,2; 11,8)	12,9** (11,0; 13,5)	17,0* (14,2; 17,3)	12,3** (12,0; 12,5)
Биохимическое исследование мочи				
Уробилиноген, мкмоль/л	1,6 (1,6; 1,6)**	1,6 (1,6; 1,6)**	1,6 (1,6; 1,6)**	1,6 (1,6; 1,6)**
Кетоны, мкмоль/л	0,0 (0,0; 0,0)**	0,0 (0,0; 0,0)**	0,0 (0,0; 0,0)**	0,0 (0,0; 0,0)**
Белок, г/л	1,0 (0,3; 1,0)**	0,3 (0,0; 1,0)**	0,0 (0,0; 0,0)**	1,0 (0,0; 1,0)**
Плотность, г/мл	1,03 (1,03; 1,03)	1,028 (1,025; 1,03)	1,025 (1,025; 1,025)*	1,03 (1,025; 1,03)
pH	6,0 (6,0; 6,0)*	6,3 (6,0; 6,5)**	6,0 (6,0; 6,5)*	6,3 (6,0; 6,0)*
Суточный диурез, мл	5,0 (5,0; 6,0)	7,5 (6,0; 8,0)	13,3 (10,0; 15,0)*	5,3 (4,0; 22,0)*

Примечание. Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой: * – при $p \leq 0,05$, ** – при $p \leq 0,01$; с опытной группой 2: • – при $p \leq 0,05$, ** – при $p \leq 0,01$.

В частности, после 14 сут воздействия ПЖК концентрация креатинина в сыворотке крови у опытных животных групп 3–6 была достаточно высокой относительно контрольных значений, но при этом существенно более низкой по сравнению с животными опытной группы 2. Причем у животных, получавших ПЖК-1, это уменьшение было статистически значимым как при потреблении воды, так и на фоне продолжающейся алкалоидизации.

Аналогичные тенденции были отмечены и для активности фермента ЛДГ, которая в сыворотке крови животных опытных групп 3, 5, 6 была достоверно выше по отношению к контролю, но на 2,3–10,7 % более низкой, а у животных опытной группы 4 – на 22,3 % ниже по сравнению с аналогичным показателем в группе алкалоидизированных животных.

Наиболее выраженное нормализующее действие ПЖК отмечалось в отношении маркера процессов перекисного окисления липидов – концентрации малонового диальдегида. Так, концентрация МДА в сыворотке крови опытных животных групп 3, 4, 6 по окончании эксперимента была сопоставима с аналогичным показателем контрольных животных. Только у животных опытной группы 5 содержание МДА в сыворотке крови оставалось повышенным по отношению к контролю, но при этом снижение его уровня, по сравнению с животными группы 2, также было статистически значимо.

Потребление ПЖК алкалоидизированными животными приводило к некоторому перераспределению белковых фракций в сыворотке крови: относительное содержание α₁-глобулиновой фракции заметно

уменьшилось (особенно на фоне отсутствия дополнительной алкалоидной нагрузки) при сохранении тенденции к снижению относительного содержания β - и γ -глобулиновых фракций в сыворотке крови животных опытных групп 3–6.

Позитивные сдвиги были отмечены и при исследовании образцов мочи опытных животных групп 3–6: независимо от питьевого режима содержание уробилиногена, белка и кетонов в моче находилось на уровнях показателей контрольных животных. Во всех группах опытных животных суточный диурез был выше, чем у алкалоидизированных крыс. При этом у животных групп 5, 6, находившихся на стандартном питьевом режиме, это увеличение было статистически значимым. Даже у опытных крыс групп 3 и 4 на фоне продолжающейся алкалоидной нагрузки суточный диурез был в 2–3 раза выше, чем у животных группы 2, находившихся на аналогичном режиме выпашивания.

Данные исследования мочи согласуются с результатами биохимического исследования крови опытных животных (тенденция к нормализации уровня мочевины и креатинина, снижение МДА до контрольных значений и др.), что свидетельствует о значимом улучшении функционирования гепатобилиарной и мочевыделительной систем алкалоидизированных животных при потреблении ПЖК.

Можно предположить, что корригирующее действие ПЖК обусловлено комбинированным воздействием компонентов, входящих в состав композиций, оказывающих многоплановое нормализующее действие на основные патологические состояния, обусловленные табакопотреблением, прежде всего гипоксию и гипоэргоз. В частности, благодаря мультифакторным механизмам действия глицин и 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат при поступлении в организм приводят к снижению продукции свободных радикалов, оказывая антиоксидантное и выраженное гепато- и нефропротекторное действие³ [18–22]. Мексидол, как модулятор компенсаторных метаболических потоков, активизирует ферментативные процессы цикла Кребса (сукцинатаксидазное звено), способствует утилизации глюкозы, синтезу и внутриклеточному накоплению АТФ и др. [18; 21; 22]. Это, наряду с улучшением микронутриентной обеспеченности, позволяет сохранить энергосинтезирующую функцию клеток при обусловленных гипоксией начальных нарушениях энергетического обмена, а также способствует минимизации негативного токсического влияния субстанций табака на организм [21–24].

Поскольку различные рецептуры ПЖК предполагали разнонаправленное действие на ЦНС (ПЖК-1 – седативное, ПЖК-2 – адаптогенное), определенный интерес представляло исследование влияния применения композиций на основные поведенческие характеристики опытных животных (табл. 6).

Таблица 6

Интегральные показатели индивидуальных поведенческих реакций у подопытных животных при исследовании корригирующего действия ПЖК

Table 6

Integral indicators of individual behavioral reactions in experimental animals in the study of corrective actions of acid

Показатели	Группы сравнения, индекс показателей (Ме (LQ; UQ))					
	Группа 1 (n = 16)	Группа 2 (n = 6)	Группа 3 (n = 6)	Группа 4 (n = 6)	Группа 5 (n = 6)	Группа 6 (n = 6)
Исследовательская активность	45,6 (33,9; 56,8)	50,7 (46,5; 56,5)	42,5 (20,5; 66,0)	56,8 (49,5; 61,0)	33,2 (29,0; 48,0)	46,5 (36,5; 53,5)
Интегральный уровень тревожности	1,0 (1,0; 2,5)	1,5 (0,0; 2,0)	0,0 (0,0; 1,5)	1,0 (1,0; 1,8)	1,0 (1,0; 2,0)	1,3 (0,3; 1,9)

Как видно из представленных данных, к окончанию экспериментов статистически значимых отклонений интегральных этологических индексов ни в одной опытной группе по сравнению с интактными животными не отмечено. Тем не менее у животных, получавших в течение двух недель ПЖК-1 (группы 3 и 5), наблюдалась характерная тенденция к снижению исследовательской активности, более выраженная на фоне отсутствия дополнительной алкалоидной нагрузки. Так, в группе 5 установлено уменьшение ИА на 27,2 и 34,5 % относительно интактных и алкалоидизированных животных соответственно. В группе 3 эти изменения менее выражены, что может быть связано со стимулирующим действием никотина и прочих компонентов ВЭТИ. Снижение индекса ИА, вклад в который вносят показатели двигательной активности и норкового рефлекса, применяемые при анализе модулирующего действия препаратов, позволяет предположить реализацию слабого седативного эффекта ПЖК-1 в избранном режиме воздействия [11; 25; 26].

³Отравление наркотиками и психодислептиками : федер. клин. рекомендации. М., 2013.

Заключение

Возрастание длительности потребления водного экстракта из табачных изделий до 59 сут сопровождалось углублением системного токсического действия растворимых никотинсодержащих субстанций табака на организм по сравнению со стандартной 45-суточной моделью оральной алкалоидизации неполовозрелых белых крыс, что проявлялось значительными изменениями основных интегральных индексов и большинства из изученных биохимических показателей крови и мочи. Двухнедельное применение разработанных образцов профилактических жевательных композиций в ежедневной дозе по 10 мг/кг массы опытного животного (по мексидолу) оказало достаточно эффективное защитное действие на организм алкалоидизированных животных на фоне продолжающейся алкалоидной нагрузки, и особенно при прекращении воздействия ВЭТИ, о чем свидетельствуют нормализация либо существенное улучшение нарушенных у алкалоидизированных животных морфофункциональных показателей организма интоксикационного генеза.

В целом доклинические токсикологические исследования и экспериментальное установление протекторных противointоксикационных эффектов разработанных рецептур профилактических жевательных композиций в отношении вредного действия растворимых субстанций табака на организм неполовозрелых животных обосновывают перспективность их применения для медико-биологической профилактики негативных последствий табакопотребления у молодежи и позволяют рекомендовать их для дальнейшего изучения с этой целью.

Библиографические ссылки

1. Коноразов ИИ, Кралько АА, Зиматкина ОС, Кечина ЕА. *Исследование по употреблению психоактивных веществ подростками и молодежью в Республике Беларусь* [Интернет]. Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь; 2016 [процитировано 10 января 2019]. Доступно по: <https://www.unicef.by/uploads/models/2018/04/short-summary-issledovanie-psihoakt-vv.pdf>. Совместное издание с Представительством Детского фонда ООН (ЮНИСЕФ) в Республике Беларусь.
2. Benowitz NL. Nicotine Addiction. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362(24):2295–2303. DOI: 10.1056/NEJMa0809890.
3. Пронина ТН, Сычик СИ, Грекова НА, Полянская ЮН. К вопросу о табакокурении современных подростков в Республике Беларусь. В: Сычик СИ, главный редактор. *Здоровье и окружающая среда. Выпуск 26*. Минск: РНМБ; 2016. с. 97–102.
4. Lando HA, Hipple BJ, Muramoto M, Klein JD, Prokhorov AV, Ossip DJ, et al. Tobacco is a global pediatric concern. *Bulletin of the World Health Organization*. 2010;88(1):2. DOI: 10.2471/BLT.09.069583.
5. Пац НВ, Балейко ИО. Информированность различных групп населения о рисках для здоровья, обусловленных использованием насвая. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2010;1(29):89–90.
6. Кислицына ОА. Детерминанты здоровья подростков. *Социальные аспекты здоровья населения* [Интернет]. 30 сентября 2011 [процитировано 18 декабря 2018]. 2011;3(19). Доступно по: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/311/30/lang.ru/>.
7. Скачкова МА, Никитина ОВ, Метелева АВ, Карпова ЕГ, Устименко СП. Клинико-функциональные показатели состояния дыхательной системы у активно и пассивно курящих детей и подростков. *Оренбургский медицинский вестник*. 2013;1(1):68–71.
8. Адамович АВ, Римжа ЕА, Тарасюк ИВ, Юрага ТМ, Швед ИА. Биохимические и морфологические изменения при воспроизведении никотинозависимости у молодых крыс. *Вестник БГУ. Серия 2. Химия. Биология. География*. 2011;1:43–46.
9. Адамович АВ, Шевляков ВВ, Римжа ЕА, Шерстюк ГВ, Швед ИА, Юрага ТМ. Биологическое действие на организм неполовозрелых крыс экстракта из табачных изделий при субхроническом алиментарном потреблении. В: Сычик СИ, главный редактор. *Здоровье и окружающая среда. Выпуск 26*. Минск: РНМБ; 2016. с. 193–197.
10. Адамович АВ. Особенности биохимических сдвигов в сыворотке крови неполовозрелых крыс в зависимости от способов экспериментальной алкалоидизации. В: *Актуальні питання біології та медицини: збірник наукових праць за матеріалами XV Всеукраїнська наукова конференція; 25–26 травня 2017 р.; Старобільськ, Україна*. Старобільськ: ЛНУ імені Тараса Шевченка; 2017. с. 12–14.
11. Вальдман АВ, Пошивалов ВП. *Фармакологическая регуляция внутривидового поведения*. Ленинград: Медицина; 1984.
12. Бессалова ЕЮ. Половые и сезонные отличия поведения крыс в «открытом поле». *Світ медицини та біології*. 2011;7(4):12–16.
13. Римжа ЕА, Адамович АВ. Результаты исследования острой токсичности антиникотиновых композиций. В: *Актуальные вопросы медицинской науки: сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 1000-летию г. Ярославля; 18–20 апреля 2012 г.; Ярославль, Россия*. Ярославль: ЯрМедиаГруп; 2010. с. 71–72.
14. Адамович АВ, Римжа ЕА, Юрага ТМ. Исследование потенциальных токсических свойств антиникотиновых композиций в подострых опытах. *Вісник Української медичної стоматологічної академії. Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2009;9(4 частина 3):178–179.
15. Адамович АВ, Римжа ЕА, Тарасюк ИВ, Юрага ТМ. Исследование безопасности антиникотиновых композиций при длительном применении. В: *Актуальные проблемы охраны лиц молодого возраста: сборник материалов VII Международной научно-практической конференции; 5–7 октября 2010 г.; Брянск, Россия*. Брянск: Группа компаний «Десяточка»; 2010. с. 304–309.
16. Адамович АВ, Римжа ЕА, Шерстюк ГВ. Экспериментальное дозозависимое действие новой антиникотиновой композиции на гематологический статус организма. В: Сычик СИ, главный редактор. *Здоровье и окружающая среда. Том 1, выпуск 24*. Минск: РНМБ; 2014. с. 179–182.

17. Римжа ЕА. Экспериментальное моделирование никотинозависимости организма. В: *Оптимизация больничной среды средствами новых технологий. Материалы XXXVII научной конференции; 15 апреля 2004 г.; Санкт-Петербург, Россия.* Санкт-Петербург: СПбМАПО; 2004. с. 250–251.
18. Воронина ТА. Антиоксидант Мексидол. Основные эффекты и механизм действия. *Психофармакология и биологическая наркология.* 2001;1:2–12.
19. Юлдашев НМ, Нишантаев МК, Каримова ШФ, Исмаилова ГО. Влияние глицина на интенсивность перекисного окисления липидов и активность антиоксидантной системы в динамике экспериментального инфаркта миокарда. *Фундаментальные исследования.* 2013;10(6):1284–1287.
20. Селиванова ОС, Напалкова СМ. Изменение функциональных показателей и выраженности оксидативного стресса в условиях доксорубинового поражения почек у крыс на фоне применения глицина. *Ульяновский медико-биологический журнал.* 2011;3:117–124.
21. Левченкова ОС, Новиков ВЕ. Антигипоксанты: возможные механизмы действия и клиническое применение. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* 2011;4:43–57.
22. Зарубина ИВ. Принципы фармакотерапии гипоксических состояний антигипоксантами – быстро действующими корректорами метаболизма. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2002;1(1):19–28.
23. Захарова ИН, Скоробогатова ЕВ, Обычная ЕГ, Коровина НА. Дефицит витаминов и микроэлементов у детей и их коррекция. *Педиатрия. Журнал имени Г. Н. Сперанского.* 2007;86(3):112–118.
24. Михнева НН. Актуальность коррекции витаминно-минеральной недостаточности у взрослых и детей. *Семейная медицина.* 2016;4:55–59.
25. Алексеева РР. Фитотерапевтический седативный препарат. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016;8(часть 4):573–576.
26. Быстрова МН, Демидова МА, Шнеур СЯ. Исследование седативных свойств экстракционных извлечений успокоительного сбора № 3. *Современные проблемы науки и образования.* 2015;1(часть 1):1789.

References

1. Konorazov II, Kral'ko AA, Zimatkina OS, Kechina EA. *Issledovanie po upotrebleniyu psikhoaktivnykh veshchestv podrostkami i molodezh'yu v Respublike Belarus'* [Internet]. Minsk: Ministry of Health of the Republic of Belarus; 2016 [cited 2019 January 10]. Available from: <https://www.unicef.by/uploads/models/2018/04/short-summary-issledovanie-psihoakt-vv.pdf>. Co-published by the United Nations Children's Fund, Belarus Office. Russian.
2. Benowitz NL. Nicotine Addiction. *The New England Journal of Medicine.* 2010;362(24):2295–2303. DOI: 10.1056/NEJMr-a0809890.
3. Pronina TN, Sychik SI, Grekova NA, Polyanskaya YuN. The issue of tobacco use among adolescents in the Republic of Belarus. In: Sychik SI, chief editor. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda. Vypusk 26.* Minsk: Republican Scientific Medical Library; 2016. p. 97–102. Russian.
4. Lando HA, Hipple BJ, Muramoto M, Klein JD, Prokhorov AV, Ossip DJ, et al. Tobacco is a global pediatric concern. *Bulletin of the World Health Organization.* 2010;88(1):2. DOI: 10.2471/BLT.09.069583.
5. Pats NV, Baleyko IO. [Awareness of various groups of the population about the health risks caused by the use of nasvai]. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta.* 2010;1(29):89–90. Russian.
6. Kislitsyna OA. Determinants of adolescents' health. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya* [Internet]. 2011 September 30 [cited 2018 December 18]. 2011;3(19). Available from: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/311/30/lang,ru/>. Russian.
7. Skachkova MA, Nikitina OV, Metelyova AV, Karpova EG, Ustimenko SP. Clinical and functional indices of condition of respiratory system in active and passive smoking children and young adults. *Orenburgskii meditsinskii vestnik.* 2013;1(1):68–71. Russian.
8. Adamovich AV, Rimzha EA, Tarasiuk IV, Yuraga TM, Shved IA. Biochemical and morphological changes by nicotine dependence modeling by youth white rats. *Vestnik BGU. Seriya 2. Khimiya. Biologiya. Geografiya.* 2011;1:43–46. Russian.
9. Adamovich AV, Shevlyakov VV, Rimzha EA, Sherstyuk GV, Shwed IA, Yuraha TM. Biological effects of tobacco extract on immature rats organism at subchronic nutritional consumption. In: Sychik SI, chief editor. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda. Vypusk 26.* Minsk: Republican Scientific Medical Library; 2016. p. 193–197. Russian.
10. Adamovich AV. [Features of biochemical changes in the serum of immature rats depending on the methods of experimental alkaloidization]. In: *Actual questions of biology and medicine: collection of scientific papers of the materials of XV Ukrainian scientific conference; 2017 May 25–26; Starobilsk, Ukraine.* Starobilsk: Luhansk Taras Shevchenko National University; 2017. p. 12–14. Russian.
11. Valdman AV, Poshivalov VP. *Farmakologicheskaya regulyatsiya vnutrividovogo povedeniya* [Pharmacological regulation of intraspecific behavior]. Leningrad: Meditsina; 1984. Russian.
12. Bessalova YeYu. [Sexual and seasonal differences of rats' behavior in the «open field»]. *World of Medicine and Biology.* 2011;7(4):12–16. Russian.
13. Rimzha EA, Adamovich AV. [Results of the study of acute toxicity of anti-nicotine compositions]. In: *Aktual'nye voprosy meditsinskoj nauki: sbornik nauchnykh rabot studentov i molodykh uchenykh Vserossijskoj nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 1000-letiyu g. Yaroslavya; 18–20 aprelya 2012 g.; Yaroslavl', Rossiya* [Actual problems of medical science: collection of scientific articles of students and young scientists of the All-Russian scientific-practical conference with international participation, dedicated to the 1000th anniversary of the city of Yaroslavl; 2012 April 18–20; Yaroslavl, Russia]. Yaroslavl: YarMediaGrup; 2010. p. 71–72. Russian.
14. Adamovich AV, Rimzha EA, Tarasyuk IV, Yuraga TM. [Investigation of the potential toxic properties of antinicotinous compositions in subacute experiments]. *Visnyk Ukrai'ns'koi medychnoi stomatologichnoi akademii. Aktual'ni problemy suchasnoi medytsyny.* 2009;9(4 part 3):178–179. Russian.
15. Adamovich AV, Rimzha EA, Yuraga TM. [Study of the safety of antinicotinous compositions with long-term use]. In: *Aktual'nye problemy okhrany lits molodogo vozrasta: sbornik materialov VII Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii; 2010 October 5–7; Bryansk, Russia.* Bryansk: Gruppa kompanii «Desyatochka»; 2010. с. 304–309. Russian.

16. Adamovich AV, Rimzha EA, Sherstyuk GV. Experimental dose-dependent effect of the new antinicotine compositions haematology status of the body. In: Sychik SI, chief editor. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda. Tom 1, vypusk 24*. Minsk: Republican Scientific Medical Library; 2014. p. 179–182. Russian.
17. Rimzha EA. [Experimental modeling of the nicotine dependence]. In: *Optimizatsiya bol'nichnoi sredy sredstvami novykh tekhnologii. Materialy XXXVII nauchnoi konferentsii; 2004 April 15; Saint Petersburg, Russia*. Saint Petersburg: Saint Petersburg Medical Academy of Postgraduate Studies; 2004. p. 250–251. Russian.
18. Voronina TA. Antioxidant Mexidol. The basic neuropsychotropic effects and mechanism of action. *Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya*. 2001;1:2–12. Russian.
19. Yuldashev NM, Nishantaeva MK, Karimova SF, Ismailova GO. Impact on glycine lipid peroxidation and antioxidant system activity in dynamics of experimental myocardial infarction. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2013;10(6):1284–1287. Russian.
20. Selivanova OS, Napalkova SM. Amelioration of doxorubicin-induced renal functional changes and oxidative stress by glycine in rats. *Ul'yanovskii mediko-biologicheskii zhurnal*. 2011;3:117–124. Russian.
21. Levchenkova OS, Novikov VE. Antihypoxants: possible mechanisms of action and their clinical uses. *Vestnik Smolenskoii gosudarstvennoi meditsinskoi akademii*. 2011;4:43–57. Russian.
22. Zarubina IV. [Principles of pharmacotherapy of hypoxic states with antihypoxants – fast-acting metabolic correctors]. *Obzory po klinicheskoi farmakologii i lekarstvennoi terapii*. 2002;1(1):19–28. Russian.
23. Zakharova IN, Skorobogatova EV, Obynochnaya EG, Korovina NA. [Vitamin and trace element deficiencies in children and their correction]. *Pediatrics. Zhurnal imeni G. N. Speranskogo*. 2007;86(3):112–118. Russian.
24. Mikhneva NN. [The relevance of the correction of vitamin-mineral deficiency in adults and children]. *Simejna medycyna*. 2016;4:55–59. Russian.
25. Alekseeva RR. [Phytotherape sedative preparation]. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016;8(part 4):573–576. Russian.
26. Bystrova MN, Demidova MA, Shneur SYa. Research of sedative properties of extraction sedative gathering No. 3. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2015;1(part 1):1789. Russian.

Статья поступила в редколлегию 27.01.2019.
Received by editorial board 27.01.2019.

АНАЛИЗ ФЕНОТИПА ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

**В. Ю. БОНДАРЕНКО¹⁾, А. В. БАРКОВСКИЙ²⁾, А. Ю. ШАШКО¹⁾,
М. А. ЧЕРНЫШ¹⁾, Д. А. ПРЖЕВАЛЬСКАЯ¹⁾, Д. В. КОЛБАНОВ³⁾,
А. И. СОКОЛИК¹⁾, И. И. СМОЛИЧ¹⁾, С. С. МЕДВЕДЕВ⁴⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾**

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники,
ул. Петруся Бровки, 6, 220013, г. Минск, Беларусь

³⁾Республиканское учебно-опытное унитарное предприятие БГУ «Щемяслица»,
ул. Жуковского, 15-А, 223049, агрогородок Щемяслица, Минская обл., Беларусь

⁴⁾Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская набережная, 7/9, 199034, г. Санкт-Петербург, Россия

Феномика – междисциплинарная научная область, объектом исследования которой являются фенотипы, их качественные и количественные показатели, а также закономерности их формирования в ходе онтогенеза и в результате взаимодействия с внешними факторами. Методология феномики – совокупность подходов фенотипирования

Образец цитирования:

Бондаренко ВЮ, Барковский АВ, Шашко АЮ, Черныш МА, Пржевальская ДА, Колбанов ДВ, Соколик АИ, Смолич ИИ, Медведев СС, Демидчик ВВ. Анализ фенотипа декоративных растений с использованием искусственных нейронных сетей: определение таксономических и физиологических характеристик. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;1:25–32.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-25-32>

For citation:

Bandarenka UYu, Barkovsky AV, Shashko AYU, Charnysh MA, Przhevalskaya DA, Kolbanov DV, Sokolik AI, Smolich II, Medvedev SS, Demidchik VV. Taxonomic determination and physiological analysis of ornamental plants using convolutional neural networks. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;1:25–32. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-25-32>

Авторы:

Владислав Юрьевич Бондаренко – стажер младшего научного сотрудника научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Антон Викторович Барковский – магистрант кафедры информатики факультета компьютерных систем и сетей.

Антонина Юрьевна Шашко – стажер младшего научного сотрудника научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Мария Александровна Черныш – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Дарья Андреевна Пржевальская – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Дмитрий Викторович Колбанов – заместитель директора.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Игорь Иванович Смолич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Сергей Семенович Медведев – доктор биологических наук, профессор; заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений, заведующий лабораторией биологии развития растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Uladzislau Yu. Bandarenka, probationer of junior researcher at the research laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering.
uladzislau.bandarenka@gmail.com

Anton V. Barkovsky, master's degree student at the department of computer science, faculty of computer systems and networks.
anton@swarmer.me

Antonina Yu. Shashko, probationer of junior researcher at the research laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering.
antonina.shashko@gmail.com

Maryia A. Charnysh, junior researcher at the research laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering.
chernyshmaryia@gmail.com

Darya A. Przhevalskaya, junior researcher at the research laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering.
daryaprzhevalskaya@gmail.com

Dmitrii V. Kolbanov, deputy director.
dmitry-kolbanov@tut.by

Anatoliy I. Sokolik, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering.
sokolik@bsu.by

Igor I. Smolich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering.
smolich@bsu.by

Sergei S. Medvedev, doctor of science (biology), full professor; head of the department of plant physiology and biochemistry, head of the laboratory of plant development biology.
s.medvedev@spbu.ru

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering.
dzemidchik@bsu.by

растений, включающая в себя ряд наиболее современных технологий получения изображений, спектрального, биохимического, молекулярного и генетического анализа, а также инновационных методов информатики, таких как распознавание изображений, компьютерное зрение и машинное обучение. Целью настоящей работы была разработка феномного приложения, основанного на компьютерном зрении и методах машинного обучения, для таксономической классификации и определения физиологического состояния декоративных растений различных групп. В результате работы созданы, классифицированы и аннотированы базы данных *Thuja occidentalis* L., *Forsythia intermedia* Vahl, *Heuchera micrantha* Douglas ex Lindl., *Syringa vulgaris* L., *Phalaenopsis × hybridum* Blume. Разработана модель сверточной нейронной сети для таксономической классификации и определения физиологического состояния растений на основе RGB-изображений. Обучение проводилось на основе баз изображений, полученных в стандартизированных условиях при помощи высококачественных RGB-камер. Разработанная нейронная сеть продемонстрировала коэффициент детерминации (R^2) около 0,66 при определении физиологического состояния. Также нейронная сеть показала высокую эффективность распознавания таксономической принадлежности декоративных видов растений (около 90,8 %).

Ключевые слова: феномика; машинное обучение; компьютерное зрение.

Благодарность. Работа финансировалась в рамках проекта № 13 подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» ГП «Наукоёмкие технологии и техника» Республики Беларусь, проекта № 63 ОНТП Республики Беларусь «Интродукция, озеленение, экобезопасность», тем базового финансирования ГПНИ Республики Беларусь «Природопользование и экология» и «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» (№ 20161634 и 20161274).

TAXONOMIC DETERMINATION AND PHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF ORNAMENTAL PLANTS USING CONVOLUTIONAL NEURAL NETWORKS

U. Yu. BANDARENKA^a, A. V. BARKOVSKY^b, A. Yu. SHASHKO^a,
M. A. CHARNYSH^a, D. A. PRZHEVALSKAYA^a, D. V. KOLBANOV^c,
A. I. SOKOLIK^a, I. I. SMOLICH^a, S. S. MEDVEDEV^d, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bBelarusian State University of Informatics and Radioelectronics,
6 Petrusia Broŭki Street, Minsk 220013, Belarus

^cTeaching and Research Centre «Schemislitsa», Belarusian State University,
15-A Žukoŭskaha Street, Ščomyślica 223049, Minsk region, Belarus

^dSaint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya Embankment, Saint Petersburg 199034, Russia

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchik@bsu.by)

Phenomics is an interdisciplinary scientific field, the object of research of which are phenotypes, their qualitative and quantitative parameters, as well as regularities of their formation during ontogenesis and as a result of interaction with external factors. The methodology of phenomics is a set of approaches for the phenotyping of plants, including a number of the most modern technologies of imaging, spectral analysis, biochemical, molecular and genetic analyses, and also innovative informatics techniques such as image recognition, computer vision and machine learning. The purpose of this work was to develop a phenomics application based on computer vision and methods of machine learning for taxonomic classification and determination of physiological condition of different ornamental plants. As a result of this work, the annotated databases *Thuja occidentalis* L., *Forsythia intermedia* Vahl, *Heuchera micrantha* Douglas ex Lindl., *Syringa vulgaris* L., *Phalaenopsis × hybridum* Blume, etc. were created and annotated. The model of a convolution neural network for taxonomic classification and determination of physiological condition of plants on the basis of RGB-images was developed. The training used images obtained in standardized conditions by high quality RGB-cameras. The neural network showed high efficiency of recognition, when analysing with taxonomic properties of decorative plants (about 90.8 %). The developed neural network also demonstrated coefficient of determination (R^2) about 0.66 in the analysis of physiological state.

Key words: phenomics; machine learning; computer vision.

Acknowledgements. The work was financed within the project No. 13 of subprogramme 1 «Innovative biotechnologies – 2020» of the state project «Science-intensive technologies and technics» Republic of Belarus, the project No. 63 of the Industrial scientific and technical programs of the Republic of Belarus «Introduction, greening, eco-safety», the basic financing State programs of scientific research «Nature use and ecology» and «Chemical technologies and materials, natural resources potential» (No. 20161634 and 20161274).

Введение

Фенотип – совокупность морфологических, физиологических и биохимических характеристик организма в конкретных условиях существования. Организмы, имеющие одинаковый генотип, могут по-разному его реализовать в зависимости от внешних условий. Влияние стрессовых факторов может модифицировать фенотип, подавляя процессы роста и развития растений. Это проявляется в снижении качества и количества урожая [1]. Получение фенотипа с заданными свойствами является важнейшей задачей селекционного процесса и большинства агротехнических мероприятий [2].

Всеобъемлющее цифровое исследование фенотипа стало возможным лишь в последние годы с внедрением в биологию современных физико-химических методов измерений, подходов биоинформатики и системной биологии. Сложилось новое направление исследований – феномика, занимающееся выявлением закономерностей формирования и изменения фенотипов на большом фактологическом материале при помощи неинвазивных методов измерения и биоинформационных подходов [3]. Отличием феномики от классических морфометрических измерений является автоматизация регистрации, хранения и анализа данных, а также использование современных алгоритмов распознавания изображений и работа с крупными массивами графических данных [4]. Феномная информация менее подвержена влиянию человеческого фактора, т. е. субъективности измерений и обработки данных [5]. Собственные феномные технологии развиваются во многих странах мира. В результате создаются и совершенствуются так называемые феномные платформы (LemnaTec – в Германии, Qubit – в Канаде, Phenospex – в Нидерландах, Photon Systems – в Чехии и др.), представляющие собой программно-аппаратные комплексы для фенотипирования растений. Они включают в себя как компактные комплексы для автоматического анализа растений в лабораторных условиях, так и массивные полевые установки [6].

Одним из перспективных направлений в феномике растений является применение методов машинного обучения [7], которое представляет собой класс методов искусственного интеллекта, обеспечивающих решение задачи не напрямую, а в результате обучения при решении множества сходных тест-задач. Для построения таких вычислительных методов используются средства статистики, численных методов, методов оптимизации, теории вероятностей, теории графов, различные техники работы с данными в цифровой форме [8]. Машинное обучение использует алгоритмы, которые обладают встроенной способностью распознавать соответствия паттернов при анализе больших массивов данных и использовать их для самообучения [9]. Одна из основных задач машинного обучения и вычислительной биологии состоит в создании и модификации эффективных подходов для перевода сложных и многофакторных биологических данных, например таких, как описание геномов и феномов, в численную форму и в виде моделей, которые применимы на практике [10].

Наиболее часто анализируемые с использованием техники машинного обучения органы растения – корень и лист. Примерами успешного анализа листовых пластинок с использованием методов машинного обучения являются работы, выполненные на *Triticum durum*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana* и некоторых других видах высших растений [11]. На базе машинного обучения созданы технологии количественного анализа площади листьев и роста побегов [12], разработана динамическая модель развития розетки для изучения развития листа, оценен вклад генотипа в формирование фенотипа побега на ранних стадиях онтогенеза [13], выявлены закономерности изменения флуоресценции хлорофилла при воздействии важнейших патогенов [14], показана взаимосвязь между увеличением площади поверхности листа и накоплением биомассы [15] и др. Для анализа корневой системы создана компьютерная программа для 3D-моделирования ее архитектуры и детального анализа процессов развития [16]. На базе компьютерных моделей осуществлено выявление роли некоторых генов, например гена кальциевых рецепторов, в регуляции развития корневой системы [17]. Также изучена способность многих видов растений к выживанию в условиях недостатка влаги [18], показаны изменения ключевых физиологических параметров, обусловленные стрессовым состоянием под действием патогенов или гербицидов [14]. Широко распространены полевые исследования надземных частей растения и их анализ с использованием систем машинного обучения [19], а также изучение их реакции на стресс в условиях засоления и засухи [20]. Активно анализируются генетически обусловленные вариации в ростовых характеристиках пшеницы и других зерновых культур как ответ на низкие температуры [21]. Кроме того, полевые исследования проводятся с целью улучшить селекционные процессы для кормовых культур и газонных трав [22].

Среди методов машинного обучения, применяющихся для обработки больших массивов изображений, в последние годы все большую популярность приобретает технология сверточных нейронных сетей [23]. Она обеспечивает исключительно высокую точность и детализацию анализов в случае фенотипирования растений. Работа сверточной нейронной сети обычно интерпретируется как переход от конкретных особенностей изображения к более абстрактным деталям и далее – к еще более

абстрактным деталям вплоть до выделения понятий высокого уровня. Нейронная сеть вырабатывает необходимую иерархию признаков (последовательности карт признаков), отсеивает маловажные детали и выделяет существенные [24]. Автоматизированный анализ изображений с помощью нейронных сетей может быть использован для классификации растений по их видам, физиологическому состоянию, наличию симптомов заболевания или изменению морфологических параметров при внешних и внутренних факторах [25].

Непосредственно сверточные нейронные сети используют с целью создать специализированное программное обеспечение для высокопроизводительного фенотипирования [26], чтобы решить различные задачи: от автоматического анализа данных микроскопии [27] и оценки посевного материала для селекции [28] до широкомасштабных полевых исследований, примером которых служат работа по отслеживанию цветения хлопка [29] или анализ вегетирующих органов пшеницы с применением аэрофотографий [30]. Сверточные нейронные сети используются как модули или отдельные программные продукты при определении видов, сортов и физиологического состояния растений [31]. В декоративном цветоводстве США, Нидерландов, Германии программные продукты на основе машинного обучения используют в селекции тюльпанов, орхидей и т. д. Кроме того, методы машинного обучения применимы для определения отличий между сортами и генетическими линиями культурных растений [32]. Для некоторых исследований создаются сложные и комплексные программные продукты, например для поиска на изображении и оценки характеристик соцветий риса [33], скрининга растений кукурузы по целому спектру параметров с применением алгоритмов сегментации [34], а также при идентификации механизмов хлороза сои, вызванного дефицитом железа, в полевых условиях с использованием подходов RGB-имиджинга [35].

