

Журнал основан в 1918 г.

**УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ**  
**ТАВРИЧЕСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО**  
**УНИВЕРСИТЕТА им. В. И. ВЕРНАДСКОГО**

Научный журнал

*Серия “Биология, химия”*

**Том 27 (66). № 1**

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского  
Симферополь, 2014

Список научных специализированных изданий Украины:  
Постановление Президиума ВАК Украины № 1-05/2 от 10 марта 2010 года**Редакционный совет журнала****«Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского»:**

1. Багров Н.В. – д.г.н., проф., академик НАН Украины, (главный редактор)
2. Шульгин В.Ф. – д.хим.н., проф. (зам. главного редактора)
3. Дзедолик И.В. – д.ф.-м.н., доц. (отв. секретарь)

**Члены Совета (редакторы серий и разделов серий):**

- |  |  |
|--|--|
| 1. Бержанский В.Н. – д.ф.-м.н., проф.  | 7. Копачевский Н.Д. – д.ф.-м.н., проф. |
| 2. Богданович Г.Ю. – д.филол.н., проф. | 8. Непомнящий А.А. – д.и.н., проф.     |
| 3. Вахрушев Б.А. – д.г.н., проф.       | 9. Подсолонко В. А. – д.э.н., проф.    |
| 4. Гришковец В.И. – д.х.н., проф.      | 10. Рогань В.Г. – д.ю.н., проф.        |
| 5. Казарин В.П. – д.филол.н., проф.    | 11. Темуриянц Н.А. – д.б.н., проф.     |
| 6. Климчук С.В. – д.э.н., доц.         | 12. Шоркин А.Д. – д.филос.н., проф.    |

**Редакционная коллегия серии «Биология, химия»:****Раздел «Биология»:**

Гольдин П.Е. – к.б.н., доц.  
 Ивашов А.В. – д.б.н., проф.  
 Коношенко С.В. – д.б.н., проф.  
 Коренюк И. И. – д.б.н., проф.  
 Котов С.Ф. – к.б.н., доц.  
 Лебедева Н.Н. – д.б.н., проф.  
 Макачук Н.Е. – д.б.н., проф.  
 Мартынюк В.С. – д.б.н., проф.  
 Павленко В.Б. – д.б.н., проф.  
 Темуриянц Н.А. – д.б.н., проф., (редактор  
 серии, редактор раздела «Биология»),  
 (timur328@gmail.com)  
 Чуян Е.Н. – д.б.н., проф.

**Раздел «Химия»:**

Гришковец В.И. – д.х.н., проф., (редактор  
 раздела «Химия»), (physchem@crimea.edu)  
 Еременко И.Л. – академик РАН, с.н.с.  
 Земляков А. Е. – д.х.н., проф.  
 Новоторцев В.М. – академик РАН  
 Першина Е.Д. – к.х.н., доц.  
 Федоренко А. М. – д.х.н., проф.  
 Чирва В. Я. – д.х.н., проф.  
 Шульгин В.Ф. – д.х.н., проф.

**Печатается по решению Ученого Совета Таврического национального университета  
 им. В.И. Вернадского, протокол № 2 от 19.02.2014 г.**

Подписано в печать 26.02.2014 формат 70x100/16  
 17,75 усл. п. л. 14,95 уч.-изд. л. Тираж 500. Заказ № 17/а.  
 Отпечатано в информационно-издательском отделе ТНУ,  
 пр. Вернадского 4, г. Симферополь, 95007

**«Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського»**

Науковий журнал. Том 27 (66), №1, Біологія, хімія.  
 Сімферополь, Таврійський національний університет ім. В.І.Вернадського, 2014  
 Журнал заснований у 1918 р.

Адреса редакції: пр. Вернадського, 4, м. Сімферополь, 95007  
 Надруковано у інформаційно-видавничьому відділі Таврійського національного університету  
 ім. В.І. Вернадського, пр. Вернадського, 4, м. Сімферополь, 95007  
<http://sn-biolchem.crimea.edu/>

© Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, 2014 г.

# БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

---

Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского

Серия «Биология, химия». Том 27 (66). 2014. № 1. С. 3-11.

**УДК 612.65 : 616-056.216**

## ОСОБЕННОСТИ ВОСПРИЯТИЯ МУЖСКОЙ И ЖЕНСКОЙ РЕЧИ У ДЕТЕЙ-СИРОТ ВОЗРАСТОМ ДВУХ С ПОЛОВИНОЙ - ТРЕХ С ПОЛОВИНОЙ ЛЕТ

*Белалов В.В.<sup>1</sup>, Дягилева Ю.О.<sup>1</sup>, Хрипун А.Я.<sup>2</sup>, Тимуш И.Я.<sup>2</sup>, Куленкова А.А.<sup>1</sup>,  
Павленко В.Б.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Таврический национальный университет им. В.И.Вернадского, Симферополь, Украина*

<sup>2</sup>*Детский дом «Елочка», Симферополь, Украина*

*E-mail: vadyt.bielalov@gmail.com*

У детей-сирот (n=41) и детей из семей (n=50) возрастом от двух с половиной до трех с половиной лет изучали особенности изменения спектральной плотности мощности (СПМ) ритмов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) в процессе прослушивания речевого сообщения записанного мужским и женским голосом. У детей из семей сравнение ЭЭГ при восприятии речи с фоновой записью текущей ЭЭГ в состоянии относительного покоя выявило десинхронизацию альфа-, и синхронизацию тета-, бета- и особенно гамма-ритмов в ответ как на женскую, так и на мужскую речь. Обнаружен ряд отличий в уровне синхронизации/десинхронизации при восприятии мужской речи у детей-сирот. Наблюдалось значимое уменьшение процесса десинхронизации альфа-ритма ЭЭГ в основном в правом полушарии, и уменьшение коэффициентов синхронизации гамма-ритма в центральных областях. Так же были обнаружены отличия при восприятии мужской речи детьми из семей и детьми-сиротами. У детей из семей наблюдалось значимое увеличение СПМ гамма-ритма в 11 отведениях обоих полушарий, а у детей-сирот лишь в пяти, расположенных преимущественно в лобной области. Предполагается, что меньший уровень увеличения СПМ в данном диапазоне ЭЭГ, свидетельствует о нарушениях в процессах осознания речевого сообщения детьми-сиротами и может являться следствием недостаточного развития нейронных сетей мозга, отвечающих за переработку вербальной информации. Данные изменения, возможно, связаны с недостаточным вовлечением мужского персонала в воспитательную работу в доме ребенка.

**Ключевые слова:** электроэнцефалограмма, дети-сироты, восприятие речи.

### ВВЕДЕНИЕ

Освоение речи носит неравномерный характер и проходит через определенное количество критических периодов, в которых развитие языковых способностей происходит скачкообразно [1]. Наиболее быстрое развитие способности ребенка воспринимать содержание целостного речевого сообщения приходится на возрастной период от двух с половиной до трех с половиной лет [2]. Такое ускорение речевого развития связывают с приобретением большинством пирамидных нейронов типичной

формы. Терминальные ветвления апикальных дендритов усложняются, активно формируются базальные дендритные букеты, что свидетельствует об усилении внутрикорковой интеграции, а также совпадает со сроками увеличения функциональной специализации речедвигательных корковых центров и развитием артикуляционных возможностей ребенка [3], а также с увеличением синаптических контактов в соответствующих кортикальных регионах [4].

На адекватное развитие речи ребенка влияют его взаимодействие с родителями или другими значимыми взрослыми. Уже в первые несколько месяцев жизни ребенок способен отличать материнский голос [6]. В течение первого года жизни ребенок предпочитает женские голоса и голос матери мужским голосам [2]. Видимо это связано с разным формантным составом мужской и женской речи. Мужская речь больше «загружена» неречевыми звуками, и ребенку сложнее выделять речевые звуки из общего акустического сигнала. Однако, по мере формирования и развития речевых способностей, и накоплению коммуникативного опыта общения с мужчинами, ребенок к возрастному периоду младшего раннего детства уже воспринимает семантический смысл из мужской и женской речи приблизительно одинаково [2, 1]. В связи с тем, что большое количество детей до сих пор воспитывается в детских домах, где основной персонал представлен преимущественно женским полом, анализ особенностей восприятия мужской и женской речи у таких детей является особенно актуальным. Кроме того, у детей-сирот, часто присутствуют задержки в развитии речевой сферы [7, 8], которые связывают с депривацией детско-родительских отношений, отсутствием значимого взрослого на протяжении начального этапа жизни ребенка [9].

В связи с этим целью нашей работы было выявление особенностей восприятия мужской и женской речи на основе анализа паттерна ЭЭГ у детей-сирот, в возрасте от двух с половиной до трех с половиной лет.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В исследовании принял участие 91 ребенок. Основную группу составляли социальные сироты из дома ребенка «Елочка» (г. Симферополь) (n=41; 27 мальчиков и 14 девочек) возрастом от 30 до 41 месяца (средний возраст –  $36 \pm 2$  месяца). Контрольная группа была представлена детьми из полных семей (n=50; 31 мальчик и 19 девочек) возрастом от 29 до 42 месяцев (средний возраст –  $35 \pm 3$  месяца). В обследованные группы не были включены дети: а) вес которых при рождении был менее двух с половиной килограммов, б) имеющие генетические заболевания, в) имеющие записи в медицинской карточке о заболеваниях ЦНС, г) с зарегистрированным фетальным алкогольным синдромом, д) рисующие левой рукой. В основную группу также не включались дети, пребывающие в доме ребенка менее года. Тестирование детей-сирот проводилось на основании официального разрешения руководителей дома ребенка «Елочка», и в присутствии психолога данного учреждения. В контрольную группу дети были набраны с помощью объявлений, размещенных в детских садах г. Симферополя. Их родителям были предоставлены все необходимые сведения о процедуре исследования. Родителями было дано письменное согласие на бесплатное участие ребенка в данном

исследовании. Данное исследование соответствовало этическим принципам Хельсинкской декларации 1964 г, и было одобрено этическим комитетом Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Регистрация ЭЭГ проводилась в трех экспериментальных ситуациях. Первая ситуация – регистрация текущей ЭЭГ ребенка в условиях относительного покоя (фоновая запись продолжительностью 60 с). Вторая – регистрация ЭЭГ при прослушивании речевого стимула записанного женским голосом. Третья – регистрация ЭЭГ при прослушивании речевого стимула записанного мужским голосом. Очередность второй и третьей ситуации определялась в случайном порядке. Речевой стимул представлял собой воспроизведение звуковой записи стихотворения (продолжительность 20 с) понятного для ребенка содержания. Основные особенности методики отведения ЭЭГ описывались в наших работах ранее [10, 11]. Так как распределение данных отличалось от нормального, то для сравнения значений СПМ ритмов ЭЭГ внутри групп, при разных экспериментальных ситуациях, был использован непараметрический критерий Вилкоксона, а для сравнения между группами – критерий Манна-Уитни. Для графического представления данных рассчитывали коэффициент вызванной синхронизации/десинхронизации (ВСД), по методу, предложенному рядом авторов [6, 12]. Метод основан на вычислении отношения изменений СПМ ритмов ЭЭГ при воздействии какого либо стимула по отношению к текущей ЭЭГ (фоновая запись). Для каждого частотного диапазона в каждом из исследуемых отведений коэффициенты ВСД вычислялись по формуле:  $ВСД = (S - F) / F$ , где  $S$  – средняя СПМ ЭЭГ при воздействии стимула речевого стимула (вторая ситуация), а  $F$  – средняя СПМ текущей фоновой ЭЭГ при открытых глазах (первая ситуация). Значения  $ВСД > 0$  свидетельствуют о синхронизации ритмов ЭЭГ, т.е о росте СПМ по сравнению с фоновой записью, а  $ВСД < 0$  – о десинхронизации ритмов ЭЭГ в данном отведении для вычисляемого частотного диапазона, т.е о падении СПМ данного ритма.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показано в наших предыдущих работах [10, 11], дети из детских домов имеют заниженные показатели речевого развития, по сравнению с детьми из семей. На рис. 1 представлена диаграмма коэффициентов, отражающих изменение спектральной плотности мощности ритмов ЭЭГ при прослушивании мужской речи, по сравнению с фоновой записью у детей контрольной и основной групп.

В контрольной группе испытуемых наиболее типичной реакцией на женскую и мужскую речь было увеличение СПМ в диапазонах тета-, бета- и гамма- ритма по сравнению с уровнем указанных ритмов при регистрации текущей ЭЭГ в условиях относительного покоя. В частности, для тета-ритма статистически значимая синхронизация СПМ была зарегистрирована в лобных, височных, центральном и теменном отведениях левого полушария, а также в лобных, центральном и передневисочном отведениях правого полушария. Исследования ряда авторов [13–15] свидетельствуют, что активация тета-ритма является неизменным компонентом перестройки паттерна ЭЭГ при активации когнитивных и эмоциональных процессов.

Для бета-ритма значимая синхронизация наблюдалась главным образом в лобных и передневисочных отведениях обоих полушарий. Синхронизация гамма-ритма выявлена в большинстве отведений (в 10 из 16) обоих полушарий. В тоже время для альфа-ритма была выявлена десинхронизация в левых заднелобном и височном отведениях. К угнетению альфа-ритма ведет, прежде всего, активация внимания при восприятии разнообразных значимых сигналов [13, 16, 17]. Топографические особенности десинхронизации альфа-ритма у детей контрольной группы при восприятии речи вполне согласуются с известными данными о том, что у большинства индивидов корковые регионы, отвечающие за восприятие и генерацию речи (центры Вернике и Брока), локализованы именно в левом полушарии.