В настоящее время в СНГ отсутствуют систематические работы в области высокопроизводительного фенотипирования растений, однако имеется ряд примеров использования подходов феномики для решения узких задач физиологии растений. Например, разработана компьютерная программа, производящая автоматический подсчет зерен в колосе и определяющая их размер [36]. В упомянутых государствах отсутствуют приложения на основе нейронных сверточных сетей для анализа серийных изображений при фенотипировании растений. В связи с этим нами была поставлена цель разработать и испытать сверточную нейронную сеть, способную распознавать таксономическую принадлежность и важные физиологические состояния ряда декоративных растений, включая древесные и травянистые формы. Работа была сфокусирована на использовании одной из наиболее эффективных моделей нейронных сетей – MobileNet, отличающейся высокой надежностью и простотой. Выбор растительных объектов был продиктован их слабой изученностью с позиций феномики, а также тем, что работа с востребованными в питомниководстве видами имеет большое прикладное значение, доминирующее в белорусской науке.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования в настоящей работе являлись культуры декоративных растений, выведенных *ex vitro* (*Forsythia intermedia* Vahl, *Heuchera micrantha* Douglas ex Lindl., *Syringa vulgaris* L., *Phalaenopsis × hybridum* Blume), и растения, полученные путем черенкования (*Thuja occidentalis* L.). Они часто используются при озеленении городов и в декоративном цветоводстве. *Forsythia intermedia* Vahl, *Heuchera micrantha* Douglas ex Lindl., *Syringa vulgaris* L. культивировались на агаризованной среде WPM (Woody Plant Medium, *Duchefa Biochemie*, the Netherlands), дополненной 3 % сахарозой, 2 % активированным углем, 0,9 % агаром (pH 5,8). При культивировании *Phalaenopsis × hybridum* Blume использовалась среда Orchimax (*Duchefa Biochemie*), дополненная 3 % сахарозой, 2 % активированным углем, 0,9 % агаром (pH 5,5). Растения культивировались в стандартизированных условиях: искусственное освещение циклами 16/8 (свет/темнота) при температуре (26 ± 2) °C и влажности 70–80 %. При культивировании *in vitro* проводились регулярные пересадки на новую питательную среду. Когда полностью были сформированы 5–6 листьев и достаточно разрастались корни, растения пересаживались в грунт.

В качестве субстрата для выведения растений *ex vitro* следует применить смесь торф – песок – вермикулит в соотношении 2 : 1 : 2 (по объему). Предпочтительны крупнозернистый вермикулит с гранулами размером не менее 5 мм и верховой торф с показателем pH не ниже 5,6 (рыхлый, коричневого цвета), допускается наличие фрагментов древесины и корней. При культивировании черенков *Thuja occidentalis* L., полученных с маточных плантаций, в качестве субстрата рекомендуется использовать смесь торфа с вермикулитом в соотношении 1 : 1.

Для обучения нейронной сети были созданы базы данных цифровых изображений, регистрация которых осуществлялась в лабораторных условиях при постоянном освещении, с четырех позиций

и в полевых условиях в различное время суток для того, чтобы нейронная сеть смогла распознавать вид и физиологическое состояние растений вне зависимости от внешних условий. Методика регистрации изображений близка к экспериментам, описанным в [37]. Каждое цифровое изображение анализировалось специалистами, которые выставляли оценку, характеризующую физиологическое состояние растения от 0 до 1 (0 – погибшее растение, 1 – полностью здоровое). Помимо этого, изображения растений были сгруппированы по видовым характеристикам для возможности обучения нейронной сети определению таксона. Растения были проанализированы на разных стадиях жизненного цикла для обеспечения возможности распознавания объектов во время онтогенетических изменений.

Результаты и их обсуждение

Распространенная архитектура систем машинного обучения MobileNet использовалась как основа нейронной сети [38]. Она является одной из наиболее эффективных для решения задач обработки изображений. При разработке нейронной сети также применялись вспомогательные методы, позволяющие повысить точность анализа и добиться более быстрой «сходимости» во время обучения. Среди них – ReLU (Rectified Linear Unit), инициализация Xavier, Batch Normalization и дополнение обучающего набора деформированными данными. Tensorflow и Keras использовались для реализации модели на базе MobileNet. Эти инструменты обеспечивают помощь в описании, обучении и обслуживании нейронных сетей [39]. Архитектура нейронной сети представлена на схеме (рис. 1).

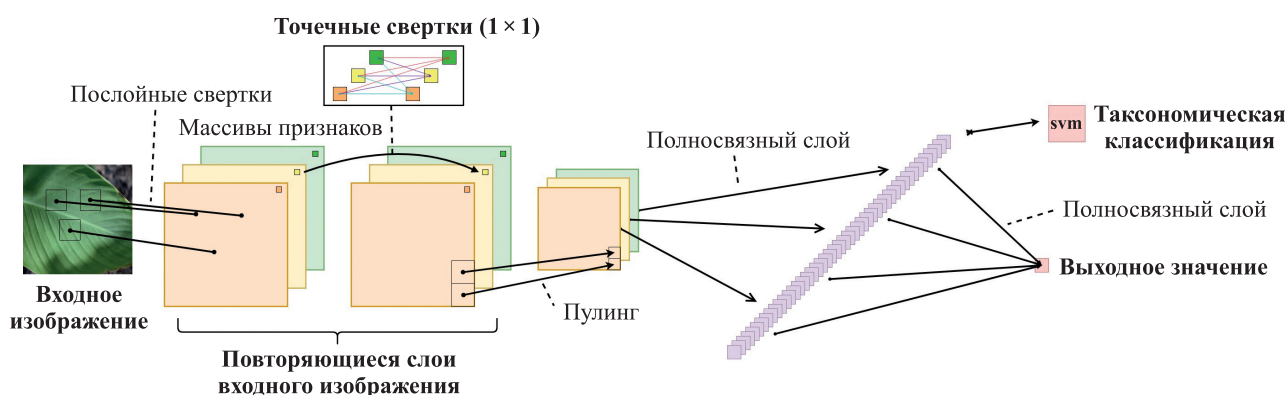


Рис. 1. Анализ изображений растений с использованием сверточной нейронной сети

Fig. 1. Plant images analysis using a convolutional neural network

Разработанная программа включает в себя ряд этапов, в которых нейронная сеть принимает изображение растения в качестве входных данных, анализирует его и создает 1024-мерное вложение. SVM (метод опорных векторов) принимает вложение изображения и относит его к известному декоративному виду [40]. Так как вложения могут быть линейно неразделимы, в качестве ядра SVM используется RBF (Radial Basis Function) [41]. Дополнительный слой нейронной сети принимает на вход 1024-мерное вложение и генерирует выходное значение, описывающее физиологическое состояние растения в диапазоне от 0 до 1. Полученные нейронной сетью результаты сравнивались с результатами специалистов-биологов. Коэффициент детерминации (R^2) определения физиологического состояния составил 0,66 (рис. 2). Стоит отметить, что коэффициент, полученный между оценками двух групп специалистов, равнялся 0,85. Показатель стандартного отклонения ($p = 0,019$) свидетельствовал о достоверности полученных результатов.

Нейронная сеть была способна классифицировать входное изображение с растением и соотносить его с уже изученными группами видов растений. Обученная нейронная сеть (рис. 3) демонстрировала высокое качество распознавания таксономических особенностей репрезентативных декоративных видов (90,8 %).

Современные алгоритмы машинного обучения, такие как нейронные сети, обладают способностью самостоятельно находить нелинейные закономерности в данных, что делает применение статистической обработки избыточным [42]. Так как тестирование сверточных нейронных сетей необходимо проводить на большом количестве исследуемых объектов, то для повышения эффективности нейросети используемая база данных не была разделена на выборки, и, как следствие, в данной работе статистический анализ не проводился.

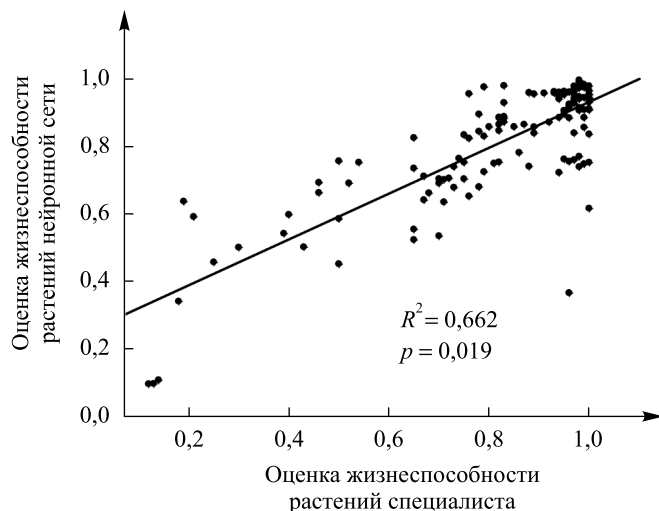


Рис. 2. Пример выявления корреляции между оценками физиологического состояния растений, выставленными человеком и нейронной сетью (линейная регрессия)

Fig. 2. Example of detecting a correlation between the estimates of the physiological state of plants, exposed by human and neural network (linear regression)

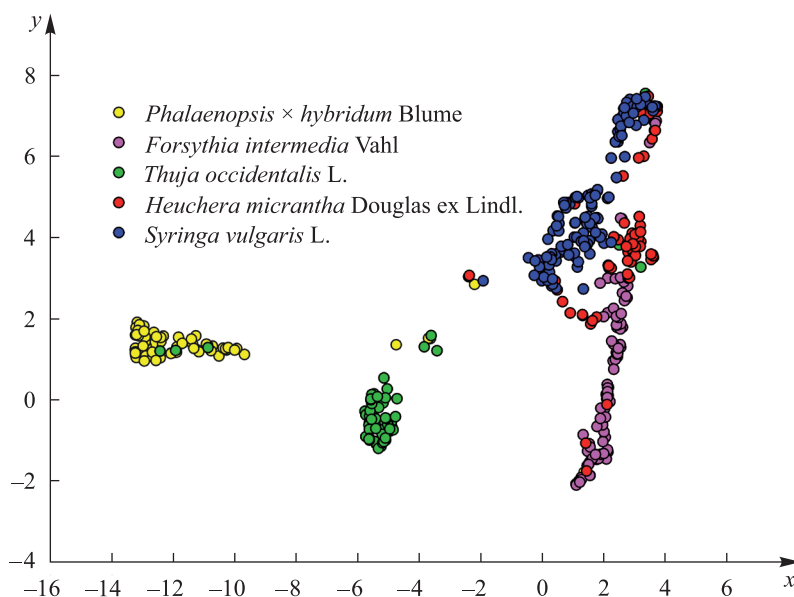


Рис. 3. Специфические видовые признаки растений, выявленные с использованием сверточной нейронной сети на базе алгоритма UMAP

Fig. 3. Specific species characteristics of plants identified by convolutional neural network based on the UMAP algorithm

Таким образом, в результате проведенных работ было разработано феноменное приложение, основанное на методах компьютерного зрения и машинного обучения, для таксономической классификации и определения физиологического состояния декоративных растений различных групп. Точность таксономического классификатора (90,8 %) была близкой к подобным характеристикам, описанным в литературе. Например, нейронная сеть, разработанная в [25], определяющая восемь типов биотического и абиотического стрессов по изображениям листьев сои, давала точность определения в 94,1 %. Схожий классификатор, определяющий таксономическую принадлежность, демонстрировал 90 % [43]. Полученный в настоящей работе коэффициент детерминации физиологического состояния 0,66 (см. рис. 2) близок к коэффициентам, рассчитанным в [44] для нейронной сети, идентифицирующей возбудителей

заболеваний растений ($R^2 = 0,5$). Некоторые источники указывают, что у подобных программ, использующих методы машинного обучения, коэффициент детерминации определения физиологического состояния в среднем составляет около 0,7 [45].

Результатом проделанной работы является первое в СНГ компьютерное приложение для фенотипирования декоративных растений на основе алгоритмов машинного обучения, в частности сверточных нейронных сетей. При ее испытании была продемонстрирована высокая точность определения видовой принадлежности *Thuja occidentalis* L., *Forsythia intermedia* Vahl, *Heuchera micrantha* Douglas ex Lindl., *Syringa vulgaris* L., *Phalaenopsis × hybridum* Blume (90,8 %). Это сравнительно высокий показатель для подобных систем. Показана также высокая степень корреляции (0,66) между оценками жизнеспособности декоративных растений, полученными от исследователя-специалиста, и нейронной сетью.

Библиографические ссылки/References

- Schilling CH, Edwards JS, Palsson BO. Toward metabolic phenomics: analysis of genomic data using flux balances. *Biotechnology Progress*. 1999;15(3):288–295. DOI: 10.1021/bp9900357.
- Deans AR, Lewis SE, Huala E, Anzaldo SS, Ashburner M, Balhoff JP, et al. Finding our way through phenotypes. *PLOS Biology*. 2015;13(1):14–29. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002033.
- Gerlai R. Phenomics: fiction or the future? *Trends in Neurosciences*. 2002;25(10):506–509. DOI: 10.1016/S0166-2236(02)02250-6.
- Houle D, Govindaraju DR, Omholt S. Phenomics: the next challenge. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11:855–866. DOI: 10.1038/nrg2897.
- Großkinsky DK, Svensgaard J, Christensen S, Roitsch T. Plant phenomics and the need for physiological phenotyping across scales to narrow the genotype-to-phenotype knowledge gap. *Journal of Experimental Botany*. 2015;66(18):5429–5440. DOI: 10.1093/jxb/erv345.
- Reuzeau C. TraitMill (TM): A high throughput functional genomics platform for the phenotypic analysis of cereals. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2007;43(4):20–24.
- Ubbens JR, Stavness I. Deep plant phenomics: a deep learning platform for complex plant phenotyping tasks. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:1190. DOI: 10.3389/fpls.2017.01190.
- Mirowski P, LeCun Y. Statistical machine learning and dissolved gas analysis: a review. *IEEE Transactions on Power Delivery*. 2012;27(4):1791–1799. DOI: 10.1109/TPWRD.2012.2197868.
- Hof RD. Deep learning. With massive amounts of computational power, machines can now recognize objects and translate speech in real time. Artificial intelligence is finally getting smart. *MIT Technology Review*. 2013;116(2):78–86.
- Libbrecht MW, Noble WS. Machine learning applications in genetics and genomics. *Nature Reviews Genetics*. 2015;16:321–332. DOI: 10.1038/nrg3920.
- Raj MP, Jatinderkumar RS, Swaminarayan P. Compartmentalization of new released and old wheat cultivars (*Triticum durum* & *Triticum aestivum*) of Gujarat region of India by employing computer. *Smart Trends in Information Technology and Computer Communications*. 2016;628:1–10. DOI: 10.1007/978-981-10-3433-6_1.
- Namin ST, Esmailzadeh M, Najafi M, Brown TB, Borevitz JO. Deep phenotyping: deep learning for temporal phenotype/genotype classification. *Plant Methods*. 2008;14:1–16. DOI: 10.1186/s13007-018-0333-4.
- Arvidsson S, Pérez-Rodríguez P, Mueller-Roeber B. Growth phenotyping pipeline for *Arabidopsis thaliana* integrating image analysis and rosette area modeling for robust quantification of genotype effects. *New Phytologist*. 2011;191:895–907. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03756.
- Rolfe A, Scholes D. Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma*. 2010;247:163–175. DOI: 10.1007/s00709-010-0203-z.
- Sharkey D, Sarathi M, Weraduwege JC, Fransisca C, Anozie AM, Sean E. The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 2015;194:59–68. DOI: 10.3389/fpls.2015.00167.
- Clark RT, MacCurdy RB, Jung JK, Shaff JE, McCouch SR, Aneshansley DJ, et al. Three-dimensional root phenotyping with a novel imaging and software platform. *Plant Physiology*. 2011;156(2):455–465. DOI: 10.1104/pp.110.169102.
- Slovak R, Göschl C, Su X, Shimotani K, Shiina T, Busch W. A scalable open-source pipeline for large-scale root phenotyping of *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2014;26:2390–2403. DOI: 10.1105/tpc.114.124032.
- Vello E, Tomita A, Diallo AO, Bureau TE. A comprehensive approach to assess *Arabidopsis* survival phenotype in water-limited condition using a non-invasive high-throughput phenomics platform. *Frontiers in Plant Science*. 2015;6:1101–1120. DOI: 10.3389/fpls.2015.01101.
- DeChant C, Wiesner-Hanks T, Chen SY, Stewart EL, Yosinski J, Gore MA, et al. Automated identification of northern leaf blight-infected maize plants from field imagery using deep learning. *Phytopathology*. 2017;107(11):1426–1432. DOI: 10.1094/PHYTO-11-16-0417-R.
- Price AH, Jones HJ, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology*. 2009;36:978–989. DOI: 10.1071/FP09123.
- Grieder C, Walter A, Hund A. Image based phenotyping during winter: a powerful tool to assess wheat genetic variation in growth response to temperature. *Functional Plant Biology*. 2015;42:387–402. DOI: 10.1071/FP14226.
- Walter A, Studer B, Kölliker R. Advanced phenotyping offers opportunities for improved breeding of forage and turf species. *Annals of Botany*. 2012;110:1271–1279. DOI: 10.1093/aob/mcs026.
- Lawrence S, Giles CL, Tsoi AC, Back AD. Face recognition: a convolutional neural-network approach. *IEEE Transactions on Neural Networks*. 1997;8(1):98–113. DOI: 10.1109/72.554195.

24. Kuzniecky R, Madhavan D, LeCun Y, Mirowski PW. Comparing SVM and convolutional networks for epileptic seizure prediction from intracranial EEG. In: *Proceedings of the 2008 IEEE Workshop on Machine Learning for Signal Processing, MLSP 2008*. Cancun: [publisher unknown]; 2008. p. 244–249. DOI: 10.1109/MLSP.2008.4685487.
25. Ghosal S, Blystone D, Singh AK, Ganapathysubramanian B, Sarkar S. An explainable deep machine vision framework for plant stress phenotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115(18):4613–4618. DOI: 10.1073/pnas.1716999115.
26. Gehan MA, Fahlgren N, Abbasi A, Berry JS, Callen ST, Chavez L, et al. PlantCV v2: Image analysis software for high-throughput plant phenotyping. *PeerJ*. 2017;5:54–79. DOI: 10.7717/peerj.4088.
27. Kraus OZ, Grys BT, Ba J, Chong Y, Frey BJ, Boone C, et al. Automated analysis of high-content microscopy data with deep learning. *Molecular Systems Biology*. 2017;13(4):924–937. DOI: 10.15252/msb.20177551.
28. Uzal LC, Grinblat GL, Namias R, Larese MG, Bianchi JS, Morandi EN, et al. Seed-per-pod estimation for plant breeding using deep learning. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2018;150:196–204. DOI: 10.1016/j.compag.2018.04.024.
29. Xu R, Li CY, Paterson AH, Jiang Y, Sun SP, Robertson JS. Aerial images and convolutional neural network for cotton bloom detection. *Frontiers in Plant Science*. 2018;8:2235. DOI: 10.3389/fpls.2017.02235.
30. Khan Z, Rahimi-Eichi V, Haefele S, Garnett T, Miklavcic SJ. Estimation of vegetation indices for high-throughput phenotyping of wheat using aerial imaging. *Plant Methods*. 2018;14(1):20–34. DOI: 10.1186/s13007-018-0287-6.
31. König IR, Auerbach J, Gola D, Held E, Holzinger ER, Legault MA, et al. Machine learning and data mining in complex genomic data – a review on the lessons learned in Genetic Analysis Workshop. *BMC Genetics*. 2016;17:49–56. DOI: 10.1186/s12863-015-0315-8.
32. Gutierrez S, Novales JF, Diago MP, Tardaguila J. On-the-go hyperspectral imaging under field conditions and machine learning for the classification of grapevine varieties. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1102–1113. DOI: 10.3389/fpls.2018.01102.
33. Xiong X, Duan LF, Liu LB, Tu HF, Yang P, Wu D, et al. Panicle-SEG: a robust image segmentation method for rice panicles in the field based on deep learning and superpixel optimization. *Plant Methods*. 2017;104(13):1–15. DOI: 10.1186/s13007-017-0254-7.
34. Jin S, Su Y, Gao S, Wu F, Hu T, Liu J, et al. Deep learning: individual maize segmentation from terrestrial lidar data using faster RCNN and regional growth algorithms. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:866–879. DOI: 10.3389/fpls.2018.00866.
35. Bai G, Jenkins S, Graef GL, Ge Y. Field-based scoring of Soybean iron deficiency chlorosis using RGB Imaging and Statistical Learning. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1002–1014. DOI: 10.3389/fpls.2018.01002.
36. Komyshev E, Genaev M, Afonnikov D. Evaluation of the SeedCounter, a mobile application for grain phenotyping. *Frontiers in Plant Science*. 2017;7:1–9. DOI: 10.3389/fpls.2016.01990.
37. Mellit A, Pavan AM. A 24-h forecast of solar irradiance using artificial neural network: Application for performance prediction of a grid-connected PV plant at Trieste, Italy. *Solar Energy*. 2010;84(5):807–821. DOI: 10.1016/j.solener.2010.02.006.
38. Navaratnarajah S, Saeed A, Dianati M, Imran M. Energy efficiency in heterogeneous wireless access networks. *IEEE Wireless Communications*. 2013;20(5):37–43. DOI: 10.1109/MWC.2013.6664472.
39. Rampasek L, Goldenberg A. TensorFlow: Biology’s Gateway to Deep Learning? *Cell Systems*. 2016;2(1):12–14. DOI: 10.1016/j.cels.2016.01.009.
40. Suykens JAK, Vandewalle J. Least squares support vector machine classifiers. *Neural Processing Letters*. 1999;9(3):293–300. DOI: 10.1023/A:1018628609742.
41. Ghosh-Dastidar S, Adeli H, Dadmehr N. Principal component analysis-enhanced cosine radial basis function neural network for robust epilepsy and seizure detection. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2008;55(2):512–518. DOI: 10.1109/TBME.2007.905490.
42. Henaff M, Bruna J, LeCun Y. Deep convolutional networks on graph-structured data. 2015. arXiv:1506.05163 [cs.LG].
43. Gang SW, Sheng FB, You EX, Wang Y, Chang Y, Xiang O. A leaf recognition algorithm for plant classification using probabilistic neural network. In: *IEEE International Symposium on Signal Processing and Information Technology. Proceedings of the conference; 2007 December 15–18; Giza, Egypt*. Giza: IEEE; 2007. p. 11–16. DOI: 10.1109/ISSPIT.2007.4458016.
44. Camargo A, Smith JS. Image pattern classification for the identification of disease causing agents in plants. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2009;66(2):121–125. DOI: 10.1016/j.compag.2009.01.003.
45. Sankaran S, Mishra A, Ehsani R, Davis C. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2010;72(1):1–13. DOI: 10.1016/j.compag.2010.02.007.

Статья поступила в редакцию 25.01.2019.
Received by editorial board 25.01.2019.

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ФЕНОТИПИРОВАНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ ПРИ ПОМОЩИ АЛГОРИТМОВ МАШИННОГО ЗРЕНИЯ И СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

А. Ю. ШАШКО¹⁾, В. Ю. БОНДАРЕНКО¹⁾, А. А. МИХАЛЬЧЕНКО¹⁾, Т. Г. КАЛЯГА²⁾,
О. Ю. САФОНОВА²⁾, Д. А. ПРЖЕВАЛЬСКАЯ¹⁾, М. А. ЧЕРНЫШ¹⁾, Д. В. КОЛБАНОВ³⁾,
В. Н. ЖАБИНСКИЙ⁴⁾, В. А. ХРИПАЧ⁴⁾, И. И. СМОЛИЧ¹⁾, А. И. СОКОЛИК¹⁾,
А. Н. ВАЛЬВАЧЕВ¹⁾, С. В. АБЛАМЕЙКО¹⁾, В. В. КРАСНОПРОШИН¹⁾,
Г. Н. СМОЛИКОВА⁵⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

³⁾Республиканское учебно-опытное унитарное предприятие БГУ «Щемяслица»,
ул. Жуковского, 15-А, 223049, агрогородок Щемяслица, Минская обл., Беларусь

⁴⁾Институт биоорганической химии НАН Беларуси,
ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, 220141, г. Минск, Беларусь

⁵⁾Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская набережная, 7/9, 199034, г. Санкт-Петербург, Россия

Фенотипирование – современная технология, позволяющая производить автоматическую регистрацию и анализ данных о фенотипах живых систем. В последние годы значительно развито высокоэффективное фенотипирование высших растений в целях глубокого исследования физиологических и биохимических основ их функционирования, а также селекции новых высокопродуктивных и стрессоустойчивых сортов. Оно базируется на адаптации и внедрении современных информационных подходов, таких как алгоритмы компьютерного зрения, и позволяет получать детальную информацию о феномах растений на различных уровнях их организации. Одним из не изученных пока разделов в данной области является фенотипирование саженцев древесных растений. В настоящем исследовании разработана система фенотипирования зеленых стеблевых черенков древесных растений *Thuja occidentalis* L. (сорт Smaragd), *Juniperus scopulorum* Sarg. (сорт Blue Arrow), *Picea abies* L., Н. Karst. с использованием алгоритмов машинного зрения и спектрального анализа. Создан модульный феномный комплекс, состоящий из бокса, систем культивирования растений, освещения и полива, а также системы регистрации и обработки RGB-изображений, включая программное обеспечение. Данный комплекс протестирован в лаборатории и в условиях открытого грунта. Его первичное тестирование показало, что изменения кривых распределения пикселей RGB-изображений по длинам волн могут служить основой оценки размеров и физиологического состояния черенков древесных растений. Установлено, что смещение спектральной кривой отраженного света в длинноволновую область под действием водного дефицита позволяет неинвазивно и статистически достоверно регистрировать гибель части клеток. В то же время статистически достоверных отличий не было выявлено при тестировании воздействия фитогормонов (ауксинов и брассиностероидов) на укоренение черенков хвойных видов. Полученные результаты имеют фундаментальную практическую значимость и могут быть использованы в исследованиях физиологических процессов у высших растений, декоративном питомниководстве и лесоводстве.

Ключевые слова: фенотипирование; феномика растений; компьютерное зрение; черенки древесных растений; хвойные растения; декоративное питомниководство; фитогормоны.

Благодарность. Работа финансировалась в рамках проекта № 13 подпрограммы 1 «Инновационные биотехнологии – 2020» ГП «Научно-технологические технологии и техника» Республики Беларусь, проекта № 63 ОНТП Республики Беларусь «Интродукция, озеленение, экобезопасность», тем базового финансирования ГПИ Республики Беларусь «Природопользование и экология» и «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал» (№ 20161634 и 20161274).

Образец цитирования:

Шашко АЮ, Бондаренко ВЮ, Михальченко АА, Каляга ТГ, Сафонова ОЮ, Пржевальская ДА, Черныш МА, Колбанов ДВ, Жабинский ВН, Хрипач ВА, Смолич ИИ, Соколик АИ, Вальвачев АН, Абламейко СВ, Краснопрошин ВВ, Смоликова ГН, Демидчик ВВ. Разработка системы фенотипирования древесных растений при помощи алгоритмов машинного зрения и спектрального анализа. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;1:33–44.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-33-44>

For citation:

Shashko AYU, Bandarenka UYu, Mikhanchenko AA, Kaliaha TG, Safonova OYu, Przhevalskaya DA, Charnysh MA, Kolbanov DV, Zhabinskii VN, Khripach VA, Smolich II, Sokolik AI, Valvachev AN, Ablameyko SV, Krasnoproschin VV, Smolikova GN, Demidchik VV. Development of woody plants phenotyping system with the help of machine vision and spectral analysis algorithms. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;1:33–44. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-33-44>

DEVELOPMENT OF WOODY PLANTS PHENOTYPING SYSTEM WITH THE HELP OF MACHINE VISION AND SPECTRAL ANALYSIS ALGORITHMS

A. Yu. SHASHKO^a, U. Yu. BANDARENKA^a, A. A. MIKHALCHENKO^a, T. G. KALIAHA^b,
O. Yu. SAFONOVA^b, D. A. PRZHEVALSKAYA^a, M. A. CHARNYSH^a, D. V. KOLBANOV^c,
V. N. ZHABINSKII^d, V. A. KHRIPACH^d, I. I. SMOLICH^a, A. I. SOKOLIK^a,
A. N. VALVACHEV^a, S. V. ABLAMEYKO^a, V. V. KRASNOPROSHIN^a,
G. N. SMOLIKOVA^e, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^cTeaching and Research Centre «Schemislitsa», Belarusian State University,
15-A Žukoŭskaha Street, Ščomyślica 223049, Minsk region, Belarus

^dInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5 Academician V. F. Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

^eSaint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya Embankment,
Saint Petersburg 199034, Russia

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchik@bsu.by)

Phenotyping is a modern technology that allows registering and analyzing data about living systems phenotypes in automatic mode. In recent years a high-efficiency higher plants phenotyping with the aim of deep study of the physiological and biochemical bases of their functioning, as well as selection of new high-yielding and stress-resistant varieties has acquired significant development. It is based on adaptation and introduction of modern information approaches such as algorithms of «computer vision» and allows receiving detailed information about plants phenomes at various organization levels. One of the unreached research sections in this field is tree plant cuttings phenotyping, which represents a great practical interest. In this work the system of phenotyping of green stem cuttings of woody plants *Thuja occidentalis* L. (Smaragd), *Juniperus scopulorum* Sarg. (Blue Arrow), *Picea Abies* L., H. Karst. was developed using machine vision algorithms and spectral analysis. A modular phenomics complex was created. It consist of phenomics box, plant cultivation system, lighting and watering systems, as well as system of registration and processing of RGB-images, including software. This complex has been tested in the laboratory and in field conditions. The initial testing of the phenomics complex was carried out. It showed that the data of changes in the pixel distribution of RGB-images by wavelengths can be the basis for estimating the size and physiological state of stem cuttings of woody plants. It was shown that the shift of the spectral curve of the reflected light into the long-wave area under the influence of water deficit allows to non-invasive and statistically reliably register the death of some cells. At the same time, statistically reliable distinctions have not been revealed at testing of influence of phytohormones (auxins and brassinosteroids) on rooting of stem cuttings of coniferous species. The obtained results have a fundamental practical significance and can be used in the research of physiological processes in higher plants, ornamental crop production and forestry.

Key words: phenotyping; plant phenomics; computer vision; stem cuttings of woody plants; coniferous plants; ornamental nursery-gardening; phytohormones.

Acknowledgements. The work was financed within the project No. 13 of subprogramme 1 «Innovative biotechnologies – 2020» of the state project «Science-intensive technologies and technics» Republic of Belarus, the project No. 63 of the Industrial scientific and technical programs of the Republic of Belarus «Introduction, greening, eco-safety», the basic financing State programs of scientific research «Nature use and ecology» and «Chemical technologies and materials, natural resources potential» (No. 20161634 and 20161274).

Введение

В последние годы в биологии растений активно развивается новое направление – феномика, объектом исследования которой являются закономерности формирования и функционирования фенотипов на различных уровнях организации живых систем. Работы в области феномики направлены на решение проблем регуляции роста и развития растений, фотосинтетических и метаболических процессов, выявление механизмов стрессовых реакций и адаптации к неблагоприятным факторам среды, формирования высокой урожайности и повышения качества сельскохозяйственной продукции [1–4]. Феномика также имеет значительный потенциал в области создания новых сортов и культиваров сельскохозяйственных растений с заданными свойствами, а также разработки прогрессивных технологий в лесоводстве и питомниководстве [5–7].

Важнейшим методическим подходом феномики растений является так называемое фенотипирование индивидуального организма или групп растений, осуществляемое при помощи широкого спектра регистрирующих устройств, таких как гиперспектральные, термальные и RGB-камеры, сенсоры флуоресценции, различного рода томографы [8–12]. Получаемая информация накапливается в виде библиотек изображений (имиджей) и обрабатывается с использованием специализированных компьютерных приложений, обеспечивающих выделение измеряемых параметров и их детальный анализ. Современные феномные комплексы способны осуществлять «высокопроизводительное» фенотипирование, при котором регистрируются характеристики сотен или даже тысяч растений в течение нескольких месяцев. Автоматизированная обработка информации в таких комплексах приобретает исключительно большое значение.

В настоящее время феномика растений активно привлекает современные методы обработки графических данных, в частности технологии компьютерного зрения, гиперспектрального анализа и машинного обучения [13–15]. Такие подходы обеспечивают максимально глубокий уровень детализации и высокую эффективность обработки сложных имиджей. Использование методов компьютерного зрения в феномике позволяет осуществлять обнаружение, выделение, мониторинг, определение физических и спектральных свойств, классификацию и статистический анализ растительных объектов [16]. Алгоритмы компьютерного зрения способны четко определить границы области имиджа, занимаемой растением, его органами или частями, отделить его от фона, отфильтровать шумы, а также отобрать зоны с заданными пользователем параметрами [17]. С применением технологии компьютерного зрения в последние годы проведены исследования по различным направлениям физиологии и биотехнологии растений. Так, был разработан метод автоматического анализа изображений суспензионной культуры клеток *Arabidopsis thaliana*, что позволило создать высокопроизводительные фотосинтезирующие культуры для данного вида [18]; выявлены закономерности влияния плотности суспензионной культуры на продукцию биомассы и эффективность использования света в культуре *Synechocystis* sp. PCC 6803 [19]; продемонстрированы механизмы возникновения водного дефицита в листьях высших растений при помощи визуализации флуоресценции хлорофилла *a* [20].

Одним из направлений феномики, которое остается недостаточно развитым, является фенотипирование древесных видов, что обусловлено как крупными размерами и продолжительным жизненным циклом данных растений, так и отсутствием соответствующих теоретических подходов и программных средств для работы со сложными комплексными феномами. В феномике древесных растений на данный момент преобладают исследования лесных массивов (бук *Fagus sylvatica* L., дуб *Quercus ilex* L., ель *Picea abies* L., сосна *Pinus sylvestris* L.) и посадок плодовых деревьев, таких как яблони *Malus domestica*, абрикосы *Prunus armeniaca*, персики *Prunus persica*, лимоны *Citrus × limon*, апельсины *Citrus sinensis*, при помощи мультиспектральных и гиперспектральных датчиков, закрепленных на беспилотных летательных аппаратах или спутниках [21; 22]. Это дает информацию о размерах, форме, наличии заболеваний или водного дефицита у больших групп изучаемых растений. В то же время пока отсутствуют развитые феномные системы, позволяющие проводить анализ укоренения черенков древесных растений, что крайне необходимо для развития новых технологий в питомниководстве и лесоводстве [23; 24].

Цель настоящего исследования – разработка системы фенотипирования укореняющихся черенков древесных растений на базе алгоритмов машинного зрения и спектрального анализа. Для этого решались задачи подбора компонентов феномной системы (бокс, культивационный трей, системы освещения и полива, система получения RGB-изображений, управляющий сервер-компьютер), тестирования ее функциональности в лабораторных и полевых условиях, демонстрации изменений спектральных характеристик на базе RGB-изображений черенков декоративных древесных растений, возникающих в ответ на стрессовые воздействия и фитогормональные обработки.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – черенки туи западной (*Thuja occidentalis* L., сорт Smaragd), культивируемые в нестерильных условиях. Это вечнозеленое хвойное дерево из семейства кипарисовых, высотой 3–5 м, с компактной пирамидальной кроной, чешуевидной, глянцевой, от желто-зеленой до буро-зеленой хвоей [25]. Широко применяется в городском и частном озеленении благодаря своей декоративности, нетребовательности к условиям местообитания, а также простоте культивирования. Также использовались черенки можжевельника скального (*Juniperus scopulorum* Sarg., сорт Blue Arrow) и ели обыкновенной (*Picea abies* L., Н. Karst.), обладающих схожей с туей значимостью для озеленения.

Стандартные протоколы вегетативного размножения и последующего культивирования древесных растений [26] в питомниках могут быть непригодными для феномного анализа [27], что обусловлено необходимостью строгой стандартизации исходного материала для фенотипирования. Поэтому в ходе

экспериментов использовались черенки туи западной, полученные от элиты деревьев синхронной маточной плантации УП «Щемяслица» БГУ, заложеной в 2012 г. Отбирались черенки размерами 7–15 см со здоровой зеленой хвоей и фрагментом древесины прошлого года у основания (так называемая «пятка»), которые помещались в 0,3 % раствор диметилсульфоксида или 0,01 % тиомочевины на 12–24 ч и высаживались в субстрат.

В качестве субстрата для подращивания черенков применялась простерилизованная смесь крупнозернистого вермикулита (4–5 мм) и раскисленного верхового торфа в соотношении 1 : 1 по объему. Субстрат стерилизовался в автоклаве при давлении 1,4–1,6 атм и температуре 120–130 °С в течение не менее 30 мин, после чего обрабатывался контактно-системным фунгицидом в рекомендуемых производителем дозах. Культивационными сосудами служили одиночные черные пластиковые горшки по 500 мл или черные пластиковые кассеты с ячейками объемом 200 мл. Черенки высаживались в субстрат «пяткой» на глубину 2–3 см, после чего грунт вокруг черенка слегка уплотнялся и обильно поливался теплым (30 °С) 5 % раствором солей Woody Plant Medium (WPM) без органических добавок в расчете 1 л на 8 л субстрата. Культивационные емкости с черенками помещались на ростовые стеллажи, оснащенные системой освещения из 6 светодиодных ламп (11 Вт; 3000 К; 850 лм) с режимом 16/8 ч (свет/темнота), обеспечиваемым электронным реле. В помещении поддерживалась температура 22 °С и относительная влажность 70 %; стерильность воздуха сохранялась с помощью бактерицидных ультрафиолетовых рециркуляторов «Витязь 01 ФК» (ОАО «Витязь», Беларусь).

Для тестирования разработанного программно-аппаратного комплекса в условиях открытого грунта (т. е. вне контролируемых условий лабораторного помещения) часть черенков после укоренения переносилась в теплицы на базе УП «Щемяслица» БГУ в отсутствие стандартизации параметров освещенности, температуры и влажности воздуха.

Непосредственно экспериментальная часть исследования проводилась в специально разработанной феномной системе. Составными компонентами программно-аппаратного феномного комплекса являются бокс, культивационный трей, системы освещения и полива, система получения RGB-изображений, а также управляющий сервер-компьютер. Феномный бокс размером 300 × 200 × 200 см представляет собой алюминиевый каркас со стенками из гомогенного низкобликового пластика синего цвета. Его размерность позволяет расположить в нем все остальные компоненты; отсутствие пола и потолка обеспечивает возможность поддержания температуры и влажности воздуха на том же уровне, что и во всем лабораторном помещении для культивирования опытных черенков.

В центральной части феномного бокса помещался рабочий стенд (трей) из нержавеющей стали. Размер рабочей поверхности площадки 147 × 86 см, высота (26 ± 3) см. Вокруг стенда располагались по 4 осветителя и SLR-камеры NIKON D3400. В качестве источника света применялись также оригинальные осветительные приборы, представляющие собой утолщенный алюминиевый лист 30 × 60 см, усиленный алюминиевыми швеллерами по всему периметру; на передней поверхности были расположены 8 светодиодных ламп (11 Вт; 3000 К; 850 лм). Расстояние от осветителей и камер до объекта фенотипирования фиксировалось благодаря использованию настраиваемых стоек и штативов.

Феномная система автоматизирована при помощи компьютера, оснащенного хабом для широкого спектра подключений. Использовались операционная система Ubuntu 16.04 и язык программирования Python 3. Для работы с камерами, управления феномной системой и анализа данных создана компьютерная программа «Система автоматического получения и вывода RGB-имиджей». Для передачи информации управляющему компьютеру в феномную систему включены микроконтроллеры Arduino (*HC*, Китай), которые производили мониторинг данных от датчиков света, увлажненности почвы и температуры в феномном боксе. Датчики непрерывно собирали информацию и передавали ее на компьютер, который предупреждал пользователя при смещении норм считываемых параметров.

Спектральный анализ на основе подходов машинного зрения производился программой «Система автоматического получения и вывода RGB-имиджей», упрощенный алгоритм действий которой включает следующие этапы.

Этап 1. Перевод изображения в палитру HSV (Hue – оттенок, Saturation – насыщенность, Value – яркость). Для определения участков с изображениями растений выделяются все пиксели с параметром *H*, соответствующим зеленому цвету, т. е. от 46 до 112, а также с компонентами *S* от 39 до 255 и *V* от 42 до 255.

Этап 2. Уменьшение размеров изображения для ускорения процессов обработки.

Этап 3. Фильтрация шумов путем наложения медианного фильтра.

Этап 4. Определение начальной аппроксимации маски. Маской фотосинтезирующих частей растения является таковая исходного изображения, содержащая 1 только в пикселях, которые соответствуют растению, т. е. начальной аппроксимацией маски служит выборка пикселей, удовлетворяющих условиям: *H* [46, 112], *S* [39, 255], *V* [42, 255].

Этап 5. Дилатация – расширяющее преобразование маски. Расширение маски в определенную точку производится только в том случае, если расстояние между ее цветом и цветом точки, на основании которой данная точка будет добавлена к маске, достаточно невелико.

Этап 6. Фильтрация областей маски. Полученная на предыдущих этапах маска может содержать некоторое количество замкнутых областей; в зависимости от размера обрабатываемого изображения и предварительных параметров могут быть удалены небольшие по площади контуры (например, содержащие менее 10 пк).

Этап 7. Перевод показателей HSV в длины волн по формуле $L = 625 - (2H \cdot 175/240)$, где L – длина волны, соответствующая пикселю со значением оттенка в градусах, равным H .

Этап 8. Построение кривой распределения процентного соотношения пикселей по длине волны.

Следует отметить, что показатели длин волн – это приближенная интерпретация параметра H цветовой модели HSV; они не являются абсолютными значениями длин волн и достоверным отображением спектра отражения. По результатам обработки изображений программой можно получить информацию о наличии на исходной фотографии объектов с цветом, отличным от синего и зеленого (сухие части растения или же посторонние объекты). При наблюдении динамики распределения процентного соотношения пикселей по длине волны можно сделать выводы об изменениях в состоянии растения, например о его засыхании.

Данный программный пакет реализован как система поддержки принятия решений – компьютерная автоматизированная система, целью которой является помощь пользователям в сложных условиях для полного и объективного анализа предметной деятельности [28]. Эти системы в своей работе используют целый ряд методов, включая информационный поиск, интеллектуальный анализ данных, имитационное моделирование, рассуждение на основе прецедентов, эволюционные вычисления и генетические алгоритмы, нейронные сети, ситуационный анализ, когнитивное моделирование и др.

Результаты и их обсуждение

Решен целый ряд задач, направленных на создание собственной феномной платформы. Для обеспечения оптимальных условий фотографирования собран феномный бокс, разработаны система освещения, методика съемки и программа для дистанционного управления SLR-камерами, автоматического накопления изображений и их анализа.

Для тестирования программы «Система автоматического получения и вывода RGB-имиджей» сформирована база данных изображений черенков туи западной (рис. 1), для чего изначально идентичные по возрасту, фазе жизненного цикла и физиологическому состоянию растения разделялись на две группы: контрольную (стандартный полив) и подверженную стрессу, вызванному водным дефицитом (исключение полива на период 30 сут).

Анализ полученных имиджей (рис. 2) продемонстрировал, что у растений туи западной контрольной группы характерны пики в области 520–525 и 540–545 нм, а для группы, подверженной стрессовому воздействию, пики наблюдались в более длинноволновой части спектра (540–550 нм). Таким образом, были идентифицированы отличия спектральных свойств изображений туи западной при разных физиологических состояниях.

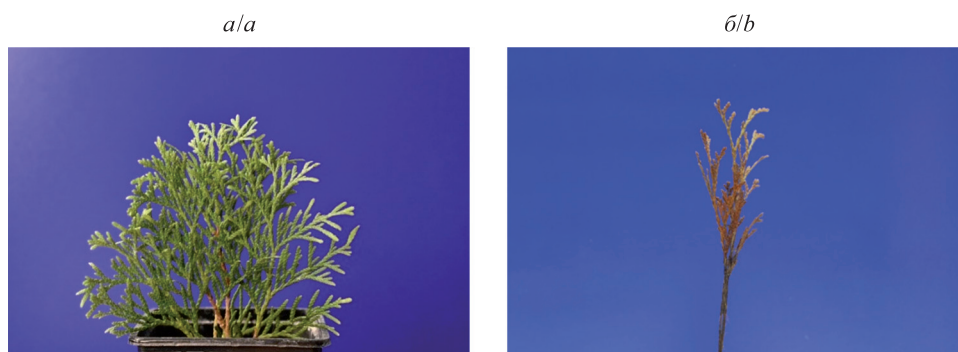


Рис. 1. Примеры RGB-изображений базы данных черенков в разном физиологическом состоянии:

а – черенок туи западной из контрольной выборки;

б – фенотип черенка, подверженного водному дефициту

Fig. 1. Examples of RGB-images of the database of stem cuttings of *Thuja occidentalis* L., Smaragd in different physiological conditions:
a – the stem cuttings of the *Thuja occidentalis* L., Smaragd from the control sample;
b – phenotype of the cutting exposed to water deficit

Для отработки протоколов программно-аппаратного феномного комплекса проведен имиджинг растений в условиях теплицы и открытого грунта на базе УП «Щемяслица» БГУ. Регистрация изображений осуществлялась так же, как и в условиях феномного бокса, с четырех сторон SLR-камерами на штативах. Были протестированы черенки туи западной, можжевельника скального, а также ели обыкновенной. В процессе культивирования растения обрабатывались 10^{-6} моль/л кастастерона (КС), 10^{-6} моль/л гомокастастерона (ГК), 10^{-6} моль/л брассинолида (БЛ), 10^{-6} моль/л гомобрассинолида (ГБ), 50 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК) и 50 мг/л дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Контрольные черенки не обрабатывались фитогормонами. Результаты исследования укореняемости черенков на примере туи

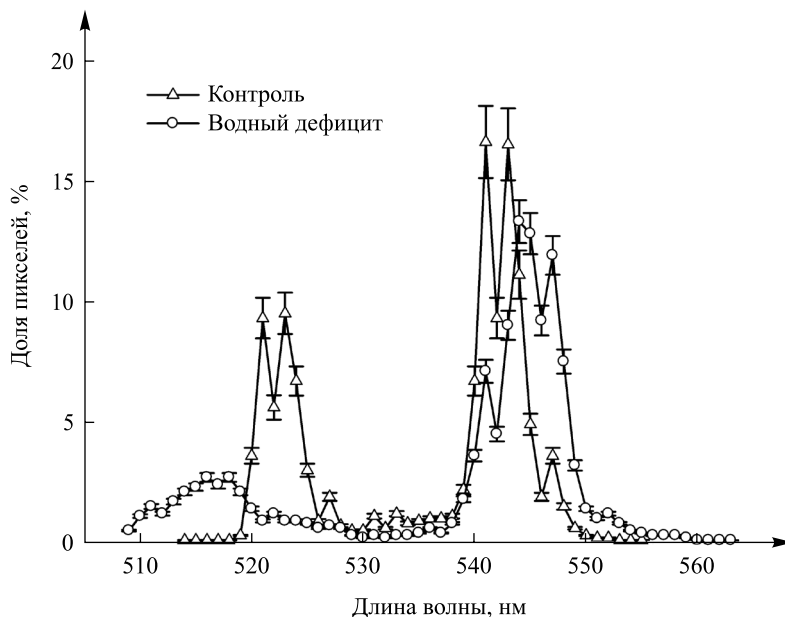


Рис. 2. Сравнительная характеристика спектрального состава изображений туи западной в различном физиологическом состоянии ($n = 60$; $X \pm S_x$)

Fig. 2. Comparative characteristics of the spectral composition of images of *Thuja occidentalis* L., Smaragd, in various physiological state ($n = 60$; $X \pm S_x$)

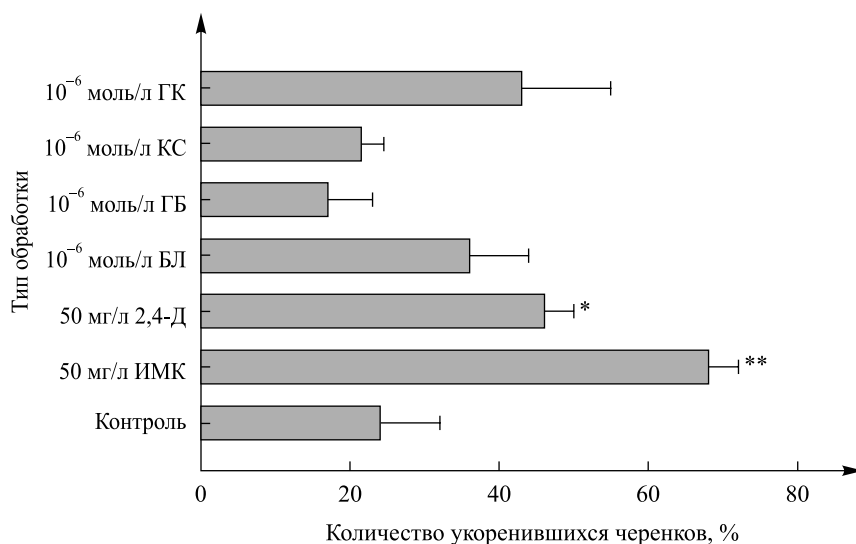


Рис. 3. Воздействие фитогормонов на укоренение черенков *Thuja occidentalis* L. сорта Smaragd ($n = 30$; $*p < 0,05$, $**p < 0,0001$)

Fig. 3. Effects on the rooting of stem cuttings of *Thuja occidentalis* L., Smaragd ($n = 30$; $*p < 0,05$, $**p < 0,0001$) of phytohormones: homocastasteron (ГК), castasteron (КС), homobrassinolide (ГБ), brassinolide (БЛ), dichlorophenoxyacetic acid (2,4-Д), indolebutyric acid (ИМК)

западной через 120 сут представлены на рис. 3. Оценка укоренения растений можжевельника скального и ели обыкновенной в эти сроки не проводилась. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что из представленных фитогормонов статистически достоверно повышали эффективность укоренения черенков туи западной только 2,4-Д и ИМК (50 мг/л).

Для выявления взаимосвязи между формированием корневой системы при действии фитогормонов и изменением спектральных характеристик растений проводился имиджинг групп растений туи западной, можжевельника скального и ели обыкновенной. Регистрация изображений проводилась на 120-е сутки культивирования с целью исследовать спектральные характеристики изображений черенков древесных растений программой «Система автоматического получения и вывода RGB-имиджей». Пример анализа спектрального состава растений на примере можжевельника скального представлен на рис. 4.

Результаты исследования спектральных характеристик имиджей черенков туи западной, можжевельника скального, ели обыкновенной представлены в таблице. Для растений, подверженных воздействию фитогормонов, выявлены статистически достоверные смещения пиков для черенков туи западной, обработанных ИМК, БЛ, КС и ГК; для черенков можжевельника скального, обработанных КС и ГБ, а также для черенков ели обыкновенной во всех обработках.

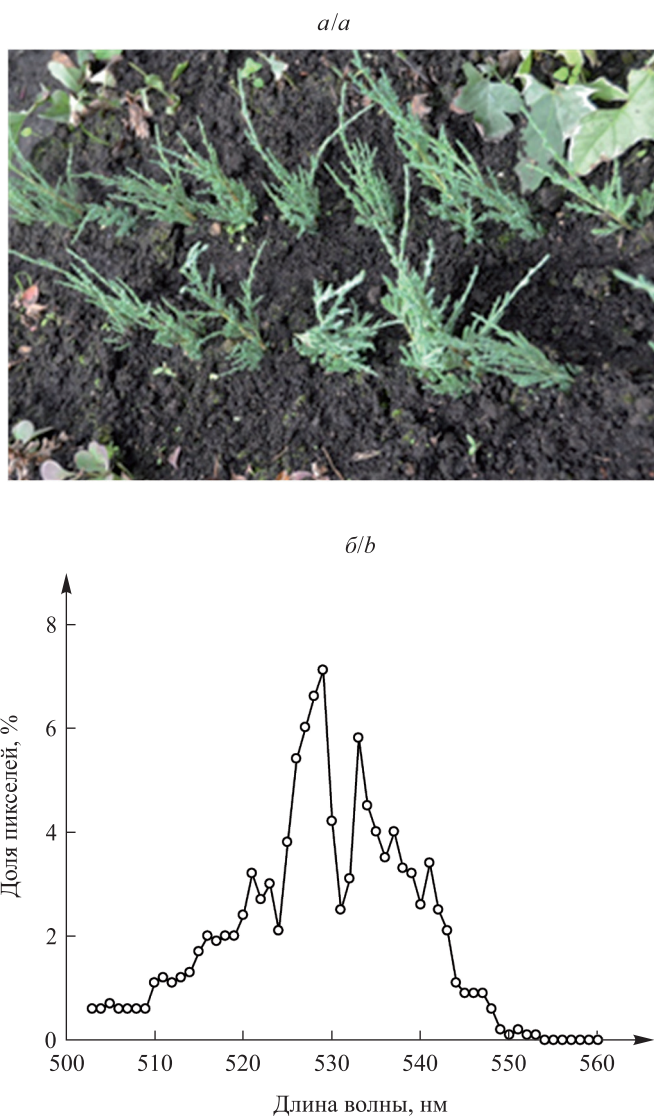


Рис. 4. Типичный RGB-имидж растений можжевельника скального, выращенных в открытом грунте (а), и распределение пикселей данного изображения по длинам волн (б)

Fig. 4. Typical RGB-image of *Juniperus scopulorum* Sarg. grown in open ground (a) and pixel distribution by wavelengths of the given image (b)

Спектральные характеристики RGB-изображений черенков туи западной, можжевельника скального и ели обыкновенной, обрабатываемых различными фитогормонами, на 120-е сутки культивирования
Spectral characteristics of RGB-images of stem cuttings of *Thuja occidentalis* L., Smaragd, *Juniperus scopulorum* Sarg., Blue Arrow, *Picea abies* L., H. Karst., treated by different phytohormones during 120 d of cultivation

Тип обработки	Диапазон значений пиков, нм	Среднее значение пика, нм	Уровень значимости <i>p</i> (тест ANOVA)
Туя западная (<i>Thuja occidentalis</i> L., сорт Smaragd)			
Контроль	524–532	528 ± 0,81	–
50 мг/л ИМК	531–542	533 ± 1,08	0,001 6
50 мг/л 2,4-Д	521–534	526 ± 1,21	0,185 3
10 ⁻⁶ моль/л БЛ	527–537	532 ± 1,03	0,006 9
10 ⁻⁶ моль/л ГБ	527–535	529 ± 0,78	0,384 4
10 ⁻⁶ моль/л КС	546–553	550 ± 0,75	0,000 1
10 ⁻⁶ моль/л ГК	532–539	537 ± 0,69	0,000 1
Можжевельник скальный (<i>Juniperus scopulorum</i> Sarg., сорт Blue Arrow)			
Контроль	516–528	521 ± 1,07	–
50 мг/л ИМК	518–525	520 ± 0,67	0,438 3
50 мг/л 2,4-Д	520–532	524 ± 1,27	0,086 8
10 ⁻⁶ моль/л БЛ	514–525	520 ± 1,24	0,549 0
10 ⁻⁶ моль/л ГБ	515–523	517 ± 0,78	0,007 3
10 ⁻⁶ моль/л КС	520–529	525 ± 0,96	0,012 1
10 ⁻⁶ моль/л ГК	518–527	522 ± 0,97	0,497 5
Ель обыкновенная (<i>Picea abies</i> L., H. Karst.)			
Контроль	539–548	542 ± 0,86	–
50 мг/л ИМК	544–552	547 ± 0,70	0,000 3
50 мг/л 2,4-Д	556–569	561 ± 1,42	0,000 1
10 ⁻⁶ моль/л БЛ	580–588	583 ± 0,74	0,000 1
10 ⁻⁶ моль/л ГБ	542–553	546 ± 1,10	0,010 1
10 ⁻⁶ моль/л КС	544–554	547 ± 1,13	0,002 5
10 ⁻⁶ моль/л ГК	540–549	545 ± 0,98	0,033 5

Повышение эффективности функционирования программного комплекса «Система автоматического получения и вывода RGB-имиджей» и технологии феномного анализа саженцев древесных пород в будущем возможно по мере расширения базы имиджей с большим числом видов декоративных древесных растений на разных этапах развития черенков и в различных физиологических состояниях. Для получения необходимого количества черенков растений для феномных исследований была заложена маточная плантация элиты декоративных древесных культур и на базе Ботанического сада биологического факультета БГУ.

Заключение

Разработанная программа обеспечивает получение данных о спектральных характеристиках растений, в частности черенков декоративных древесных видов, а также производит оценку их жизнеспособности. В ее основе лежит графическая информация от недорогих и доступных RGB/SLR-камер. Подобным функционалом обладает ряд феномных программ, однако все они базируются на полноценном и дорогостоящем гиперспектральном анализе [29–31] или применении методов автоматического стереоимиджинга для выявления закономерностей накопления биомассы, маркеров водного дефицита, а также корреляций между «зеленостью» черенков, определенной в RGB-диапазоне, и биомассой, между высотой и биомассой [23].

Алгоритмы компьютерного зрения, схожие с разработанными в настоящем исследовании, используются коммерческими платформами, такими как *Bellwether* [32] и *PhenomicsNL* [33]. Преимущество созданной программы – доступность для инсталляции на обычный персональный компьютер, простота интерфейса, в том числе для операторов, не являющихся специалистами в области феномики, возможность просмотра и экспортирования данных на всех этапах анализа (от удаления шума и наложения масок до табличных данных и итоговых диаграмм).

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

- разработанный и собранный модульный феномный комплекс (бокс, культивационный трей, системы освещения и полива, система получения RGB-изображений, компьютерная установка, специализированное программное обеспечение) обладает функциями, необходимыми для применения в лаборатории и в условиях открытого грунта, и обеспечивает регистрацию и анализ спектральных данных имиджей как одиночных растений, так и их групп;
- по изменению кривых распределения пикселей по длинам волн, получаемых при помощи программы «Система автоматического получения и вывода RGB-имиджей», можно судить об изменении физиологического состояния черенков древесных растений (в частности, продемонстрировано смещение пиков спектра отражения в длинноволновую область под действием водного дефицита);
- спектральные характеристики изображений черенков туи западной, можжевельника скального и ели обыкновенной статистически значимо изменяются под действием ауксинов и брассиностероидов.

Библиографические ссылки

1. Furbank RT, Tester M. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science*. 2011;16(12): 635–644. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.09.005.
2. Coppens F, Wuyts N, Inze D, Dhondt S. Unlocking the potential of plant phenotyping data through integration and data-driven approaches. *Current Opinion in Systems Biology*. 2017;4:58–63. DOI: 10.1016/j.coisb.2017.07.002.
3. Tardieu F, Cabrera-Bosquet L, Pridmore T, Bennett M. Plant phenomics, from sensors to knowledge. *Current Biology*. 2017; 27(15):770–783. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.055.
4. Ghanem ME, Marrou H, Sinclair TR. Physiological phenotyping of plants for crop improvement. *Trends in Plant Science*. 2015; 3:139–144. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.11.006.
5. Awada L, Phillips PWB, Smyth SJ. The adoption of automated phenotyping by plant breeders. *Euphytica*. 2018;214. DOI: 10.1007/s10681-018-2226-z.
6. Araus JL, Cairns JE. Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science*. 2014;19(1): 52–61. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.09.008.
7. Wallace A, Nichol C, Woodhouse I. Recovery of forest canopy parameters by inversion of multispectral LiDAR data. *Remote Sensing*. 2012;4(2):509–531. DOI: 10.3390/rs4020509.
8. Gerlai R. Phenomics: fiction or the future? *Trends Neurosciences*. 2002;25(10):506–509. DOI: 10.1016/S0166-2236(02)02250-6.
9. Thorp KR, Gore MA, Andrade-Sanchez P, Carmo-Silva AE, Welch SM, White JW, et al. Proximal hyperspectral sensing and data analysis; approaches for field-based plant phenomics. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2015;118:225–236. DOI: 10.1016/j.compag.2015.09.005.
10. Hughes N, Askew K, Scotson CP, Williams K, Sauze C, Corke F, et al. Non-destructive, high-content analysis of wheat grain traits using X-ray micro computed tomography. *Plant Methods*. 2017;13:76. DOI: 10.1186/s13007-017-0229-8.
11. Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology*. 2009;36:978–989. DOI: 10.1071/FP09123.
12. Garbout A, Munkholm LJ, Hansen SB, Petersen BM, Munk OL, Pajor R. The use of PET/CT scanning technique for 3D visualization and quantification of real-time soil/plant interactions. *Plant and Soil*. 2012;352:113–127.
13. Zhang J, Naik HS, Assefa T, Sarkar S, Reddy RVC, Singh A, et al. Computer vision and machine learning for robust phenotyping in genome-wide studies. *Scientific Reports*. 2017;7:440–448. DOI: 10.1038/srep44048.
14. Ghosal S, Blystone D, Singh AK, Ganapathysubramanian B, Singh A, Sarkar S. An explainable deep machine vision framework for plant stress phenotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(18):4613–4618. DOI: 10.1073/pnas.1716999115.
15. Gutiérrez S, Fernandez-Novales J, Diago MP, Tardaguila J. On-the-go hyperspectral imaging under field conditions and machine learning for the classification of grapevine varieties. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1102. DOI: 10.3389/fpls.2018.01102.
16. Hunt ER, Hively WD, Fujikawa S, Linden D, Daughtry CST, McCarty G. Acquisition of NIR-Green-Blue digital photographs from unmanned aircraft for crop monitoring. *Remote Sensing*. 2010;2(1):290–305. DOI: 10.3390/rs2010290.
17. Pottmann H. Integral invariants for robust geometry processing. *Computer Aided Geometric Design*. 2009;26(1):37–60. DOI: 10.1016/j.cagd.2008.01.002.
18. Sello S, Moscatiello R, La Rocca N, Baldan B, Navazio L. A rapid and efficient method to obtain photosynthetic cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:1444. DOI: 10.3389/fpls.2017.01444.
19. Straka L, Rittmann BE. Effect of culture density on biomass production and light utilization efficiency of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018;115(2):507–511. DOI: 10.1002/bit.26479.
20. Mishra KB, Mishra A, Novotná K, Rapantová B, Hodaňová P, Urban O, et al. Chlorophyll a fluorescence, under half of the adaptive growth-irradiance, for high-throughput sensing of leaf-water deficit in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Methods*. 2016; 12(46). DOI: 10.1186/s13007-016-0145-3.

21. Gonzalez-Dugo V, Zarco-Tejada P, Nicolas E, Nortes PA, Alarcon JJ, Intrigliolo DS, et al. Using high resolution UAV thermal imagery to assess the variability in the water status of five fruit tree species within a commercial orchard. *Precision Agriculture*. 2013; 14(6):660–678. DOI: 10.1007/s11119-013-9322-9.
22. Dungey HS, Dash JP, Pont D, Clinton PW, Watt MS, Telfer EJ. Phenotyping whole forests will help to track genetic performance. *Trends in Plant Science*. 2018;23(10):854–864. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.08.005.
23. Montagnoli A, Terzaghi M, Fulgaro N, Stoew B, Wipenmyr J, Ilver D, et al. Non-destructive phenotypic analysis of early stage tree seedling growth using an automated stereovision imaging method. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1644–1662. DOI: 10.3389/fpls.2016.01644.
24. Krabel D, Meyer M, Nyamjav B, Reiche B. Phenotyping trees for traits related to drought stress tolerance – importance and challenge. In: *Agrosym 2017. VIII International Scientific Agriculture Symposium; 2017 October 5–8; Jahorina, Bosnia and Herzegovina*. Lukavica: University of East Sarajevo; 2017.
25. Матюхин ДЛ, Манина ОС, Королёва НС. *Виды и формы хвойных, культивируемые в России*. Москва: Товарищество научных изданий КМК; 2009. с. 138–139.
26. Леонтьев ГП. *Дендропроектирование (Архитектура зеленого строительства)*. Тирасполь: ПГУ; 2006. с. 16–17.
27. Warner JL, Denny JC, Kreda DA, Alterovitz G. Seeing the forest through the trees: Uncovering phenomic complexity through interactive network visualization. *Journal of the American Medical Informatics Association*. 2015;22(2):324–329. DOI: 10.1136/amia-jnl-2014-002965.
28. Ларичев ОИ. Системы поддержки принятия решений. Современное состояние и перспективы их развития. *Итоги науки и техники. Серия: Техническая кибернетика*. 1987;21:131–164.
29. Martin SL, George T. Applications of hyperspectral image analysis for precision agriculture. In: *Conference on Micro- and Nanotechnology Sensors, Systems, and Applications X; 2018 April 15–19; Orlando, United States*. Orlando: [publisher unknown]; 2018. DOI: 10.1117/12.2303921.
30. Zhao H, Xu L, Shi S, Jiang H, Chen D. A high throughput integrated hyperspectral imaging and 3D measurement system. *Sensors*. 2018;18(4):1068. DOI: 10.3390/s18041068.
31. Yao X, Si H, Cheng T, Jia M, Chen Q, Tian Y, et al. Hyperspectral estimation of canopy leaf biomass phenotype per ground area using a continuous wavelet analysis in wheat. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1360. DOI: 10.3389/fpls.2018.01360.
32. Fahlgren N, Feldman M, Gehan MA, Wilson MS, Shyu C, Bryant DW, et al. A versatile phenotyping system and analytics platform reveals diverse temporal responses to water availability in *Setaria*. *Molecular Plant*. 2015;8(10):1520–1535. DOI: 10.1016/j.molp.2015.06.005.
33. Phenomics NL. Wageningen UR [Internet]. [Cited 2018 November 29]. Available from: <https://www.wageningenur.nl/en/Research-Results/Projects-and-programmes/PhenomicsNL.htm>.

References

1. Furbank RT, Tester M. Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science*. 2011;16(12): 635–644. DOI: 10.1016/j.tplants.2011.09.005.
2. Coppens F, Wuyts N, Inze D, Dhondt S. Unlocking the potential of plant phenotyping data through integration and data-driven approaches. *Current Opinion in Systems Biology*. 2017;4:58–63. DOI: 10.1016/j.coisb.2017.07.002.
3. Tardieu F, Cabrera-Bosquet L, Pridmore T, Bennett M. Plant phenomics, from sensors to knowledge. *Current Biology*. 2017; 27(15):770–783. DOI: 10.1016/j.cub.2017.05.055.
4. Ghanem ME, Marrou H, Sinclair TR. Physiological phenotyping of plants for crop improvement. *Trends in Plant Science*. 2015; 3:139–144. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.11.006.
5. Awada L, Phillips PWB, Smyth SJ. The adoption of automated phenotyping by plant breeders. *Euphytica*. 2018;214. DOI: 10.1007/s10681-018-2226-z.
6. Araus JL, Cairns JE. Field high-throughput phenotyping: The new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science*. 2014;19(1): 52–61. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.09.008.
7. Wallace A, Nichol C, Woodhouse I. Recovery of forest canopy parameters by inversion of multispectral LiDAR data. *Remote Sensing*. 2012;4(2):509–531. DOI: 10.3390/rs4020509.
8. Gerlai R. Phenomics: fiction or the future? *Trends Neurosciences*. 2002;25(10):506–509. DOI: 10.1016/S0166-2236(02)02250-6.
9. Thorp KR, Gore MA, Andrade-Sanchez P, Carmo-Silva AE, Welch SM, White JW, et al. Proximal hyperspectral sensing and data analysis; approaches for field-based plant phenomics. *Computers and Electronics in Agriculture*. 2015;118:225–236. DOI: 10.1016/j.compag.2015.09.005.
10. Hughes N, Askew K, Scotson CP, Williams K, Sauze C, Corke F, et al. Non-destructive, high-content analysis of wheat grain traits using X-ray micro computed tomography. *Plant Methods*. 2017;13:76. DOI: 10.1186/s13007-017-0229-8.
11. Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology*. 2009;36:978–989. DOI: 10.1071/FP09123.
12. Garbout A, Munkholm LJ, Hansen SB, Petersen BM, Munk OL, Pajor R. The use of PET/CT scanning technique for 3D visualization and quantification of real-time soil/plant interactions. *Plant and Soil*. 2012;352:113–127.
13. Zhang J, Naik HS, Assefa T, Sarkar S, Reddy RVC, Singh A, et al. Computer vision and machine learning for robust phenotyping in genome-wide studies. *Scientific Reports*. 2017;7:440–448. DOI: 10.1038/srep44048.
14. Ghosal S, Blystone D, Singh AK, Ganapathysubramanian B, Singh A, Sarkar S. An explainable deep machine vision framework for plant stress phenotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(18):4613–4618. DOI: 10.1073/pnas.1716999115.
15. Gutiérrez S, Fernandez-Novales J, Diago MP, Tardaguila J. On-the-go hyperspectral imaging under field conditions and machine learning for the classification of grapevine varieties. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1102. DOI: 10.3389/fpls.2018.01102.
16. Hunt ER, Hively WD, Fujikawa S, Linden D, Daughtry CST, McCarty G. Acquisition of NIR-Green-Blue digital photographs from unmanned aircraft for crop monitoring. *Remote Sensing*. 2010;2(1):290–305. DOI: 10.3390/rs2010290.

17. Pottmann H. Integral invariants for robust geometry processing. *Computer Aided Geometric Design*. 2009;26(1):37–60. DOI: 10.1016/j.cagd.2008.01.002.
18. Sello S, Moscattello R, La Rocca N, Baldan B, Navazio L. A rapid and efficient method to obtain photosynthetic cell suspension cultures of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:1444. DOI: 10.3389/fpls.2017.01444.
19. Straka L, Rittmann BE. Effect of culture density on biomass production and light utilization efficiency of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018;115(2):507–511. DOI: 10.1002/bit.26479.
20. Mishra KB, Mishra A, Novotná K, Rapantová B, Hodaňová P, Urban O, et al. Chlorophyll a fluorescence, under half of the adaptive growth-irradiance, for high-throughput sensing of leaf-water deficit in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Plant Methods*. 2016;12(46). DOI: 10.1186/s13007-016-0145-3.
21. Gonzalez-Dugo V, Zarco-Tejada P, Nicolas E, Nortes PA, Alarcon JJ, Intrigliolo DS, et al. Using high resolution UAV thermal imagery to assess the variability in the water status of five fruit tree species within a commercial orchard. *Precision Agriculture*. 2013;14(6):660–678. DOI: 10.1007/s11119-013-9322-9.
22. Dungey HS, Dash JP, Pont D, Clinton PW, Watt MS, Telfer EJ. Phenotyping whole forests will help to track genetic performance. *Trends in Plant Science*. 2018;23(10):854–864. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.08.005.
23. Montagnoli A, Terzaghi M, Fulgaro N, Stoew B, Wipenmyr J, Ilver D, et al. Non-destructive phenotypic analysis of early stage tree seedling growth using an automated stereovision imaging method. *Frontiers in Plant Science*. 2016;7:1644–1662. DOI: 10.3389/fpls.2016.01644.
24. Krabel D, Meyer M, Nyamjav B, Reiche B. Phenotyping trees for traits related to drought stress tolerance – importance and challenge. In: *Agrosym 2017. VIII International Scientific Agriculture Symposium; 2017 October 5–8; Jahorina, Bosnia and Herzegovina*. Lukavica: University of East Sarajevo; 2017.
25. Matyukhin DL, Manina OS, Koroleva NS. *Vidy i formy khvoynikh, kul'tiviruemye v Rossii*. Moscow: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK; 2009. p. 138–139. Russian.
26. Leontyak GP. *Dendroproektirovanie (Arkhitektura zelenogo stroitel'stva)*. Tiraspol: Pridnestrovian State University named after Taras Shevchenko; 2006. p. 16–17. Russian.
27. Warner JL, Denny JC, Kreda DA, Alterovitz G. Seeing the forest through the trees: Uncovering phenomic complexity through interactive network visualization. *Journal of the American Medical Informatics Association*. 2015;22(2):324–329. DOI: 10.1136/amia-jnl-2014-002965.
28. Larichev OI. Sistemy podderzhki prinyatiya reshenii. Sovremennoe sostoyanie i perspektivy ikh razvitiya. *Itogi nauki i tekhniki. Seriya: Tekhnicheskaya kibernetika*. 1987;21:131–164. Russian.
29. Martin SL, George T. Applications of hyperspectral image analysis for precision agriculture. In: *Conference on Micro- and Nanotechnology Sensors, Systems, and Applications X; 2018 April 15–19; Orlando, United States*. Orlando: [publisher unknown]; 2018. DOI: 10.1117/12.2303921.
30. Zhao H, Xu L, Shi S, Jiang H, Chen D. A high throughput integrated hyperspectral imaging and 3D measurement system. *Sensors*. 2018;18(4):1068. DOI: 10.3390/s18041068.
31. Yao X, Si H, Cheng T, Jia M, Chen Q, Tian Y, et al. Hyperspectral estimation of canopy leaf biomass phenotype per ground area using a continuous wavelet analysis in wheat. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1360. DOI: 10.3389/fpls.2018.01360.
32. Fahlgren N, Feldman M, Gehan MA, Wilson MS, Shyu C, Bryant DW, et al. A versatile phenotyping system and analytics platform reveals diverse temporal responses to water availability in *Setaria*. *Molecular Plant*. 2015;8(10):1520–1535. DOI: 10.1016/j.molp.2015.06.005.
33. Phenomics NL. Wageningen UR [Internet]. [Cited 2018 November 29]. Available from: <https://www.wageningenur.nl/en/Research-Results/Projects-and-programmes/PhenomicsNL.htm>.

Статья поступила в редколлегию 25.01.2019.
Received by editorial board 25.01.2019.