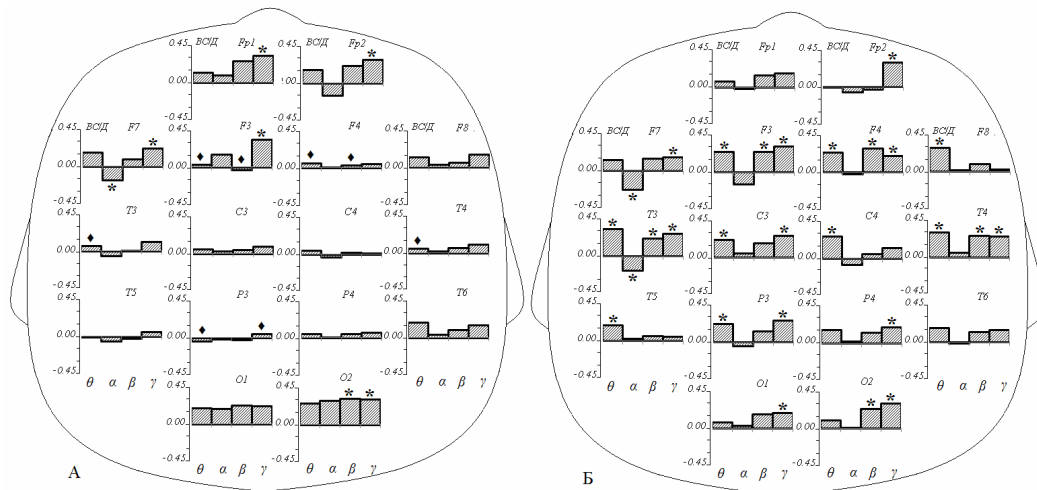


Рис. 1 Диаграмма коэффициентов, отражающих изменение спектральной плотности мощности ритмов ЭЭГ при прослушивании мужской речи, по сравнению с фоновой записью у детей основной (А) и контрольной групп (Б).

Каждый график соответствует определенному отведению ЭЭГ. По оси абсцисс представлены ритмы ЭЭГ: тета-ритм ( $\theta$ ), альфа-ритм ( $\alpha$ ), бета-ритм ( $\beta$ ) и гамма-ритм ( $\gamma$ ). По оси ординат – значения коэффициента вызванной синхронизации/десинхронизации. Звездочками отмечены случаи значимого увеличения или уменьшения спектральной плотности мощности ритмов по сравнению с фоновой записью при  $p \leq 0.05$ . Ромбиками отмечены статистически значимые отличия между величиной коэффициента синхронизации-десинхронизации при восприятии женского и мужского голоса при  $P \leq 0.05$ .

У детей из дома ребенка прослушивание мужской речи вызывало статистически значимое увеличение СПМ в частотных диапазонах тета-, бета- и гамма-ритмов. Однако, количество отведений, в которых это произошло было существенно меньше, чем у детей контрольной группы. Синхронизация СПМ бета-ритма наблюдалась лишь в правом затылочном отведении. Значимое увеличение СПМ для гамма-ритма выявлено в 5 отведениях из 16, расположенных преимущественно во фронтальном полюсе, лобных отведениях левого полушария и правом затылочном

отведении. В частотном диапазоне альфа-ритма значимое снижение СПМ наблюдалось лишь в левом заднелобном отведении.

Диаграмма коэффициентов, отражающих степень синхронизации-десинхронизации в момент речевого воздействия речью произнесенной женским (А) и мужским (Б) голосом у детей контрольной (дети из семей) группы, представлена на рис 2.

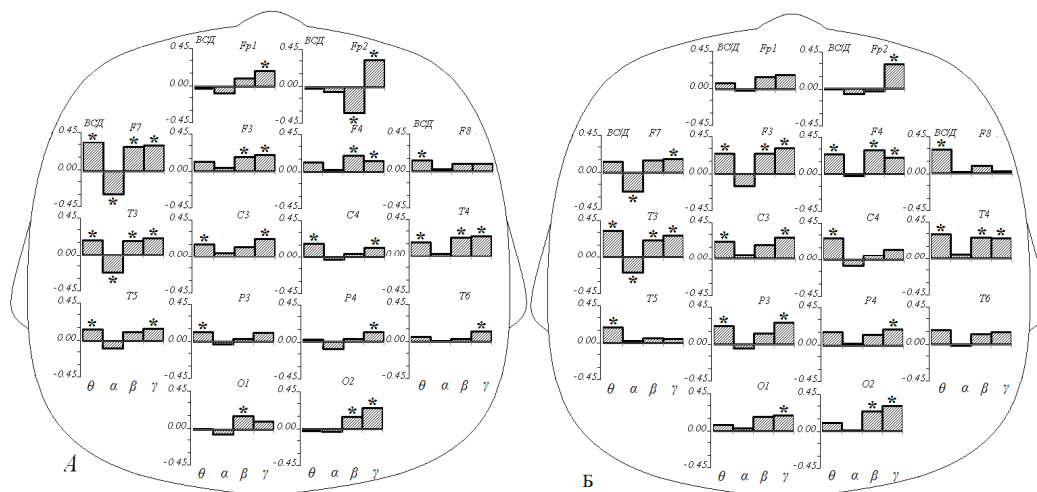


Рис. 2. Диаграмма коэффициентов, отражающих степень синхронизации-десинхронизации в момент речевого воздействия речью произнесенной женским (А) и мужским (Б) голосом у детей контрольной группы. Обозначения как на рис 1.

Однако, как видно из рис. 2. количество отведений, в которых зарегистрировано значимое изменение мощности ЭЭГ для женской и мужской речи различно. У детей из семей не было обнаружено статистически достоверных различий при сравнении коэффициентов вызванной синхронизации-десинхронизации в ответ на мужскую и женскую речь.

Диаграмма коэффициентов, отражающих степень синхронизации-десинхронизации в момент речевого воздействия речью произнесенной женским (А) и мужским (Б) голосом у детей основной (дети-сироты) группы, представлена на рис 3.

По сравнению с ЭЭГ реакцией на речь в контрольной группе, в группе детей-сирот, были обнаружены значимые отличия в значениях коэффициента вызванной синхронизации-десинхронизации в момент восприятия мужской и женской речи. При восприятии речи сказанной мужским голосом синхронизируется в основном фронтальный полюс, левые лобные и затылочные отведения. Всего зарегистрировано 6 статистически достоверных случаев синхронизации СПМ ЭЭГ ритмов, и 1 случай десинхронизации. При восприятии женского голоса значимые изменения СПМ ритмов ЭЭГ наблюдаются в большинстве отведений (12 из 16). Разница в изменении коэффициента ВСД наблюдалась в частотных диапазонах альфа-, бета- и гамма ритмов ЭЭГ. В частотном диапазоне альфа-ритма, при восприятии женского голоса наблюдалась значимо более сильная десинхронизация

в височных, лобных отведениях правого полушария, а также затылочных отведениях обоих полушарий. Для частотной полосы бета-ритма достоверные различия были обнаружены в локусах F4, T5 и O2. И было обнаружено 3 отведения, где значимо отличалась синхронизация гамма-ритма: Fp2, P4 и O2. Следует отметить, что в левом полушарии подобных отличий не наблюдалось.

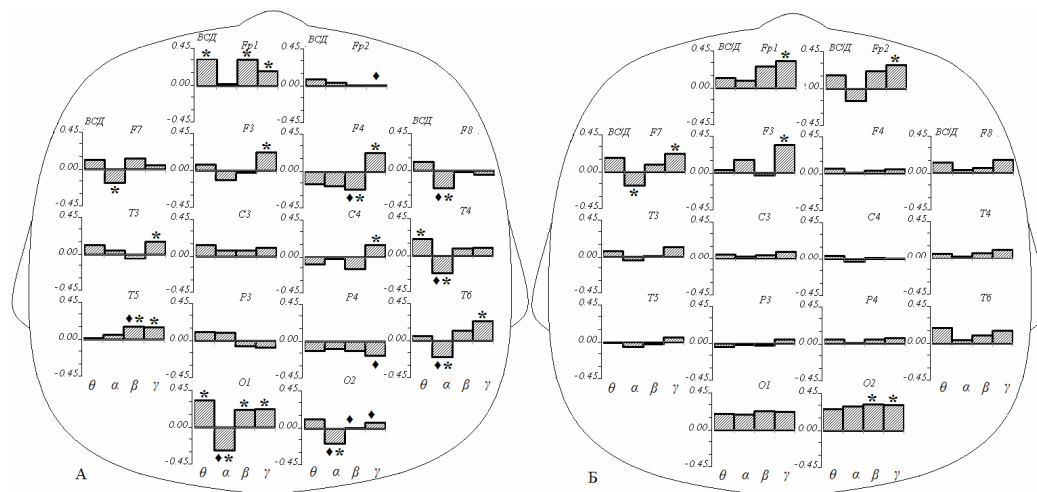


Рис. 3. Диаграмма коэффициентов, отражающих степень синхронизации-десинхронизации в момент речевого воздействия речью произнесенной женским (А) и мужским (Б) голосом у детей основной группы. Обозначения как на рис 1.

Биологическую значимость матери в первые годы жизни ребенка сложно переоценить, и ребенок узнает голос матери уже в первые месяцы жизни [6], и продолжает предпочитать женские голоса в течение течения первого года жизни [2]. Это связано с накоплением опыта общения преимущественно с матерью. Также это может быть связано с разным формантным составом мужской и женской речи. Мужская речь больше «загружена» неречевыми звуками, и ребенку сложнее выделять речевые звуки из общего акустического сигнала. Однако, по мере формирования и развития речевых способностей, а так же накоплению коммуникативного опыта общения с мужчинами, к трем годам ребенок способен равноценно извлекать смысл из мужской и женской речи [2, 1]. Как видно из результатов нашего исследования у детей из контрольной группы не было достоверной разницы в восприятии мужского и женского речевого стимула. В группе детей-сирот женская речь вызывает значимую синхронизацию гамма-ритма во многих отведениях, в отличие от мужской речи. Это свидетельствует о затрудненном понимании речи, сказанной мужским голосом. Вероятно, это связано с особенностью кадрового состава специализированных домов ребенка, где основную часть персонала, которые непосредственно и больше всего контактируют с ребенком, составляют именно женщины. Можно предположить, что недостаток мужского персонала объясняет отсутствие опыта восприятия мужского голоса у детей-сирот.



**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Прослушивание речевого сигнала записанного мужским и женским голосом вызывает сходный паттерн реакции, заключающийся в синхронизации тета-, бета- и гамма-ритмов, а также десинхронизации альфа-ритма ЭЭГ у детей воспитывающихся в семьях.
2. У детей, воспитывающихся в детском доме, количество отведений со значимым увеличением гамма-ритма было существенно меньше, чем у детей, воспитываемых в семье. Предполагается, что меньший уровень увеличения СПМ в данном диапазоне ЭЭГ свидетельствует о нарушениях в процессах осознания речевого сообщения детьми-сиротами и может являться следствием недостаточного развития нейронных сетей мозга, отвечающих за переработку вербальной информации.
3. У детей-сирот восприятие мужской речи вызывает значимо меньшую десинхронизацию высокочастотных ритмов ЭЭГ, по сравнению с женской речью, что, вероятно, свидетельствует о пониженной способности воспитанников детского дома понимать смысл речи, записанной мужским голосом.

**Список литературы**

1. Rivera-Gaxiola M. Brain potentials to native and non-nativespeech contrasts in 7- and 11-month-old American infants / M. Rivera-Gaxiola, J. Silva-Pereyra, P.K. Kuhl // *Dev. Sci.* – 2005b. – Vol. 8. –P. 162–172.
2. Kuhl P.K. Is speech learning 'gated' by the social brain? / P.K. Kuhl // *Dev. Sci.* – 2007. – Vol. 10. – P. 110–120.
3. Цехмистренко Т. А. Структурные преобразования cito- и фиброархитектоники фронтальной коры мозга человека от рождения до 20 лет / Т.А. Цехмистренко, Н.А. Черных, И.К. Шеховцев // *Физиология человека.* – 2010. – Т.36. – С. 16–23.
4. Tommerdahl M. Minicolumnar activation patterns in SI cortex / M. Tommerdahl, O. Favorov, B. Whitsel // *Cerebral Cortex.* – 1993. – Vol. 3. – P. 399.
5. Krause C. Relative alpha desynchronization and synchronization during speech perception/ C. Krause, B. Porn, and H. Lang // *Cognitive Brain Research.*– 1997.–Vol. 5(3).–P. 295-299.
6. Vouloumanos A. Tuned to the signal: the privileged status of speech for young infants /A. Vouloumanos, J.F. Werker // *Developmental science.* – 2004. – Vol 7(3) – P. 270-276.
7. Juffer F. Behavior problems and mental health referrals of international adoptees: A meta-analysis / F. Juffer, M.H. Van Ijzendoorn // *J/ American Medical Association.* – 2005. –Vol. 293(20).–P. 569-577.
8. Zeanach C.H. Attachment in institutionalized and non-institutionalized Romanian children / C.H. Zeanach, A.T. Smyke, S.F.M. Koga // *Children development.*– 2005.– Vol. 76. – P. 1015-1028.
9. Karel S.R. Analysis of environmental deprivation: Cognitive and social development in Romanian orphans / S.R. Karel, B.J. Freeman // *J. of Child Psychology and Psychiatry.*– 1994.– Vol. 35 (4). –P. 769-781.
10. Белалов В.В. ЭЭГ- корреляты развития речи у детей сирот, возрастом до трех с половиной лет / В.В. Белалов, Ю. О. Дягилева, А. Я. Хрипун // *Ученые записки Таврического национального Университета им. В. И. Вернадского. Серия: Биология, Химия.* – 2013. – Т 26 (65). – № 1.– С. 3-9 .
11. Белалов В.В. Динамика восприятия речи у детей-сирот возрастом двух с половиной – трех с половиной лет / В.В. Белалов, Ю.О. Дягилева, А.Я. Хрипун // *Ученые записки Таврического национального Университета им. В. И. Вернадского. Серия: Биология, Химия.* – 2013. – Т 26 (65). – № 3.– С. 15-26 .
12. Pfurtsheller G. Event-related synchronization (ERS): an electrophysiological correlate of cortical areas at rest / G. Pfurtsheller // *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* – 1992.– Vol. 83.– P. 62-69.
13. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis/ W. Klimesch // *Brain Res. Rev.*–1999– Vol. 29(2-3).– P. 169-195.
14. Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus / G. Buzsáki // *Neuron.*– 2002.– Vol. 33(3).– P. 325-340.