Авторы:

Антонина Юрьевна Шашко – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.
Владислав Юрьевич Бондаренко – магистрант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.
Александр Алексеевич Михальченко – стажер младшего научного сотрудника научно-исследовательской лаборатории информационных технологий и компьютерной графики кафедры информационных систем управления факультета прикладной математики и информатики.
Татьяна Геннадьевна Каляга – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.
Ольга Юрьевна Сафонова – младший научный сотрудник лаборатории биофизики и биохимии растительной клетки.

Authors:

Antonina Yu. Shashko, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. antonina.shashko@gmail.com
Uladzislau Yu. Bandarenka, master's degree student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. uladzislau.bandarenka@gmail.com
Alexander A. Mikhailchenko, probationer of junior researcher at the research laboratory of information technologies and computer graphics, department of management information systems, faculty of applied mathematics and computer science.
Tatsiana G. Kaliyaha, junior researcher at the laboratory of plant cell biophysics and biochemistry. t_kalyaga@mail.ru
Olga Yu. Safonova, junior researcher at the laboratory of plant cell biophysics and biochemistry. olga.safonova.1995@mail.ru

Дарья Андреевна Пржевальская – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии и биотехнологии растений кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Мария Александровна Черныш – аспирант кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Дмитрий Викторович Колбанов – заместитель директора. **Владимир Николаевич Жабинский** – доктор химических наук, доцент; главный научный сотрудник лаборатории химии стероидов.

Владимир Александрович Хрипач – академик НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор; заведующий лабораторией химии стероидов.

Игорь Иванович Смолич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Александр Николаевич Вальвачев – кандидат технических наук; доцент кафедры информационных систем управления факультета прикладной математики и информатики.

Сергей Владимирович Абламейко – академик НАН Беларуси, доктор технических наук, профессор; профессор кафедры веб-технологий и компьютерного моделирования механико-математического факультета.

Виктор Владимирович Краснопрошин – доктор технических наук, профессор; заведующий кафедрой информационных систем управления факультета прикладной математики и информатики.

Галина Николаевна Смоликова – кандидат биологических наук; доцент кафедры физиологии и биохимии растений биологического факультета.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Darya A. Przhevalskaya, junior researcher at the research laboratory of plant physiology and biotechnology, department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. daryaprzhevalskaya@gmail.com

Maryia A. Charnysh, postgraduate student at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. chernyshmaryia@gmail.com

Dmitrii V. Kolbanov, deputy director. dmitry-kolbanov@tut.by

Vladimir N. Zhabinskii, doctor of science (chemistry), docent; chief researcher at the laboratory of steroid chemistry. vz@ns.iboch.ac.by

Vladimir A. Khrpach, academician of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (chemistry), full professor; head of the laboratory of steroid chemistry. khripach@iboch.bas-net.by

Ihor I. Smolich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. smolich@bsu.by

Anatoliy I. Sokolik, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. sokolik@bsu.by

Alexander N. Valvachev, PhD (engineering); associate professor at the department of information management systems, faculty of applied mathematics and computer science. van_955@mail.ru

Sergei V. Ablameyko, academician of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (engineering), full professor; professor at the department of web technologies and computer modeling, faculty of mechanics and mathematics. ablameyko@bsu.by

Victor V. Krasnoproshin, doctor of science (engineering), full professor; head of the department of information management systems, faculty of applied mathematics and computer science. krasnoproshin@bsu.by

Galina N. Smolikova, PhD (biology); associate professor at the department of plant physiology and biochemistry, faculty of biology. galina.smolikova@gmail.com

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology. dzemidchik@bsu.by

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

УДК 577.21:575.113

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ *acdS*-ГЕНА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* В-37 В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *NICOTIANA TABACUM*

А. А. МЕЛЬНИКОВА¹⁾, Е. А. ХРАМЦОВА¹⁾,
Е. С. КОРОЛЕВА¹⁾, Д. А. РУТКЕВИЧ¹⁾, Т. А. КУКУЛЯНСКАЯ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Осуществлен перенос рекомбинантной плазмиды pB1121*acdS*, несущей *acdS*-ген бактерий *P. putida* В-37, в клетки *A. tumefaciens* AGL0. С помощью агробактериальной трансформации получены трансгенные растения *N. tabacum*. Методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров к данному гену подтверждена интеграция *acdS*-гена *P. putida* В-37 в геном трансгенных растений *N. tabacum*, а с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией – факт экспрессии гетерологичного гена в растениях *N. tabacum*. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 в трансгенных растениях *N. tabacum*,

Образец цитирования:

Мельникова АА, Храмцова ЕА, Королева ЕС, Руткевич ДА, Кукулянская ТА. Анализ экспрессии *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;1:45–53.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-45-53>

For citation:

Melnikava AA, Khramtsova AA, Karaleva KS, Rutkevich DA, Kukulianskaya TA. Expression analysis of *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* В-37 in transgenic plants *Nicotiana tabacum*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019;1:45–53. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-45-53>

Авторы:

Алеся Андреевна Мельникова – младший научный сотрудник кафедры генетики биологического факультета.

Елена Аркадьевна Храмцова – кандидат биологических наук; доцент кафедры генетики биологического факультета.

Екатерина Сергеевна Королева – студентка биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.

Дарья Андреевна Руткевич – студент биологического факультета. Научный руководитель – Е. А. Храмцова.

Татьяна Александровна Кукулянская – кандидат биологических наук; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Authors:

Alesia A. Melnikava, junior researcher at the department of genetics, faculty of biology.

Alena A. Khramtsova, PhD (biology); associate professor at the department of genetics, faculty of biology.

elena_khramtsova@inbox.ru

Katsiaryna S. Karaleva, student at the faculty of biology.

Daria A. Rutkevich, student at the faculty of biology.

Tatsiana A. Kukulianskaya, PhD (biology); associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

проведенный с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени, показал, что величина экспрессии была в 1,27 раза выше, чем у референс-гена. Это подтверждает факт экспрессии гена в данных растениях на высоком уровне. Указанный факт экспрессии был также подтвержден определением удельной активности 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат-деаминазы в трансгенных растениях *N. tabacum*.

Ключевые слова: АЦК-деаминаза; *Nicotiana tabacum*; *acdS*-ген; *Pseudomonas putida*.

EXPRESSION ANALYSIS OF *acdS*-GENE OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* B-37 IN TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM*

A. A. MELNIKA^a, A. A. KHRAMTSOVA^a,
K. S. KARALEVA^a, D. A. RUTKEVICH^a, T. A. KUKULIANSKAYA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus
Corresponding author: A. A. Khramtsova (elena_khramtsova@inbox.ru)

In current work was realized the transfer of recombinant plasmid pBI121*acdS*, carrying *P. putida* B-37 bacterial *acdS*-gene to the *A. tumefaciens* AGL0 cells. Transgenic plants of *N. tabacum* were created by agrobacterial transformation. Integration of *P. putida* B-37 bacterial *acdS*-gene to transgenic plants of *N. tabacum* was verified by PCR analysis, using specific primers to present gene. Presence of target *acdS*-gene in transgenic plants genome was proved by RT-PCR analysis. With help of Real-time PCR was shown the difference between reference gene and target *P. putida* B-37 bacterial *acdS*-gene expression. Expression of target gene exceeded reference gene in 1.27 times, those fact proved expression of *acdS*-gene in plants on high level. Expression of the heterologous gene in *N. tabacum* plants was also proved by biochemical method of ACC-deaminase specific activity define.

Key words: ACC-deaminase; *Nicotiana tabacum*; *acdS*-gene; *Pseudomonas putida*.

Введение

В настоящее время одна из ключевых задач – получение растений, обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды. Растения, произрастающие в сложных условиях, подвергаются стрессу, который вызван недостатком питательных веществ и химической токсичностью. Естественной реакцией растений на стресс является продукция стрессового гормона этилена, который приводит к снижению роста, уменьшению биомассы и ускорению процессов старения, пожелтению и опадению плодов [1; 2].

Этилен в оптимальной концентрации выполняет важную роль в процессах, связанных с нормальным ростом и развитием растений, однако в условиях абиотического и биотического стрессов его уровень повышается, что приводит к ингибированию роста корня, старению листьев и их опадению, разрушению хлорофилла [3; 4]. Одним из подходов к снижению уровня стрессового этилена в растениях является использование фермента АЦК-деаминазы, который разлагает предшественника этилена – АЦК – до аммиака и α -кетобутирата. В последнее время особое внимание уделяется исследованиям, направленным на разработку способов снижения продукции растениями стрессового этилена путем создания трансгенных растений, несущих бактериальный *acdS*-ген, кодирующий АЦК-деаминазу, и, как следствие, обладающих устойчивостью к стрессовым факторам среды [5–7].

Экспрессия *acdS*-гена бактерий в растениях существенно повышает показатели их роста и продуктивности. В настоящее время показано, что такая экспрессия в трансгенных растениях приводит к усиленной деградации стрессового этилена в корневой зоне и снятию негативного эффекта его действия, придает устойчивость к засухе, засолению и загрязнению почвы солями тяжелых металлов [8–12]. Создание трансгенных растений, синтезирующих бактериальную АЦК-деаминазу, которые характеризуются повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам, вызванным засолением почв или загрязнением их тяжелыми металлами, является в настоящее время высокоактуальным в связи с постоянно усиливающимся техногенным воздействием на природные сообщества и ухудшением экологической обстановки на территориях, занятых сельскохозяйственным производством.

Таким образом, цель данной работы – получение трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, несущих *acdS*-ген бактерий *Pseudomonas putida* B-37, и анализ его экспрессии в растениях табака.

Материалы и методы исследования

В качестве основных **объектов исследований** использовались бактериальные штаммы *P. putida* B-37, *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 и растения табака *N. tabacum*. Также применялись бактериальный штамм *E. coli* XI-1 Blue из коллекции научно-исследовательской лаборатории молекулярной генетики и биотехнологии биологического факультета БГУ и генетическая конструкция pBI121*acdS*, полученная нами ранее [13].

Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса по [14].

Электрофоретический анализ ДНК проводили в агарозном геле с использованием буферной системы TAE согласно методическим указаниям, изложенным в руководствах [15].

Рестрикцию ДНК осуществляли в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя ферментов *Thermo Fisher Scientific* (Литва).

Прямую трансформацию *A. tumefaciens* проводили методом замораживания-оттаивания согласно рекомендациям, изложенным в руководстве [15].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли по заданной программе с использованием аппарата C1000 Touch™ ThermalCycler фирмы *Bio-Rad Laboratories* (США). При постановке ПЦР применяли реактивы производства *Thermo Fisher Scientific*: Taq-полимеразу, 10-кратный Taq-буфер для ПЦР, смесь дНТФ и деионизированную воду в концентрациях, предложенных производителем. Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Аmplификацию гена *acdS* производили с использованием следующих праймеров:

- Forward: (Fatg) 5'-tccggatccatgaacctgaatcgttttaacgttatc-3';
- Reverse: (Rtga) 5'-tccggatcctcagccgttgcgraacargaag-3'.

Параметры циклов амплификаций: 5 мин при 94 °С – 1 цикл; по 30 с при 94 и 54 °С, 1,5 мин при 72 °С – 35 циклов; 30 с при 72 °С – 1 цикл.

Аmplификацию гена *virE2* производили с использованием следующих праймеров:

- Forward: (VirE2-F) 5'-cgaatacattctcgtgcgtcaaacg-3';
- Reverse: (VirE2-R) 5'-tttcgagtcataatgcctgac-3'.

Параметры циклов амплификаций: 5 мин при 94 °С – 1 цикл; по 30 с при 94 и 59 °С, 1 мин при 72 °С – 30 циклов; 7 мин при 72 °С – 1 цикл.

Выделение растительной РНК. Растительный материал растирали тонким металлическим шпателем. Добавляли 500 мкл буфера для экстракции, центрифугировали 10 мин при 12 000 об/мин. Отбирали водную фазу, соединяли ее с равным объемом 4-молярного LiCl. Центрифугировали 30 мин при 10 000 об/мин, к осадку добавляли 250 мкл H₂O, 25 мкл 3 моль/л AcNa (pH 5,2) и 550 мкл 96 % этанола. Пробы центрифугировали 30 мин при 12 000 об/мин. Осадок промывали 1 мл 70 % этанола. Образцы центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин. Удаляли супернатант, подсушивали осадок и растворяли его в 40 мкл H₂O.

Синтез кДНК. В стерильный эппендорф на льду добавляли в следующем порядке реактивы: мРНК (0,1–5,0 нг), праймеры (0,5 мкг), ДЕПК-воду (до 12,5 мкл). Затем вводили 4 мкл 5x-буфера для реакции, 0,5 мкл ингибитора РНКазы, 2 мкл смеси нуклеотидов, 1 мкл обратной транскриптазы. Инкубировали 10 мин при 25 °С, 60 мин – при 42 °С. Ингибировали реакцию нагреванием до 70 °С в течение 10 мин.

Для синтеза кДНК использовали обратную транскриптазу Revert Aid TM Premium Reverse Transcriptase, произведенную фирмой *Fermentas*.

Культивирование и агробактериальная трансформация табака. Листья растений *N. tabacum* 6–8-недельного возраста, выращенные на среде А1 при 24 °С и 16-часовом световом дне, разрезали на фрагменты около 0,25 см², отделив предварительно центральную жилку, делали насечки по краям и выкладывали на чашки с агробактериями на среде А2, нижней стороной вниз, по 10–12 штук на чашку. Инкубировали 2 сут в темноте при 28 °С, затем переносили диски на среду А3 с селективным агентом для стимуляции каллусогенеза (канамицин – Km) и тиментином для элиминации агробактериального роста. Помещали на свежую среду А3 раз в неделю до образования каллусов. При появлении каллусогенеза осуществляли перенос на чашки со средой А4 с селективным антибиотиком и необходимыми гормонами для стимуляции образования побегов. Последние переносили на среду А5 с антибиотиком и затем в почву.

Выделение тотальной ДНК. Растительный материал помещали в пробирку, вливали жидкий азот, выдерживали несколько секунд до его испарения и быстро растирали листовую ткань в порошок. Добавляли буфер для выделения ДНК до объема 750 мкл; ресуспендировали и инкубировали пробу при 65 °С в течение 10 мин. Затем вводили 200 мкл 5 моль/л ацетата калия, пробирку энергично встряхивали. Инкубировали пробу на ледяной бане 20 мин. Центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант переносили в новую пробирку, добавляли равный

объем изопропанола, перемешивали и центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 2 мин. Удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в равном объеме 80 % этанола. Супернатант удаляли, осадок подсушивали. Растворяли ДНК в 50 мкл ТЕ-буфера и хранили при -20°C .

Количественная ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл составляли следующим образом: 2 × ПЦР-буфер Maxima SYBR Greenq PCR Master Mix (*Thermo Scientific*, США) – 12,5 мкл; праймер F – 0,5 мкл; праймер R – 0,6 мкл; образец кДНК (20 нг/мкл) – 2 мкл. Конечный объем доводили водой до 25 мкл. Программа амплификации была следующей: 2 мин при 50°C – 1 цикл; 10 мин при 95°C – 1 цикл; 15 с при 95°C , 30 с при 55°C , 60 с при 60°C – 40 циклов. Использованные праймеры:

- RT-ATG-For1 – 5' – ATGAACCTGAATCGTTTTGAACGTTATC-3';
- RT-ATG-Rev1 – 5' – CACTGTTGCAGTCTTCACGTTTG-3'.

Определение содержания белка в растительных гомогенатах проводили биуретовым методом [16]. Активность АЦК-деаминазы оценивали по количеству α -кетобутирата, образующегося за 1 мин на 1 мг белка в растительном гомогенате при дезаминировании 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата. Количество α -кетобутирата определяли спектрофотометрически при 540 нм. Реакционную смесь, содержащую 20 мкл растительного гомогената и 10 мкмоль АЦК и 200 мкл 0,1 моль/л трис-буфера (рН 7,4), инкубировали 60 мин при 30°C . Реакцию останавливали добавлением 180 мкл 0,56 моль/л HCl и вносили 30 мкл 0,1 % раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Пробы инкубировали в течение 15 мин при 30°C , останавливали реакцию добавлением 200 мкл NaOH (2 моль/л) и измеряли оптическую плотность при 540 нм.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами была создана генетическая конструкция, несущая *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37 под контролем промотора 35SCaMV в составе бинарного вектора pBI121. Показано, что данная рекомбинантная плазмида pBI121*acdS* способна встраиваться в растительный геном, и установлено наличие транзientной экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в растительных клетках *Nicotiana benthamiana* [13]. Следовательно, полученная генетическая конструкция может быть использована для создания трансгенных растений, эффективно экспрессирующих *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37 и обладающих повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, таким как засоление почвы, загрязнение ее солями тяжелых металлов, засухе и др.

Трансформация клеток *A. tumefaciens* AGL0. Трансгенные растения *N. tabacum* получали с помощью агробактериальной трансформации. Для этого использовали гипервирулентный штамм агробактерий *A. tumefaciens* AGL0. Перенос рекомбинантной плазмиды pBI121*acdS* в клетки *A. tumefaciens* AGL0 осуществляли путем прямой трансформации. Отбор трансформантов проводили на селективной среде, содержащей антибиотика Km в концентрации 50 мкг/мл и рифампицин в концентрации 20 мкг/мл. Из отобранных клонов выделена плазмидная ДНК, которая впоследствии использована в качестве ДНК-матрицы для ПЦР. Как видно из данных, представленных на рис. 1, в ходе ПЦР с использованием специфических праймеров к последовательности *acdS*-гена получен фрагмент ДНК размером 1000 п. н., соответствующий целевому гену бактерий *P. putida* B-37.

Таким образом, был осуществлен перенос рекомбинантной плазмиды pBI121*acdS* из клеток *E. coli* XI-1 Blue в бактерии *A. tumefaciens* AGL0.

Агробактериальная трансформация клеток *N. tabacum*. Агробактериальная трансформация растений табака 6–8-недельного возраста клетками *A. tumefaciens* AGL0, несущими рекомбинантную плазмиду pBI121*acdS*, произведена методом листовых дисков. Через 2 сут инкубирования листовые диски перенесены на чашки Петри с селективным агентом. Для элиминации *A. tumefaciens* в среду был добавлен цефотаксим в концентрации 150 мкг/мл.

В качестве контролей использованы нетрансформированные фрагменты листьев. Положительный контроль (без содержания Km) показывал способность среды инициировать каллусообразование; отрицательный контроль демонстрировал чувствительность растительных клеток к содержанию в среде антибиотика Km.

Через три недели на образцах и положительном контроле наблюдался процесс каллусообразования. Четырехнедельные образцы представлены на рис. 2.

Каллусная ткань была перенесена на среду, стимулирующую образование сначала побегов, а затем корней. Растения-регенеранты далее помещались в условия закрытого грунта.

Определение интеграции *acdS*-гена *P. putida* B-37 в растения *N. tabacum*. Для проверки наличия вставки *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в геном растений-регенерантов проводили выделение тотальной ДНК с последующим проведением ПЦР с использованием специфических праймеров к данному гену. В результате получен фрагмент ДНК размером ~1000 п. н., соответствующий размеру *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 (рис. 3).

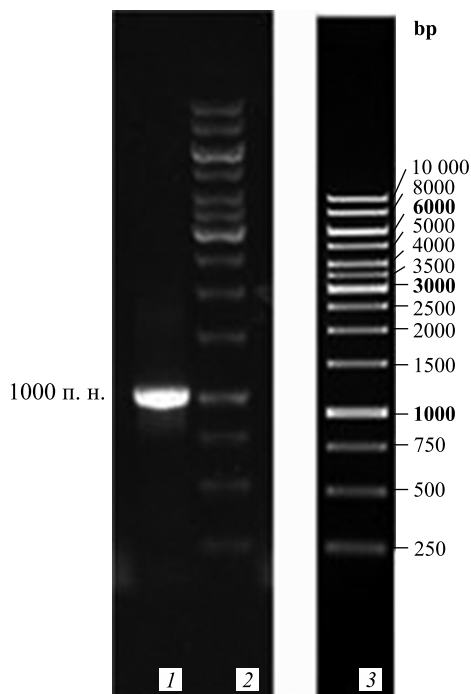


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР:
1 – фрагмент (~1000 п. н.), соответствующий *acdS*-гену бактерий *P. putida* B-37; 2, 3 – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 1. Electrophoregram of PCR results:
1 – fragment (~1000 bp), corresponding to the *acdS*-gene of bacteria *P. putida* B-37; 2, 3 – Gene Ruler 1 kb DNA Ladder marker DNA



Рис. 2. Трансформированные четырехнедельные листовые диски:
1 – трансформированные клетки растения табака *N. tabacum* с плазмидой pBI121*acdS*;
2 – положительный контроль (без антибиотика Km); 3 – отрицательный контроль (с антибиотиком Km)

Fig. 2. Transformed four-week leaf disks:
1 – transformed cells of the tobacco plant *N. tabacum* with plasmid pBI121*acdS*;
2 – positive control (without antibiotic Km); 3 – negative control (with antibiotic Km)

Для того чтобы удостовериться в том, что положительный результат ПЦР с праймерами к *acdS*-гену *P. putida* B-37 не является следствием контаминации проб клетками *A. tumefaciens* AGL0, была проведена ПЦР со специфическими праймерами к *virE2*-гену указанных бактерий. Показано, что все проверенные образцы не выявили при амплификации наличия продукта размером 620 п. н., соответствующего фрагменту агробактериального гена *virE2*.

Таким образом, установлено, что в геноме растений-регенерантов *N. tabacum*, полученных из трансформированной каллусной культуры, содержится *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37. Однако следует отметить, что наличие чужеродного гена в растительном организме не может означать, что данный ген будет там эффективно экспрессироваться.

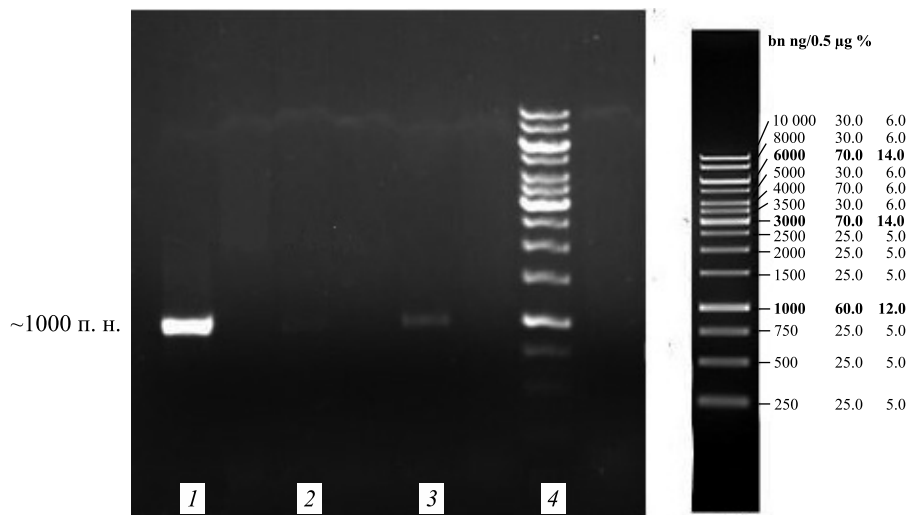


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР: 1 – положительный контроль на *acdS*-ген; 2, 3 – фрагменты ДНК размером ~1000 п. н.; 4 – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Fig. 3. Electrophoretic analysis of PCR products: 1 – positive control for *acdS*-gene; 2, 3 – DNA fragments ~1000 bp in size; 4 – Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

Анализ уровня экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 в трансгенных растениях *N. tabacum*. Установлено, что на эффективность экспрессии гетерологичного гена может оказывать влияние место его интеграции в геном растений, в частности, интеграция в область гетерохроматина может привести к замолчанию трансгена. Также в процессе развития растений возможно изменение уровня экспрессии трансгена или полная инактивация гетерологичного гена [17; 18].

Для подтверждения экспрессии гетерологичного гена в растениях табака проведена ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), где в качестве матрицы использована тотальная РНК, выделенная из растений-регенерантов. Полученную кДНК далее применяли для постановки ПЦР с праймерами к *acdS*-гену *P. putida* В-37.

Данные, представленные на рис. 4, показывают, что во всех анализируемых трансгенных растениях обнаруживается ПЦР-продукт размером 1000 п. н., соответствующий *acdS*-гену *P. putida* В-37.

В результате ОТ-ПЦР мРНК контрольных нетрансформированных растений продуктов амплификации целевого гена *acdS* не выявлено. Для контроля качества синтеза кДНК, как и ранее, использовался ген альфа-субъединицы фактора элонгации транскрипции *Ef-1α*. Таким образом, не только доказана успешная интеграция целевого гена АЦК-дезаминазы в растительный геном, но и подтвержден факт экспрессии гетерологичного гена в растениях *N. tabacum*. Однако на основании проведенных экспериментов нельзя судить об уровне экспрессии трансгена в растении.

Для определения уровня экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 в трансгенных растениях *N. tabacum* применяли метод ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).

Для определения уровня экспрессии гетерологичного гена в трансгенных растениях *N. tabacum* применяли протокол ПЦР-РВ с использованием интеркалирующих флуоресцентных агентов (SYBR Green). Общепринятым стандартом значений порогового цикла флуоресценции (*C_q*) при количественной оценке ПЦР является диапазон 15–30, рекомендованный для использования в большинстве сертифицированных протоколов и представленных на рынке коммерческих тест-систем [19]. Абсолютные значения *C_q* изучаемого гена *acdS* для использованных образцов находились в пределах 23–28 циклов.

Расчет данных ПЦР-РВ производили методом прямого сравнения по формуле $2^{-C_q(acdS) - C_q(Ef1\alpha)}$. Установлено, что уровень экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 в одном из трансгенных растений *N. tabacum* был в 1,27 раза выше, чем у референс-гена (рис. 5).

Для подтверждения экспрессии чужеродного гена в растениях *N. tabacum* определена удельная активность АЦК-дезаминазы. Установлено, что в трансгенных растениях, не испытывающих стрессовых воздействий, активность АЦК-дезаминазы составляла $(4,32 \pm 0,18)$ нмоль/(ч · мг белка), что согласуется с литературными данными об удельной активности фермента в других трансгенных растениях [20].

Таким образом, были получены трансгенные растения *N. tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *P. putida* В-37, и подтвержден факт его эффективной экспрессии в данных растениях.

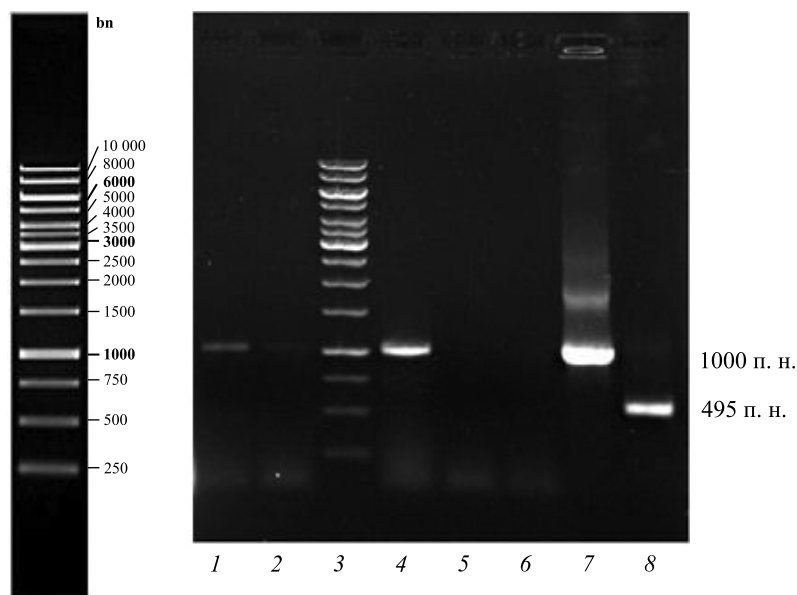


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР:

- 1, 2, 4 – κДНК растительных образцов *N. tabacum*;
3 – маркерная ДНК Gene Ruler 1 kb DNA Ladder;
5, 6 – отрицательный контроль κДНК (нетрансформированные растения);
7 – контроль ДНК, фрагмент ~1000 п. н., соответствующий *acdS*-гену *P. putida* B-37;
8 – положительный контроль κДНК, *Ef-1α* (495 п. н.)

Fig. 4. Electrophoretic analysis of PCR products:

- 1, 2, 4 – cDNA of plant *N. tabacum* samples; 3 – Gene Ruler 1 kb DNA Ladder marker DNA;
5, 6 – negative control cDNA (untransformed plants); 7 – DNA control, fragment ~1000 bp,
corresponding to the *acdS*-gene of *P. putida* B-37; 8 – positive control cDNA, *Ef-1α* (495 bp)

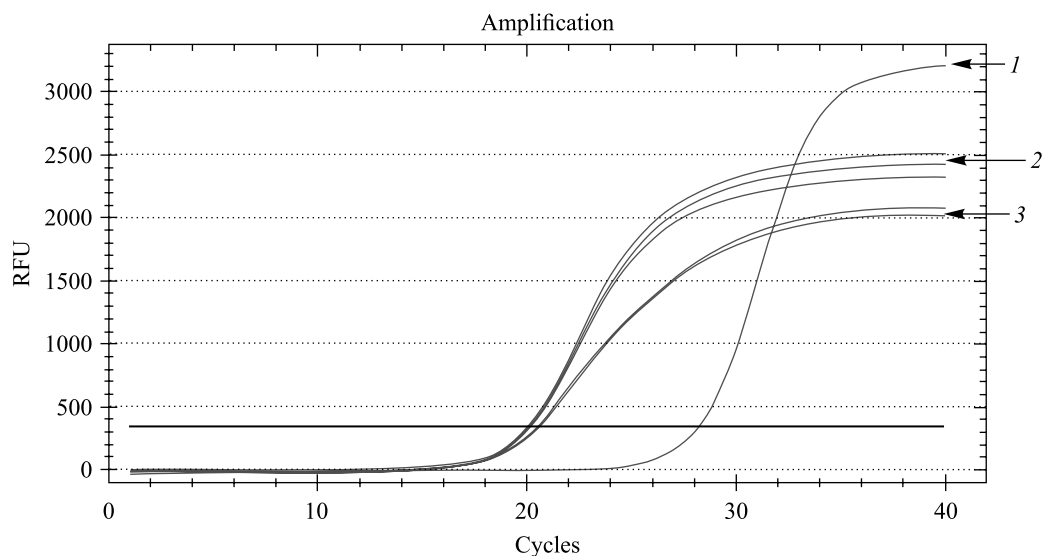


Рис. 5. Уровень экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* B-37 в трансгенном растении *N. tabacum*:
1 – отрицательный контроль (без матрицы); 2 – образцы, соответствующие исследуемому гену (*acdS*);
3 – образцы, соответствующие референс-гену (*Ef-1α*)

Fig. 5. The expression level of the *acdS*-gene of *P. putida* B-37 bacteria in the *N. tabacum* transgenic plant:
1 – negative control (no matrix); 2 – samples corresponding to the gene under study (*acdS*);
3 – samples corresponding to the reference gene (*Ef-1α*)

Заклучение

Осуществлен перенос рекомбинантной плазмиды pBI121*acdS* из клеток *E. coli* XI-1 Blue в бактерии *A. tumefaciens* AGL0. Методом листовых дисков произведена агробактериальная трансформация табака клетками *A. tumefaciens* AGL0, несущими рекомбинантную плазмиду, получены растения-регенеранты. С помощью ПЦР установлено, что в геноме растений-регенерантов *N. tabacum* из трансформированной каллусной культуры содержится *acdS*-ген бактерий *P. putida* В-37. С использованием ОТ-ПЦР, где в качестве матрицы применялась тотальная РНК, выделенная из растений-регенерантов, не только доказана успешная интеграция целевого гена АЦК-деаминазы в растительный геном, но и подтвержден факт экспрессии гетерологического гена в растениях *N. tabacum*.

Методом ПЦР-РВ установлено, что уровень экспрессии *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 в одном из трансгенных растений *N. tabacum* был в 1,27 раза выше, чем у референс-гена.

Таким образом, были получены трансгенные растения *N. tabacum*, несущие *acdS*-ген бактерий *P. putida* В-37, и подтвержден факт его эффективной экспрессии в этих растениях.

Практическая значимость данного исследования связана с использованием трансгенных растений, экспрессирующих бактериальный ген АЦК-деаминазы (*acdS*) и обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным воздействиям окружающей среды.

Библиографические ссылки

1. Полевой ВВ. *Физиология растений*. Москва: Высшая школа; 1989. 351 с.
2. Glick BR. *Beneficial plant-bacterial interactions*. Heidelberg: Springer; 2015. 243 p.
3. Bakker PAHM, Raaijmakers JM, Bloembergen G, Hoftte M, Lemanceau P, Cooke BM, editors. New perspectives and approaches in plant growth-promoting *Rhizobacteria* research. *European Journal of Plant Pathology*. 2007;119(3):334–358.
4. Jin Z, Di Rienzi SC, Janson A, Werner JJ, Angenent LT, Dangl JL, editors. Novel rhizosphere soil alleles for the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase queried for function with an *in vivo* competition assay. *Applies and Environmental Microbiology*. 2016;82(4):1050–1059. DOI: 10.1128/AEM.03074-15.
5. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. In: Maheshwari DK, editor. *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 187–204. DOI: 10.1007/978-3-642-23465-1.
6. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. PMID: 388356.
7. Singh RP, Shelke GM, Kumar A, Jha PN. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to «stress ethylene» produced in plants. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:937. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00937.
8. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.
9. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, Shah S, Dixon DG, et al. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil*. 2006;288(1):309–318. DOI: 10.1007/s11104-006-9119-y.
10. Sergeeva E, Shan S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
11. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, McCormack K, Shah S, et al. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environmental Pollution*. 2007;147(3):540–545. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.10.014.
12. Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Nejati A, Rahmani HA, Sadaghiani HR, et al. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*. 2009;166(6):667–674. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.08.004.
13. Мельникова АА, Волкова ДС, Храмова ЕА. Характеристика *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 и создание генетической конструкции для определения транзиторной экспрессии данного гена в растительных клетках *Nicotiana benthamiana*. *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. 2017;3:61–68.
14. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction producer for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
15. Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование*. Баева АА, Скрыбина КГ, редакторы. Москва: Мир; 1984. 479 с.
16. Семак ИВ, Зырянова ТН, Губич ОИ. *Биохимия белков*. Минск: БГУ; 2007. 49 с.
17. Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biology*. 2000;43(2–3):401–415. DOI: 10.1023/A:1006484806925.
18. Дейнеко ЕВ, Загорская АА, Филипенко ЕА, Кочетов АВ, Шумный ВК, Филипенко МЛ и др. Нестабильность экспрессии гена *nr1I* у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) при инбридинге. *Генетика*. 1998;34(9):1212–1219.
19. Saunders NA, Lee MA, editors. *Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications*. Poole: Caister Academic Press; 2013. 302 p.
20. Gontia-Mishra I, Sasidharan S, Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2014;36(5):889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.

References

1. Polevoj VV. *Fiziologiya rastenii* [Plant physiology]. Moscow: Vysshaya shkola; 1989. 351 p. Russian.
2. Glick BR. *Beneficial plant-bacterial interactions*. Heidelberg: Springer; 2015. 243 p.
3. Bakker PAHM, Raaijmakers JM, Bloemberg G, Hofte M, Lemanceau P, Cooke BM, editors. New perspectives and approaches in plant growth-promoting *Rhizobacteria* research. *European Journal of Plant Pathology*. 2007;119(3):334–358.
4. Jin Z, Di Rienzi SC, Janzon A, Werner JJ, Angenent LT, Dangl JL, editors. Novel rhizosphere soil alleles for the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase queried for function with an *in vivo* competition assay. *Applies and Environmental Microbiology*. 2016;82(4):1050–1059. DOI: 10.1128/AEM.03074-15.
5. Saravanakumar D. Rhizobacterial ACC deaminase in plant growth and stress amelioration. In: Maheshwari DK, editor. *Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 187–204. DOI: 10.1007/978-3-642-23465-1.
6. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. PMID: 388356.
7. Singh RP, Shelke GM, Kumar A, Jha PN. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to «stress ethylene» produced in plants. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:937. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00937.
8. Grichko VP, Filby B, Glick BR. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(1):45–53. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00270-4.
9. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, Shah S, Dixon DG, et al. The use of transgenic canola (*Brassica napus*) and plant growth-promoting bacteria to enhance plant biomass at a nickel-contaminated field site. *Plant Soil*. 2006;288(1):309–318. DOI: 10.1007/s11104-006-9119-y.
10. Sergeeva E, Shan S, Glick BR. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. Westar) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006;22(3):277–282. DOI: 10.1007/s11274-005-9032-1.
11. Farwell AJ, Vesely S, Nero V, Rodriguez H, McCormack K, Shah S, et al. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environmental Pollution*. 2007;147(3):540–545. DOI: 10.1016/j.envpol.2006.10.014.
12. Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Nejati A, Rahmani HA, Sadaghiani HR, et al. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonads, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*. 2009;166(6):667–674. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.08.004.
13. Melnikava AA, Volkava DS, Khramtsova EA. Characteristics of bacterial *acdS*-gene from the strain *Pseudomonas putida* B-37 and the creation of a genetic construct for determining its transient expression in the plant cells *Nicotiana benthamiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*. 2017;3:61–68. Russian.
14. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction producer for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6):1513–1523. DOI: 10.1093/nar/7.6.1513.
15. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. 545 p.
Russian edition: Maniatis T, Frich E, Sembruk Dzh. *Molekulyarnoe klonirovanie*. Baeva AA, Skryabina KG, editors. Moscow: Mir; 1984. 479 p.
16. Semak IV, Zyryanova TN, Gubich OI. *Biokhimiya belkov* [Biochemistry of proteins]. Minsk: Belarusian State University; 2007. 49 p. Russian.
17. Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biology*. 2000;43(2–3):401–415. DOI: 10.1023/A:1006484806925.
18. Deineko EV, Zagorskaya AA, Filipenko EA, Kochetov AV, Shumnyi VK, Filipenko ML, et al. Instability of the gene *npI* expression in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants during inbreeding. *Genetika*. 1998;34(9):1212–1219. Russian.
19. Saunders NA, Lee MA, editors. *Real-Time PCR: Advanced Technologies and Applications*. Poole: Caister Academic Press; 2013. 302 p.
20. Gontia-Mishra I, Sasidharan S, Tiwari S. Recent developments in use of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase for conferring tolerance to biotic and abiotic stress. *Biotechnology Letters*. 2014;36(5):889–898. DOI: 10.1007/s10529-014-1458-9.

Статья поступила в редакцию 08.01.2019.
Received by editorial board 08.01.2019.

УДК 577.19+615.017

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ АДАПТОГЕНОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОГО АЛКОГОЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ *in vivo*

О. И. ГУБИЧ¹⁾, Я. Ю. ДАШКОВА¹⁾, И. Н. КРИВЛЕНЯ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Изучена эффективность коррекции величин биохимических маркеров поражения печени и перекисного окисления липидов препаратами растительных адаптогенов (железницы крымской (*Sideritis scardica*), суданской розы (*Hibiscus sabdariffa*), рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii Rehder*)) у лабораторных крыс в экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации. Показано, что употребление всех исследованных препаратов в определенной мере способствует нормализации клинических показателей поражения печени (активность щелочной фосфатазы и аланинаминотрансферазы, содержание свободного и связанного билирубина в сыворотке крови) и перекисного окисления липидов подопытных животных (содержание восстановленных SH-групп и ТБК-активных продуктов, активность каталазы и супероксиддисмутазы в гомогенате печени). В использованной модели наиболее выраженные антиоксидантные и защитные эффекты, сопоставимые с действием классических препаратов гепатопротекторного ряда «Гепсил-Рн» и «Эссенциале форте», проявляли отвары железницы крымской и рододендрона Адамса, что может быть обусловлено высоким содержанием в их составе флавоноидов и ненасыщенных жирных кислот.

Ключевые слова: адаптоген; хроническая алкогольная интоксикация; сыворотка крови; гепатопротекция; перекисное окисление липидов; «Эссенциале форте».

Образец цитирования:

Губич ОИ, Дашкова ЯЮ, Кривленя ИН. Сравнительная оценка гепатопротекторных свойств растительных адаптогенов на экспериментальной модели хронического алкогольного поражения печени *in vivo*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2019;1:54–62. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-54-62>

For citation:

Hubich AI, Dashkova YaYu, Krivlenya IN. The comparative evaluation of plant adaptogenes' hepatoprotective properties on the experimental model of rat liver chronic alcohol damage *in vivo*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2019;1:54–62. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-54-62>

Авторы:

Оксана Игоревна Губич – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Яна Юрьевна Дашкова – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Инна Николаевна Кривленя – студентка биологического факультета. Научный руководитель – О. И. Губич.

Authors:

Aksana I. Hubich, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

hubich_oksana@tut.by

Yana Yu. Dashkova, student at the faculty of biology.

yanadashkova_98@mail.ru

Inna N. Krivlenya, student at the faculty of biology.

inna_krivlenya@mail.ru

THE COMPARATIVE EVALUATION OF PLANT ADAPTOGENES' HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES ON THE EXPERIMENTAL MODEL OF RAT LIVER CHRONIC ALCOHOL DAMAGE *in vivo*

A. I. HUBICH^a, Yu. Yu. DASHKOVA^a, I. N. KRIVLENYA^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. I. Hubich (hubich_oksana@tut.by)

This work is devoted to the study of the effectiveness of biochemical liver damage markers and lipid peroxidation correction by plant adaptogens (*Sideritis scardica*, *Hibiscus sabdariffa*, *Rhododendron adamsii* Rehder) in laboratory rats with experimental chronic alcohol intoxication. It was shown that the using of all drugs studied contributes to the normalization of liver damage indicators (alkaline phosphatase and alanine aminotransferase activity, the content of free and bound bilirubin in the blood serum) and lipid peroxidation markers (the content of reduced SH-groups and TBA-active products, catalase and superoxide dismutase activity in the liver homogenate). It was demonstrated that the most pronounced antioxidant and hepatoprotective effects in this model, comparable to the action of classical hepatoprotectors «Hepsil-Rn» and «Essentiale Forte», had decoctions of *Sideritis scardica* and *Rhododendron adamsii* Rehder which may be due to the high content of flavonoids and unsaturated fatty acids in their composition.

Key words: adaptogen; chronic alcohol intoxication; blood serum; hepatoprotection; lipid peroxidation; «Essentiale Forte».

Введение

Злоупотребление спиртными напитками распространено повсеместно и представляет серьезную проблему медицинского и социального плана. Согласно экспертным оценкам, по причине злоупотребления алкоголем ежегодно в мире умирает около 1,8 млн человек, что составляет примерно 3,2 % общего уровня смертности [1]. Токсическое действие этанола на организм человека сложно и многообразно. Известно, что этиловый спирт оказывает влияние на центральную нервную систему, функционирование печени, легких, форменных элементов крови, регенерацию тканей [2]. При значительном употреблении алкоголя включаются прямые механизмы цитотоксического влияния, развиваются электролитные нарушения, активируются аутоиммунные процессы, перекисное окисление липидов (ПОЛ), происходит накопление эстерифицированных жирных кислот, развивается алкогольная болезнь сердца [3]. Доказан нейровоспалительный механизм этанолиндукцированного повреждения мозга за счет нарушения функционирования транскрипционного фактора NF-κB [4]. На фоне алкогольного опьянения замедляются процессы реэпителизации и ангиогенеза при повреждении кожных покровов [2]. К иным значимым алкоголь-индуцированным болезням и состояниям относят артериальную гипертензию, аритмию, порфирию, гиперлипотеинемию, периферическую нейропатию, деменцию, туберкулез, эндокардит, псориаз, гастрит, гастроэзофагеальную рефлюксную болезнь [5].

По данным Всемирной организации здравоохранения, 70 % пациентов, злоупотребляющих алкоголем, страдают алкогольной болезнью печени (АБП), проявляющейся 3 основными формами: жировой дистрофией (60–90 % случаев), алкогольным гепатитом (10–30 %) и циррозом печени (8–20 %) [6]. Наиболее опасным при развитии АБП является ежедневный прием алкоголя, тогда как периодический не лишает печень способности к регенерации.

На сегодня механизмы этанольного поражения печени хорошо изучены. Основные звенья патогенеза в данном случае связаны с воздействием эндотоксинов, развитием окислительного стресса и воспаления [6]. Установлено, что метаболизм этанола в печени осуществляется при помощи 3 ферментных систем: алкогольдегидрогеназы, цитохрома P₄₅₀2E1 (CYP2E1) и каталазы [7]. Под действием алкогольдегидрогеназы и CYP2E1 алкоголь метаболизируется в ацетальдегид, который является высокореактивным и потенциально токсичным соединением, а также проявляет канцерогенные свойства, повышая риск развития гепатоцеллюлярного рака [7–9]. Ацетальдегид оказывает повреждающее действие на гепатоциты, вызывая разрушение биологических мембран и некроз клеток печени. Он усиливает синтез триацилглицеринов и способствует их отложению в гепатоцитах, ингибирует синтез альбумина и нарушает обезвреживающую функцию печени по отношению к экзогенным токсинам, стимулирует процессы фиброгенеза, нарушает метаболизм пиридоксиновых кофакторов ферментов и витаминов группы B [10]. Метаболизм этанола сопровождается увеличением продукции активных форм кислорода, включая гидроксильные радикалы и супероксидный анион, что приводит к индукции ПОЛ, повреждению структуры белков и митохондриальной ДНК, что, в свою очередь, снижает энергетический баланс клетки [11].

В клинической практике для терапии АБП традиционно используются гепатопротекторы, антихолестатические и витаминные препараты [12]. Воспалительная природа алкогольного гепатита и иммунологические нарушения предопределяют перспективность применения кортикостероидов. Повышение уровня восстановленного глутатиона, как основного эндогенного антиоксиданта, может быть достигнуто назначением предшественников цистеина – ацетилцистеина или S-аденозилметионина [13]. Среди гепатопротекторов растительного происхождения, проявляющих антиоксидантный эффект, особое место занимают препараты силимарина из расторопши пятнистой [14]. Вместе с тем поиск лекарственных средств, обладающих гепатопротекторной активностью и препятствующих развитию патологических процессов на фоне снижения эндогенной антиоксидантной защиты, по-прежнему не теряет своей актуальности.

Современные подходы в фармакотерапии острой интоксикации этанолом разрабатывают исходя из необходимости усилить детоксикацию этанола в печени с минимальными побочными эффектами [15]. Подобным действием могут обладать препараты природных адаптогенов. Эффект данных соединений на организм человека многовекторный: они проявляют иммуностимулирующую активность и улучшают пластический обмен, стимулируют центральную нервную и эндокринную системы, модулируют избирательную проницаемость биологических мембран, оказывают антиоксидантное действие и активируют ферменты энергетического обмена, что приводит к нормализации обмена веществ [16; 17]. Среди прочих адаптогенов пристальное внимание привлекает к себе железница крымская (*Sideritis scardica*), характеризующаяся чрезвычайно богатым химическим составом, включающим дитерпены, гидрокарбонаты, жирные кислоты, простые и сложные эфиры, алифатические и ароматические спирты, стеролы, тритерпены и монотерпены, танины, флавины, благодаря чему данное растение уже используется как противовоспалительное, седативное, противомикробное, противоязвенное, антиоксидантное, спазмолитическое, противосудорожное [18–20].

Компоненты отвара суданской розы (*Hibiscus sabdariffa*), более известной как каркаде (органические кислоты, флавоноиды, антоцианы, аскорбиновая кислота), укрепляют стенки кровеносных сосудов, снижают артериальное давление, регулируют уровень холестерина в крови, проявляют иммуномодулирующую активность, обладают противовоспалительным, тонизирующим и антибактериальным действием [21].

Рододендрон Адамса (*Rhododendron adamsii Rehder*) широко применяется в тибетской и монгольской народной медицине благодаря своим адаптогенным, тонизирующим, антибактериальным, иммуностимулирующим, противовоспалительным и антиоксидантным свойствам [22]. Изучение химического состава позволило установить в его надземной части наличие флавоноидов, дубильных веществ, гликозидов, кумаринов, эфирных масел, жирных кислот, кислот с циклопропановым фрагментом, пренилированных фенолов [23; 24].

Ранее проведенное на кафедре биохимии биологического факультета БГУ исследование возможной коррекции изменений углеводного и белкового обмена у крыс с аллоксановым диабетом, равно как и у животных, находившихся на экспериментальной «ресторанной диете» с преобладанием легкоусвояемых углеводов, путем ежедневного введения отваров аптечных препаратов указанных выше растений подтверждает их эффективность [25; 26]. В то же время, несмотря на многочисленные фармакологические эффекты отваров и экстрактов данных растений, их способность оказывать стабилизирующее влияние на печень в условиях хронического алкогольного воздействия прежде не изучалась.

Цель данной работы – изучение влияния отваров железницы крымской (*Sideritis scardica*), суданской розы (*Hibiscus sabdariffa*) и рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii Rehder*) на биохимические маркеры поражения печени и показатели ПОЛ лабораторных крыс в экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на беспородных белых крысах-самцах массой 180–200 г, находящихся на стандартной диете вивария БГУ. Все эксперименты осуществляли в соответствии с этическими нормами обращения с животными, а также правилами проведения работ с использованием лабораторных животных в научных исследованиях на биологическом факультете БГУ, составленными на основании рекомендаций и требований Всемирного общества защиты животных и Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (Страсбург, 1986).

Для создания экспериментальной модели хронической алкогольной интоксикации 96 % этанол разводили водой до 15 % и предоставляли для питья (как альтернативу воде) в течение 6 недель лабораторным крысам, имеющим предрасположенность к алкоголизму, т. е. добровольно употреблявшим этиловый спирт в объеме 10–12 мл/сут. Указанная модель была разработана Институтом фармакологии имени А. В. Вальдмана (Санкт-Петербург) и использована нами без модификаций.

Применялись следующие аптечные препараты: трава железницы крымской (ООО «Русские корни», Россия), цветы суданской розы (ООО «НЕП», Россия), трава рододендрона Адамса (ООО «Иван-чай»,

Республика Бурятия, Россия). Во всех экспериментальных сериях отвар адаптогена готовили в соответствии с прилагающейся инструкцией и предоставляли группам экспериментальных животных вместо питьевой воды в течение 7 сут. Среднее потребление отвара составляло (15 ± 5) мл на крысу в сутки.

В качестве препарата сравнения использовали известный аптечный препарат гепатопротекторной группы «Эссенциале форте» (*Nattermann & Cie. GmbH*, Германия), активным ингредиентом которого являются фосфолипиды соевых бобов, содержащие 76 % холина. Данное средство рекомендуется пациентам с алкогольным гепатитом, токсическими поражениями печени, жировой дистрофией печени различной этиологии, циррозом печени, а также нарушениями функции печени при соматических заболеваниях [14]. «Эссенциале форте» в виде суспензии вводили интактным животным и крысам с алкогольным поражением печени в дозе 30 мг/кг в течение 7 сут перорально с помощью пипетки.

Как эталонный растительный препарат гепатопротекторного действия применяли «Гепсил-Рн» (ООО «Рубикон», Беларусь), активным фармацевтическим компонентом которого является сухой экстракт из плодов расторопши пятнистой, эквивалентный 35 мг силимарина [14]. «Гепсил-Рн» используется при алкогольном, вирусном, лекарственном, токсическом поражении печени, а также циррозах различной этиологии. Водную суспензию данного препарата вводили интактным животным и крысам с алкогольным поражением печени в дозе 9 мг/кг в течение 7 сут перорально с помощью пипетки.

По истечении указанного времени лабораторных животных выводили из эксперимента путем декапитации и проводили измерение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови, а также активности каталазы и супероксиддисмутазы, содержания ТБК-активных продуктов и восстановленных SH-групп в гомогенате печени. Активность АлАТ и ЩФ определяли спектрофотометрическим методом с помощью коммерческих наборов реагентов, содержание билирубина – по методу Йендрашика [27], активность каталазы – как описано в [28], активность супероксиддисмутазы (СОД) – по методу Костюка [29], содержание восстановленных SH-групп – по методу Элмана [30], содержание ТБК-активных продуктов – спектрофотометрическим методом [31].

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с вычислением среднего арифметического (\bar{X}), стандартной ошибки среднего арифметического ($\pm S_x$) и достоверности при уровне значимости $p \leq 0,05$. Для статистических расчетов использовали лицензионный пакет программ *Stadia 6.0*.

Результаты и их обсуждение

Как известно, этанол – это вещество, сочетающее в себе свойства естественного метаболита организма человека, токсичного ксенобиотика и алиментарного фактора, который способен существенно изменять эффективность лекарственной терапии [10]. Биотрансформация этанола в печени, как отмечалось выше, сопровождается образованием ацетальдегида, способного опосредованно активировать ПОЛ, что связано с его свойством снижать в гепатоцитах содержание восстановленного глутатиона, который абсолютно необходим для функционирования глутатионпероксидазы, участвующей в катаболизме H_2O_2 [32]. Накопление активных форм кислорода, в свою очередь, приводит к нарушению структуры липидного бислоя мембран клеток печени, что предопределяет возможность развития острого алкогольного гепатита и цирроза печени у алкоголиков [32]. Данный факт послужил основанием для изучения, наряду с классическими сывороточными маркерами поражения печени, интенсивности ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной защиты (каталаза, СОД) в печени крыс в условиях хронической алкогольной интоксикации, вызванной ежедневным свободным употреблением 15 % этанола. Результаты представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Влияние отваров природных адаптогенов и препаратов гепатопротекторного ряда на показатели поражения печени в сыворотке крови интактных крыс и животных с экспериментальной алкогольной интоксикацией

Table 1

The effect of natural adaptogens decoctions and hepatoprotective drugs on the liver damage markers in the blood serum of intact rats and animals with experimental alcohol intoxication

Серия	Активность ЩФ, мкмоль/л	Активность АлАТ, моль НАДН/мин	Содержание свободного билирубина, мкмоль/л	Содержание связанного билирубина, мкмоль/л
Интактные крысы	$205,5 \pm 17,5$ (100 %)	$77,5 \pm 8,6$ (100 %)	$8,4 \pm 1,2$ (100 %)	$6,4 \pm 0,6$ (100 %)
Алкогольное поражение печени	$420,0 \pm 19,9$ (204,4 %)*	$144,5 \pm 2,1$ (186,5 %)*	$17,8 \pm 4,3$ (211,9 %)*	$18,4 \pm 1,9$ (287,5 %)*

Окончание табл. 1
Ending table 1

Серия	Активность ЩФ, мкмоль/л	Активность АЛАТ, моль НАДН/мин	Содержание свободного билирубина, мкмоль/л	Содержание связанного билирубина, мкмоль/л
«Гепсил-Рн» (7 сут)	235,7 ± 21,5 (114,7 %)	90,3 ± 2,7 (116,9 %)	7,9 ± 1,0 (94,1 %)	6,7 ± 0,8 (104,7 %)
«Эссенциале форте» (7 сут)	224,2 ± 9,7 (109,1 %)	88,2 ± 3,4 (113,8 %)	8,4 ± 1,2 (100 %)	7,1 ± 0,7 (110,1 %)
Отвар железницы крымской (7 сут)	210,4 ± 8,9 (102,4 %)	74,5 ± 7,4 (96,1 %)	8,3 ± 1,1 (98,9 %)	5,9 ± 0,7 (92,2 %)
Отвар рододендрона Адамса (7 сут)	224,0 ± 23,1 (109,0 %)	69,3 ± 7,3 (89,4 %)	9,7 ± 2,5 (115,5 %)	6,5 ± 0,9 (101,6 %)
Отвар суданской розы (7 сут)	207,6 ± 11,3 (101,0 %)	68,3 ± 7,3 (89,4 %)	7,6 ± 1,5 (90,2 %)	7,4 ± 1,3 (116,1 %)
«Гепсил-Рн» на фоне алкогольного поражения печени	332,1 ± 12,6 (161,6 %)* ^a	97,1 ± 3,9 (125,3 %)* ^a	15,8 ± 1,2 (188,1 %)* ^a	6,8 ± 1,1 (106,3 %)* ^a
«Эссенциале форте» на фоне алкогольного поражения печени	285,4 ± 11,1 (138,9 %)* ^a	112,2 ± 1,8 (144,8 %)* ^a	8,7 ± 0,7 (103,3 %)* ^a	7,7 ± 0,9 (120,1 %)* ^a
Отвар железницы крымской на фоне алкогольного поражения печени	275,3 ± 14,1 (133,9 %)* ^a	72,0 ± 4,8 (92,9 %)* ^a	8,7 ± 1,2 (103,6 %)* ^a	7,6 ± 1,0 (118,8 %)* ^a
Отвар рододендрона Адамса на фоне алкогольного поражения печени	402,1 ± 11,2 (195,7 %)	84,7 ± 2,7 (109,3 %)* ^a	11,6 ± 2,7 (138,1)* ^a	5,8 ± 1,2 (90,6 %)* ^a
Отвар суданской розы на фоне алкогольного поражения печени	368,1 ± 10,3 (179,3 %)* ^a	141,7 ± 7,3 (182,9 %)	15,7 ± 3,7 (187,9 %)* ^a	12,8 ± 3,4 (199,3 %)* ^a

Пр и м е ч а н и е. Данные в таблице представлены в виде $\bar{X} \pm S_x$. *, *^a – результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии). Достоверность эффектов этанола, аптечных гепатопротекторов и растительных отваров оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов коммерческих гепатопротекторов и растительных отваров, вводимых крысам с экспериментальным поражением печени, – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших изучаемый препарат (*^a).

Таблица 2

Влияние отваров природных адаптогенов и препаратов гепатопротекторного ряда на показатели ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты печени интактных крыс и животных с экспериментальной алкогольной интоксикацией

Table 2

The effect of the natural adaptogens decoctions and hepatoprotective drugs on the indicators of lipid peroxidation and the antioxidant enzymes activity in liver of intact rats and animals with experimental alcohol intoxication

Серия	Содержание SH-групп, ммоль/л	Содержание ТБК-активных продуктов, мкмоль/л	Активность каталазы, ммоль H ₂ O ₂ / мг белка · мин	Активность СОД, у. е.
Интактные крысы	147,7 ± 13,1 (100 %)	0,44 ± 0,1 (100 %)	10,3 ± 1,0 (100 %)	221,1 ± 8,7 (100 %)
Алкогольное поражение печени	88,8 ± 7,1 (60,1 %)*	0,69 ± 0,1 (156,8 %)*	14,1 ± 1,7 (140,2 %)*	291,0 ± 14,2 (131,7 %)*
«Гепсил-Рн» (7 сут)	136,6 ± 7,3 (92,5 %)	0,51 ± 0,1 (115,9 %)	12,0 ± 0,7 (116,5 %)	219,7 ± 14,9 (99,4 %)

Окончание табл. 2
Ending table 2

Серия	Содержание SH-групп, ммоль/л	Содержание ТБК-активных продуктов, мкмоль/л	Активность каталазы, ммоль H ₂ O ₂ /мг белка · мин	Активность СОД, у. е.
«Эссенциале форте» (7 сут)	141,8 ± 16,7 (96,1 %)	0,45 ± 0,1 (102,0 %)	11,6 ± 1,1 (113,1 %)	136,6 ± 19,8 (107,1 %)
Отвар железницы крымской (7 сут)	143,3 ± 11,7 (97,0 %)	0,52 ± 0,1 (117,1 %)	15,4 ± 1,0 (149,3 %)*	284,9 ± 14,7 (128,9 %)*
Отвар рододендрона Адамса (7 сут)	152,9 ± 7,6 (103,5 %)	0,43 ± 0,1 (97,7 %)	8,8 ± 0,8 (85,4 %)	220,0 ± 9,1 (99,5 %)
Отвар суданской розы (7 сут)	143,3 ± 4,6 (97,1 %)	0,41 ± 0,1 (93,0 %)	9,8 ± 1,7 (95,2 %)	236,6 ± 11,3 (107,1 %)
«Гепсил-Рн» на фоне алкогольного поражения печени	116,5 ± 5,6 (78,9 %)* ^a	0,52 ± 0,1 (118,2 %)* ^a	19,2 ± 0,8 (136,2 %)	239,7 ± 11,2 (108,4 %)* ^a
«Эссенциале форте» на фоне алкогольного поражения печени	128,5 ± 19,6 (87,9 %)* ^a	0,60 ± 0,1 (136,0 %)* ^a	12,3 ± 0,7 (119,0 %)	265,5 ± 13,6 (120,1 %)* ^a
Отвар железницы крымской на фоне алкогольного поражения печени	116,7 ± 12,1 (79,1 %)* ^a	0,47 ± 0,1 (107,5 %)* ^a	11,9 ± 1,2 (116,1 %)* ^a	240,9 ± 13,2 (109,2 %)* ^a
Отвар рододендрона Адамса на фоне алкогольного поражения печени	102,1 ± 4,2 (69,1 %)	0,53 ± 0,1 (128,5 %)* ^a	11,2 ± 1,2 (108,7)* ^a	260,0 ± 11,7 (117,6 %)
Отвар суданской розы на фоне алкогольного поражения печени	167,8 ± 9,3 (88,3 %)* ^a	0,66 ± 7,3 (150,3 %)	14,2 ± 2,0 (138,1 %)	329,4 ± 17,1 (149,1 %)* ^a

Примечание. Данные в таблице представлены в виде $X \pm S_x$. *, *^a – результаты достоверны при $p \leq 0,05$ ($n = 5$ для каждой серии). Достоверность эффектов этанола, аптечных гепатопротекторов и растительных отваров оценивалась по отношению к показателям интактной серии (*), а эффектов коммерческих гепатопротекторов и растительных отваров, вводимых крысам с экспериментальным поражением печени, – по отношению к показателям животных с данной патологией, не получавших изучаемый препарат (*^a).

Как следует из табл. 2, хроническое спаивание крыс этанолом приводило к выраженным изменениям всех анализируемых показателей: содержание ТБК-активных продуктов в печени возросло на 56,8 %, активность каталазы – на 40,2 %, СОД – на 31,7 %, фиксировалось снижение содержания восстановленных SH-групп на 40 %, что хорошо согласуется как с первоначальной гипотезой, так и с данными литературы [33]. Нарушение антиоксидантного статуса гепатоцитов сопровождалось нарушением их функции, что обусловило увеличение активности маркерных ферментов печени в сыворотке крови подопытных крыс: АЛАТ – на 86,5 %, ЩФ – на 104,4 %, а также содержания свободного билирубина – на 111,9 %, связанного – на 187,5 % (см. табл. 1).

На следующем этапе исследований крысам с хроническим алкогольным поражением печени вводили широко используемый в медицинской практике гепатопротектор «Эссенциале форте», применяемый для лечения алкогольной дистрофии печени, а также при других заболеваниях или нарушениях работы данного органа, включая патологии, вызванные лекарственными препаратами, оказывающими негативное влияние на печень [14]. Терапевтическое действие «Эссенциале форте» определяется наличием в его составе эссенциальных фосфолипидов, которые способствуют регулированию метаболизма липопротеинов в печени, транспортируя холестерин и нейтральные жиры к местам их окисления. Это становится возможным главным образом благодаря увеличению способности липопротеинов высокой плотности связываться с холестерином. Известно, что данный препарат оказывает нормализующее действие на сохранение и восстановление клеточной структуры печени, сохранение фосфолипидозависимых ферментных систем, торможение формирования соединительной ткани в печени, метаболизм липидов и белков, восстановление клеток печени, нормализацию дезинтоксикационной функции печени, стабилизацию синтеза желчи и снижение литогенного индекса при экскреции фосфолипидов [34].

Установлено, что после ежедневного применения в течение 7 сут препарата «Эссенциале форте» (30 мг/кг) в экспериментальной модели хронического алкогольного воздействия активность АлАТ снизилась на 41,7 %, ЩФ – на 65,5 %, содержание свободного и связанного билирубина – на 108,6 и 167,4 % соответственно. Описанные изменения сопровождались и некоторой стабилизацией величин изучаемых показателей ПОЛ и активностей ферментов антиоксидантной защиты: содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате печени крыс снизилось на 20,8 %, активность каталазы – на 21 %, наблюдалось повышение содержания восстановленных SH-групп на 27 % по сравнению с показателями животных с хроническим поражением печени этанолом, не получавших препарат (см. табл. 1 и 2).

Аналогичные результаты были получены и при использовании коммерческого гепатопротектора растительного происхождения «Гепсил-Рн». Находящиеся в его составе биофлавоноиды обеспечили проявление выраженного антиоксидантного действия и способствовали частичному восстановлению функций гепатоцитов крыс, подвергшихся хроническому алкогольному воздействию (см. табл. 1 и 2). Таким образом, оба коммерческих препарата, использованных в качестве препаратов сравнения, несмотря на различный состав и механизм действия, проявили на использованной экспериментальной модели гепатопротекторные свойства.

На дальнейшем этапе исследований животным с хроническим поражением печени и интактным крысам в течение 7 сут предоставлялись для питья отвары анализируемых адаптогенов как альтернатива воде. Ежедневное потребление анализируемых отваров интактными крысами не сопровождалось изменением активности ферментов антиоксидантной защиты, маркеров ПОЛ и биохимических показателей поражения печени, что хорошо согласуется с основным постулатом теории адаптогенов Н. В. Лазарева, согласно которому терапевтическое действие данных соединений реализуется в неблагоприятных условиях, в благоприятных же действие адаптогенов не проявляется или реализуется минимально [35].

Анализ исследуемых показателей у крыс с алкогольным поражением печени, ежедневно употреблявших отвары адаптогенов, свидетельствует о их защитном действии, выраженном в разной степени. Максимальный эффект наблюдался при использовании отвара железницы крымской (см. табл. 1 и 2). Так, содержание ТБК-активных продуктов в печени крыс, получавших отвар, снизилось на 49,3 %, активность СОД – на 22,7 %, активность каталазы – на 24,1 % по сравнению с животными, не получавшими отвар. Содержание восстановленных SH-групп возросло на 19,1 %. Таким образом, способность железницы крымской подавлять интенсивность ПОЛ, описанная в литературе, была продемонстрирована и на модели хронического поражения печени алкоголем. По мнению большинства авторов, флавоноиды, их дигликозиды и незаменимые жирные кислоты определяют данную активность, проявляемую препаратами этого растения *in vivo* и *in vitro* [18; 19]. С антиоксидантной активностью коррелировали и гепатопротекторные свойства указанного отвара. Ежедневный его прием подопытными крысами сопровождался снижением активности ЩФ на 70,5 %, АлАТ – на 93,6 %, свободного и связанного билирубина – до значений, статистически неотличимых от уровня интактных животных.

Достоверное антиоксидантное и гепатопротекторное действие наблюдалось и при использовании препарата рододендрона Адамса, в составе которого, как отмечалось выше, также присутствуют биофлавоноиды, пренилированные фенолы и ненасыщенные жирные кислоты. По всей видимости, именно их присутствие позволило снизить величину ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты в печени крыс с хронической алкогольной интоксикацией (содержание ТБК-активных продуктов оказалось на 28,3 % ниже соответствующего контроля, активность каталазы – на 31,5 %; наблюдалась тенденция к снижению активности СОД), а также значения клинических маркеров повреждения гепатоцитов (активность АлАТ снизилась на 167 %, свободного и связанного билирубина – на 73,8 и 196,9 % соответственно).

Антиоксидантные свойства отвара суданской розы в использованной модели были выражены в наименьшей степени (см. табл. 2). Тем не менее его использование позволило снизить гепатотропное действие этанола, что нашло отражение в уменьшении активности ЩФ и обеих фракций билирубина в сыворотке крови подопытных животных (см. табл. 1).

Заключение

В соответствии с полученными результатами наиболее выраженным антиоксидантным и гепатопротекторным эффектом на крыс с экспериментальным алкогольным поражением печени, превосходящим по ряду показателей действие классических гепатопротекторов «Гепсил-Рн» и «Эссенциале форте», обладал отвар железницы крымской, что может быть обусловлено наличием в его составе флавоноидов и ненасыщенных жирных кислот, проявляющих антиоксидантные свойства, а также отвар рододендрона Адамса, антиоксидантный эффект которого был описан прежде на иных экспериментальных моделях. Полученные данные могут оказаться полезными для подбора оптимальных средств фитотерапии в целях профилактики заболеваний печени у пациентов, страдающих алкоголизмом.

Библиографические ссылки

1. Афанасьев АВ, Афанасьев ВВ, Рубитель ЛТ. *Острая интоксикация этиловым алкоголем*. Санкт-Петербург: Интермедика; 2002.
2. Ильницкий АН, Жернакова НИ, Постникова ЛИ, Борисов ОА, Позднякова НМ. Молекулярные механизмы нейроиммуноэндокринных эффектов алкоголя и соматическая патология. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. 2011;13(4(99)):5–12.
3. Разводовский ЮЕ. Алкогольная кардиомиопатия: современное состояние проблемы. *Здравоохранение*. 2007;4:42–45.
4. Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L, et al. BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. 2006;30(11):1938–1949. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2006.00239.x.
5. Щеголев АИ, Туманова УН. Роль алкоголя в развитии рака печени. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2017;11(2):223–227.
6. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2000;76(895):280–286. DOI: 10.1136/pmj.76.895.280.
7. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(8):599–612. DOI: 10.1038/nrc2191.
8. Кляритская ИЛ, Иськова ИА. Роль алкоголя в возникновении рака желудочно-кишечного тракта. *Крымский терапевтический журнал*. 2017;2(2):18–23.
9. Туманова УН, Щеголев АИ. Ангиогенез при гепатоцеллюлярном раке. *Успехи современной биологии*. 2015;135(2):164–176.
10. Еремина ЕЮ. Алкогольная болезнь печени. *Архив внутренней медицины*. 2012;6(8):26–30. DOI: 10.20514/2226-6704-2012-0-6-50-54.
11. O'Shea RS, Dasarthy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010;51(1):307–328. DOI: 10.1002/hep.23258.
12. Шоломицкая ИА, Капралов НВ. *Алкогольная болезнь печени*. Минск: БГМУ; 2015.
13. Разводовский ЮЕ. Алкогольные поражения печени. *Медицинские новости*. 2003;7:66–70.
14. Машковский МД. *Лекарственные средства*. Москва: Новая волна; 2012.
15. Рослый ИМ, Абрамов СВ, Водолажская МГ, Шуляк ЮА. Биохимические показатели плазмы крови в оценке метаболических особенностей патогенеза алкоголизма. *Вестник Ставропольского государственного университета*. 2005;42:119–128.
16. Студенцов ЕП, Рамш СМ, Казурова НГ, Непорожнева ОВ. Адаптогены и родственные группы лекарственных препаратов: 50 лет поисков. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2013;11(3):3–43.
17. Шабанов ПД. Адаптогены и антигипоксанты. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2003;2(3):50–80.
18. Danesi F, Saha S, Kroon PA, Glibetić M, Konić-Ristić A, D'Antuono LF, et al. Bioactive-rich *Siderites scardiaca* tea (mountain tea) is as potent as *Camellia sinensis* tea at inducing cellular antioxidant defences and preventing oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(14):3558–3564. DOI: 10.1002/jsfa.6214.
19. Gonzales-Burgos E, Carretero ME, Gomes-Serranillos MP. *Sideritis spp.*: uses, chemical composition and pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;135(2):209–225. DOI: 10.1016/j.jep.2011.03.014.
20. *Siderites scardiaca*. In: Lim TK. *Edible medicinal and non medicinal plants. Volume 8. Flowers*. [Netherlands]: Springer; 2014. p. 207–214. DOI: 10.1007/978-94-017-8748-2.
21. Ifie I, Marshal LJ, Ho P. *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) extract and wine: phytochemical profile, physicochemical properties and carbohydrase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(24):4921–4931. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01246.
22. Рогачев АД. *Фитохимическое исследование Rhododendron adamsii Rehder*. Новосибирск: Новосибирский государственный университет; 2009.
23. Минович ВМ, Федосеева ГМ, Левента АИ. Определение суммарного содержания флавоноидов в наземной части *Rhododendron adamsii* спектрофотометрическим методом. *Растительные ресурсы*. 2005;4:67–73.
24. Rogachev AD, Komarova NI, Korchagina DV, Dolgikh MP, Sorokina IV, Baev DS, et al. Some prenylated phenols of *Rhododendron adamsii*: isolation, modification and pharmacological tests. *Chemistry for Sustainable Development*. 2008;1:17–22.
25. Губич ОИ, Пучкова КВ, Залеская НА, Крючкова НВ. Исследование адаптогенных свойств рододендрона Адамса (*Rhododendron adamsii Rehder*) на экспериментальных моделях *in vivo*. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;1:60–68.
26. Губич ОИ, Капанева АП, Бурак ЕВ. Сравнительная эффективность регуляции природными адаптогенами углеводного обмена крыс с экспериментальным сахарным диабетом. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2018;3:14–20.
27. Камышников ВС. *Справочник по клинико-биохимической диагностике*. Минск: Медпресс-информ; 2009.
28. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
29. Костюк ВА, Потапович АИ, Ковалева ЖВ. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопросы медицинской химии*. 1990;36(2):88–91.
30. Северин СЕ, Соловьева ГА. *Практикум по биохимии*. Москва: МГУ; 1989.
31. Губич ОИ. *Медицинская биохимия*. Минск: БГУ; 2015.
32. Тарасова ОИ, Огурцов ПП, Мазурчик НВ, Моисеев ВС. Современные лабораторные маркеры употребления алкоголя. *Клиническая фармакология и терапия*. 2007;16(1):1–5.
33. Ковалев ГА, Петренко АЮ. Экспериментальная модель алкогольного поражения печени у самок крыс. *Вестник Харьковского национального университета*. 2004;617(8):15–18.
34. Ливзан МА, Лялокова ЕА. Алкогольная болезнь печени: современные аспекты диагностики и лечения. *Медицинский совет*. 2014;13:49–53. DOI: 10.21518/2079-701X-2014-13-49-53.
35. Яременко КВ, Учение Н. В. Лазарева о СНПС и адаптогенах как базовая теория профилактической медицины. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2005;5(4):1089–1092.