15. Laufs H Where the BOLD signal goes when alpha EEG leaves / H. Laufs, J.L. Holt, and R. Elfont // *Neuroimage*.– 2006.– Vol. 31(4).– P. 1408-1418.
16. Wróbel A. Beta activity: a carrier for visual attention / A. Wróbel // *Acta Neurobiol. Exp.*–2000.– Vol. 60(2).– P. 247-260.
17. Ploner M. Oscillatory activity reflects the excitability of the human somatosensory system / M. Ploner, J. Gross, and L. Timmermann // *Neuroimage*.– 2006.– Vol. 32(3).– P. 1231-1236.

**Белалов В.В. Особливості сприйняття жіночої та чоловічої мови у дітей-сиріт віком двох з половиною - трьох із половиною років / В.В. Белалов, Ю.О. Дягілева, О.Я. Хрипун, І.Я. Тимуш, А.А. Куленкова, В.Б. Павленко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 3-11.**

У дітей-сиріт (n = 41) та дітей з сімей (n = 50) віком від двох з половиною до трьох з половиною років вивчали особливості зміни спектральної щільності потужності (СЩП) ритмів електроенцефалограми (ЕЕГ) у процесі прослуховування мовного повідомлення записаного чоловічим і жіночим голосом. У дітей з сімей порівняння ЕЕГ при сприйнятті мови з фоновим записом поточної ЕЕГ в стані відносного спокою виявило десинхронізацію альфа-, і синхронізацію тета-, бета- і особливо гамма-ритмів у відповідь як на жіночу, так і на чоловічу мову. Виявлено ряд відмінностей в рівні синхронізації/десинхронізації при сприйнятті чоловічої мови у дітей-сиріт. Спостерігалось значиме зменшення процесу десинхронізації альфа-ритму ЕЕГ в основному в правій півкулі, і зменшення коефіцієнтів синхронізації гамма-ритму в центральних областях. Так само були виявлені відмінності при сприйнятті чоловічої мови дітьми з сімей та дітьми-сиротами. У дітей з сімей спостерігалось значуще збільшення СЩП гамма-ритму в 11 відведеннях обох півкуль, а у дітей-сиріт лише в п'яти, розташованих переважно в лобовій області. Передбачається, що менший рівень збільшення СЩП в даному діапазоні ЕЕГ, свідчить про порушення в процесах усвідомлення мовного повідомлення дітьми-сиротами і може бути наслідком недостатнього розвитку нейронних мереж мозку, відповідальних за переробку вербальної інформації. Дані зміни, можливо, пов'язані з недостатнім залученням чоловічого персоналу в виховну роботу у будинку дитини.

**Ключові слова:** електроенцефалограма, діти-сироти, сприйняття мови.

## **FEATURES OF PERCEPTION OF MALE AND FEMALE SPEECH IN ORPHANS TWO AND A HALF - THREE AND A HALF YEARS OLD**

***Bielalov V.V., Dyagileva Iu.O., Khripun A.Y., Timush I.J., Kulenkova A.A., Pavlenko V.B.***

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Ukraine  
E-mail: vadyb.bielalov@gmail.com*

Children orphaned (n = 41) and children of families (n = 50) aged from two and a half to three and a half years studying the peculiarities of change of power spectral density (PSD) rhythms of the electroencephalogram (EEG) while listening to a voice message recorded male and female voice. Children from families with a comparison of EEG perception of speech with background EEG recording the current state of relative calm revealed alpha desynchronization and synchronization of theta, beta and gamma rhythms especially in response to both the female and the male speech. Found a number of differences in the level of synchronization/desynchronization in the perception of speech in male orphans. There was a significant reduction process desynchronized EEG alpha rhythm mainly in the right hemisphere, and a decrease in synchronization coefficients gamma rhythm in the central regions. Were also found differences in the perception of male speech of families and children orphans. Listening to the speech signal recorded male and female voices is a

similar pattern of response is to synchronize the theta, beta and gamma rhythms and desynchronization of EEG alpha rhythm in children raised in families. Children who are brought up in an orphanage, the number of leads with a significant increase in gamma rhythm was significantly less than that of children in the family. It is assumed that a lower level of increase in the range of SPM EEG evidence of irregularities in the process of realizing the voice message orphans and may be due to lack of development of neural networks of the brain responsible for processing verbal information. Children orphaned male speech perception is significantly less high-frequency desynchronization of EEG rhythms, compared with female speech, which is probably indicative of a reduced ability of the orphans to understand the meaning of speech recorded by a male voice.

**Keywords:** electroencephalogram, orphans, speech perception.

### References

1. M. Rivera-Gaxiola, J. Silva-Pereyra, P.K. Kuhl Brain potentials to native and non-nativespeech contrasts in 7- and 11-month-old American infants *Dev. Sci.* – 2005b. – Vol. **8**. –P. 162–172.
2. Kuhl P.K. Is speech learning ‘gated’ by the social brain? *Dev. Sci.* – 2007. – Vol. **10**. – P. 110–120.
3. T.A. Tsehmistrenko, N.A. Chernyh, I.K. Shehovtsev Strukturnye preobrazovaniya tsito- i fibroarhitektoniki frontal'noy kory mozga cheloveka ot rozhdeniya do 20 let *Fiziologiya cheloveka.* – 2010. – Vol.**36**. – P. 16–23.
4. M. Tommerdahl, O. Favorov, B. Whitsel *Minicolumnar activation patterns in SI cortex* // *Cerebral Cortex.* – 1993. – Vol. **3**. – P. 399.
5. C. Krause, B. Porn, and H. Lang Relative alpha desynchronization and synchronization during speech perception *Cognitive Brain Research.*– 1997.–Vol. **5**(3).– P. 295-299.
6. A. Vouloumanos JF Werker Tuned to the signal: the privileged status of speech for young infants *Developmental science.* – 2004. – Vol **7**(3) – P. 270-276.
7. F. Juffer, M.H. Van Ijzendoorn Behavior problems and mental health referrals of international adoptees: A meta-analysis *American Medical Association.* – 2005. –Vol. **293**(20).–P. 569-577.
8. C.H. Zeanach, A.T. Smyke, S.F.M. Koga Attachment in institutionalized and non-institutionalized Romanian children *Children development.*– 2005.– Vol. **76**. – P. 1015-1028.
9. S.R. Karel, B.J. Freeman Analysis of environmental deprivation: Cognitive and social development in Romanian orphans *J. of Child Psychology and Psychiatry.*– 1994.– Vol. **35** (4). –P. 769-781.
10. V. V. Bielalov, Yu. O. Dyagileva, A. Ya. Hripun V.V. EEG- korrelyaty razvitiya rechi u detey sirot, vozrastom do treh s polovinoj let *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Seriya: Biologiya, Himiya.* – 2013. – Vol. **26** (65). – № 1.– P. 3-9.
11. V. V. Bielalov, Yu. O. Dyagileva, A. Ya. Hripun V.V. Dinamica rechevogo razvitiya u detey sirot, vozrastom do treh s polovinoj let *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Seriya: Biologiya, Himiya.* – 2013. – Vol. **26** (65). – № 3.– P. 15-26.
12. Pfurtsheller G. Event-related synchronization (ERS): an electrophysiological correlate of cortical areas at rest *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* – 1992.– Vol. **83**.– P. 62-69.
13. Klimesch W. EEG alpha and theta oscillations reflect cognitive and memory performance: a review and analysis *Brain Res. Rev.*–1999– Vol. **29**(2-3).– P. 169-195.
14. Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus *Neuron.*– 2002.– Vol. **33**(3).– P. 325-340.
15. H. Laufs, J.L. Holt, and R. Elfont Where the BOLD signal goes when alpha EEG leaves *Neuroimage.*– 2006.– Vol. **31**(4).– P. 1408-1418.
16. Wróbel A. Beta activity: a carrier for visual attention *Acta Neurobiol. Exp.*–2000.–Vol. **60**(2).– P. 247-260.
17. M. Ploner, J. Gross, and L. Timmermann Oscillatory activity reflects the excitability of the human somatosensory system *Neuroimage.*– 2006.– Vol. **32**(3).– P. 1231-1236.

Поступила в редакцию 22.01.2014 г.

**УДК 591.471.37:597/599**

## **НЕКОТОРЫЕ СТРУКТУРНО-БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

*Брошко Е.О.*

*Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины, Киев, Украина  
E-mail: y.broshko@gmail.com*

Исследованы некоторые особенности относительных изменений структурно-биомеханических свойств скелетных элементов стилоподия и зейгоподия конечностей пресмыкающихся и млекопитающих. Определены следующие морфометрические и структурно-биомеханические параметры костей: масса кости; линейные размеры кости – длина, фронтальный и сагиттальный диаметры диафиза; параметры геометрии сечения диафиза: площадь компакты, моменты инерции (главные и полярный), радиусы инерции. Установлено, что указанные параметры костей стилоподия и зейгоподия представителей разных классов имеют различный характер аллометрических зависимостей от массы тела. Во всех случаях отмечена положительная аллометрия массы кости и изометрия длины кости к массе тела. Большинство параметров элементов стилоподия пресмыкающихся и элементов зейгоподия млекопитающих имеют положительную аллометрию к массе тела. Это свидетельствует о различном характере механических нагрузок на отдельные элементы скелета конечностей у представителей разных классов, что связано с различной ориентацией конечностей (сегментальная у пресмыкающихся, парасагиттальная у млекопитающих).

**Ключевые слова:** пресмыкающиеся, млекопитающие, скелет конечностей, ориентация конечностей, структурно-биомеханические параметры, аллометрия.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Представители классов пресмыкающихся и млекопитающих характеризуются различной ориентацией конечностей относительно тела (сегментальная у пресмыкающихся, парасагиттальная у млекопитающих), а отсюда и особенностями локомоции. Ориентация конечностей влияет на характер структурно-биомеханических особенностей длинных костей конечностей в пределах различных классов, обусловленных различным распределением механических нагрузок на различные звенья скелета конечностей.

У пресмыкающихся при сегментальной ориентации конечностей элементы скелета стилоподия подвержены преимущественно нагрузкам на кручение в связи со значительной осевой ротацией конечности во время локомоции [1-4]. У млекопитающих с прямой постановкой конечностей в элементах стилоподия преобладают нагрузки на изгиб [2]. Хотя у примитивных их представителей (однопроходные, некоторые сумчатые) в связи с особой постановкой конечностей (промежуточная между сегментальной и парасагиттальной) здесь присутствуют также значительные нагрузки на кручение, подобные таковым у рептилий [5].

Те или иные нагрузки на кость наиболее адекватно определяются величинами и взаимоотношением параметров поперечного сечения диафиза кости.

Аллометрические зависимости параметров костей от массы тела могут быть описаны с помощью двух альтернативных моделей [6]. Согласно модели геометрического подобия параметры изменяются изометрически к массе тела. Она применима для рассмотрения относительных изменений линейных размеров [6-13]. Согласно модели упругого подобия параметры изменяются неизометрически и зависят от упругих свойств кости, что более характерно для параметров геометрии поперечного сечения [12; 14; 15]. Но во многих случаях сложно определить изменчивость параметров в соответствии лишь с одной из моделей [16].

Цель данной работы – выявить масштаб изменчивости структурно-биомеханических параметров длинных костей конечностей пресмыкающихся и млекопитающих, а также попытка определения общих закономерностей этих изменений у тетрапод.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованы длинные кости конечностей 9 видов рептилий и 23 видов млекопитающих: плечевая (humerus), лучевая (radius), локтевая (ulna), бедренная (femur) и большеберцовая (tibia) (табл. 1). Определены их морфометрические и структурно-биомеханические параметры: масса ( $m$ , г); линейные размеры – длина ( $l$ , мм), фронтальный ( $d_f$ , мм) и сагиттальный ( $d_s$ , мм) диаметры; параметры геометрии поперечного сечения – площадь компакты ( $S_k$ , мм<sup>2</sup>), главные ( $I_{max}$ ,  $I_{min}$ , мм<sup>4</sup>) и полярный ( $J$ , мм<sup>4</sup>) моменты инерции, радиусы инерции ( $i_{max}$ ,  $i_{min}$ , мм). Основные параметры геометрии сечения являются показателями сопротивления кости к тем или иным нагрузкам: на сжатие и растяжение (площадь компакты), изгиб (главные моменты инерции), кручение (полярный момент инерции) [17; 18]. Для определения указанных механических параметров была использована специальная методика. Изображение сечения наносилось на координатную сетку, где определялись координаты отдельных точек на внешнем и внутреннем контурах сечения. Полученные координаты обрабатывались с помощью специальной компьютерной программы [6] с получением величин параметров геометрии сечения.

Для определения коэффициентов аллометрического роста параметров кости относительно массы тела использован аллометрический метод, который выражает изменения параметров относительно определенной независимой переменной (в данном случае массы тела). Для этого использовано уравнение нелинейной регрессии:  $y = ax^b$ , где  $x$  – независимая переменная (масса тела),  $y$  – показатель отдельного параметра,  $a$  – константа начального роста,  $b$  – аллометрическая константа [6; 11; 19-24]. Согласно общепринятым теоретическим расчетам, при изометрии параметров к массе тела их аллометрическая константа будет составлять: для массы костей – 1, линейных параметров – 0,33, площади сечения – 0,67, моментов инерции – 1,33. Если соответствующие аллометрические константы больше указанных величин, это свидетельствует о положительной аллометрии признака относительно массы тела, если меньше – об отрицательной аллометрии.

Расчеты показателей нелинейной регрессии произведены с помощью программы SigmaPlot 11.0.

Таблица 1

## Список исследованных видов

Вид	n	Исследованные элементы	Вид	n	Исследованные элементы
Шипохвостая агама ( <i>Uromastix sp.</i> )	1	H, R, U, F, T	Байбак ( <i>Marmota bobak</i> )	1	H, R, U, F, T
Бородатая агама ( <i>Pogona vitticeps</i> )	2	H, R, U, F, T	Бобр ( <i>Castor fiber</i> )	1	H, R, U, F, T
Обыкновенная игуана ( <i>Iguana iguana</i> )	1	H, R, U, F, T	Нутрия ( <i>Miocastor coypus</i> )	2	H, R, U, F, T
Йеменский хамелеон ( <i>Chamaeleo calytratus</i> )	1	H, R, U, F, T	Барсук ( <i>Meles meles</i> )	2	H, R, U, F, T
Леопардовый хамелеон ( <i>Furcifer pardalis</i> )	1	H, R, U, F, T	Бурый медведь ( <i>Ursus arctos</i> )	3	H, R, U, F, T
Пятнистый зублефар ( <i>Eublepharis macularius</i> )	1	H, R, U, F, T	Гималайский медведь ( <i>Ursus thibetanus</i> )	1	H, R, U, F, T
Прыткая ящерица ( <i>Lacerta agilis</i> )	10	H, R, U, F, T	Кот ( <i>Felis catus</i> )	2	H, R, U, F, T
Зеленая ящерица ( <i>Lacerta viridis</i> )	1	H, R, U, F, T	Гуанако ( <i>Lama guanicoe</i> )	1	H, R, F, T
Серый варан ( <i>Varanus griseus</i> )	4	H, R, U, F, T	Лама ( <i>Lama glama</i> )	1	H, R, F, T
Ехидна ( <i>Tachyglossus aculeatus</i> )	1	H, R, U, F, T	Благородный олень ( <i>Cervus elaphus elaphus</i> )	1	H, R, F, T
Опоссум ( <i>Didelphis virginiana</i> )	1	H, R, U, F, T	Изюбр ( <i>C. e. xanthopygus</i> )	1	H, R, F, T
Горный кенгуру ( <i>Macropus robustus</i> )	1	H, R, U, F, T	Пятнистый олень ( <i>Cervus nippon</i> )	1	H, R, F, T
Еж ( <i>Erinaceus concolor</i> )	1	H, R, U, F, T	Лань ( <i>Cervus dama</i> )	1	H, R, F, T
Обыкновенная бурозубка ( <i>Sorex araneus</i> )	10	H, R, U, F, T	Голубой гну ( <i>Connochaetes taurinus</i> )	1	H, R, F, T
Павиан гамадрил ( <i>Papio hamadryas</i> )	1	H, R, U, F, T	Нильгау ( <i>Boselaphus tragocamelus</i> )	1	H, R, F, T
Макак резус ( <i>Macaca mulatta</i> )	1	H, R, U, F, T	Канна ( <i>Taurotragus oryx</i> )	1	H, R, F, T
Заяц русак ( <i>Lepus europaeus</i> )	1	H, R, F, T			

Примечание: H – плечевая кость, R – лучевая кость, U – локтевая кость, F – бедренная кость, T – большеберцовая кость.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## Пресмыкающиеся

Для параметров костей конечностей рептилий установлены следующие показатели их корреляции с массой тела. Высокий уровень корреляции с массой тела имеют большинство параметров всех исследованных костей: линейные размеры, площадь компакты и радиусы инерции ( $r > 0,7$ ; табл. 2). Корреляция с массой тела моментов инерции разных костей имеет некоторые различия. В

локтевой и большеберцовой костях (0,639-0,742) она больше, чем в лучевой и костях стилоподия (0,468-0,605). Корреляция с массой тела массы элементов скелета тазовой конечности (0,689-0,707) более высокая по сравнению с таковой для элементов грудной конечности (0,39-0,467).

**Таблица 2**  
Аллометрические зависимости параметров костей конечностей от массы тела у пресмыкающихся

	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>r</b>		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>r</b>
<b><i>Humerus</i></b>					<b><i>Radius</i></b>				
m	0,771	1,198	0,172	0,467	m	0,111	1,232	0,196	0,39
l	46,62	0,32	0,039	0,915	l	34,08	0,335	0,052	0,865
d <sub>f</sub>	4,053	0,358	0,028	0,958	d <sub>f</sub>	2,039	0,381	0,055	0,867
d <sub>s</sub>	4,106	0,386	0,025	0,97	d <sub>s</sub>	1,93	0,366	0,045	0,904
S <sub>k</sub>	6,55	0,704	0,084	0,82	S <sub>k</sub>	2,419	0,676	0,079	0,824
I <sub>max</sub>	8,42	1,55	0,151	0,597	I <sub>max</sub>	0,516	1,392	0,183	0,468
I <sub>min</sub>	5,789	1,583	0,166	0,544	I <sub>min</sub>	0,371	1,346	0,166	0,548
J	14,24	1,564	0,157	0,573	J	0,888	1,371	0,175	0,503
i <sub>max</sub>	1,198	0,358	0,038	0,925	i <sub>max</sub>	0,589	0,313	0,051	0,859
i <sub>min</sub>	1,016	0,366	0,05	0,878	i <sub>min</sub>	0,495	0,323	0,052	0,858
<b><i>Ulna</i></b>					<b><i>Femur</i></b>				
m	0,321	1,315	0,173	0,484	m	1,201	1,101	0,119	0,707
l	36,82	0,345	0,054	0,865	l	55,47	0,328	0,037	0,925
d <sub>f</sub>	2,277	0,411	0,06	0,862	d <sub>f</sub>	4,065	0,341	0,03	0,951
d <sub>s</sub>	2,195	0,311	0,046	0,882	d <sub>s</sub>	4,951	0,386	0,027	0,965
S <sub>k</sub>	3,158	0,682	0,064	0,883	S <sub>k</sub>	8,058	0,711	0,078	0,839
I <sub>max</sub>	1,641	1,4	0,118	0,733	I <sub>max</sub>	14,13	1,571	0,151	0,605
I <sub>min</sub>	0,614	1,375	0,142	0,649	I <sub>min</sub>	7,655	1,564	0,178	0,481
J	2,254	1,391	0,128	0,697	J	21,84	1,569	0,162	0,553
i <sub>max</sub>	0,795	0,339	0,033	0,941	i <sub>max</sub>	1,443	0,378	0,038	0,928
i <sub>min</sub>	0,5	0,301	0,047	0,873	i <sub>min</sub>	1,139	0,359	0,051	0,87
<b><i>Tibia</i></b>									
m	0,535	1,085	0,123	0,689	I <sub>max</sub>	1,005	1,34	0,09	0,832
l	42,67	0,337	0,039	0,92	I <sub>min</sub>	0,428	1,279	0,112	0,762
d <sub>f</sub>	3,387	0,356	0,04	0,921	J	1,461	1,312	0,092	0,826
d <sub>s</sub>	3,467	0,379	0,032	0,951	i <sub>max</sub>	0,671	0,338	0,032	0,946
S <sub>k</sub>	4,566	0,64	0,059	0,89	i <sub>min</sub>	0,461	0,316	0,037	0,918

Примечание: здесь и в таблице 3 *a* – константа начального роста; *b* – аллометрическая константа; *S<sub>b</sub>* – ошибка аллометрической константы; *r* – коэффициент корреляции.

При исследовании аллометрических зависимостей параметров костей от массы тела у рептилий выявлены некоторые характерные особенности. Судя по показателям аллометрической константы *b*, масса исследованных костей рептилий

имеет положительную аллометрию относительно массы тела (1,085-1,315; табл. 2). Изменения линейных размеров костей конечностей относительно массы тела также имеют общие тенденции для всех костей: изометрия длины кости (0,32-0,345), положительная аллометрия диаметров диафиза (0,341-0,411). Среди последних параметров исключение составляет сагиттальный диаметр локтевой кости, для которого наблюдается небольшая отрицательная аллометрия (0,311). Для параметров геометрии поперечного сечения элементов стилоподия и зейгоподия отмечен различный характер зависимостей. Указанные параметры костей стилоподия имеют положительный аллометрический рост относительно массы тела (площадь компакты – 0,704-0,711; моменты инерции – 1,55-1,583; радиусы инерции – 0,358-0,378). В то же время, в костях зейгоподия наблюдается преимущественно изометрия данных параметров с массой тела (площадь компакты – 0,64-0,682; моменты инерции – 1,315-1,403; радиусы инерции – 0,301-0,352).

Положительная аллометрия массы кости и диаметров диафиза (фронтального и сагиттального) относительно массы тела свидетельствует о том, что на повышение нагрузок на скелет конечностей кости реагируют увеличением количества компактного костного вещества. Изометрия длины каждой из исследованных костей к массе тела свидетельствует о пропорциональных изменениях размеров элементов конечностей относительно массы тела, а также указывает на их консервативность у ящериц.

Положительную аллометрию параметров геометрии сечения диафиза костей стилоподия можно считать подтверждением предположения о ведущей роли стилоподия в кинематике конечности и поддержании положения тела, поскольку на них воздействуют максимальные механические нагрузки. Поэтому при определенных видоспецифических изменениях строения конечности вследствие морфо-функциональных приспособлений к тому или иному типу локомоции у рептилий, на наш взгляд, наиболее изменчивым является именно стилоподий. В то же время, изометрия указанных параметров для элементов скелета зейгоподиального звена с массой тела у ящериц может указывать на постоянство относительных изменений параметров данных костей и возможное отсутствие адаптивных специализаций зейгоподия, проявляющихся на этом уровне. Одним из немногих исключений среди исследованных нами представителей рептилий являются хамелеоны, у которых относительно удлинен зейгоподий. Это объясняется специфической ориентацией конечностей хамелеонов, близкой к парасагиттальной.

Исходя из наших данных, у рептилий (в данном случае, у ящериц) наблюдается изменчивость длины кости согласно модели геометрического подобия (изометрическая), а диаметров диафиза – согласно модели упругого подобия (неизометрическая). Совокупная изменчивость параметров геометрии сечения всех исследованных костей пресмыкающихся может быть описана с помощью обеих моделей. С одной стороны, отмечена значительная положительная аллометрия в костях стилоподия (модель упругого подобия), с другой стороны, преобладает изометрическая зависимость в костях зейгоподия (модель геометрического подобия). Таким образом, общие закономерности изменений параметров для разных костей у ящериц отличаются от тех, которые можно наблюдать, например, у



млекопитающих. Это, вероятно, вызвано тем, что потенциальные возможности к изменениям характера локомоции у рептилий ограничиваются сегментальной ориентацией конечностей. Поэтому главные изменения сказываются на параметрах диафиза костей стилоподия, подверженных наибольшему количеству механических нагрузок.

### **Млекопитающие**

Все параметры костей конечностей исследованных видов млекопитающих имеют высокий уровень корреляции с массой тела ( $r > 0,7$ ). Исключение составляют моменты инерции сечения локтевой кости (0,574-0,614; табл. 3).

Масса костей ( $b=1,074-1,171$  – положительная аллометрия) и их длина ( $b=0,325-0,357$  – изометрия) у млекопитающих имеют такие же тенденции изменений, как и у пресмыкающихся. Аллометрические зависимости остальных рассмотренных параметров у млекопитающих имеют значения обратные таковым у рептилий. То есть, наблюдается преимущественно изометрия к массе тела большинства параметров элементов стилоподия, а также локтевой кости (диаметры диафиза – 0,322-0,359; площадь компакты – 0,674-0,708; моменты инерции – 1,201-1,43; радиусы инерции – 0,31-0,369), и положительная аллометрия параметров основных элементов зейгоподия – лучевой и большеберцовой костей (диаметры диафиза – 0,359-0,411; площадь компакты – 0,756-0,796; моменты инерции – 1,518-1,606; радиусы инерции – 0,383-0,429) (табл. 3).

По данным некоторых авторов у млекопитающих наблюдается преимущественно отрицательная аллометрия длин и диаметров костей и выраженная положительная аллометрия площади сечений и моментов инерции [6; 16; 25]. Однако это не полностью подтверждается нашими данными.