References

1. Afanasyev AV, Afanasyev VV, Rubitel LT. *Ostraya intoksikatsiya etilovym alkogolem* [Acute toxicity by ethyl alcohol]. Saint Petersburg: Intermedika; 2002. Russian.
2. Il'nitski AN, Zhernakova NI, Postnikova LI, Borisov OA, Pozdnyakova NM. Molecular mechanisms of neuroimmunoendocrine effects of alcohol. *Belgorod State University Scientific bulletin: Medicine. Pharmacy*. 2011;13(4(99)):5–12. Russian.
3. Razvodovsky YE. [Alcoholic cardiomyopathy: current state of the problem]. *Zdravookhranenie*. 2007;4:42–45. Russian.
4. Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L, et al. BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*. 2006;30(11):1938–1949. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2006.00239.x.
5. Schegolev AI, Tumanova UN. The role of alcohol in the occurrence of liver cancer. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2017;11(2):223–227. Russian.
6. Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postgraduate Medical Journal*. 2000;76(895):280–286. DOI: 10.1136/pmj.76.895.280.
7. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(8):599–612. DOI: 10.1038/nrc2191.
8. Klyaritskaya IL, Iskova IA. The role of alcohol in the development of gastrointestinal cancer. *Krymskii terapevicheskii zhurnal*. 2017;2(2):18–23. Russian.
9. Tumanova UN, Shchegolev AI. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2015;135(2):164–176. Russian.
10. Eremina EY. [Alcoholic liver disease]. *Arkhiv vnutrennei meditsiny*. 2012;6(8):26–30. Russian. DOI: 10.20514/2226-6704-2012-0-6-50-54.
11. O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology*. 2010;51(1):307–328. DOI: 10.1002/hep.23258.
12. Sholomitskaya IA, Kapralov NV. *Alkohol'naya bolezni' pecheni* [Alcoholic liver disease]. Minsk: Belarusian State Medical University; 2015. Russian.
13. Razvodovsky YuE. [Alcoholic liver damage]. *Meditsinskie novosti*. 2003;7:66–70. Russian.
14. Mashkovsky MD. *Lekarstvennyye sredstva* [Medicines]. Moscow: Novaya volna; 2012. Russian.
15. Roslyj IM, Abramov SV, Vodolazhskaya MG, Shulyak UA. Biochemical parameters of plasma as metabolic features pathogenesis of the alcoholism. *Vestnik Stavropol'skogo gosudarstvennogo universiteta*. 2005;42:119–128. Russian.
16. Studentsov EP, Ramsh SM, Kazurova NG, Naporozhneva OV. Adaptogens and related groups of drugs: 50 years of searching. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2013;11(3):3–43. Russian.
17. Shabanov PD. [Adaptogens and antihypoxants]. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2003;2(3):50–80. Russian.
18. Danesi F, Saha S, Kroon PA, Glibetić M, Konić-Ristić A, D'Antuono LF, et al. Bioactive-rich *Siderites scardiac* tea (mountain tea) is as potent as *Camellia sinensis* tea at inducing cellular antioxidant defences and preventing oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(14):3558–3564. DOI: 10.1002/jsfa.6214.
19. Gonzales-Burgos E, Carretero ME, Gomes-Serranillos MP. *Sideritis spp.*: uses, chemical composition and pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011;135(2):209–225. DOI: 10.1016/j.jep.2011.03.014.
20. *Siderites scardiac*. In: Lim TK. *Edible medicinal and non medicinal plants. Volume 8. Flowers*. [Netherlands]: Springer; 2014. p. 207–214. DOI: 10.1007/978-94-017-8748-2.
21. Ifie I, Marshal LJ, Ho P. *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) extract and wine: phytochemical profile, physicochemical properties and carbohydrase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(24):4921–4931. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b01246.
22. Rogachev AD. *Fitokhimicheskoe issledovanie Rhododendron adamsii Rehder* [Phytochemical study of *Rhododendron adamsii* Rehder]. Novosibirsk: Novosibirsk State University; 2009. Russian.
23. Mirovich VM, Fedoseeva GM, Leventa AI. [Determination of the total content of flavonoids in the ground part of *Rhododendron adamsii* by the spectrophotometric method]. *Rastitel'nye resursy*. 2005;4:67–73. Russian.
24. Rogachev AD, Komarova NI, Korchagina DV, Dolgikh MP, Sorokina IV, Baev DS, et al. Some prenylated phenols of *Rhododendron adamsii*: isolation, modification and pharmacological tests. *Chemistry for Sustainable Development*. 2008;1:17–22.
25. Hubich AI, Puchkova KV, Zalesskaya NA, Kryuchkova NV. The investigation of the adaptogenic properties of *Rhododendron adamsii* Rehder. on experimental models *in vivo*. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;1:60–68. Russian.
26. Hubich AI, Kapaneva AP, Burak EV. The comparative efficiency of the carbohydrate exchange regulation in rats with experimental diabetes mellitus by natural adaptogens. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2018;3:14–20. Russian.
27. Kamyshnikov VS. *Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoi diagnostike* [Handbook of clinical and biochemical diagnostics]. Minsk: Medpress-inform; 2009. Russian.
28. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*. 1984;105:121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
29. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1990;36(2):88–91. Russian.
30. Severin SE, Solovyova GA. *Praktikum po biokhimii* [Workshop on biochemistry]. Moscow: Moscow State University; 1989. Russian.
31. Hubich AI. *Meditsinskaya biokhimiya* [Medical biochemistry]. Minsk: Belarusian State University; 2015. Russian.
32. Tarasova OL, Ogurtsov PP, Mazurchik NV, Moiseev VS. [Modern laboratory markers of alcohol use]. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2007;16(1):1–5. Russian.
33. Kovalev GA, Petrenko AYU. An experimental model of alcohol induced hepatic injury at female rats. *Vestnik Khar'kovskogo natsional'nogo universiteta*. 2004;617(8):15–18. Russian.
34. Livzan MA, Lyalukova EA. [Alcoholic liver disease: modern aspects of diagnosis and treatment]. *Meditsinskii sovet*. 2014;13:49–53. Russian. DOI: 10.21518/2079-701X-2014-13-49-53.
35. Jaremenko KV. The N. V. Lazarev's theory of State Unspecific Increased Resistance (SUIR) and adaptogens as the basic of preventive medicine. *Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya*. 2005;5(4):1089–1092. Russian.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

BIODIVERSITY

УДК 518.9:57.082(477.46)

ГИДРОФИЛЬНЫЕ ВИДЫ В СОСТАВЕ ЭКСИКАТ HERBARIUM FLORAE ROSSICAE ГЕРБАРИЯ УМАНСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА САДОВОДСТВА (UM)

Г. А. ЧОРНА¹⁾, Т. В. МАМЧУР²⁾

¹⁾Уманский государственный педагогический университет им. Павла Тычины,
ул. Садовая, 2, 20300, г. Умань, Украина

²⁾Уманский национальный университет садоводства,
ул. Институтская, 1, 20300, г. Умань, Украина

По результатам инвентаризации гидрофильных видов из коллекции Herbarium Florae Rossicae (1897–1970) исторического гербария Уманского национального университета садоводства (акроним UM) установлено, что гидрофильные таксоны представлены 160 видами 70 родов 30 семейств высших споровых и покрытосеменных растений. Проанализирован количественный состав эксикат отдельных коллекторов и территориальная приуроченность сборов. Наиболее полно представлены гидрофильные виды территорий, относящихся в современном понимании к Латвии (коллектор К. Купффер), северо-западной России, в частности окрестностям Санкт-Петербурга (коллекторы Н. Пуринг, В. Андреев). На территории Украины сборы сделаны в окрестностях Киева и в Черниговской области (коллекторы А. Ракочи, Н. Цингер), окрестностях Харькова (коллектор П. Наливайко). Из состава эксикат выделено 40 гидрофильных видов, охраняемых в настоящее время во многих государствах Европы. *Aldrovanda vesiculosa*, представленная сборами фундатора издания эксикат Herbarium Florae Rossicae С. Коржинского и А. Ракочи, а также *Caldesia parnassifolia* (коллекторы А. Лорченко и В. Финн) отнесены ныне

Образец цитирования:

Чорна ГА, Мамчур ТВ. Гидрофильные виды в составе эксикат Herbarium Florae Rossicae гербария Уманского национального университета садоводства (UM). *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1: 63–72.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-63-72>

For citation:

Chorna GA, Mamchur TV. Hydrophilic species in the composition of Herbarium Florae Rossicae exsiccatum at herbarium of Uman National University of Horticulture (UM). *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1:63–72. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-63-72>

Авторы:

Галина Анатольевна Чорна – кандидат биологических наук; доцент кафедры биологии и методики ее обучения естественно-географического факультета.

Татьяна Васильевна Мамчур – кандидат сельскохозяйственных наук; доцент кафедры садово-паркового хозяйства факультета лесного и садово-паркового хозяйства.

Authors:

Galina A. Chorna, PhD (biology); associate professor at the department of biology and teaching methods, faculty of natural-geographical.

udpy_botanika@ukr.net

Tatyana V. Mamchur, PhD (agricultural sciences); associate professor at the department of forestry and landscape gardening, faculty of forestry and landscape gardening.

mamchur-tv@ukr.net

к видам, охраняемым Бернской конвенцией. Приведены сведения о флористических исследованиях А. Ракочи (1894–1903) и П. Наливайко (1891–1897). Установлено, что местообитания наиболее редких гидрофильных видов, собранных ими для эксикат Herbarium Florae Rossicae, на сегодня утрачены, таким образом, изданные более 100 лет назад эксикаты приобретают мемориальную ценность. Наиболее полно в составе эксикат представлено семейство Cyperaceae.

Ключевые слова: эксикаты; Herbarium Florae Rossicae; гербарий UM; сосудистые гидрофильные растения; редкие виды.

HYDROPHILIC SPECIES IN THE COMPOSITION OF HERBARIUM FLORAE ROSSICAE EXSICCATUM AT HERBARIUM OF UMAN NATIONAL UNIVERSITY OF HORTICULTURE (UM)

G. A. CHORNA^a, T. V. MAMCHUR^b

^aPavlo Tychyna Uman State Pedagogical University,
2 Sadovaya Street, Uman 20300, Ukraine

^bUman National University of Horticulture, 1 Institutskaya Street, Uman 20300, Ukraine
Corresponding author: T. V. Mamchur (mamchur-tv@ukr.net)

Results of processing of hydrophilic species from Herbarium Florae Rossicae (1897–1970) of the historical herbarium of Uman National University of Horticulture are presented (UM). It is found that hydrophilic taxa are represented by 160 species of 70 genera of 30 families of higher spore and angiospermous plants. Quantitative composition of exsiccate of individual collectors and territorial gathering are analyzed. It is found that hydrophilic types of territories in Latvia (collector K. Kupffer), North-West Russia, in particular, surroundings of St. Petersburg (collectors N. Purring and V. Andreev) are most fully represented. On the territory of Ukraine, gathering was made in surroundings of Kiev and Chernigiv region (collectors A. Rakoci and N. Zinger) and in surroundings of Kharkov (collector P. Nalyvaiko). We determined 40 hydrophilic species in the exsiccate composition which are now protected in many European countries. *Aldrovanda vesiculosa* presented by collections of the founders of exsiccate publication Herbarium Florae Rossicae S. Korzhinsky and A. Rakoci, as well as *Caldesia parnassifolia* (collectors A. Lorchenko and V. Finn) are now classified as species protected by the Bern Convention. Information on the floristic studies of A. Rakoci (1894–1903) and P. Nalyvaiko (1891–1897) is presented. It is found that the habitats of the rarest hydrophilic species collected by them for exsiccate Herbarium Florae Rossicae are now lost, so that these samples published more than 100 years ago acquire a memorial value. It is determined that the Cyperaceae family is most fully represented in the exsiccate composition.

Key words: exsiccate; Herbarium Florae Rossicae; herbarium (UM); hydrophilic plants; rare species.

Введение

Ценность эксикат как исторических коллекций многогранна: в их составе находятся сборы известных ботаников, представлены виды из различных регионов, часто весьма удаленных и обширных по занимаемой площади, разнообразных по природным условиям [1; 2]. В 2015 г. нами начата обработка исторического гербария (UM) Уманского национального университета садоводства (УНУС), в составе которого выделен Herbarium Florae Rossicae (1897–1907), представленный в данной коллекции, по предварительным подсчетам, около 2 тыс. гербарных образцов (г. обр.) [3; 4].

Использование исторических гербариев необходимо для проведения хронологических, фитосоциологических исследований, поскольку наличие в таких коллекциях сборов редких в настоящее время видов позволяет провести ретроспективный анализ их бывшего распространения. Показательны в этом плане издаваемые в различные времена эксикаты, сбор образцов для которых проводился в количестве 50–100 экз. каждого вида из одного местообитания. Это служит косвенным свидетельством того, что в этих локалитетах во времена сбора гербария вид встречался довольно обычно.

Представляет интерес экологический аспект сбора эксикат, наличие в составе коллекции, хранящейся в УНУС, видов различных экологических групп, прежде всего гидрофильных – гидро- и гелофитов. Цель данной работы – выявление, оценка репрезентативности и обнаружение гербарных сборов гидрофильных видов из состава эксикат Herbarium Florae Rossicae, хранящихся в фондах UM. В задачи исследования входило также выделение в отдельный список редких и исчезающих в настоящее время гидрофильных видов, а для тех видов, гербарий которых для издания эксикат был собран на территории Украины, предусматривался анализ современного состояния их исторических локалитетов.

Материалы и методика

Материалом исследования послужили эксикаты Herbarium Florae Rossicae, растения для которых были собраны преимущественно в 1897–1902 гг. различными коллекторами в разных регионах. Анализ сборов гидрофильных видов проводился непосредственно по гербарным этикеткам, а также по опубликованным в Санкт-Петербурге в 1898–1908 гг. выпускам I–VI «Schedae ad Herbarium Florae Rossicae», более детально проанализирован один из этих выпусков [5]. Объем просмотренных и проанализированных гербарных материалов составляет около 2 тыс. г. обр. Указанные на гербарных этикетках названия видов приведены в соответствие с современной ботанической номенклатурой по [6]. Если указанное коллектором или ответственным за выпуск эксикат лицом, определявшим вид, название не совпадает с современным, то последнее приведено в скобках. Поскольку гербарные этикетки Herbarium Florae Rossicae не предусматривали запись названия семейства, при составлении списков и их анализе нами проведено соответствующее распределение видов по таксономическим категориям высшего ранга.

При отборе гидрофильных видов из общего состава Herbarium Florae Rossicae мы руководствовались подходами, использованными при составлении обзоров по пресноводной флоре Средней Европы (1980), России и сопредельных государств (1994), Украины (2006) [7–9]. Кроме того, учтена монографическая обработка рода осока (*Carex* L.) Т. В. Егоровой [10].

Результаты и их обсуждение

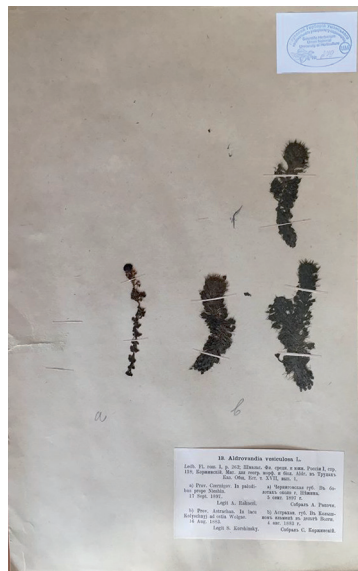
В части эксикат Herbarium Florae Rossicae, собранного в первое десятилетие его издания (1898–1908), представлен ряд гидрофильных семейств: Isoetaceae, Elatinaceae, Haloragaceae, Hippuridaceae, Lentibulariaceae, Nymphaeaceae, Alismataceae, Cyperaceae, Juncaceae, Lemnaceae, Najadaceae, Sparganiaceae, Typhaceae. В состав этого издания входят также отдельные роды и виды, относящиеся к семействам более широкой экологической амплитуды. Среди 14 хранящихся в УМ гербарных сборов С. И. Коржинского, сделанных в 1883–1900 гг., большую ценность представляет насекомоядное растение – гидрофит *Aldrovanda vesiculosa* L., собранная в 1883 г. в дельте Волги.

Кроме гербарных сборов из состава эксикат Herbarium Florae Rossicae, хранящихся в УМ, проанализированы сопровождающие выпуск эксикат издания «Schedae ad Herbarium Florae Rossicae, a Museo Botanico Academiae Imperialis Scientiarum Petropolitanae editum». Эксикаты Herbarium Florae Rossicae имели тираж 50 экз., рассылались путем обмена по ботаническим учреждениям и затем, как правило, были инсерированы в фонды соответствующих гербариев. Известно, что сборы из этого собрания хранятся в Санкт-Петербурге (LE, ЛЕСВ), Украине (KW, KWHU, LWS) и других европейских странах (ERE, BRNU, W).

В одном из таких списков растений (Санкт-Петербург, 1901, III), сохранившемся в фондах библиотеки УНУС, приводится 30 таксонов гидрофильной флоры. В подготовке этого издания, в котором продублированы этикетки 300 гербарных образцов выпусков XIII–XVIII «Гербария русской флоры», принимал участие академик С. И. Коржинский (1861–1900). В определении растений и написании гербарных этикеток (ярлыков) участвовали также его последователи – В. И. Липский и Д. И. Литвинов. Поскольку эксикаты предназначались для обмена, в том числе международного, этикетки составлялись на двух языках: латинском и русском. На этикетках цитировались также флоры, в которых были приведены определенные виды, прежде всего «Flora Rossica» К. Ф. Ледебура (C. F. Ledebour) и «Флора» И. Ф. Шмальгаузена.

Издание Herbarium Florae Rossicae связано с Ботаническим музеем Академии наук в Санкт-Петербурге [11]. До слияния Ботанического музея с Ботаническим садом было издано 8 сборников (1898–1922) под названием «Список растений Гербария русской флоры» («Schedae ad Herbarium Florae Rossicae»). Сборники дублируют этикетки к 2800 номерам изданных растений. Проведенный нами анализ показывает, что в УМ хранится более 70 % этой ценной коллекции растений. Уникальность уманской коллекции состоит еще и в том, что гербарные сборы не инсерированы в общий фонд, а хранятся обособленно согласно составленному специально для них каталогу. Трудно оценить представленность этого издания эксикат в других гербариях, поскольку они распределены согласно принятой в каждом учреждении системе хранения. Так, в 1978 г. при обработке гидрофильных видов в гербарии Ботанического института имени В. Л. Комарова (LE) один из авторов данной публикации находил отдельные номера эксикат в папках соответствующих родов и семейств: 13. *Aldrovanda vesiculosa* L. (Droseraceae); 380. *Utricularia minor* L. (Lentibulariaceae); 2538. *Alisma parnassifolium* Bassi (*Caldesia parnassifolia* (L.) Parl. (Alismataceae) – в разделе гербария флоры Украины. Эксикаты первых двух из приведенных видов хранятся также в УМ.

В уманской коллекции эксикат представлено более 700 г. обр. с территории европейской части России, более 300 – с Украины, 250 – с Кавказа, по 200 – из Сибири и Туркестана. По 10–50 г. обр. собрано на территории Беларуси, Литвы, Латвии, Финляндии, есть также единичные сборы из других регионов (см. рисунок).



13. Aldrovandia vesiculosa L.
Ledeb. Fl. ross. I, p. 262; Шмалъг. Фл. средн. и южн. Россіи I, стр. 118; Коржинскій, Мат. для геогр. морф. и бѣол. Алдг. въ Трудахъ Каз. Общ. Ест. т. XVII, вып. 1.
а) Prov. Czernigov. In paludibus prope Nieshin. 17 Sept. 1897. Legit A. Rakoczi. Собралъ А. Ракочи.
б) Prov. Astrachan. In lacu Kolyschnyj ad ostia Wolgae. 16 Aug. 1883. Legit S. Korshinsky. Собралъ С. Коржинскій.



199. Isoetes lacustris L.
Ledeb. Fl. ross. IV, p. 495; Шмалъг. Флора средн. и южн. Россіи II, стр. 675; Aschers. Syn. mitteleur. Fl. I, p. 166.
Livonia. In lacu Langsting prope Rigan. 16 Julii 1897. Legit K. Kupffer. Собралъ К. Купфферъ.
Лифляндія. Въ озерѣ Лянгстингъ около Риги. 4 іюля 1897 г.



140. Schoenus ferrugineus L.
Boiss. Fl. or. V, p. 393; Шмалъг. Флора средн. и южн. Россіи II, стр. 550; Chaetospora ferruginea Rchb.—Ledeb. Fl. ross. IV, p. 260.
Livonia. In palude natante in lacu Kanger prope Kemmerna. 16 Junii 1897. Legit K. Kupffer. Собралъ К. Купфферъ.
Лифляндія. Въ плавучемъ болотѣ въ оз. Кангеръ около Кеммерна. 4 іюля 1897 г.



118. Lobelia Dortmanna L.
Ledeb. Fl. ross. II, p. 868; Шмалъг. Фл. средн. и южн. Россіи II, стр. 170.
Livonia. In lacu Langsting prope Rigan. 16 Julii 1897. Legit K. Kupffer. Собралъ К. Купфферъ.
Лифляндія. Въ озерѣ Лянгстингъ около Риги. 4 іюля 1897 г.

Образцы эдикат Herbarium Florae Rossicae
Herbarium Florae Rossicae exsiccate samples

В результате проведенного нами анализа коллекции эксикат Herbarium Florae Rossicae (UM) составлен список 160 гидрофильных видов, относящихся к 70 родам и 30 семействам высших споровых (2 вида, 2 рода, 2 семейства) и покрытосеменных растений (158 видов, 68 родов, 28 семейств). Обширна география сборов гидрофильных видов, выполненных более чем 20 коллекторами. Наиболее интересны и многочисленны сборы ботаника К. Р. Купффера (K. R. Kupffer) (1872–1935), в 1897–1903 гг. гербаризировавшего в Лифляндии (Латвия) и Эстляндии (Эстония); ботаника-любителя лесничего Н. И. Пурина, в те же годы собиравшего растения в окрестностях Санкт-Петербурга. Интересны также сборы А. Ракочи, Н. Цингера, П. Наливайко с территории Украины. Учащийся Уманского училища земледелия и садоводства Я. Ткаченко в июне 1897 г. собрал 50 г. обр. *Phragmites communis* Trin. (*P. australis* (Cav.) Trin. ex Steud.) в стоячих водах в окрестностях Умани. Один из этих образцов уже как составная часть Herbarium Florae Rossicae спустя некоторое время вернулся в Умань.

Гербарий, собранный Н. Андросовым в 1901 г. в Туркестане, свидетельствует, что уже тогда в регионе был интродуцирован и разводился по арыкам в садах *Arundo donax* L. Еще один гидрофильный злак – *Zizania latifolia* (Griseb.) Stapf – был собран в 1903 г. Д. Литвиновым по р. Сунгари в Маньчжурии.

Ниже приводится перечень выделенных нами редких видов с сохранением оригинальных данных гербарных этикеток и прежних географических названий в соответствии с Herbarium Florae Rossicae (1897–1903). Перед видовым названием указан инвентарный номер гербарного образца, а в скобках – номер эксиката. В случае несоответствия видового названия современной номенклатуре в скобках приведено название согласно [6].

Isoetaceae: UM 2 (199) *Isoetes lacustris* L. Лифляндия. В оз. Лянгстинг около Риги. 4 июля 1897. К. Купффер.

Lycopodiaceae: UM 1 (99) *Lycopodium inundatum* L. (*Lycopodiella inundata* (L.) Holub). Лифляндия. На берегу оз. Лянгстинг около Риги. 4 июля 1897. К. Купффер.

Crassulaceae: UM 27 (18) *Tillaea aquatic* L. (*Crassula aquatic* (L.) Schönland). Лифляндия. На берегах р. Аа около г. Шлок. 10 июля 1897. К. Купффер.

Droseraceae: UM 279 (13) *Aldrovanda vesiculosa* L. а) Черниг. губ. В болотах около г. Нежина. б) Астрахан. губ. в Кольшном ильмене в дельте Волги. а) 5 сент. 1897. б) 4 авг. 1883. а) А. Ракочи. б) С. Коржинский.

UM 165 (106) *Drosera anglica* Huds. Финляндия. В торфяных болотах около Гельсингфорса. Июль 1897. В. Шохин.

UM 1370 (356) *Drosera intermedia* Науне. Окр. С.-Петербурга. Болотистый берег взморья за Лисьим Носом. 1 авг. 1898. Н. Пуринг и И. Ступа.

Elatinaceae: UM 252 (912) *Elatine alsinastrum* L. Черниг. губ. Остерск. у. В озерах по р. Десне бл. Новоселок. Конец июня 1900. А. Ракочи.

UM 1265 (1460) *Elatine callitrichoides* Kaufm. (*Elatine triandra* Schkuhr). Бл. С.-Петербурга. Стоячие воды бл. устьев Невы на Каменном острове. 20 июля 1901. Н. Пуринг.

UM 1266 (1459) *Elatine hydropiper* L. (*E. hydropiper* L.). Бл. С.-Петербурга. В стоячей воде на островах в устьях Невы. 10 июля 1901. Н. Пуринг.

Lentibulariaceae: UM 1493 (426) *Pinguicula vulgaris* L. Псковск. губ. Остр. у. Болотистый луг бл. с. Покровского вместе с *Primula farinosa* L. Начало июня 1898. А. Дзейвер.

UM 1494 (381) *Utricularia intermedia* Науне. Псковск. губ. Остр. у. Торфяное болото по дороге из Покровского в Дубохново. Июнь и июль 1898. А. Дзейвер.

UM 1495 (380) *Utricularia minor* L. Псковск. губ. Остр. у. Торфяное болото по дороге из Покровского в Дубохново, вместе с *U. intermedia* Науне. Июнь, июль 1898. А. Дзейвер.

Lobeliaceae: UM 37 (118) *Lobelia dortmanna* L. Лифляндия. В оз. Лянгстинг около Риги. 4 июля 1897. К. Купффер.

Nymphaeaceae: UM 3 (1053) *Nuphar pumilum* Sm. (*N. pumila* (Timm) DC.). Лифл. губ. Рижск. у. В оз. Купфергамер бл. Уэксюля. 2 авг. 1900. К. Купффер.

UM 1193 (353а) *Nymphaea candida* C. Presl. Перм. губ. В озерах и старицах по р. Каме у с. Слудского Перм. у. 30 июня 1898. П. Сюзев.

Saxifragaceae: UM 1367 (19) *Saxifraga hirculus* L. (*S. hirculus* L.). В торфяных болотах и вдоль ручьев около д. Глоты Псковск. у., нередко. 14 июля 1897. Е. Исполатов.

Violaceae: UM 1286 (456) *Viola uliginosa* Schrad. (*V. uliginosa* Besser). Окр. С.-Петербурга. Крестовский остров. Сырой кустарник бл. устьев Невы. 10 мая 1898. Н. Пуринг.

Cyperaceae: UM 52 (91) *Carex buxbaumii* Wahlenb. (*C. buxbaumii* Wahlenb.). Лифляндия. На плавающим болоте в оз. Кангер у Кеммерна. 20 июня 1897. К. Купффер.

UM 1780 (493) *Carex chordorrhiza* Fhrh. Окр. С.-Петербурга. Торфяные болота у Колтушей (бл. Лесного). Растет вместе с *C. limosa* L., *Oxycoccus*, etc. 21–29 мая 1898. Н. Пуринг.

UM 1783 (1345) *Carex cyperoides* L. (*C. bohémica* Schreb.). Томск. губ. По песчаным берегам «Песчаного озера» около Томска. 25 июня 1902. П. Крылов.

UM 1786 (843) *Carex dioica* L. Окр. С.-Петербурга. Болотистые луга у Левашова. Июнь 1899 и 1900. Н. Пуринг.

UM 1805 (346) *Carex globularis* L. 1). Окр. С.-Петербурга. По торфяным болотам бл. Колтушей (Лесной). 2) С.-Петерб. губ. Царскосельск. у. Лисинское лесничество. 1) 24 мая 1898. 2) 15 июня 1898. Н. Пуринг.

UM 1813 (645) *Carex heleonastes* Ehrh. (*C. heleonastes* Ehrh. ex L. f.). Окр. С.-Петербурга. Торфяное болото за Коломягами. 16 июня и 1 июля 1899. Н. Пуринг.

UM 398 (744a) *Carex limosa* L. Черниг. губ. Остерск. у. На торфянике у оз. Рыбного бл. Броваров. 25 мая 1899. А. Ракочи.

UM 1826 (295) *Carex loliacea* L. С.-Петерб. губ. Царскосельск. у. Лисинское лесничество. В сырых ольшатниках. 13 июня 1898. Н. Пуринг.

UM 1833 (1594a) *Carex orthostachys* C. A. Mey. (*C. atherodes* Spreng.). Тульск. губ. и у. Берег р. Осетра бл. Мелеховки. 5 июня 1902. Н. Цингер.

UM 57 (36) *Cladium mariscus* R. Br. (*C. mariscus* (L.) Pohl). Лифляндия. На плавучем болоте в оз. Кангер у Кеммерна. 20 июня 1897. К. Купффер.

UM 401 (35) *Cyperus flavescens* L. (*Pycreus flavescens* (L.) P. Beauv. ex Rchb.). Черниг. губ. На сырых песчаных местах у слоб. Никольской Остерск. у. 19 авг. 1897. Н. Цингер.

UM 1160 (943) *Fimbristylis dichotoma* (L.) Vahl. Бухарск. влад. По болотистому месту бл. Фараба на р. Аму-Дарья. 16 авг. 1901. М. Келов и Н. Андросов.

UM 202 (1996) *Heleocharis mamillata* Lindb. fil. (*Eleocharis mamillata* (H. Lindb.) H. Lindb.). Финляндия. Флористическая провинция «Савония северная», приход Иоронис, с. Ервикиле во рвах, на торфянистой почве. 2 июля и 9 авг. 1903. Г. Линдберг.

UM 97 (1695) *Rhynchospora fusca* R. et S. (*R. fusca* (L.) W. T. Aiton). Эстляндская губ. Остров Даго, редко в торфяных низменностях верещатников и боров северной части острова. 29 июля 1903. К. Купффер.

UM 59 (140) *Schoenus ferrugineus* L. Лифляндия. В плавучем болоте в оз. Кангер около Кеммерна. 4 июля 1897. К. Купффер.

UM 404 (593) *Scirpus michelianus* L. (*Cyperus michelianus* (L.) Delile). Черниг. губ. Остерск. у. По берегам р. Десны бл. с. Новоселки. 4 авг. 1898. А. Ракочи.

Juncaceae: UM 1750 (538) *Juncus stygius* L. Псковск. губ. Остр. у. Торфяное болото бл. с. Покровского. Июль, нач. авг. 1898. А. Дзейвер.

UM 50 (1690) *Juncus supinus* Moenh. var. *nodosus* Lang. (*Juncus bulbosus* L.). Лифл. губ. Рижск. у. На влажных местах по дороге бл. Нейбада. 9 авг. 1903. Н. Цингер и В. Финн.

Orchidaceae: UM 45 (185) *Epipactis palustris* (L.) Crantz. Лифляндия. Около Юрьева. 28 июня 1897. А. Фомин.

UM 48 (80) *Liparis loeselii* (L.) Rich. Лифляндия. В болотах у оз. Кангер около Кеммерна. 2 июня 1897. К. Купффер.

UM 1732 (1495) *Malaxis paludosa* Sw. (*Hammarbya paludosa* (L.) Kuntze). Бл. С.-Петербурга, по торфяным болотам. Бл. Сестрорецка (крупные экз.). Бл. Левашова (небольшие экз.). Июль 1900, цв. и незр. пл. 1 июля 1901 цв. Н. Пуринг.

Sparganiaceae: UM 76 (136) *Sparganium affine* Schnitz. (*S. angustifolium* Michx.). Лифляндия. В оз. Лянгстинг около Риги. 4 июля 1897. К. Купффер.

Typhaceae: UM 1188 (1892) *Typha minima* Funck. Туркестан. Бухарск. влад. По берегу р. Аму-Дарья бл. Фараба. Туземное назв.: «Тозгаке». 13 апр. 1903 цв. 30 мая 1903 пл. Н. Андросов.

Особый интерес представляли сборы растений для Herbarium Florae Rossicae с территории Украины. В связи с тем что Черниговская губернская управа начала специальное исследование болот в целях их осушения, преподавателю Киевского университета А. Ракочи (1867–1922) было поручено изучить растительность ряда болот в Остерском, Козелецком и Нежинском уездах. В 1894–1896 гг. им исследованы болота вдоль левых притоков Днепра – Остра и Трубежа – и отдельные болотные массивы «Рыбное озеро», «Выдра» и др., а также собран гербарий свыше 250 видов болотных и прибрежных растений [12]. Тогда А. Ракочи изучил локалитеты *Aldrovanda vesiculosa* около г. Остра и близ болотного массива «Рыбное озеро» в Остерском уезде. В последующие годы (1897–1902) именно здесь этот вид был собран им для Herbarium Florae Rossicae. А. Ракочи гербаризировал также в окрестностях Киева и Смелы Киевской губернии. В пойме Днепра он собрал редкий ныне вид *Elatine alsinastrum*, в стоячих водах у Смелы – *Wolffia arrhizal*.

Из предоставленных харьковским ботаником П. Наливайко в гербарии УМ только 8 г. обр. Все они датированы 1897 г. и собраны коллектором во время изучения флоры окрестностей Харькова [13]. Наибольший интерес из находящихся в УМ эксикат П. Наливайко вызывают массовые (50 экз.) сборы водной и наземной форм *Ranunculus polyphyllus* Waldst из торфяных болот около Харькова, сделанные в мае 1897 г. В настоящее время вид не указывается для Харьковской области, а из других регионов Украины его новые сборы редки. Если на обследованных в конце XIX в. торфяных болотах (за мельницей Скуридина, за полотном железной дороги, у дороги в Дудковку и вблизи моста через Лопань) обе формы *Ranunculus polyphyllus* П. Наливайко называл довольно обыкновенными, то в настоящее время исчезли даже сами названные болота.

В составленный нами список редких таксонов вошли 2 семейства, 2 рода, 2 вида высших споровых и 13 семейств, 25 родов и 38 видов покрытосеменных растений. Соотношение однодольных и двудольных составляет 5 : 8, 14 : 11 и 23 : 15 для семейств, родов и видов соответственно. Наибольшим количеством редких таксонов представлено семейство Сурегасеае. Из его состава в список входят представители 8 родов, при этом из рода *Carex* отмечено 9 видов.

Проведен анализ наличия охранного статуса у 38 гидрофильных видов из состава эксикат согласно резолюции 6 Бернской конвенции [14] и красным книгам Украины, Польши, Латвии, Литвы, Эстонии, Беларуси, России, а также стран, приуроченных к Фенноскандии [15–20]. Поскольку *Fimbristylis dichotoma* (*F. bisumbellata*) и *Typha minima* были собраны для Herbarium Florae Rossicae в Туркестане, т. е. за пределами анализируемого в данной работе региона, в настоящий список они не включены (см. таблицу).