Согласно нашим данным, у млекопитающих параметры костей стилоподия изменяются изометрически относительно массы тела. Что касается костей зейгоподия (лучевая и большеберцовая кости), которые у млекопитающих подвергаются основным механическим нагрузкам, то их структурно-биомеханические параметры имеют довольно высокую положительную аллометрию к массе тела. При сравнении элементов зейгоподия грудной конечности в локтевой кости отмечена изометрия изученных параметров к массе тела (в отличие от лучевой). Причем аллометрическая константа полярного момента инерции сечения локтевой кости свидетельствует даже о небольшой отрицательной аллометрии. То есть, при возрастании массы тела у млекопитающих нагрузки на кручение в локтевой кости возрастают менее интенсивно. В целом изменения параметров костей стилоподия можно описать с помощью модели геометрического подобия, а костей зейгоподия – с помощью модели упругого подобия. Таким образом, в связи с парасагитальной ориентацией конечностей, у млекопитающих кости стилоподия проявляют относительно постоянные свойства механической устойчивости при возрастании массы тела. А основные несущие компоненты зейгоподия (лучевая и большеберцовая кости) увеличивают свои прочностные характеристики более интенсивно (в том числе и за счет относительного увеличения количества костного вещества – положительная аллометрия диаметров диафиза и площади компакты). Как известно, у млекопитающих изменчивость отдельных элементов скелета

конечностей увеличивается в направлении от проксимального к дистальному. Поэтому можно предположить, что у них механическая функция скелетных элементов зейгоподия является более существенной, чем у элементов стилоподия.

**Таблица 3**  
Аллометрические зависимости параметров костей конечностей от массы тела у млекопитающих

	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>r</b>		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>S<sub>b</sub></b>	<b>r</b>
<b><i>Humerus</i></b>					<b><i>Radius</i></b>				
<b>m</b>	1,099	1,131	0,042	0,882	<b>m</b>	0,409	1,143	0,059	0,833
<b>l</b>	43,01	0,341	0,015	0,977	<b>l</b>	43,44	0,357	0,014	0,981
<b>d<sub>f</sub></b>	4,334	0,341	0,018	0,972	<b>d<sub>f</sub></b>	2,863	0,411	0,028	0,949
<b>d<sub>s</sub></b>	5,136	0,359	0,016	0,977	<b>d<sub>s</sub></b>	2,212	0,405	0,023	0,954
<b>S<sub>k</sub></b>	9,153	0,688	0,034	0,921	<b>S<sub>k</sub></b>	3,589	0,796	0,042	0,887
<b>I<sub>max</sub></b>	16,99	1,373	0,057	0,808	<b>I<sub>max</sub></b>	1,122	1,518	0,099	0,531
<b>I<sub>min</sub></b>	9,151	1,383	0,065	0,797	<b>I<sub>min</sub></b>	0,646	1,564	0,09	0,631
<b>J</b>	26,98	1,375	0,058	0,809	<b>J</b>	1,778	1,533	0,097	0,553
<b>i<sub>max</sub></b>	1,553	0,353	0,015	0,981	<b>i<sub>max</sub></b>	0,829	0,429	0,024	0,962
<b>i<sub>min</sub></b>	1,138	0,369	0,019	0,974	<b>i<sub>min</sub></b>	0,575	0,415	0,018	0,974
<b><i>Ulna</i></b>					<b><i>Femur</i></b>				
<b>m</b>	0,487	1,074	0,069	0,793	<b>m</b>	1,365	1,171	0,035	0,908
<b>l</b>	41,27	0,353	0,031	0,954	<b>l</b>	50,54	0,356	0,014	0,982
<b>d<sub>f</sub></b>	2,567	0,322	0,03	0,953	<b>d<sub>f</sub></b>	4,888	0,339	0,02	0,964
<b>d<sub>s</sub></b>	3,395	0,362	0,033	0,939	<b>d<sub>s</sub></b>	4,315	0,371	0,014	0,983
<b>S<sub>k</sub></b>	4,033	0,674	0,058	0,85	<b>S<sub>k</sub></b>	8,571	0,708	0,035	0,906
<b>I<sub>max</sub></b>	1,748	1,334	0,099	0,614	<b>I<sub>max</sub></b>	13,56	1,391	0,069	0,73
<b>I<sub>min</sub></b>	0,798	1,201	0,102	0,574	<b>I<sub>min</sub></b>	8,393	1,43	0,069	0,757
<b>J</b>	2,627	1,291	0,1	0,602	<b>J</b>	21,59	1,399	0,069	0,74
<b>i<sub>max</sub></b>	0,929	0,353	0,035	0,935	<b>i<sub>max</sub></b>	1,498	0,353	0,021	0,964
<b>i<sub>min</sub></b>	0,655	0,31	0,032	0,945	<b>i<sub>min</sub></b>	1,193	0,367	0,015	0,981
<b><i>Tibia</i></b>									
<b>m</b>	1,303	1,113	0,036	0,914	<b>I<sub>max</sub></b>	6,269	1,598	0,069	0,812
<b>l</b>	58,51	0,325	0,016	0,897	<b>I<sub>min</sub></b>	3,822	1,606	0,072	0,815
<b>d<sub>f</sub></b>	3,621	0,392	0,018	0,974	<b>J</b>	10,11	1,604	0,07	0,814
<b>d<sub>s</sub></b>	4,031	0,359	0,016	0,974	<b>i<sub>max</sub></b>	1,195	0,387	0,016	0,979
<b>S<sub>k</sub></b>	7,772	0,756	0,031	0,936	<b>i<sub>min</sub></b>	0,954	0,383	0,016	0,98

Аллометрические зависимости в пределах класса млекопитающих отображают усредненные изменения параметров костей конечностей, то есть демонстрируют их общие закономерности. Определенные локомоторные специализации могут вызывать довольно значительные отклонения от общего тренда относительных изменений показателей. Однако наличие в исследуемой выборке представителей видов млекопитающих с адаптациями противоположного характера подтверждает

общую закономерность изменений параметров. А ошибка общей аллометрической константы для определенного параметра указывает на размах определенных отклонений.

#### **Общие закономерности изменчивости параметров у пресмыкающихся и млекопитающих**

В отношении закономерностей изменений линейных параметров, наши выводы согласуются с выводами Р. Блоба [2]: длина костей пресмыкающихся относительно меньше, чем у млекопитающих, при приблизительно равных диаметрах, а диаметры костей ящериц имеют такие же аллометрические зависимости, как у млекопитающих. Также следует добавить, что связь линейных размеров (длина, диаметры кости) с максимальной разрушающей нагрузкой является несколько меньшей по сравнению с параметрами сечения кости [26].

В целом для тетрапод характерны следующие особенности относительного роста морфометрических и структурно-биомеханических параметров элементов скелета конечностей. Масса кости всегда имеет положительную аллометрию к массе тела. Длина кости всегда является изометричной к массе тела. В элементах скелета конечностей, подверженных наибольшему механическому нагружению, наблюдается положительный аллометрический рост диаметров диафиза и параметров геометрии сечения диафиза. Таким образом, при возрастании массы тела структурно-биомеханические параметры возрастают относительно более интенсивно для обеспечения необходимого запаса прочности кости. Локтевая кость является единственным элементом, для которого не отмечена подобная закономерность ни у пресмыкающихся, ни у млекопитающих. Ее механическая функция, вероятно, уменьшается при возрастании массы тела. Хорошим примером этого является грудная конечность копытных, где лучевая кость является гораздо более развитой. Хотя в этом исследовании данные по локтевой кости копытных не учитываются, но и без них можно говорить о подобной тенденции для всех животных в целом. Если сравнивать общие тенденции относительных изменений морфометрических и структурно-биомеханических параметров элементов скелета разных звеньев конечности у пресмыкающихся и млекопитающих, то можно говорить об относительном утолщении костей зейгоподия и увеличении их механической функции у тетрапод в целом (учитывая также такие факторы, как ориентация конечностей и увеличение массы тела).

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Структурно-биомеханические параметры элементов скелета различных звеньев конечности (стилоподия и зейгоподия) у пресмыкающихся и млекопитающих имеют различный характер аллометрических зависимостей от массы тела. Так, довольно высок уровень положительной аллометрии этих параметров в костях стилоподия у пресмыкающихся и зейгоподия у млекопитающих (при изометрии с массой тела параметров остальных костей). Это, вероятно, связано с различным характером распределения механических нагрузок по звеньям конечности у представителей разных классов в связи с различной ориентацией

- конечностей. Сегментальная ориентация конечностей предполагает более интенсивные нагрузки на элементы стилоподия, а парасагиттальная – на элементы зейгоподия. Соответственно, прочностные характеристики этих элементов имеют более интенсивный относительный рост количественных параметров при увеличении массы тела.
2. У тетрапод в целом отмечается общая тенденция к относительному возрастанию структурно-биомеханических параметров элементов скелета зейгоподия при увеличении массы тела.
  3. Судя по аллометрическим зависимостям параметров костей зейгоподия грудной конечности, у тетрапод с возрастанием массы тела наблюдается повышение механической функции лучевой кости наряду с ее снижением для локтевой кости.

#### Список литературы

1. Brown J. The description of mammals. 2. Limbs and locomotion of terrestrial mammals / J. Brown, D.W. Yalden // *Mammal Review*. – 1973. – Vol. 3. – No 4. – P. 107-134.
2. Blob R. W. Interspecific scaling of the hindlimb skeleton in lizards, crocodylians, felids and canids: does limb bone shape correlate with limb posture? / R. W. Blob // *Journal of Zoology, London*. – 2000. – Vol. 250. – P. 507-531.
3. Butcher M. T. In vivo strains in the femur of river cooter turtles (*Pseudemys concinna*) during terrestrial locomotion: tests of force-platform models of loading mechanics / M. T. Butcher, N. R. Espinoza, S.R. Cirilo, R. W. Blob // *J. Exp. Biol.* – 2008. – Vol. 211. – P. 2397-2407.
4. Sheffield K. M. Locomotor loading mechanics in the hindlimbs of tegu lizards (*Tupinambis merianae*): comparative and evolutionary implications / K.M. Sheffield, M.T. Butcher, S.K. Shugart, J.C. Gander, R.W. Blob // *The Journal of Experimental Biology*. – 2011. – Vol. 214. – P. 2616-2630.
5. Butcher M. T. In vivo strains in the femur of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) during terrestrial locomotion: testing hypotheses of evolutionary shifts in mammalian bone loading and design / M. T. Butcher, B. J. White, N. B. Hudzik, W. C. Gosnell, J. H. A. Parrish, R. W. Blob // *The Journal of Experimental Biology*. – 2011. – Vol. 214. – P. 2631-2640.
6. Мельник К. П. Локомоторный аппарат млекопитающих. Вопросы морфологии и биомеханики скелета / К. П. Мельник, В. И. Клыкков. – К.: Наукова думка, 1991. – 208 с.
7. Alexander R. McN. Allometry of the limb bones of mammals from shrews (*Sorex*) to elephant (*Loxodonta*) / R. McN. Alexander, A.S. Jayes, G. M. O. Maloiy, E. M. Wathuta // *J. Zool., Lond.* – 1979. – Vol. 189. – P. 305-314.
8. Biewener A. A. Allometry of quadrupedal locomotion: the scaling of duty factor, bone curvature and limb orientation to body size / A. A. Biewener // *J. Exp. Biol.* - 1983. – Vol. 105. – P. 147-171.
9. Cubo J. The variation of the cross-sectional shape in the long bones of birds and mammals / J. Cubo, A. Casinos // *Annales des Sciences Naturelles*. – 1998. – Vol. 36, No. 1. – P. 51-62.
10. Jungers W. L. Shape, relative size, and size-adjustments in morphometrics / W. L. Jungers, A. B. Falsetti, C. E. Wall // *Yearbook of Physical Anthropology*. – 1995. – Vol. 38. – P. 137-161.
11. McMahon T. A. Size and shape in biology / T. A. McMahon // *Science*. – 1973. – Vol. 179. – P. 1201-1204.
12. McMahon T. A. Allometry and biomechanics: limb bones and adult ungulates / T. A. McMahon // *Amer. Natur.* – 1975. – Vol. 9. – P. 547-563.
13. McMahon T. A. Using body size to understand the structural design of animals: quadrupedal locomotion / T. A. McMahon // *J. Appl. Physiol.* – 1975a. – Vol. 39. – P. 619-627.
14. Alexander R. McN. Allometry of the limbs of antelopes (*Bovidae*) / R. McN. Alexander // *J. Zool., Lond.* – 1977. – Vol. 183. – P. 125-146.
15. Scott K. M. Allometric trends and locomotor adaptations in the bovidae / K. M. Scott // *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* – 1985. – Vol. 179. – P. 197-288.

16. Клык В. И. Скелет конечностей некоторых хищных млекопитающих (морфология, пропорции, аллометрия) / В. И. Клык, К. С. Мусабеков // Материалы по функциональной морфологии скелета конечностей представителей хищных и копытных млекопитающих. – К.: Институт зоологии АН Украины, 1993. – С. 3-26.
17. Богданович И. А. Особенности формы поперечных сечений длинных костей конечности у птиц / И. А. Богданович, В. И. Клык // Vestnik zoologii. – 2011. – Т. 45. – №3. – С. 283-288.
18. Simons E. L. R. Cross sectional geometry of the forelimb skeleton and flight mode in Pelecaniform birds / E. L. R. Simons, T. L. Hieronymus, P. M. O'Connor // Journal of Morphology. – 2011. – Vol. 272. – P.958-971.
19. Клебанова Е. А. Морфофункциональные особенности органов опоры и движения зайцеобразных / Е. А. Клебанова, Р. С. Полякова, А. С. Соколов // Тр. Зоол. ин-та. – 1971. – Т.48. – С. 121-151.
20. Шмидт-Нильсен К. Размеры животных: почему они так важны?: Пер. с англ. / К. Шмидт-Нильсен. – М.: Мир, 1987. – 259 с.
21. Huxley J. S. Problems of relative growth. – London, 1932. – 276 p.
22. Gould S. J. Allometry and size in ontogeny and phylogeny / S. J. Gould // Biol. Rev. Cambridge Phill. Soc. – 1966. – Vol. 41, No. 4. – P. 587-640.
23. Smith R. J. Rethinking allometry / R. J. Smith // J. Theor. Biol. – 1980. – Vol. 87. – P. 97-111.
24. Smith R. J. Determination of relative size: the "criterion of subtraction" Problem in allometry / R.J. Smith // J. Theor. Biol. – 1984. – Vol. 108. – P.131-142.
25. Клык В. И. Некоторые морфо-биомеханические аспекты адаптации скелета конечностей копытных (*Ungulata*) / В. И. Клык, К. П. Мельник, В. А. Клыкова // Материалы по функциональной морфологии скелета конечностей представителей хищных и копытных млекопитающих. – К.: Институт зоологии АН Украины, 1993. – С. 26-50.
26. Jurist J. M. Human ulnar bending stiffness, mineral content, geometry and strength / J.M. Jurist, A.S. Foltz // J. Biomechanics. – 1977. – Vol. 10. – P. 455-459.

**Брошко Є.О. Деякі структурно-біомеханічні особливості довгих кісток кінцівок плазунів і ссавців / Є.О. Брошко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 12-23.**

Досліджено деякі особливості відносних змін структурно-біомеханічних властивостей скелетних елементів стилоподію і зейгоподію кінцівок плазунів і ссавців. Визначено наступні морфометричні і структурно-біомеханічні параметри кісток: маса кістки; лінійні лінійні розміри кістки – довжина, фронтальний і сагітальний діаметри діафізу; параметри геометрії перерізу діафізу: площа компакти, моменти інерції (головні і полярний), радіуси інерції. Встановлено, що вказані параметри кісток стилоподію і зейгоподію мають різний характер аллометричних залежностей від маси тіла. В усіх випадках відмічено позитивну аллометрію маси кістки та ізометрію довжини кістки до маси тіла. Більшість параметрів елементів стилоподію плазунів і елементів зейгоподію ссавців мають позитивну аллометрію до маси тіла. Це свідчить про різний характер механічних навантажень на окремі елементи скелету кінцівок у представників різних класів, що пов'язано з відмінною орієнтацією кінцівок (сегментальна у плазунів, пара сагітальна у ссавців).

**Ключові слова:** плазуни, ссавці, скелет кінцівок, орієнтація кінцівок, структурно-біомеханічні параметри, аллометрія.

**SOME STRUCTURAL AND BIOMECHANICAL PECULIARITIES OF LIMBS'  
LONG BONES OF REPTILES AND MAMMALS**

*Broshko Y.O.*

*I. I. Schmalhausen Institute of zoology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine  
E-mail: y.broshko@gmail.com*

Some features of the relative changes in the structural and biomechanical properties of stylopodium and zeugopodium elements of limbs' skeleton of reptiles and mammals have been investigated. Morphological and functional adaptations of limbs' skeletal elements in representatives of different classes of terrestrial vertebrates are directly related to limbs orientation and features of locomotion type. This leads to the fact that stylopodium bones of reptiles and mammals are subjected to mechanical loads of different character.

The structural and biomechanical parameters of stylopodium and zeugopodium bones of reptiles' and mammals' limbs were investigated. There are bone mass, linear dimensions (length and shaft diameters – frontal and sagittal), parameters of shaft's cross-sectional geometry (cross-sectional area, second and polar moments of inertia, radiuses of inertia). Parameters of cross-sectional geometry allow to establishing a quantitative expression of bone resistance to the loads of certain character: pressure and tension (cross-sectional area), bending (second moments of inertia), torsion (polar moment of inertia).

It has been found that the parameters of stylopodium and zeugopodium bones of representatives of different classes have different character of allometric dependences on body mass. In all cases are noted positive allometry of bone mass and isometry of bone length to body mass. Most parameters of stylopodium elements of reptiles and zeugopodium elements of mammals have positive allometry to body mass. At the same time, the parameters of zeugopodium bones of reptiles and stylopodium bones of mammals are varies isometrically relative to body mass. All this testifies to the different character of the mechanical loads on the individual elements of the limbs' skeleton of representatives of different classes, which is associated with a different orientation of limbs (segmental in reptiles, parasagittal in mammals). From this, we can make the following conclusions. The main loads are imposed on stylopodium in reptiles and zeugopodium in mammals. There is a general trend of increasing of mechanical load on the zeugopodium skeleton when the vertebrates' body mass are increasing. Also noted increase of the mechanical function of the radius compared with the ulna in vertebrates.

**Keywords:** reptiles, mammals, limb skeleton, limbs orientation, structural and biomechanical parameters, allometry.

**References**

1. Brown J. and Yalden D. W., The description of mammals. 2. Limbs and locomotion of terrestrial mammals, *Mammal Review*, **3**, 107 (1973).
2. Blob R. W., Interspecific scaling of the hindlimb skeleton in lizards, crocodylians, felids and canids: does limb bone shape correlate with limb posture?, *J. Zool., Lond.*, **250**, 507 (2000).
3. Butcher M. T., Espinoza N. R., Cirilo S. R., Blob R. W., In vivo strains in the femur of river cooter turtles (*Pseudemys concinna*) during terrestrial locomotion: tests of force-platform models of loading mechanics, *J. Exp. Biol.*, **211**, 2397 (2008).

4. Sheffield K. M., Butcher M. T., Shugart S. K., Gander J. C., Blob R. W., Locomotor loading mechanics in the hindlimbs of tegu lizards (*Tupinambis merianae*): comparative and evolutionary implications, *J. Exp. Biol.*, **214**, 2616 (2011).
5. Butcher M. T., White B. J., Hudzik N. B., Gosnell W. C., Parrish J. H. A., Blob R. W., In vivo strains in the femur of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) during terrestrial locomotion: testing hypotheses of evolutionary shifts in mammalian bone loading and design, *J. Exp. Biol.*, **214**, 2631 (2011).
6. Melnik K. P. and Klykov V. I., *Locomotor Apparatus of Mammals. Aspects of Morphology and Biomechanics of the Skeleton* (in Russian), 208 p. (Kiev, Naukova dumka, 1991).
7. Alexander R. McN., Jayes A. S., Maloiy G. M. O., Wathuta E. M., Allometry of the limb bones of mammals from shrews (*Sorex*) to elephant (*Loxodonta*), *J. Zool., Lond.*, **189**, 305 (1979).
8. Biewener A. A. Allometry of quadrupedal locomotion: the scaling of duty factor, bone curvature and limb orientation to body size, *J. Exp. Biol.*, **105**, 147 (1983).
9. Cubo J. and Casinos A., The variation of the cross-sectional shape in the long bones of birds and mammals, *An. des Sc. Natur.*, **36** (1), 51 (1998).
10. Jungers W. L., Falsetti A. B., Wall C. E., Shape, relative size, and size-adjustments in morphometrics, *Yearb. Phys. Anthropol.*, **38**, 137 (1995).
11. McMahon T. A., Size and shape in biology, *Science*, **179**, 1201 (1973).
12. McMahon T. A., Allometry and biomechanics: limb bones and adult ungulates, *The Amer. Natur.*, **109** (969), 547 (1975).
13. McMahon T. A., Using body size to understand the structural design of animals: quadrupedal locomotion, *J. Appl. Physiol.*, **39**, 619 (1975a).
14. Alexander R. McN., Allometry of the limbs of antelopes (*Bovidae*), *J. Zool., Lond.*, **183**, 125 (1977).
15. Scott K. M., Allometric trends and locomotor adaptations in the bovidae, *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, **179**, 197 (1985).
16. Klykov V. I. and Musabekov K. S., Limbs skeleton of some carnivorous mammals (morphology, proportions, allometry) (in Russian), *Materials on the limbs skeleton functional morphology of the some carnivorous and ungulates*, 3 (Kiev, Institute of Zoology AS of Ukraine, 1993).
17. Bogdanovich I. A. and Klykov V. I. Peculiarities of cross-section shape geometry of birds pelvic limbs long bones (in Russian), *Vestnik zoologii*, **45** (3), 283 (2011).
18. Simons E. L. R., Hieronymus T. L., O'Connor P. M., Cross sectional geometry of the forelimb skeleton and flight mode in Pelecaniform birds, *J. Morph.*, **272**, 958 (2011).
19. Klebanova Ye. A., Polyakova R. S., Sokolov A. S., Morphological and functional features of lagomorphs locomotor organs (in Russian), *Proceedings of the Zoological Institute*, **48**, 121 (1971).
20. Schmidt-Nielsen K. *Scaling: Why is Animal Size So Important?*, 241 p. (Cambridge, University Press, 1984).
21. Huxley J. S. *Problems of relative growth*, 276 p. (London, 1932).
22. Gould S. J., Allometry and size in ontogeny and phylogeny, *Biol. Rev. Cambridge Phill. Soc.*, **41** (4), 587 (1966).
23. Smith R. J., Rethinking allometry, *J. Theor. Biol.*, **87**, 97 (1980).
24. Smith R. J., Determination of relative size: the "criterion of subtraction" problem in allometry, *J. Theor. Biol.*, **108**, 131 (1984).
25. Klykov V. I., Melnik K. P., Klykova V. A., Some morphological and biomechanical aspects of the adaptation of limbs skeleton in ungulates (*Ungulata*) (in Russian), *Materials on the limbs skeleton functional morphology of the some carnivorous and ungulates*, 26 (Kiev, Institute of Zoology AS of Ukraine, 1993).
26. Jurist J. M. and Foltz A. S., Human ulnar bending stiffness, mineral content, geometry and strength, *J. Biomech.*, **10**, 455 (1977).

Поступила в редакцию 26.01.2014 г.

**UDK 537.86:52.7+58.027**

## **INFLUENCE OF DIFFERENT RELATIVE ORIENTATION OF STATIC AND ALTERNATIVE MAGNETIC FIELDS AND CROSS ROOTS ON THEIR GRAVITROPIC REACTION**

*Bogatina N.I.<sup>1</sup>, Sheykina N.V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics & Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine.*

<sup>2</sup>*National University of Pharmacy, Kharkov, Ukraine  
E-mail: n\_bogatina@rambler.ru*

The following variants of roots location relatively to static and alternative components of magnetic field were studied. At first variant the static magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the alternative magnetic field was directed perpendicular to static one; roots were directed perpendicular to both two fields' components and gravitation vector. At the variant the negative gravitropism for cross roots was observed. At second variant the static magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the alternative magnetic field was directed perpendicular to static one; roots were directed parallel to alternative magnetic field. At third variant the alternative magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the static magnetic field was directed perpendicular to the gravitation vector, roots were directed perpendicular to both two fields components and gravitation vector; At fourth variant the alternative magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the static magnetic field was directed perpendicular to the gravitation vector, roots were directed parallel to static magnetic field. In all cases studied the alternative magnetic field frequency was equal to Ca ions cyclotron frequency. In 2, 3 and 4 variants gravitropism was positive. But the gravitropic reaction speeds were different. In second and fourth variants the gravitropic reaction speed in error limits coincided with the gravitropic reaction speed under Earth's conditions. At third variant the gravitropic reaction speed was slowed essentially.

**Keywords:** static magnetic field, alternative magnetic field, gravitropic reaction, roots direction, cyclotron frequency.

### **INTRODUCTION**

The investigation of combined magnetic field (CMF, static and parallel to it alternative magnetic field) influence on the plants roots gravitropic reaction was studied in details before [1]. The roots in the experiments were located by the following way:

1. CMF was parallel to the gravitation vector; the roots were located perpendicular to gravitation vector and CMF vector;
2. CMF was perpendicular to the gravitation vector and roots were located perpendicular to CMF and gravitation vectors;
3. CMF was perpendicular to the gravitation vector and roots were located parallel to CMF.

It was found that roots gravitropic reaction was negative at first case and it was slowed essentially in the second one. At third case it was usual.

The hypothesis of CMF and SMF (static magnetic field) action was proposed in [1]. To confirm or throw away the hypothesis the experiments with different relative orientation of static and alternative magnetic fields and gravitation force and roots were fulfilled.



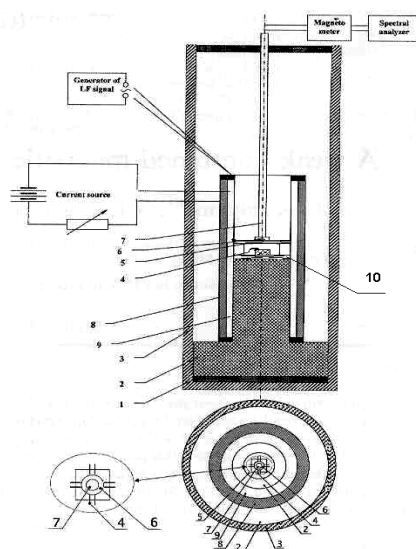
In the work the following variants of roots location relatively to static and alternative components of magnetic field were studied.

- At first variant the static magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the alternative magnetic field was directed perpendicular to static one, roots were directed perpendicular to both two fields components and gravitation vector;
- At second variant the static magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the alternative magnetic field was directed perpendicular to static one, roots were directed parallel to alternative magnetic field;
- At third variant the alternative magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the static magnetic field was directed perpendicular to the gravitation vector, roots were directed perpendicular to both two fields components and gravitation vector;
- At fourth variant the alternative magnetic field was directed parallel to the gravitation vector, the static magnetic field was directed perpendicular to the gravitation vector, roots were directed parallel to static magnetic field;
- In all cases studied the alternative magnetic field frequency was equal to Ca ions cyclotron frequency.

### MATERIALS AND METHODS

The materials and methods of the investigation were described before [2, 3].