Распространение и охрана редких гидрофильных видов в странах Восточной Европы
Distribution and protection of rare hydrophilic species in the Eastern Europe

Охраняемый таксон	Регион, в котором охраняется вид								
	Украина, 2009	Польша, 2001	Латвия, 2018	Литва, 2007	Эстония, 2008	Беларусь, 2014	Россия, 2008	Ленинградская, Новгородская и Псковская обл., 2000	Фенноскандия, 1998
<i>Isoetes lacustris</i>	+	+	!+	+	+	+	+	+	(+)
<i>Lycopodium inundatum</i>	+		!+	+	+	+		(+)	
<i>Tillaea aquatica</i> L. (<i>Crassula aquatica</i>)		+	!+		+		+	(+)	+
<i>Aldrovandia vesiculosa</i>	!+	+					!	(+)	
<i>Drosera anglica</i>	+							!	
<i>D. intermedia</i>	+							!(+)	
<i>Elatine alsinastrum</i>	!	+						(+)	
<i>Elatine callitrichoides</i> (<i>E. triandra</i>)		+						!(+)	
<i>E. hydropiper</i>		+						!	
<i>Pinguicula vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+		!(+)	+
<i>Utricularia intermedia</i>	+							!	
<i>U. minor</i>	+								
<i>Lobelia dortmanna</i>		+	!+	+	+	+	+	(+)	+
<i>Nuphar pumila</i>		+	!+	+	+	+		(+)	
<i>N. candida</i>		+			+		!	(+)	
<i>Saxifraga hirsulis</i>	+	+	+	+	+	+	!	(+)	+
<i>Viola uliginosa</i>		+	+	+	+	+		!	+
<i>Carex buxbaumii</i>	+		!+	+		+			
<i>C. chordorrhiza</i>	+	+						!	

Охраняемый таксон	Регион, в котором охраняется вид								
	Украина, 2009	Польша, 2001	Латвия, 2018	Литва, 2007	Эстония, 2008	Беларусь, 2014	Россия, 2008	Ленинградская, Новгородская и Псковская обл., 2000	Фенноскандия, 1998
<i>C. cyperoides (C. bohemica)</i>	+						!	(+)	
<i>Carex dioica</i>	+							!	
<i>C. globularis</i>	+	+						!	
<i>C. heleonastes</i>	+		+	+	+	+		!(+)	+
<i>C. limosa</i>	!	+							
<i>C. loliacea</i>	+	+						!	
<i>C. orthostachys (C. atherodes)</i>		+	+				!		+
<i>Cladium mariscus</i>	+		!+	+	+	+	+	(+)	+
<i>Cyperus flavescens (Pycneus flavescens)</i>	!	+						(+)	
<i>Eleocharis mamillata</i>	+				+				!+
<i>Rhynchospora fusca</i>		+	+	+	!+		+	(+)	+
<i>Schoenus ferrugineus</i>	+		+					(+)	+
<i>Scirpus michelianus (Cyperus michelianus)</i>	!	+							
<i>Juncus stygius</i>		+	+	+	+			!	+
<i>J. supinus (Juncus bulbosus)</i>	+		!+		+			(+)	+
<i>Epipactis palustris</i>	+		!					(+)	
<i>Liparis loeselii</i>	+	+	!+	+	+	+	+	(+)	+
<i>Malaxis paludosa (Hammarbya paludosa)</i>	+	+						!(+)	
<i>Sparganium affine (S. angustifolium)</i>	+	+	!+		+				
Общее количество редких видов в регионе	24	24	18	13	17	11	6	22	

Примечание. Знак ! указывает регион, где был собран вид для Herbarium Florae Rossicae; знаком + отмечено наличие у вида статуса охраняемого; через (+) обозначены виды, рекомендуемые к охране [21].

Заключение

Результаты выполненных исследований свидетельствуют, что большинство видов, охраняемых в настоящее время в 4–8 восточноевропейских государствах, в конце XIX – начале XX в. имели довольно многочисленные популяции прежде всего в Прибалтике, где были собраны для Herbarium Florae Rossicae. На территории Украины из указанных видов отмечена *Aldrovanda vesiculosa*. Такие виды, как *Elatine alsinastrum*, *Carex limosa*, *Pycneus flavescens*, *Cyperus michelianus*, в ряде областей Украины охраняются на региональном уровне, а в соседней Польше – на общегосударственном. Показательно также, что из числа видов, охраняемых на государственном уровне только в одной-двух странах Восточной Европы, многие (*Drosera intermedia*, виды рода *Elatine*, *Nymphaea candida*, *Carex bohemica* и др.) Н. Н. Цвелев [21] рекомендует к охране также в областях северо-западной России. Все это подтверждает необходимость охраны гидрофильных видов и их биотопов. Изучение исторических гербариев, в особенности эксикат, в сопоставлении с современным распространением видов способствует активной охране путем реинтродукции. Утраченные локалитеты могут быть местами реинтродукции, а соседние регионы, где популяции еще довольно многочисленны, – локалитетами-донорами диаспор.

Библиографические ссылки

1. Шиян НМ. Эксикаты та їх місце в гербарному обміні. *Український ботанічний журнал*. 2008;65(3):456–464.
2. Шиян НМ, редактор. *Гербарій України. Index Herbariorum Ucrainicum*. Киев: Альтерпрес; 2011. 442 с. DOI: 10.13140/RG.2.1.4742.6969.
3. Мамчур ТВ, Кравець ТО, Чорна ГА. Ексикаты Herbarium Florae Rossicae історичного гербарію Уманського училища рільництва і садівництва. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія*. 2015;25:72–76.
4. Чорна ГА, Куземко АА, Діденко ІП. Колекція папоротей історичного гербарію Уманського училища рільництва і садівництва. *Вісник Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Серія: Біологія*. 2015;25:90–96.
5. Schedae ad Herbarium Florae Rossicae, a Museo Botanico Academiae Imperialis Scientiarum Petropolitanae editum. В: *Списокъ растений Гербарія русской флоры, издаваемого Ботаническимъ Музеемъ Императорской Академіи Наукъ. III (№№ 601–900)*. Санкт-Петербург: Типографія Императорской Академіи Наук; 1901. 88 с.
6. The Plant List. A working list of all plant species [Internet]. 2013 [cited 2018 October 22]. Available from: <http://www.theplantlist.org/>.
7. Casper SJ, Krausch HD. *Pteridophyta und Anthophyta. 1. Teil / Lycopodiaceae bis Orchidaceae*. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2008. 403 S.
8. Белавская АП. *Водные растения России и сопредельных государств*. Черепанова СК, редактор. Санкт-Петербург: РАН; 1994. 64 с.
9. Чорна ГА. *Флора водойм і боліт Лисостепу України. Судинні рослини*. Київ: Фітосоціоцентр; 2006. 184 с.
10. Егорова ТВ. *Осоки (Carex L.) России и сопредельных государств в пределах бывшего СССР*. Тахтаджян АЛ, редактор. Санкт-Петербург: СПХФА; 1999. 772 с. Совместное издание с Миссурийским ботаническим садом.
11. Липшиц СЮ, Васильченко ИТ. *Центральный гербарий СССР. Исторический очерк*. Ленинград: Наука (Ленинградское отделение); 1968. 142 с.
12. Ракочи АГ. О растительности некоторых болот Черниговской губернии. *Записки Киевского общества естествоиспытателей*. 1900;16(2):3–12.
13. Наливайко ПН. Список дикорастущих и одичалых цветковых и высших споровых растений, собранных в г. Харькове и его окрестностях в 1891–1897 гг. В: *Труды Общества испытателей природы при Императорском Харьковском университете. Том 33*. 1898. с. 81–232.
14. Bern Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats [Internet]. 2018 [cited 2018 January 14]. Available from: <http://www.coe.int/en/web/bern-convention>.
15. Дідуха ЯП, редактор. *Червона книга України. Рослинний світ*. Київ: Глобалконсалтинг; 2009. 912 с.
16. Kazmierczakowa R, Zarzycki K, redaktorzy. *Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe*. Krakow: Instytut Botaniki im. W. Szafera; 2001. 664 s.
17. Красные книги. Перечень публикуемых списков охраняемых видов растений и лишайников [Интернет]. [Процитировано 18 августа 2018 г.]. Доступно по: <http://www.plantarium.ru/page/redbooks.html>.
18. Парфенов ПВ. Экологические и фитоценотические особенности произрастания *Lobelia dortmana* L. и *Isoetes lacustris* в Белоруссии. В: *Вторая Всесоюзная конференция по высшим водным и прибрежно-водным растениям: тезисы докладов; 27–29 сентября 1988 г.; Борок, Россия*. Борок: Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина АН СССР; 1988. с. 34–35.
19. Соловьева ВВ, Папченко ВГ, Распопов ИМ. Водная флора России и мира в сравнительном аспекте. В: *Гидробиология 2010. Материалы I (VII) Международной конференции по водным макрофитам; 9–13 октября 2010 г.; Борок, Россия*. Ярославль: Принт Хаус; 2010. с. 43–47.
20. Kotirante H, Uotila P, Sulkava S & Peltonen S-L, editors. *Red Data Book of East Fennoscandia*. Helsinki: Ministry of the Environment; 1999. 351 p.
21. Цвелев НН. *Определитель сосудистых растений Северо-Западной России (Ленинградская, Псковская и Новгородская области)*. Санкт-Петербург: СПХФА; 2000. 781 с.

References

1. Shiyan NM. Exsiccata and their role in herbarium exchange. *Ukrainian Botanical Journal*. 2008;65(3):456–464. Ukrainian.
2. Shiyan NM, editor. *Herbaria of Ukraine. Index Herbariorum Ucrainicum*. Kyiv: Al'terpres; 2011. 442 p. Ukrainian. DOI: 10.13140/RG.2.1.4742.6969.
3. Mamchur TV, Kravec TO, Chorna GA. Exsiccatae of the herbarium florae rossica of the historical herbarium of uman college of agriculture and horticulture. *Visnyk Harkivs'kogo nacional'nogo universytetu imeni V. N. Karazina. Serija: Biologija*. 2015;25:72–76. Ukrainian.
4. Chorna HA, Kuzemko AA, Didenko IP. Collection of ferns in the historical herbarium of uman college of agriculture and horticulture. *Visnyk Harkivs'kogo nacional'nogo universytetu imeni V. N. Karazina. Serija: Biologija*. 2015;25:90–96. Ukrainian.
5. Schedae ad Herbarium Florae Rossicae, a Museo Botanico Academiae Imperialis Scientiarum Petropolitanae editum. In: *Spysockъ rastenij Gerbarija russskoj flory, yzdavaemago Botanycheskymъ Muzeemъ Ymperatorskoj Akademiy Naukъ. III (No.No. 601–900)*. Saint Petersburg: Tipografiya Imperatorskoj Akademii Nauk; 1901. 88 p. Ukrainian.
6. The Plant List. A working list of all plant species [Internet]. 2013 [cited 2018 October 22]. Available from: <http://www.theplantlist.org/>.
7. Casper SJ, Krausch HD. *Pteridophyta und Anthophyta. 1. Teil / Lycopodiaceae bis Orchidaceae*. Wiesbaden: Springer Spektrum; 2008. 403 S. German.
8. Belavskaya AP. *Vodnye rasteniya Rossii i sopredel'nykh gosudarstv* [The list of aquatic plants of the former USSR (within the limits of the former USSR)]. Cherepanova SK, editor. Saint Petersburg: Russian Academy of Sciences; 1994. 64 p. Russian.
9. Chorna HA. *Flora vodojm i bolit Lisostepu Ukrainy. Sudynni roslyny* [Flora of the ponds and bogs of forrest-steppe zone of Ukraine. Vascular plants]. Kiev: Fitosociocentr; 2006. 184 p. Ukrainian.

10. Ehorova TV. *Osoky (Carex L.) Rossii i sopredel'nykh gosudarstv v predelakh byvshego SSSR* [The sedges (*Carex* L.) of Russia and adjacent states (within the limits of the former USSR)]. Takhtadzhyan AL, editor. Saint Petersburg: Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy; 1999. 772 p. Co-published by the Missouri Botanical Garden. Russian.
11. Lipshits SYu, Vasil'chenko IT. *Tsentrāl'nyi gerbarii SSSR. Istoricheskii ocherk* [Central herbarium of the USSR. Historical essay]. Leningrad: Nauka (Leningradskoe otdelenie); 1968. 142 p. Russian.
12. Rakochy AH. [On the vegetation of some of the swamps of the Chernigov province]. *Zapiski Kievskogo Obshchestva Estestvoispytatelei*. 1900;16(2):3–12. Russian.
13. Nalyvayko PN. [List of wild and wild flowering and higher spore plants collected in Kharkov and its environs in 1891–1897]. In: *Trudy Obshchestva ispytatelei prirody pri Imperatorskom Khar'kovskom universitete. Tom 33*. 1898. p. 81–232. Russian.
14. Bern Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats [Internet]. 2018 [cited 2018 January 14]. Available from: <http://www.coe.int/en/web/bern-convention>.
15. Didukha YaP, editor. *Chervona knyga Ukrainy. Roslynnij svit* [Red Book of Ukraine. Vegetable world]. Kiev: Globalkonsalting; 2009. 912 p. Ukrainian.
16. Kazmierczakowa R, Zarzycki K, redaktorzy. *Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe*. Krakow: Instytut Botaniki im. W. Szafera; 2001. 664 s. Polish.
17. [Red books. List of published lists of protected species of plants and lichens] [Internet]. [Cited 2018 August 18]. Available from: <http://www.plantarium.ru/page/redbooks.html>. Russian.
18. Parfenov PV. [Ecological and phytocenotic features of the growth of *Lobelia dortmana* L. and *Isoetes lacustris* in Belorусyі]. In: *Vtoraya Vsesoyuznaya konferentsiya po vysshim vodnym i pribrezhno-vodnym rasteniyam: abstracts; 1988 September 27–29; Borok, Russia*. Borok: I. D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences; 1988. p. 34–35. Russian.
19. Soloveva VV, Papchenkov VH, Raspopov YM. [The aquatic flora of Russia and the world in a comparative aspect]. In: *Gidrobotanika 2010. Materialy I (VII) Mezhdunarodnoi konferentsii po vodnym makrofitam; 2010 October 9–13; Borok, Russia*. Yaroslavl: Print Khaus; 2010. p. 43–47. Russian.
20. Kotirante H, Uotila P, Sulkava S & Peltonen S-L, editors. *Red Data Book of East Fennoscandia*. Helsinki: Ministry of the Environment; 1999. 351 p.
21. Tsvelev NN. *Opredeletel' sosudistykh rastenii Severo-Zapadnoi Rossii (Leningradskaya, Pskovskaya i Novgorodskaya oblasti)* [Manual of the vascular plants of North-West Russia (Leningrad, Pskov and Novgorod provinces)]. Saint Petersburg: Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy; 2000. 781 p. Russian.

Статья поступила в редакцию 22.03.2018.
Received by editorial board 22.03.2018.

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

SHORT COMMUNICATIONS

УДК 58.035:58.084.1

ДИНАМИКА СУТОЧНОГО РОСТА ЛИСТЬЕВ ТОМАТА И ПЕРЦА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ОСВЕЩЕНИЯ

О. О. КОЛОМИЕЦ¹⁾, С. В. ГЛУШЕН¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Исследован суточный рост листьев томата и стручкового перца в лабораторных условиях. Данный мониторинг проводили методом DISP (digital image sequence processing). При круглосуточном освещении наблюдался постоянный рост листьев в течение всех суток. При освещении в режиме 12/12 ч (день/ночь) у обоих видов кривые роста изменились кардинально, пики прироста стали ограничены по времени. Максимальный прирост у перца регистрировался ближе к началу ночи, тогда как у томата максимум прироста приходился на вторую половину ночи. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что фотопериодизм может играть роль внешнего фактора синхронизации циркадных часов, которые управляют процессами пролиферации и дифференцировки клеток в листьях растений.

Ключевые слова: томат; стручковый перец; суточный рост растений; фотопериодизм; циркадные часы; компьютерный мониторинг роста.

Образец цитирования:

Коломиец ОО, Глушен СВ. Динамика суточного роста листьев томата и перца при различных режимах освещения. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*. 2019;1:73–78.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-73-78>

For citation:

Kolomiets OO, Gloushen SV. The dynamics of diel growth of tomato and capsicum leaves with different lighting modes. *Journal of the Belarusian State University. Biology*. 2019;1: 73–78. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-73-78>

Авторы:

Олег Олегович Коломиец – аспирант кафедры генетики биологического факультета. Научный руководитель – С. В. Глушен.
Сергей Витальевич Глушен – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры генетики биологического факультета.

Authors:

Oleg O. Kolomiets, postgraduate student at the department of genetics, faculty of biology.
oleg_inna.90@mail.ru
Sergey V. Gloushen, PhD (biology); docent; associate professor at the department of genetics, faculty of biology.
sglush@mail.ru

THE DYNAMICS OF DIEL GROWTH OF TOMATO AND CAPSICUM LEAVES WITH DIFFERENT LIGHTING MODES

O. O. KOLOMIETS^a, S. V. GLOUSHEN^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: O. O. Kolomiets (oleg_inna.90@mail.ru)

The diel growth of tomato and capsicum leaves under laboratory conditions was studied. Plant growth was monitored by DISP – digital image sequence processing method. Under round-the-clock lighting mode in both species was observed more or less permanent growth of leaves. When lighting mode of 12/12 h (day/night) was applied growth curves have changed dramatically. The maximum increment at a capsicum was registered at the beginning of night whereas at a tomato the maximum increment was observed for the second half of night and early morning. The obtained results show photoperiodism can play triggering role for inner circadian clock that control processes of cell proliferation and differentiation in leaves of plants.

Key words: tomato; capsicum; diel plant growth; photoperiodism; circadian clock; computer monitoring of growth.

Введение

Процесс роста является одним из наиболее сложных явлений в биологии растений. Он может быть определен как необратимое увеличение размеров растения и его биомассы, на которое в первую очередь влияют такие факторы, как поступление питательных веществ и воды, температура, интенсивность и режим освещения. Рост зависит также от видовой принадлежности, стадии развития и условий произрастания. На тканевом уровне он обеспечивается делением, растяжением и дифференцировкой клеток [1].

Суточная динамика роста растения подчиняется ритму, который демонстрирует видовую специфичность. В листьях однодольных растений наблюдается постоянный рост, интенсивность которого зависит от времени суток. Двудольные растения отличаются кратковременным ростом в начале или в конце ночи. Ростовые процессы находятся под контролем генов, которые обеспечивают функционирование внутренних осцилляторов, или циркадных часов. Последние используются растениями для того, чтобы прогнозировать суточные и сезонные флуктуации факторов внешней среды [2].

Темпы роста на различных уровнях организации растения определяют его возможности функционировать в неоптимальных условиях. Измерение темпов роста органов растения с помощью современных компьютерных методов перспективно как для научных исследований, так и для агрономической или селекционной практики. В частности, эти методы могут быть использованы для изучения генных сетей, контролирующих рост и развитие растений, отбора устойчивых к засухе, низким температурам или засолению генотипов или изучения влияния внешних факторов различной природы.

Цель данной работы – исследование суточных ритмов роста листьев таких распространенных овощных культур, как томат (*Solanum lycopersicum* L.) и стручковый перец (*Capsicum annuum* L.), с помощью компьютерного метода регистрации роста растений.

Материалы и методы исследования

В качестве материала использовались проростки томата сорта «Пралеска» и перца сорта «Алеся». Растения выращивались в стандартных лабораторных условиях в контейнерах объемом 150 × 110 × 70 мм по 5–7 штук на универсальном грунте. Мониторинг роста начинали после появления 3–4 листков при средней длине проростков 5–8 см.

Изучение роста листьев культивируемых и дикорастущих видов растений началось в 1930-х гг. Первые измерения выполняли с помощью линейек и других простых приспособлений, поэтому они имели низкую точность. Современный подход предполагает использование методов, основанных на компьютерном анализе изображений, он отличается высоким пространственным и временным разрешением. Одна из первых разработок в этой области относится к 1990-м гг. и обозначена авторами как DISP (digital image sequence processing) [3]. В нашем исследовании использовалась модификация этого метода, которая отличается применением широко распространенных технических и программных средств, что значительно упрощает его внедрение в лабораторную практику.

Установка для мониторинга роста растений методом DISP представлена на рис. 1. Она состоит из штатива и держателя фотоаппарата с регулировкой по высоте, цифровой фотокамеры (в нашем случае D40 фирмы *Nikon*, Япония), объектива для макросъемки (Индустар-40) и компьютера с программой для управления фотокамерой по каналу USB. В связи с тем что срок непрерывной работы фотокамеры составлял более 24 ч, она была подключена к сетевому блоку питания. Съемка проводилась при следующих условиях: температура 18–20 °С, относительная влажность 51 %, освещение лампой дневного света 50 лк. В сериях с режимом освещения 12/12 ч (день/ночь), чтобы обеспечить работу фотокамеры в ночной период, растения подсвечивали лампой с темно-красным фильтром.

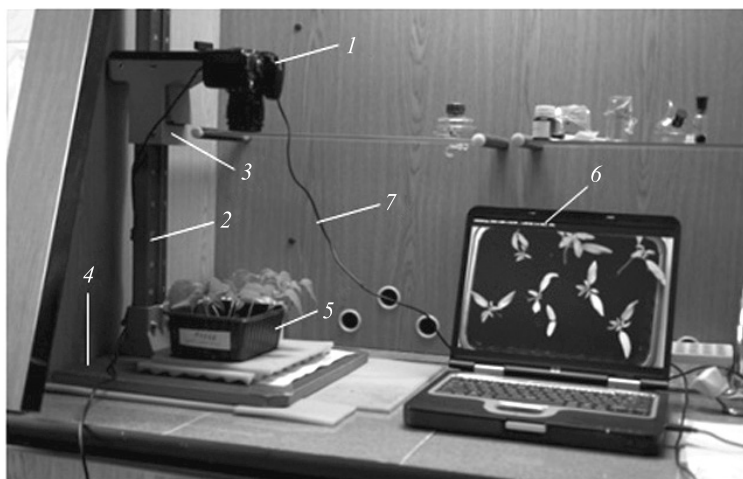


Рис. 1. Установка для метода DISP: 1 – фотокамера; 2 – стойка штатива; 3 – регулируемый по высоте держатель фотокамеры; 4 – основание штатива; 5 – контейнер с проростками; 6 – компьютер; 7 – USB-кабель, соединяющий фотоаппарат с компьютером
Fig. 1. Installation for the DISP: 1 – camera; 2 – stand; 3 – adjustable camera holder; 4 – the base of stand; 5 – container with seedlings; 6 – computer; 7 – USB cable to connect camera and computer

Каждый цикл съемки начинали в промежутке с 17 до 18 ч и завершали на следующие сутки в это же время. Интервал между снимками составлял 3 мин. В результате в одном суточном цикле регистрации роста получали 480 снимков. Период адаптации растений к условиям освещения занимал около 1 ч. Последующие циклы мониторинга повторяли через сутки.

Обработка полученных цифровых снимков включала два этапа. На первом этапе измеряли площадь проекции листа и другие параметры, зависящие от его размеров. На втором этапе графики, отражающие суточный рост листьев, сглаживали для устранения высокочастотных помех и дифференцировали для получения кривых прироста. Графики каждого типа мониторинга усредняли по 6–9 кривым роста.

Результаты и их обсуждение

В первой серии наблюдений проводился мониторинг суточного роста листьев томата и перца при постоянном освещении. Установлено, что при таком режиме как у томата, так и у перца рост листьев был круглосуточным. Об этом свидетельствуют кривые роста, представленные на рис. 2, *а* и *б*. Соответственно, и кривые прироста проходят вдоль линии, параллельной оси абсцисс (рис. 2, *в* и *г*).

Вторая серия мониторинга роста листьев была проведена в режиме освещения 12/12 ч (день/ночь). В этой серии все кривые роста листьев томата и перца имели выраженный подъем (рис. 3, *а* и *б*), что соответствует ограниченному по времени приросту (рис. 3, *в* и *г*). У перца максимум прироста наблюдался ближе к началу ночи, тогда как у томата он приходился на вторую половину ночи. В связи этими наблюдениями можно заключить, что в отличие от постоянного освещения режим 12/12 ч (день/ночь) обеспечивает синхронизацию процессов роста листьев томата и перца на клеточном уровне.

У двудольных растений имеются два типа суточного роста [4]. Для первого характерен максимальный рост листьев в конце ночи или рано утром. К нему, в частности, относятся такие виды, как клещеви́на (*Ricinus communis* L.), табак (*Nicotiana tabacum* L.) и арабидопсис (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh.). Ко второму типу принадлежат растения с максимальным ростом листьев вечером или в начале

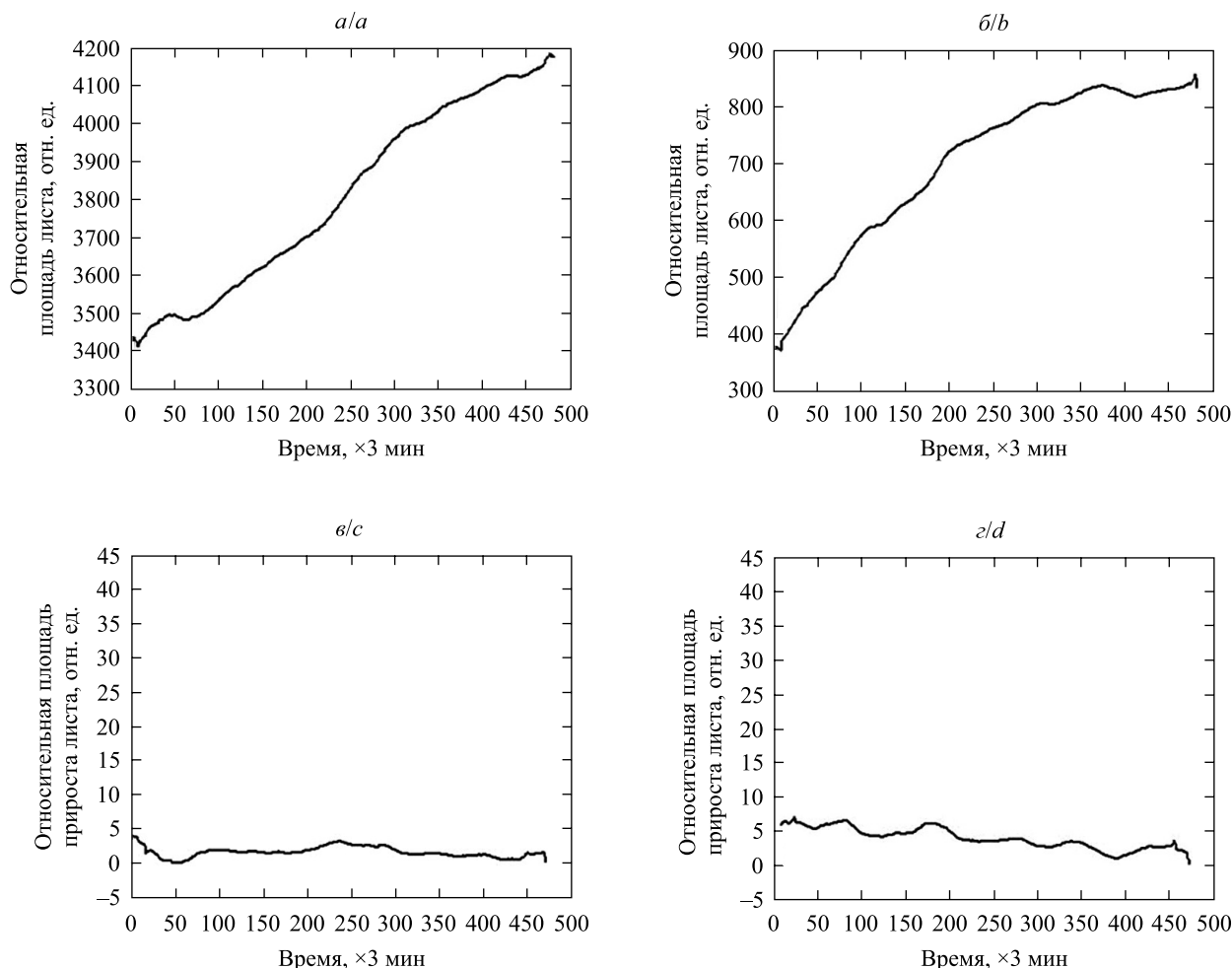


Рис. 2. Динамика суточного роста (а, б) и прироста (в, г) листьев томата (а, в) и перца (б, г) при постоянном освещении

Fig. 2. Deil growth (a, b) and growth increment (c, d) of tomato (a, c) and capsicum (b, d) leaves under constant lighting

ночи. Этот тип наблюдается, например, у тополя дельтовидного (*Populus deltoids* Bartr. ex Marsh.), кипарисовиков (*Chamaecyparis* sp.) и сои (*Glycine max* (L.) Merr.). Согласно полученным нами данным, томат относится к первому типу суточного роста двудольных растений, тогда как сладкий перец – ко второму типу.

Рост листьев очень чувствителен к изменениям внешней среды. Анализ суточного роста листьев позволяет, в частности, оценить устойчивость растений к таким формам абиотического стресса, как засуха, жара или дефицит питательных веществ, что представляет значительный интерес как в научном, так и в практическом аспекте.

Ритм суточного роста листьев двудольных растений контролируется циркадными часами, которые представляют собой генную сеть из трех регуляторных контуров – *CCA1*, *LHY* и *TOC1*. Эта сеть согласует процессы в ткани листа на клеточном уровне с суточными колебаниями абиотических факторов внешней среды. Отрицательные обратные связи молекулярных контуров настроены на 24-часовой период колебаний и синхронизируются светом и температурой [5].

Роль внутренних циркадных часов и внешних синхронизирующих факторов трактуется в литературе по-разному. Согласно более распространенной точке зрения, циркадные часы играют ведущую роль, так как они сохраняют суточный ритм даже в отсутствие внешних сигналов [2; 4]. В данной работе показано, что при постоянном освещении листья томата и перца растут круглосуточно приблизительно в одном темпе. Если использовать режим освещения 12/12 ч (день/ночь), листья как томата, так и перца растут ночью в ограниченный период времени. Это свидетельствует в пользу гипотезы, что работа циркадных часов у двудольных растений существенно зависит от режима освещения, что может быть использовано на практике для управления процессами роста.

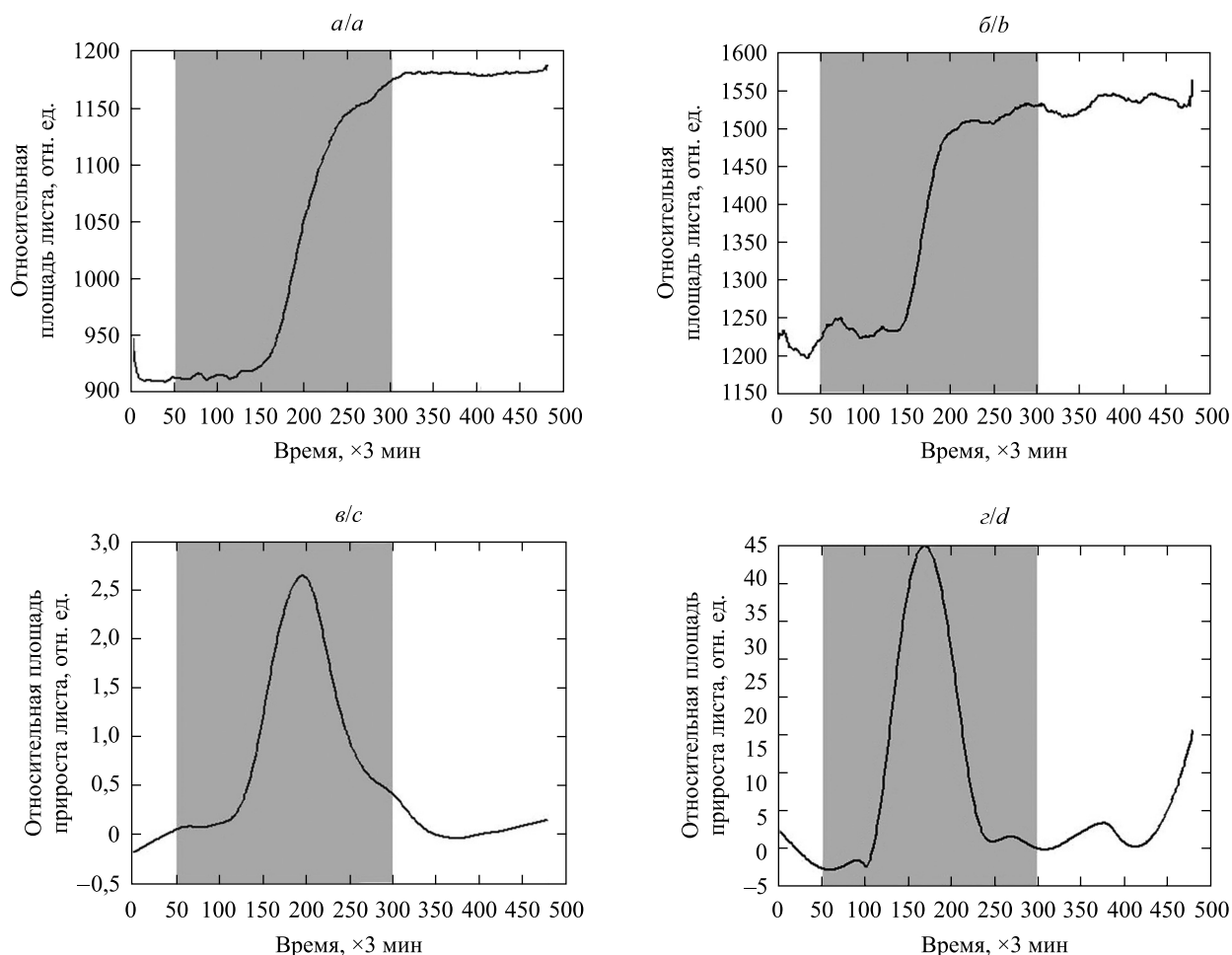


Рис. 3. Динамика суточного роста (а, б) и прироста (в, г) листьев томата (а, в) и перца (б, г) при освещении 12/12 ч (день/ночь) (на графике затенена)

Fig. 3. Diel growth (a, b) and growth increment (c, d) of tomato (a, c) and capsicum (b, d) leaves under regime 12/12 h (day/night) (shade)

Заключение

Установлено, что у стручкового перца *Capsicum annuum* L. пик прироста листьев наблюдается ближе к началу ночи, тогда как у томата *Solanum lycopersicum* L. максимум прироста приходится на вторую половину ночи. Таким образом, томаты относятся к первому типу суточного роста двудольных растений, перец – ко второму типу.

Четкие пики прироста листьев у томата и перца можно получить при использовании режима освещения 12/12 ч (день/ночь). При круглосуточном освещении, однако, у этих же видов наблюдается постоянный рост листьев. Это свидетельствует в пользу предположения, что контролирующие рост листьев циркадные часы синхронизируются сменой дня и ночи.

Библиографические ссылки

1. Юрин ВМ, Дитченко ТИ. *Физиология роста и развития растений*. Минск: БГУ; 2009.
2. Ruts T, Matsubara Sh, Wiese-Klinkenberg A, Walter A. Diel patterns of leaf and root growth: endogenous rhythmicity or environmental response? *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(9):3339–3351. DOI: 10.1093/jxb/err334.
3. Schmundt D, Stitt M, Jähne B, Schurr U. Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *The Plant Journal*. 1998;16(4):505–514. DOI: 10.1046/j.1365-313x.1998.00314.x.
4. Poiré R, Wiese-Klinkenberg A, Parent B, Mielewicz M, Schurr U, Tardieu F, et al. Diel time-courses of leaf growth in monocot and dicot species: endogenous rhythms and temperature effects. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61(6):1751–1759. DOI: 10.1093/jxb/erq049.
5. Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA. Arabidopsis circadian clock protein, *toc1*, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(8):3167–3172. DOI: 10.1073/pnas.1200355109.

References

1. Yurin VM, Ditchenko TI. *Fiziologiya rosta i razvitiya rastenii* [Physiology of growth and development of plants]. Minsk: Belarusian State University; 2009. Russian.
2. Ruts T, Matsubara Sh, Wiese-Klinkenberg A, Walter A. Diel patterns of leaf and root growth: endogenous rhythmicity or environmental response? *Journal of Experimental Botany*. 2012;63(9):3339–3351. DOI: 10.1093/jxb/err334.
3. Schmundt D, Stitt M, Jähne B, Schurr U. Quantitative analysis of the local rates of growth of dicot leaves at a high temporal and spatial resolution, using image sequence analysis. *The Plant Journal*. 1998;16(4):505–514. DOI: 10.1046/j.1365-3113x.1998.00314.x.
4. Poiré R, Wiese-Klinkenberg A, Parent B, Mielewczik M, Schurr U, Tardieu F, et al. Diel time-courses of leaf growth in monocot and dicot species: endogenous rhythms and temperature effects. *Journal of Experimental Botany*. 2010;61(6):1751–1759. DOI: 10.1093/jxb/erq049.
5. Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA. Arabidopsis circadian clock protein, *toc1*, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(8):3167–3172. DOI: 10.1073/pnas.1200355109.