The only distinction is the possibility to obtain perpendicular magnetic fields (static and alternative ones). For this purpose we added a new solenoid 10 to our setting. (See fig.1).

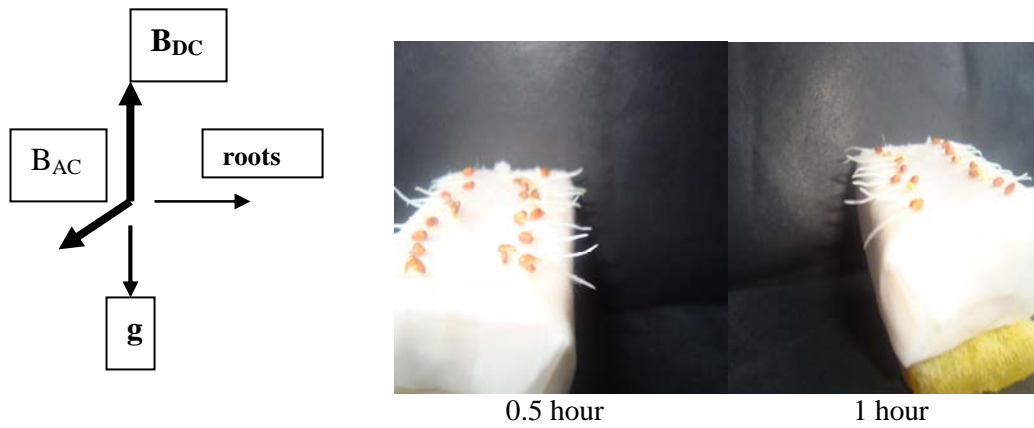


**Fig.1.** The damping rubber (1) supported the holder of dielectric material (2). The  $\mu$ -metal shield (3) surrounded the samples (4) that were mounted inside a moist chamber of non-magnetic plastic material (5) and solenoids (8, 9). The magnetic field was measured and controlled by sensor elements (fluxgate magnetometer or SQUID), (6) inside a holder

(7). The solenoids (8, 9, 10) have a cylindrical shape and comprise the system that generates the static magnetic field (9). The enlarged central part of the top view shows the orientation of 4 pairs of roots (4), arranged around the magnetic field sensor (7). The coils of solenoids (8, 9) are the spaces between the circles in the bottom part. The space between the innermost circles is the holder of dielectric material (2).

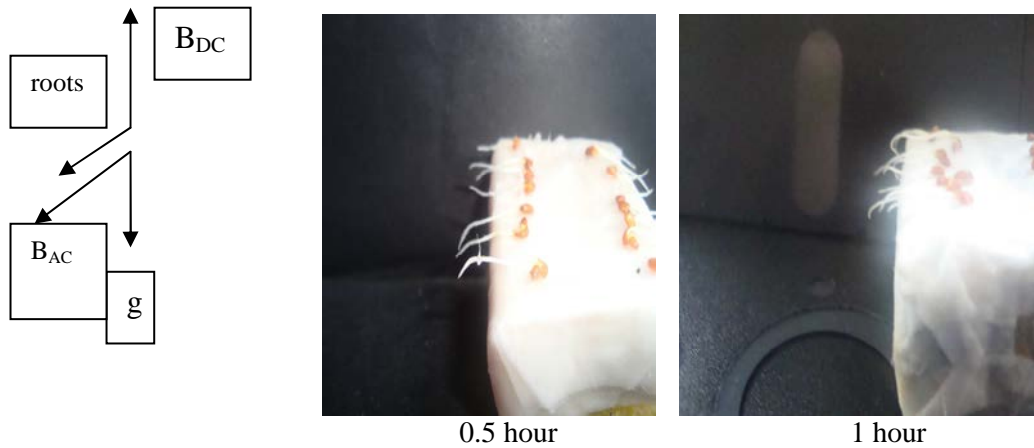
**RESULTS AND DISCUSSION**

First variant.



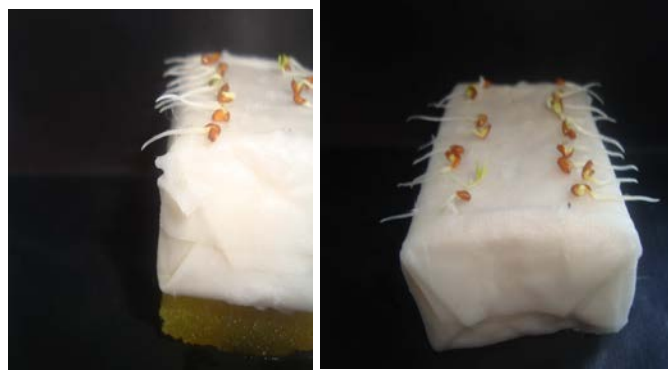
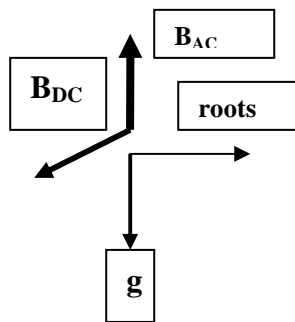
**Fig. 2.** The cress roots after 0.5 and 1 hour treatment in the field  $B_{DC}=40 \mu T$ ,  $B_{AC}=74 \mu T$ ,  $f=32 \text{ Hz}$

Second variant.



**Fig.3.** The cress roots after 0.5 and 1 hour treatment in the field  $B_{DC}=40 \mu T$ ,  $B_{AC}=74 \mu T$ ,  $f=32 \text{ Hz}$

Third variant

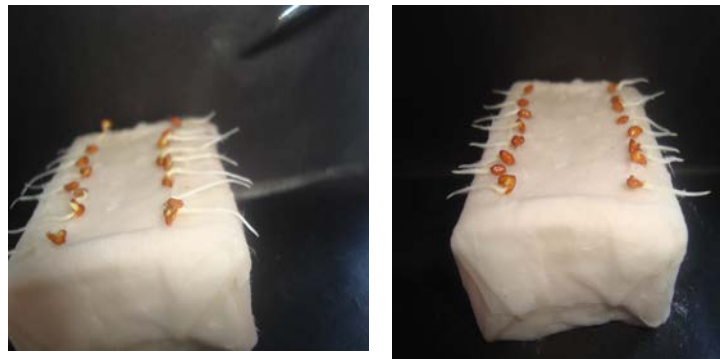
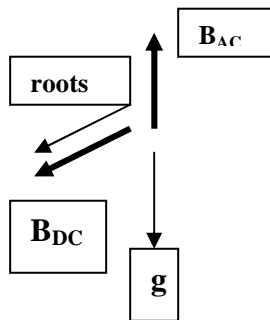


0.5 hour

1 hour

**Fig.4.** The cross roots after 0.5 and 1 hour treatment in the field  $B_{DC} = 40 \mu T$ ,  $B_{AC} = 74 \mu T$ ,  $f = 32 \text{ Hz}$ .

Forth variant.



0/5 hour

1 hour

**Fig.5** The cross roots after 0.5 and 1 hour treatment in the field  $B_{DC} = 40 \mu T$ ,  $B_{AC} = 74 \mu T$ ,  $f = 32 \text{ Hz}$ .

It was shown that the roots direction relatively  $B_{DC}$  and  $B_{AC}$  are essential for negative gravitropic reaction and decreasing of gravitropic reaction observation. The effect we obtained may be explained by our theory based on Liboff's hypothesis (the electric field was taken in consideration) and ours previous work. The breathing of the membrane is important only in the cases when the ions direction of moving is not parallel either for  $B_{DC}$  or  $B_{AC}$ .

We have to notice that while the gravitropic reaction is absent the roots become thicker. The effect may be connected with water detained in roots.

### CONCLUSIONS

1. The direction of roots relatively both static and alternative magnetic field is very important.
2. The effect may be explained by membrane breathing caused by alternative magnetic field.

## References

1. Bogatina N.I., Sheykina N.V., Kordyum E.L. Maize and cress roots orientation in combined magnetic field change roots gravitropic reaction response on its action. Experiment and new hypothesis . Adaptation mechanism. Proceedings of V1 International Congress "Low and superlow magnetic fields and radiation in biology and medicine // 02-06 July Saint-Petersburg, P.73, (2012)
2. Kordyum E.L., Bogatina N.I., Kalinina Ya..M., Sheykina N.V. Weak combined magnetic field changes root gravitropism *Advances in Space Research.*, **36**, P. 1229 ( 2005).
3. Kordyum E., Bogatina N., Sobol M., Kalinina Ja., Kondrachuk A. Cyclotron-based effects on plant gravitropism. *Adv. Space Res.* **39**. P. 1210 (2007)

**Богатина Н. И. Влияние различной ориентации постоянного и переменного магнитных полей относительно корней кресс-салата на их гравитропическую реакцию / Н.И.Богатина, Н.В.Шейкина // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С.24-28.**

Были исследованы следующие варианты расположения корней относительно постоянного и переменного магнитных полей. В первом варианте постоянное магнитное поле направлено параллельно вектору гравитации, а переменное магнитное поле перпендикулярно ему, корни расположены перпендикулярно обоим полям и вектору гравитации. Для этого варианта наблюдали отрицательный гравитропизм. Во втором варианте постоянное магнитное поле было направлено параллельно вектору гравитации, переменное магнитное поле – перпендикулярно постоянному, а корни – параллельно переменному полю. В третьем варианте переменное магнитное поле было направлено параллельно вектору гравитации, постоянное - перпендикулярно ему, а корни - перпендикулярны обоим полям и вектору гравитации. В четвертом варианте переменное магнитное поле было направлено параллельно вектору гравитации, постоянное – перпендикулярно ему, а корни – параллельно постоянному полю. Во всех исследованных вариантах частота переменного магнитного поля равнялась циклотронной частоте ионов Са. Во 2, 3 и 4 вариантах гравитропизм был положительный, однако скорость гравитропической реакции была различной. Во втором и четвертом вариантах скорость гравитропической реакции в пределах ошибки совпадает со скоростью гравитропической реакции в земных условиях. В третьем варианте скорость гравитропической реакции существенно замедляется.

**Ключевые слова:** постоянное магнитное поле, переменное магнитное поле, гравитропическая реакция, направление корней, циклотронная частота.

**Богатина Н.И. Вплив різної орієнтації постійного та змінного магнітних полів відносно коренів кресс-салату на їх гравітропічну реакцію / Н.І. Богатина, Н.В. Шейкіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27(66), № 1. – С. 24-28.**

Вивчали наступні варіанти розташування коренів та постійної і змінної складових магнітного поля. В першому варіанті постійне магнітне поле паралельно вектору гравітації, змінне магнітне поле перпендикулярне постійному, корені перпендикулярні обоим полям і вектору гравітації. В цьому варіанті спостерігали від’ємний гравітропізм. В другому варіанті постійне магнітне поле паралельно вектору гравітації, змінне магнітне поле перпендикулярне постійному, корені паралельні змінному магнітному полю. В третьому варіанті змінне магнітне поле паралельно вектору гравітації, постійне магнітне поле перпендикулярне вектору гравітації, корені перпендикулярні обоим полям і вектору гравітації. В четвертому варіанті змінне магнітне поле паралельно вектору гравітації, постійне магнітне поле перпендикулярне вектору гравітації, а корені паралельні постійному магнітному полю. В усіх варіантах частота змінного магнітного поля дорівнює циклотронній частоті іонів кальцію. У 2, 3 та 4 варіантах гравітропізм був додатний, але швидкість гравітропічної реакції була різною. В другому та четвертому варіантах швидкість гравітропічної реакції в межах помилки збігається зі швидкістю гравітропічної реакції в земних умовах. У третьому варіанті швидкість гравітропічної реакції значно зміншується.

**Ключові слова:** постійне магнітне поле, змінне магнітне поле, гравітропічна реакція, напрямки коренів, циклотронна частота.

*Поступила в редакцію 21.01.2014 г.*

УДК 582.232:[581.143+577.122.5]

## ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КВАЗИНЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЫ *DUNALIELLA SALINA* TEOD. ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОСВЕЩЁННОСТИ

*Боровков А.Б., Гудвилович И.Н.*

*Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь, Украина  
E-mail: spirit2000@ua.fm*

Проведена сравнительная оценка влияния фактора поверхностной освещённости на накопление пигментов и продукционные характеристики интенсивной культуры *Dunaliella salina*. Показано, что увеличение светового обеспечения культуры оказывает разнонаправленное действие на продуктивность (скорость роста) культуры и относительное содержание фотосинтетических пигментов в клетках *Dunaliella salina*.

**Ключевые слова:** *Dunaliella salina*, освещённость, продуктивность, содержание пигментов.

### ВВЕДЕНИЕ

Выявление оптимальных условий для роста микроводорослей и биосинтеза БАВ позволяет определить продукционный потенциал вида, который при интенсивном культивировании обычно оказывается выше, чем в природных популяциях и при экстенсивном выращивании [1–3]. Такие оптимальные условия могут быть обеспечены не только изменением состава питательных сред, но и использованием определенных режимов культивирования, выбор которых во многом зависит от специфики организма и целей использования биомассы [4–6].

Важнейшим фактором, определяющим продукционные свойства культур микроводорослей, являющихся фототрофными организмами, является свет. Зависимость жизнедеятельности водорослей, в частности, фотосинтеза от освещённости может выражаться как в лимитировании, так и в ингибировании их роста. Эти два основных процесса отражают регуляторную роль света в запасании свободной энергии для создания биомассы микроводорослей [2, 7, 8].