Статья поступила в редколлегию 19.06.2018.
Received by editorial board 19.06.2018.

УДК 57.044

ИНДУКЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ У МОЛЛЮСКА *LYMNAEA STAGNALIS* ПРИ ИНКУБАЦИИ ЖИВОТНЫХ В ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННОМ РАСТВОРЕ ГЛЮКОЗЫ

В. Н. ШАДЕНКО^{1), 2)}, А. В. СИДОРОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Республиканский научно-практический центр психического здоровья,
Долгиновский тракт, 152, 220053, г. Минск, Беларусь

Установлено, что двухчасовая инкубация моллюсков в 100 ммоль/л водном растворе глюкозы приводит к более чем 5-кратному возрастанию (с 0,17 (0,13; 0,24) до 1,30 (0,91; 1,37) ммоль/л) ее концентрации во внутренней среде (гемолимфе) улиток. Указанный эффект был кратковременным, значения показателя возвращались к исходному уровню (0,14 (0,10; 0,22) ммоль/л) уже через 2 ч после нормализации условий содержания животных (перемещение в чистую аквариумную воду), сохраняясь на этом уровне (0,20 (0,15; 0,29) ммоль/л) по прошествии суток. Использование 10 ммоль/л раствора глюкозы оказывается неэффективным для создания экспериментальной гипергликемии в гемолимфе *Lymnaea stagnalis*.

Ключевые слова: глюкоза; гемолимфа; беспозвоночные.

Благодарность. Работа выполнена в рамках проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19-49).

INDUCTION OF EXPERIMENTAL HYPERGLYCEMIA IN MOLLUSC *LYMNAEA STAGNALIS* AFTER ANIMAL'S INCUBATION IN HIGH-CONCENTRATED GLUCOSE SOLUTION

V. N. SHADENKO^{a, b}, A. V. SIDOROV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bRepublican Research and Practice Center for Mental Health, 152 Dalhinaŭski Tract, Minsk 220053, Belarus

Corresponding author: A. V. Sidorov (sidorov@bsu.by)

We established that two hours' long exposition of molluscs in 100 mmol/L glucose water solution results in more than 5-fold (from 0.17 (0.13; 0.24) to 1.30 (0.91; 1.37) mmol/L) increase of its level in snail's haemolymph. This effect was short-term. No longer than 2 h after normalization of conditions (removal of animals in «pure» aquarium water)

Образец цитирования:

Шаденко ВН, Сидоров АВ. Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска *Lymnaea stagnalis* при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;1:79–84.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-79-84>

For citation:

Shadenko VN, Sidorov AV. Induction of experimental hyperglycemia in mollusc *Lymnaea stagnalis* after animal's incubation in high-concentrated glucose solution. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;1:79–84. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-79-84>

Авторы:

Виктория Николаевна Шаденко – соискатель кафедры физиологии человека и животных биологического факультета¹⁾, научный сотрудник лаборатории клинко-эпидемиологических исследований²⁾. Научный руководитель – А. В. Сидоров.

Александр Викторович Сидоров – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Victoria N. Shadenko, competitor at the department of human and animal physiology, faculty of biology^a and researcher at the laboratory of clinical and epidemiological research^b.

vika-st-18@list.ru

Alexander V. Sidorov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

sidorov@bsu.by

haemolymph glucose level return to the initial (0.14 (0.10; 0.22) mmol/L), being stable in next twenty-four hours (0.20 (0.15; 0.29) mmol/L). Glucose water solution (10 mmol/L) was ineffective in producing experimental hyperglycemia in haemolymph of *Lymnaea stagnalis*.

Key words: glucose; haemolymph; invertebrate.

Acknowledgements. This work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. Б19-49).

Введение

Концентрация глюкозы во внутренней среде организма животных является одной из важнейших физиологических констант, определяющих его нормальное функционирование. Колебания уровня глюкозы (гипо- или гипергликемия разной степени выраженности, продолжительности и генеза) в интерстициальном пространстве оказывают выраженное влияние на целый ряд физиологических систем, включая нервную [1]. С этих позиций, особенно в случаях кратковременного, быстропроходящего сдвига концентрации, молекулу глюкозы можно рассматривать в качестве сигнальной, т. е. выступающей в роли триггера ответных реакций на клеточном (нейронном) уровне.

При исследовании клеточных механизмов нервных функций широко используются различные модельные организмы, включая беспозвоночных, в том числе и пресноводный легочный моллюск *Lymnaea stagnalis* [2]. Для данной модели в целях оценки физиологического действия различных веществ (потенциальные нейромодуляторы, загрязнители окружающей среды и т. п.) применяются два основных методических подхода: инъекция препарата в полость цефалопедального синуса или инкубация животного в аквариумах, содержащих исследуемое начало в определенной концентрации. В последнем случае возможное действие реализуется благодаря высокой проницаемости кожных покровов моллюсков для водорастворимых, относительно низкомолекулярных (~200 Да) молекул [3]. Такой подход видится более предпочтительным, поскольку не связан с нанесением травмы животному, хотя и не лишен ограничений, обусловленных растворимостью и устойчивостью препарата в воде, его высоким расходом и т. п.

Глюкоза является эндогенным компонентом внутренней среды моллюсков, активным участником углеводного обмена, а ее концентрация в гемолимфе может колебаться в широком диапазоне значений [4]. Поэтому «просто инкубация» животных в растворах глюкозы заданной концентрации не может гарантировать уравнивание ее содержания внутри организма (в гемолимфе) с таковым для внешней среды (раствор для инкубации). Сказанное явилось предпосылкой для разработки и верификации способа создания кратковременной экспериментальной гипергликемии у модельного нейробиологического объекта – моллюска *Lymnaea stagnalis*.

Материалы и методы исследования

Моллюсков (*Lymnaea stagnalis*) собирали в мелких проточных водоемах (мелиоративные и водоотводные каналы) в осенний период. В лаборатории их содержали в аквариумах (на каждую особь приходилось не менее 1 л воды) при температуре (20 ± 1) °С. Смену воды проводили каждую неделю. Пищей служили листья салата (питание *ad libitum*). Использовали животных одинакового размерного класса, которые были разбиты на три равные по численности условные группы – контрольную и две экспериментальные, не отличающиеся друг от друга по своим морфометрическим показателям согласно дисперсионному анализу (см. таблицу).

Морфологические показатели экспериментальных групп животных
Morphological parameters of experimental groups of animals

Группа моллюсков	Показатели	
	Высота раковины, см ($H = 0,92$; $P = 0,6318$)	Масса, г ($H = 5,19$; $P = 0,0747$)
1-я (контроль), $n = 13$	3,5 (3,3; 3,8)	2,1 (1,9; 2,4)
2-я (глюкоза, 10 ммоль/л), $n = 13$	3,6 (3,5; 4,0)	2,7 (2,4; 3,1)
3-я (глюкоза, 100 ммоль/л), $n = 13$	3,6 (3,3; 3,9)	2,6 (2,0; 3,3)

Примечание. H – критерий Крускала – Уоллиса (ANOVA); P – уровень значимости.

Моллюсков доставали из аквариумов их постоянного содержания, умеренной тактильной стимуляцией подошвы ноги животного вызывали реакцию полного втягивания тела в раковину (whole body withdrawal), сопровождающуюся выбросом части гемолимфы в объеме, достаточном для последующего определения концентрации глюкозы (не менее 100 мкл). Затем моллюсков возвращали в аквариум и оставляли в покое на 15 мин (до начала выдвигания из раковины и свободного перемещения). После этого животных переносили в 10-литровые аквариумы с заданными условиями инкубации, где они находились в течение 2 ч. Моллюски контрольной группы помещались в сосуды с чистой водой, а опытных групп – в аквариумы с 10 и 100 ммоль/л раствором глюкозы «ч. д. а.», приготовленным на отстоявшейся водопроводной воде. По окончании инкубации производили забор гемолимфы описанным выше способом у животных всех групп, предварительно ополоснув раковину и ногу моллюсков дистиллированной водой во избежание загрязнения пробы следами высококонцентрированного раствора глюкозы. Затем животных переносили в аквариумы их постоянного содержания. Забор проб гемолимфы повторяли еще дважды, по прошествии 2 и 24 ч после окончания инкубации.

Концентрацию глюкозы определяли глюкозооксидазным методом (набор реагентов «Анализ Х», Беларусь). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 520 нм (оптический путь 1 см) при 20 °С посредством спектрофотометра Cary 50 (Variant Inc., Австралия). Объем материала для анализа – 100 мкл, время инкубации с реагентом (1 мл) – 30 мин. В качестве стандарта использовали 100 мкл свежеприготовленного 1 ммоль/л раствора глюкозы. При оценке уровня глюкозы в гомогенатах тканей стенки тела (5 %, на основе дистиллированной воды) к 100 мкл такого материала предварительно добавляли 50 мкл 50 % трихлоруксусной кислоты. Связанный белок осаждали центрифугированием (6000 об/мин, 1 мин), а 100 мкл полученного супернатанта использовали для последующего анализа.

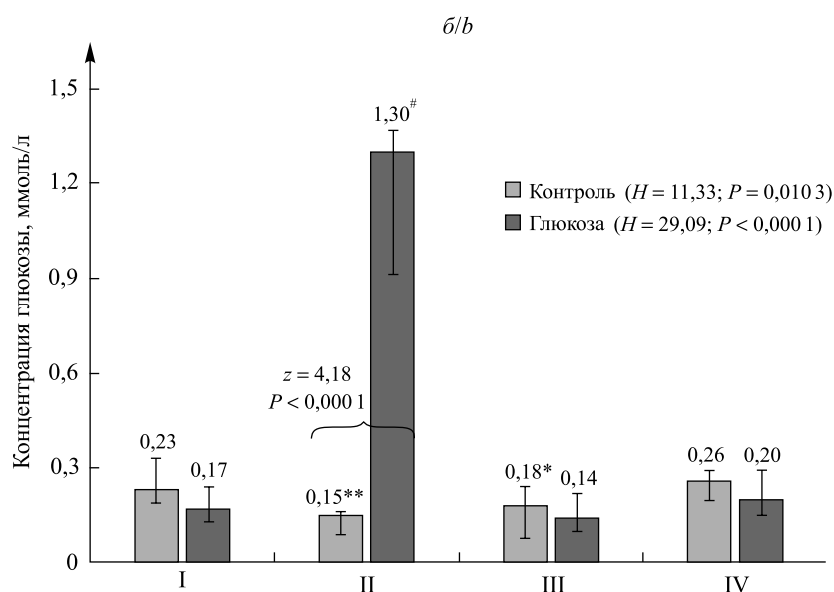
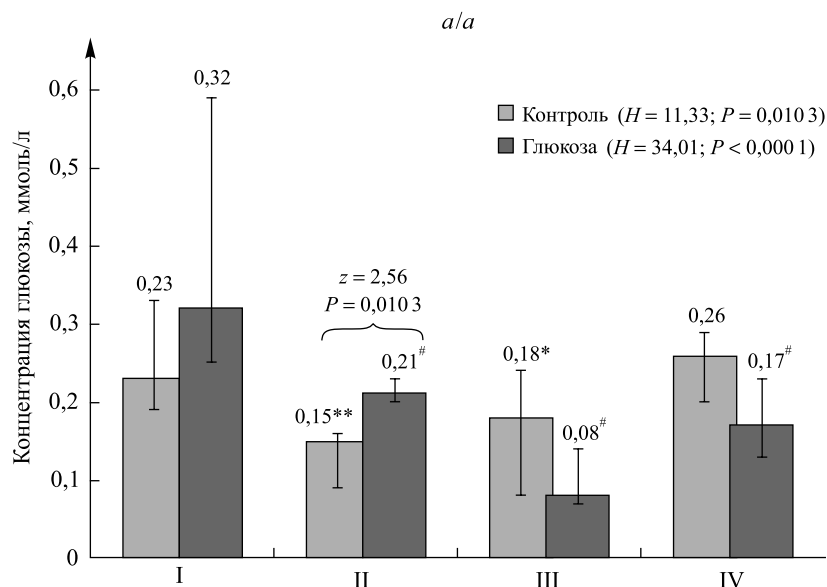
Экспериментальные данные, представленные в виде: медиана (верхний квартиль; нижний квартиль), обрабатывали общепринятыми методами медико-биологической статистики [5]. Для каждого ряда величин предварительно оценивали нормальность распределения при помощи W -теста Шапиро – Уилка. Поскольку таковая не была подтверждена для всех без исключения временных интервалов оценки уровня глюкозы каждой группы моллюсков, использовали непараметрические методы оценки. При сравнении нескольких независимых групп (моллюски не были снабжены индивидуальными метками, что не позволило отследить изменение показателя во все временные отрезки опыта индивидуально по каждой особи) применяли критерий Крускала – Уоллиса (H) для дисперсионного анализа (ANOVA) по однофакторной схеме, при сравнении двух независимых групп – U -критерий Манна – Уитни. Расчет степени изменения показателя производили на основании значений медианы. Данные обрабатывали посредством программы *Statistica 6.0*. Достоверными считались результаты при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Анализ динамики уровня глюкозы в гемолимфе животных контрольной группы (рисунок) выявил статистически достоверное падение показателя по сравнению с исходной (до инкубации) оценкой, происходящее на первое (сразу после инкубации) и последующее (спустя 2 ч) измерения, проведенные по завершении инкубации, – в 1,5 ($z = 2,67$; $P = 0,0077$) и 1,3 ($z = 2,10$; $P = 0,0355$) раза соответственно. Спустя 24 ч концентрация глюкозы в гемолимфе статистически достоверно не отличалась от первоначально измеренной. Схожее по направленности изменение наблюдалось и для животных, содержащихся в 10 ммоль/л растворе глюкозы, – снижение оцениваемого показателя по сравнению с исходным для данной группы уровнем (см. рисунок *а*). Для измерения, проведенного спустя 2 ч после инкубации, была отмечена максимальная степень падения – в 4 раза ($z = 4,14$; $P < 0,0001$). Непосредственно по завершении инкубации различия составили 1,5 раза ($z = 3,65$; $P < 0,0001$), и даже по прошествии суток концентрация глюкозы в гемолимфе была ниже в 1,9 раза ($z = 3,45$; $P < 0,0006$) по сравнению с начально оцененной для этой группы.

Отличная от описанной выше динамика рассматриваемого показателя отмечена для второй экспериментальной группы, животные которой содержались в 100 ммоль/л растворе глюкозы (см. рисунок *б*). Наблюдалось многократное, в 7,6 раза ($z = 4,18$; $P < 0,0001$), возрастание уровня глюкозы по сравнению с исходным (до инкубации) значением, выявленное при анализе проб гемолимфы, полученных сразу после завершения инкубации моллюсков. В другие временные отрезки, спустя 2 и 24 ч после окончания экспериментального воздействия, значения показателя статистически достоверно не отличались от начального.

Дисперсионный анализ полученных данных по каждому временному отрезку эксперимента показал, что статистически значимые различия между группами животных присущи начальному (до инкубации) и непосредственно после завершения инкубации измерениям: $H = 7,90$ ($P = 0,0192$) и $H = 28,31$ ($P < 0,0001$) соответственно. Однако попарное сравнение показывает, что в первом случае статистическая



Уровень глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* при инкубации моллюсков в 10 ммоль/л (а) и 100 ммоль/л (б) растворе глюкозы:

I – до начала инкубации; II – сразу после инкубации; III – через 2 ч после инкубации; IV – через 24 ч после инкубации.

Представлено значение показателя – медиана (числа над столбиками) и интерквартильный размах (планки погрешностей).

Фигурная скобка отмечает статистически достоверные пары сравнения в одинаковый временной интервал (*U*-критерий Манна – Уитни). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, различия достоверны в контрольной группе по сравнению с исходным (до начала инкубации) значением показателя (*U*-критерий Манна – Уитни); [#] $P < 0,001$,

различия достоверны в опытных группах по сравнению с исходным значением показателя (*U*-критерий Манна – Уитни). Приведено значение критерия

Крускала – Уоллиса (*H*) для дисперсионного анализа по однофакторной схеме (К – W ANOVA) и соответствующего ему уровня значимости (*P*) для всех групп моллюсков

Glucose level in the haemolymph of *Lymnaea stagnalis* during incubation in 10 mmol/L (a) and 100 mmol/L (b) glucose solutions:

I – before incubation; II – immediately; III – 2 h after; IV – 24 h after incubation.

Experimental meaning – median (numbers above the columns) and lower and upper quartiles (error bars).

Bracket – significant for the same period of time (Mann – Whitney *U*-test). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significant for control group in comparison with initial (before incubation) meaning (Mann – Whitney *U*-test);

[#] $P < 0.001$, significant for experimental groups in comparison with initial meaning (Mann – Whitney *U*-test). Kruskal – Wallis ANOVA test (*H*) (K – W ANOVA) and corresponding significance level (*P*) presented for all groups of molluscs

значимость основана на различиях между двумя экспериментальными группами. При этом каждая из них по содержанию глюкозы в гемолимфе не отличалась от контрольной: $z = 1,56$ ($P = 0,1178$) и $z = 1,36$ ($P = 0,1742$) для моллюсков, содержащихся в 10 и 100 ммоль/л растворах глюкозы соответственно. Напротив, в случае произведенного сразу после окончания инкубации измерения статистически достоверные отличия были определены по отношению к контрольной группе (см. рисунок). В оставшиеся временные интервалы (2 и 24 ч после окончания инкубации) различия между группами не носили статистически достоверного характера: $H = 5,36$ ($P = 0,0687$) и $H = 3,02$ ($P = 0,2210$) соответственно.

Полученные данные по исходному уровню глюкозы в гемолимфе *Lymnaea stagnalis* в целом совпадают с результатами работ, впервые затрагивающих вопросы подобного рода, согласно которым у непотребляющих пищу особей он составлял 30 мкг/мл [6], т. е. $\sim 0,17$ ммоль/л. В нашем случае объединенное значение по исходным (до инкубации) данным для всех трех групп составило 0,24 (0,18; 0,23) ммоль/л. Наблюдаемый разброс величин во многом можно отнести на счет использования в работе моллюсков, питание и перемещение которых в пределах аквариумов осуществлялись без всяких ограничений. Известно, что уже само потребление пищи приводит к существенному увеличению концентрации глюкозы в гемолимфе – с 16 до 36 мкг/мл (т. е. с $\sim 0,09$ до 0,20 ммоль/л) при сравнении голодных и активно питающихся особей *Lymnaea stagnalis* [4]. Длительное потребление богатых углеводами субстратов вызывает стойкое 5-кратное повышение содержания глюкозы во внутренней среде моллюсков – до 86 мкг/мл (т. е. 0,48 ммоль/л) [4]. Сезонные колебания уровня сахаров у *Lymnaea stagnalis*, связываемые с действием температурного фактора, свидетельствуют о падении уровня фруктозы и глюкозы в 35 и 12 раз соответственно в зимний период (гипобиоз, 4 °С) по сравнению с летне-осенним [7]. В сочетании с отмеченным при этом изменением поведения моллюсков [8] данный факт может служить указанием на нейромодуляторную роль молекул глюкозы по аналогии с охарактеризованной ранее ролью сдвигов кислотно-основного равновесия (рН) гемолимфы [9], в том числе и в отношении нейронных сетей мозга прудовика, не связанных с пищедобычей [10].

Наблюдаемая временная динамика исследуемого показателя у животных контрольной группы и содержащихся в 100 ммоль/л растворе глюкозы хорошо объяснима с позиций особенностей водного обмена у *Lymnaea stagnalis*. Количество выводимой за 1 ч воды равно почти 4-кратному весу тела животного при общем объеме гемолимфы (внеклеточной жидкости), составляющем $\sim 45\%$ массы моллюска, применительно к взрослым особям [11]. Период полувыведения из гемолимфы инъецированной глюкозы и вовсе равен 11 мин при 25 °С [12]. Поступление чистой воды в контрольных условиях эксперимента, призванное компенсировать общую потерю жидкости вследствие развития реакции полного втягивания тела в ходе забора проб, неизменно приведет к разбавлению содержимого внутренней среды моллюсков, т. е. к снижению концентрации глюкозы. При этом скорость поступления последней из клеточных депо оказывается недостаточной для быстрой компенсации отмеченных сдвигов уровня сахаров в гемолимфе. По схожей причине нормализация уровня глюкозы в гемолимфе отмечается уже по прошествии 2 ч после завершения инкубации моллюсков в 100 ммоль/л экспериментальном растворе глюкозы и последующего их возвращения в чистую аквариумную воду – за это время происходит почти 10-кратная полная смена объема гемолимфы.

Неожиданным было практически полное отсутствие эффектов инкубации моллюсков в 10 ммоль/л растворе глюкозы, хотя такая концентрация превышает ее уровень во внутренней среде в ~ 50 (!) раз. Да и в случае использования 100 ммоль/л раствора для инкубации, хоть и приводившего к многократному возрастанию концентрации глюкозы в гемолимфе, соотношение содержания глюкозы во внешней и внутренней среде было еще больше – примерно 75 : 1. Можно предположить, что данный факт обусловлен затрудненным проникновением глюкозы через покровы моллюска, поскольку скорость обменных процессов у холоднокровных, способных эффективно утилизировать углеводные субстраты, относительно невелика [13]. Эти затруднения могут быть связаны с повышенным, по сравнению с гемолимфой, содержанием глюкозы в тканях стенки тела прудовика, что может существенно ослабить диффузионные потоки глюкозы через означенный барьер. Для моллюсков контрольной группы, т. е. постоянно содержащихся в аквариумах с чистой водой, определенная в гомогенатах стенки тела концентрация глюкозы составила 18,19 (16,17; 21,27) ммоль/л при $n = 12$ (соотношение с таковой для гемолимфы 75 : 1), что подтверждает приведенные выше рассуждения. Кроме того, такое различие концентраций, равно как и возможный сдвиг уровня в гемолимфе, лишней раз подчеркивает потенциальную нейромодуляторную роль глюкозы по отношению к нервным центрам моллюска в качестве неспецифического экстраинаптического фактора.

Таким образом, инкубация животных в высококонцентрированном (100 ммоль/л) растворе глюкозы может быть эффективной для развития острой кратковременной гипергликемии во внутренней среде

пресноводных моллюсков (*Lymnaea stagnalis*), что позволяет использовать данную методику для моделирования состояний измененного углеводного обмена и наблюдаемых модификаций нейронной и поведенческой активности животных.

Библиографические ссылки

1. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM. Central regulation of glucose homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(2):741–764. DOI: 10.1002/cphy.c160015.
2. Сидоров АВ. Функциональная активность нервных центров беспозвоночных. Минск: БГУ; 2011.
3. Сидоров АВ, Маслова ГТ. Состояние антиокислительной защиты в центральных нервных ганглиях моллюска *Lymnaea stagnalis* при модуляции активности NO-ергической системы. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2008;44(5):453–458.
4. Veldhuijzen JP. Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(1):89–102. DOI: 10.1163/002829675X00146.
5. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1994.
6. Friedl FE. Hemolymph glucose in the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*: Basal values and an effect of ingested carbohydrate. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Physiology*. 1971;39(4):605–610. DOI: 10.1016/0300-9629(71)90182-4.
7. Каранова МВ. Сезонные изменения содержания свободных редуцирующих углеводов жидкостей тела пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis*. *Известия Российской академии наук. Серия биологическая*. 2006;4:470–475.
8. Сидоров АВ. Влияние температуры на легочное дыхание, оборонительные реакции и локомоторное поведение пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis*. *Журнал высшей нервной деятельности имени И. П. Павлова*. 2003;53(4):513–517.
9. Сидоров АВ, Полянина ИП. Кислотно-основное равновесие модулирует дыхательное и пищевое поведение моллюска *Lymnaea stagnalis*. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2003;39(5):445–450.
10. Alania M, Dyakonova V, Sakharov DA. Hyperpolarization by glucose of feeding-related neurons in snail. *Acta Biologica Hungarica*. 2004;55(1–4):195–200. DOI: 10.1556/ABiol.55.2004.1-4.24.
11. Van Aardt WJ. Quantitative aspects of the water balance in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*. 1967;18(3):253–312. DOI: 10.1163/002829668X00018.
12. Veldhuijzen JP. Glucose-tolerance in the pond snail *Lymnaea stagnalis* as affected by temperature and starvation. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(2):206–218. DOI: 10.1163/002829675X00227.
13. Berg K, Jonasson PM, Ockelmann KW. Respiration of freshwater invertebrates. *Hydrobiologia*. 1962;19:1–39.

References

1. Tups A, Benzler J, Sergi D, Ladyman SR, Williams LM. Central regulation of glucose homeostasis. *Comprehensive Physiology*. 2017;7(2):741–764. DOI: 10.1002/cphy.c160015.
2. Sidorov AV. *Funktsional'naya aktivnost' nervnykh tsevtrov bespozvonochnykh* [Nerve centers functional activity in invertebrates]. Minsk: Belarusian State University; 2011. Russian.
3. Sidorov AV, Maslova GT. State of antioxidative protection in central nervous ganglia of the mollusc *Lymnaea stagnalis* at modulation of activity of the NO-ergic system. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2008;44(5):453–458. Russian.
4. Veldhuijzen JP. Effects of different kinds of food, starvation and restart of feeding on the haemolymph-glucose of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(1):89–102. DOI: 10.1163/002829675X00146.
5. Glantz S. *Primer of Biostatistics*. New York: McGraw-Hill; 1994.
6. Friedl FE. Hemolymph glucose in the freshwater pulmonate snail *Lymnaea stagnalis*: Basal values and an effect of ingested carbohydrate. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Physiology*. 1971;39(4):605–610. DOI: 10.1016/0300-9629(71)90182-4.
7. Karanova MV. Seasonal variation in the content of free reducing sugars in body fluids of freshwater mollusk *Lymnaea stagnalis*. *Izvestiya Rossiiskoi akademii nauk. Seriya biologicheskaya*. 2006;4:470–475. Russian.
8. Sidorov AV. [Effects of temperature on respiration, defensive behavior and locomotion of fresh water snail *Lymnaea stagnalis*]. *Zhurnal vysshei nervnoi deyatel'nosti imeni I. P. Pavlova*. 2003;53(4):513–517. Russian.
9. Sidorov AV, Polyamina IP. Acid-base balance modulates respiratory and alimentary behaviour of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii*. 2003;39(5):445–450. Russian.
10. Alania M, Dyakonova V, Sakharov DA. Hyperpolarization by glucose of feeding-related neurons in snail. *Acta Biologica Hungarica*. 2004;55(1–4):195–200. DOI: 10.1556/ABiol.55.2004.1-4.24.
11. Van Aardt WJ. Quantitative aspects of the water balance in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Netherlands Journal of Zoology*. 1967;18(3):253–312. DOI: 10.1163/002829668X00018.
12. Veldhuijzen JP. Glucose-tolerance in the pond snail *Lymnaea stagnalis* as affected by temperature and starvation. *Netherlands Journal of Zoology*. 1974;25(2):206–218. DOI: 10.1163/002829675X00227.
13. Berg K, Jonasson PM, Ockelmann KW. Respiration of freshwater invertebrates. *Hydrobiologia*. 1962;19:1–39.

АННОТАЦИИ ДЕПОНИРОВАННЫХ В БГУ РАБОТ INDICATIVE ABSTRACTS OF THE PAPERS DEPOSITED IN BSU

УДК 577.1(075.8)+502.175(075.8)

Орёл Н. М. Биохимическая экология и мониторинг окружающей среды [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-31 01 02 «Биохимия», специализаций: 1-31 01 02 01 «Аналитическая биохимия», 1-31 01 02 02 «Биохимия лекарственных средств» / Н. М. Орёл ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2018. 106 с. : ил. Библиогр.: с. 105–106. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/211864>. Загл. с экрана. Деп. 02.01.2019, № 000202012019.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов специальности 1-31 01 02 «Биохимия». Его содержание предполагает изучение роли химических веществ в обеспечении внутривидовых и межвидовых эколого-биохимических взаимоотношений между организмами. Рассматриваются вопросы, касающиеся значения и путей осуществления экологического, биологического и эколого-биохимического мониторинга окружающей среды. Предусмотрено выполнение лабораторных работ, направленных на овладение практическими знаниями и умениями для решения научных и прикладных задач в области биохимической экологии.

УДК 574.24(075.8)

Нестерова О. Л. Экологическая физиология [Электронный ресурс] : электрон. учеб.-метод. комплекс для спец. 1-33 01 01 «Биоэкология» / О. Л. Нестерова ; БГУ. Электрон. текстовые дан. Минск : БГУ, 2018. 62 с. : табл. Библиогр.: с. 62. Режим доступа: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/213120>. Загл. с экрана. Деп. 22.01.2019, № 000722012019.

Электронный учебно-методический комплекс предназначен для студентов специальности 1-33 01 01 «Биоэкология», включает в себя разделы: теоретический, контроля знаний и вспомогательный, содержащий учебно-программные материалы и список рекомендованной литературы. Курс «Экологическая физиология» предполагает изучение общих закономерностей физиологических процессов адаптации организма к природным факторам среды и микроэволюции физиологических функций в связи с этими факторами. Специальные разделы посвящены реакциям организмов на сложные природные условия.

СОДЕРЖАНИЕ

КЛЕТочНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

<i>Потапович А. И., Сухан Т. О., Антипова О. А., Костюк В. А.</i> Исследование антиоксидантной и противовоспалительной активности комплекса рутина с двухвалентным железом.....	3
<i>Адамович А. В., Шевляков В. В., Юрага Т. М.</i> Экспериментальная оценка протекторных свойств оригинальных жевательных композиций в отношении токсического действия водорастворимых никотинсодержащих субстанций табака на неполовозрелый организм.....	13
<i>Бондаренко В. Ю., Барковский А. В., Шашко А. Ю., Черныш М. А., Пржевальская Д. А., Колбанов Д. В., Соколик А. И., Смолич И. И., Медведев С. С., Демидчик В. В.</i> Анализ фенотипа декоративных растений с использованием искусственных нейронных сетей: определение таксономических и физиологических характеристик.....	25
<i>Шашко А. Ю., Бондаренко В. Ю., Михальченко А. А., Каляга Т. Г., Сафонова О. Ю., Пржевальская Д. А., Черныш М. А., Колбанов Д. В., Жабинский В. Н., Хрипач В. А., Смолич И. И., Соколик А. И., Вальвачев А. Н., Абламейко С. В., Краснопрошин В. В., Смоликова Г. Н., Демидчик В. В.</i> Разработка системы фенотипирования древесных растений при помощи алгоритмов машинного зрения и спектрального анализа	33

ГЕНЕТИКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

<i>Мельникова А. А., Храмова Е. А., Королева Е. С., Руткевич Д. А., Кукулянская Т. А.</i> Анализ экспрессии <i>acdS</i> -гена бактерий <i>Pseudomonas putida</i> В-37 в трансгенных растениях <i>Nicotiana tabacum</i>	45
--	----

БИОХИМИЯ

<i>Губич О. И., Дашкова Я. Ю., Кривленя И. Н.</i> Сравнительная оценка гепатопротекторных свойств растительных адаптогенов на экспериментальной модели хронического алкогольного поражения печени <i>in vivo</i>	54
--	----

БИОРАЗНООБРАЗИЕ

<i>Чорна Г. А., Мамчур Т. В.</i> Гидрофильные виды в составе эксикат Herbarium Floerae Rossicae гербария Уманского национального университета садоводства (УМ) ...	63
--	----

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

<i>Коломиец О. О., Глушен С. В.</i> Динамика суточного роста листьев томата и перца при различных режимах освещения.....	73
<i>Шаденко В. Н., Сидоров А. В.</i> Индукция экспериментальной гипергликемии у моллюска <i>Lymnaea stagnalis</i> при инкубации животных в высококонцентрированном растворе глюкозы.....	79
Аннотации депонированных в БГУ работ.....	85

CONTENTS

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

- Potapovich A. I., Suhan T. O., Antipova O. A., Kostyuk V. A.* Research of antioxidant and anti-inflammatory activity of rutine complex with bivalent iron 3
- Adamovich A. V., Shevlyakov V. V., Yuraha T. M.* Experimental evaluation of the protective properties of the original chewing compositions in relation to the toxic effect of water soluble nicotinos-containing substances of the tobacco on an immature organism.... 13
- Bandarenka U. Yu., Barkovsky A. V., Shashko A. Yu., Charnysh M. A., Przhevalskaya D. A., Kolbanov D. V., Sokolik A. I., Smolich I. I., Medvedev S. S., Demidchik V. V.* Taxonomic determination and physiological analysis of ornamental plants using convolutional neural networks 25
- Shashko A. Yu., Bandarenka U. Yu., Mikhalchenko A. A., Kaliaha T. G., Safonova O. Yu., Przhevalskaya D. A., Charnysh M. A., Kolbanov D. V., Zhabinskii V. N., Khripach V. A., Smolich I. I., Sokolik A. I., Valvachev A. N., Ablameyko S. V., Krasno-proshin V. V., Smolikova G. N., Demidchik V. V.* Development of woody plants phenotyping system with the help of machine vision and spectral analysis algorithms 33

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

- Melnikava A. A., Khramtsova A. A., Karaleva K. S., Rutkevich D. A., Kukulianskaya T. A.* Expression analysis of *acdS*-gene of *Pseudomonas putida* B-37 in transgenic plants *Nicotiana tabacum*..... 45

BIOCHEMISTRY

- Hubich A. I., Dashkova Ya. Yu., Krivlenya I. N.* The comparative evaluation of plant adaptogenes' hepatoprotective properties on the experimental model of rat liver chronic alcohol damage *in vivo*..... 54

BIODIVERSITY

- Chorna G. A., Mamchur T. V.* Hydrophilic species in the composition of Herbarium Florae Rossicae exsiccatum at herbarium of Uman National University of Horticulture (UM) 63

SHORT COMMUNICATIONS

- Kolomiets O. O., Gloushen S. V.* The dynamics of diel growth of tomato and capsicum leaves with different lighting modes 73
- Shadenko V. N., Sidorov A. V.* Induction of experimental hyperglycemia in mollusc *Lymnaea stagnalis* after animal's incubation in high-concentrated glucose solution..... 79
- Indicative abstracts of the papers deposited in BSU..... 85

Журнал включен Высшей аттестационной комиссией Республики Беларусь в Перечень научных изданий для опубликования результатов диссертационных исследований по биологическим наукам.

Журнал включен в библиографическую базу данных научных публикаций «Российский индекс научного цитирования» (РИНЦ).

**Журнал Белорусского
государственного университета. Биология.
№ 1. 2019**

Учредитель:
Белорусский государственный университет

Юридический адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.
Почтовый адрес: пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск.
Тел. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: jbiol@bsu.by

«Журнал Белорусского государственного
университета. Биология» издается с января 1969 г.
До 2017 г. выходил под названием «Вестник БГУ.
Серия 2, Химия. Биология. География»
(ISSN 2308-9164).

Редактор *Т. Р. Джум*
Технический редактор *В. В. Кильдишева*
Корректор *Л. А. Меркуль*

Подписано в печать 25.02.2019.
Тираж 100 экз. Заказ 77.

Республиканское унитарное предприятие
«Информационно-вычислительный центр
Министерства финансов Республики Беларусь».
ЛП № 02330/89 от 03.03.2014.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

© БГУ, 2019

**Journal
of the Belarusian State University. Biology.
No. 1. 2019**

Founder:
Belarusian State University

Registered address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.
Correspondence address: 4 Niezaliežnasci Ave.,
Minsk 220030.
Tel. (017) 259-70-74, (017) 259-70-75.
E-mail: jbiol@bsu.by

«Journal of the Belarusian State University. Biology»
published since January, 1969.
Until 2017 named «Vestnik BGU.
Seriya 2, Khimiya. Biologiya. Geografiya»
(ISSN 2308-9164).

Editor *T. R. Dzhum*
Technical editor *V. V. Kil'disheva*
Proofreader *L. A. Merkul'*

Signed print 25.02.2019.
Edition 100 copies. Order number 77.

Republican Unitary Enterprise
«Informatsionno-vychislitel'nyi tsentr
Ministerstva finansov Respubliki Belarus'».
License for publishing No. 02330/89, 3 March, 2014.
17 Kal'varyjskaja Str., Minsk 220004.

© BSU, 2019