В последние годы в лабораторных исследованиях микроводорослей используют плотные культуры, то есть когда единственным фактором, ограничивающим рост культуры (клеток микроводоросли), является световой. Оптимизация процесса получения таких культур весьма актуальна для промышленного выращивания биотехнологически ценных видов микроводорослей. Такие технологии, как правило, многостадийны, тем не менее, первая фаза, как правило, должна быть направлена на получение большого количества биомассы, то есть должна характеризоваться высокой продуктивностью исследуемой культуры водорослей. Поэтому актуальными остаются работы по подбору и оптимизации режимов

получения плотных высокопродуктивных культур. Микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. – классический модельный объект многостадийных культур; её промышленное выращивание для получения  $\beta$ -каротина обычно проходит в две стадии.

Целью проведения эксперимента являлось изучение влияния поверхностной освещённости на содержание пигментов и продукционные характеристики культуры микроводоросли *D. salina*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования – зеленая эвригалобная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штамм IBSS-2) из коллекции культур ИнБЮМ НАН Украины.

Установка для культивирования микроводорослей состояла из трёх стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объемом 6 л с рабочей толщиной 5 см, осветителя – лампы ДРЛ-700, термостабилизирующей и газораспределительной систем. Объем суспензии в каждом культиваторе поддерживали на уровне 5 л.

Водоросли выращивали на модифицированной питательной среде по [8], при приготовлении которой использовали морскую соль до концентрации в растворе  $120 \text{ г} \cdot \text{дм}^{-3}$  [7]; в процессе выращивания культура непрерывно снабжалась газоздушным смесью с концентрацией углекислоты 3 % по объёму, температура составляла –  $26\text{--}28^\circ\text{C}$ , рН культуральной среды – 6–7 единиц. На начальном этапе эксперимента водоросли культивировали в накопительном режиме при поверхностной освещённости  $80 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ . Начиная с 13 дня, эксперимент продолжили в квазинепрерывном режиме. Удельная скорость протока среды для 3-х экспериментальных культиваторов составляла  $0,32 \text{ сут}^{-1}$ , а поверхностная освещённость была изменена для двух культиваторов на 19 и  $190 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ .

Содержание сухого вещества в культуре (СВ) определяли объемно-весовым [9], а также фотометрическим методами [7, 10]. Определяемые показатели химического состава выражали в пересчете на органическое вещество (ОВ). Массовую долю зольного остатка в сырой биомассе микроводорослей определяли путем предварительного высушивания навесок при  $105^\circ\text{C}$  в течение 24 ч и последующего сжигания в муфельной печи при  $t = 500^\circ\text{C}$  до постоянного веса [10]. Содержание суммарных каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом [10]. Пигменты экстрагировали из клеток микроводоросли ацетоном. Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400–800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным [11] по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов.

Рассчитывали средние арифметические ( $\bar{x}$ ), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ( $\Delta \bar{x}$ ). Все расчёты проводили для уровня значимости  $\alpha=0,05$ . В таблицах и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ( $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Накопительное культивирование было организовано от первоначальной плотности культуры  $0,12 \text{ г ОВ}\cdot\text{л}^{-1}$  (грамм органического вещества на 1 л). Накопительные кривые для всех трёх культиваторов были аналогичны и имели типичную S-образную форму, культура достигла стационарной плотности на уровне  $4,3 \text{ г ОВ}\cdot\text{л}^{-1}$  (рис. 1).

С началом квазинепрерывного режима происходило систематическое внесение биогенов в культуру, причём, поскольку удельная скорость потока была одинаковой для всех экспериментальных культиваторов, количество азота вносимого в культуру было одинаковым. При высоких удельных скоростях потока в условиях полного минерального и углеродного обеспечения максимальное накопление биомассы водорослей может ограничиваться, а значит, и определяться, поверхностной освещённостью культуры [8]. Для проверки данного предположения на третьем этапе для двух культиваторов поверхностная освещённость была изменена с  $80 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  на 19 и  $190 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  при неизменной удельной скорости потока.

При этом плотность культуры достигла стационарного динамического равновесия на 19 – 24 сутки, причём она составила: при поверхностной освещённости  $190 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  –  $2,4 \text{ г ОВ}\cdot\text{л}^{-1}$ , при  $80 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  –  $1,42 \text{ г ОВ}\cdot\text{л}^{-1}$ , при  $19 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  –  $0,45 \text{ г ОВ}\cdot\text{л}^{-1}$  (рис. 1).

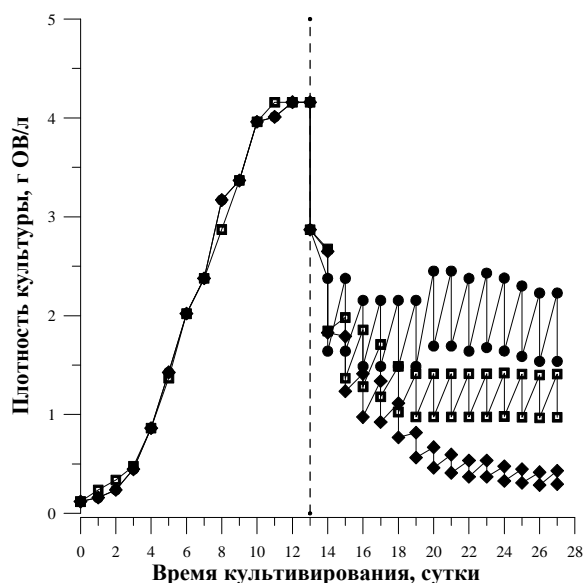


Рис. 1. Динамика плотности накопительной и квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* Теод. при различной освещённости:  $190 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  (●),  $80 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  (■),  $19 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  (◆);

пунктирная линия – граница накопительного и квазинепрерывного культивирования

Повышение поверхностной освещённости в 2,4 раза вызвало увеличение плотности культуры в 1,7 раза, а уменьшение в 4,2 раза привело к уменьшению плотности культуры в 3,2 раза, что свидетельствует об ограничении скорости роста культуры при данных условиях только интенсивностью освещения. Для данных условий, при значениях поверхностной освещённости отличающихся в 10 раз, разница по плотности культуры составляла более чем 5 раз. Таким образом, показана возможность управления плотностью культуры за счёт регулирования интенсивности поверхностной освещённости.

Содержание пигментов в клетках микроводорослей является величиной, зависящей от многих факторов: рН, температуры, минерального и углеродного питания, световых и других условий культивирования клеток [12–17]. Важнейшим из этих факторов является действующий и поглощаемый световой поток.

Изменение поверхностной освещённости оказывало значительное влияние не только на плотность культуры *D. salina*, но и на содержание пигментов в клетках микроводоросли (табл. 1).

**Таблица 1**

**Содержание пигментов в клетках *Dunaliella salina* при различном уровне поверхностной освещённости ( $\omega=0,32 \text{ сут}^{-1}$ )**

Освещённость, Вт·м <sup>-2</sup>	ХЛ <i>a</i> , % ОВ	ХЛ <i>b</i> , % ОВ	Кар, % ОВ
19	3,62±0,27	0,86±0,13	1,08±0,13
80	2,77±0,15	0,60±0,06	0,92±0,13
190	2,16±0,23	0,46±0,09	0,88±0,13

При одинаковой удельной скорости протока (0,32 сут<sup>-1</sup>), и поверхностной освещённости отличающейся на порядок (19 и 190 Вт·м<sup>-2</sup>), в соответствии с литературными данными, с понижением освещённости наблюдалось повышение относительного содержания хлорофиллов до максимальных значений (3,62 и 0,86 % ОВ для хлорофиллов *a* и *b* соответственно), а при максимальных значениях поверхностной освещённости для данного эксперимента получены минимальные значения содержания хлорофиллов (2,16 и 0,46 % ОВ для хлорофиллов *a* и *b* соответственно).

Таким образом, увеличение поверхностной освещённости в 10 раз вызвало снижение относительного содержания хлорофилла *a* в клетках *D. salina* в 1,7 раза, а хлорофилла *b* – в 1,9 раза. Что касается суммарных каротиноидов, то в проведённом эксперименте с увеличением поверхностной освещённости зарегистрирована тенденция к понижению относительного содержания каротиноидов (от 1,08±0,131 до 0,88±0,129 % ОВ). Согласно имеющимся в литературе сведениям, содержание определенной части каротиноидов, относящихся к фотосинтетически активным, изменяется пропорционально содержанию хлорофилла *a* [18], а повышение относительного содержания каротиноидов в клетках при повышенной облучённости происходит только за счёт увеличения доли фотопротекторов [19]. Однако в



проведённом эксперименте не было зарегистрировано значительного повышения относительного содержания каротиноидов при изменении поверхностной освещённости до максимальных значений для данного эксперимента (от 80 до 190 Вт·м<sup>-2</sup>) (табл. 1). Вероятно, при увеличившейся плотности культуры в 5,3 раза удельная освещённость клеток изменилась незначительно, что не вызвало роста доли фотопротекторов.

Действие света на водоросли проявляется не только в качестве источника энергии для метаболических процессов, протекающих в клетке, но и в качестве регулятора процессов. Механизм явления световой адаптации далеко не ясен, однако многочисленные проведённые исследования указывают на однозначное действие света на пигменты: с ростом интенсивности света содержание пигментов в единице биомассы уменьшается. Такая реакция пигментов микроводорослей объясняется тем, что в них под действием интенсивного света наравне с синтезом происходит деструктивное фотоокисление пигментов [20].

Вероятно, при увеличившейся плотности культуры (от 1,42 до 2,4 г ОВ·л<sup>-1</sup>) на фоне роста поверхностной освещённости от 19 до 190 Вт·м<sup>-2</sup> фотоадаптационные процессы были незначительны в связи с несущественно изменившимися условиями удельной освещённости клеток, что не вызвало роста содержания каротиноидов за счёт увеличения доли фотопротекторов. Относительное содержание всех фотосинтетических пигментов при понижении освещённости до 19 Вт·м<sup>-2</sup> увеличилось, отрицательно коррелируя с плотностью биомассы, что свидетельствует о превалирующем действии светового фактора на относительное содержание пигментов в клетках микроводоросли (табл. 1).

Известно, что продуктивность культур микроводорослей может значительно варьировать при изменении условий культивирования. Увеличение поверхностной освещённости в 10 раз вызывает повышение продуктивности культуры *D. salina* по биомассе в 5,5 раза, по хлорофиллу *a* – в 2,6 раза, по хлорофиллу *b* – в 2 раза, а по суммарным каротиноидам – в 3 раза.

**Таблица 2**

**Продуктивность культуры *Dunaliella salina* при различном уровне  
поверхностной освещённости ( $\omega=0,32$  сут<sup>-1</sup>)**

Поверхностная освещённость, Вт·м <sup>-2</sup>	Продуктивность, мг·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>			
	Биомасса	ХЛ <i>a</i>	ХЛ <i>b</i>	Каротиноиды
19	140±4	6,44±0,67	1,74±0,23	2,10±0,08
80	450±4	12,42±0,63	2,72±0,22	4,15±0,38
190	770±10	16,85±1,26	3,42±0,60	6,61±0,50

Уровень продуктивности культуры по пигментам определяется как продуктивностью культуры по биомассе, так и относительным содержанием данного компонента. Наблюдаемый рост продуктивности культуры *D. salina* по пигментам обусловлен увеличением продуктивности по биомассе, так как, при

увеличении поверхностной освещенности относительное содержание пигментов снижается.

Оптимизация лабораторного режима получения высокопродуктивных культур микроводорослей достигается за счет повышения эффективности использования культурой биогенных элементов и световой энергии. Используемая в опыте питательная среда рассчитана на получение более 4 г биомассы микроводоросли *D. salina* с 1 л культуры. При скорости протока среды  $\omega=0,32 \text{ сут}^{-1}$  в экспериментальные культиваторы поступало ежедневно 96 мг азота, что позволяло получить 0,96 – 1,20 г биомассы с 1 л культуры в сутки [21]. Экспериментально показано, что увеличение поверхностной освещенности в 4 раза вызывает рост продуктивности культуры более чем в 3 раза, как по биомассе, так и по пигментам. Дальнейшее увеличение освещенности в 2,4 раза вызывает рост продуктивности культуры по биомассе в 1,7 раза, а по пигментам в 1,3 – 1,6 раза. Однако даже при максимальной поверхностной освещенности продуктивность культуры в эксперименте в 1,2 – 1,5 раза ниже, чем максимально возможные расчетные значения (0,96 – 1,20 г/л в сутки). Это свидетельствует о наличии большого числа нерешенных проблем в данной области и оставляет простор для продолжения исследований и поиска путей повышения продуктивности культуры *D. salina*. Возможно комбинация действующих факторов повышенной освещенности и обеспеченности углеродом [22] вызовет более значительное увеличение продуктивности культуры микроводоросли *D. salina*. При успешном решении ряда научных и технических задач по оптимизации методов и режимов культивирования *D. salina* задача повышения продуктивности данной культуры будет выполнена.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что изменение поверхностной освещенности при квазинепрерывном выращивании *D. salina* оказывает разнонаправленное действие на продуктивность (скорость роста) культуры и относительное содержание фотосинтетических пигментов. Содержание пигментов в биомассе *D. salina* в диапазоне поверхностной освещенности 19 – 190 Вт·м<sup>-2</sup> снижается на 20 – 40 %, а продуктивность культуры возрастает в 5,5 раза. Максимальное содержание фотосинтетических пигментов в биомассе *D. salina* отмечено при поверхностной освещенности 19 Вт·м<sup>-2</sup>, а продуктивности – при 190 Вт·м<sup>-2</sup>.

При использовании плотных культур, когда фактором, лимитирующим рост, является обеспеченность световой энергией, а не субстратом, максимизация урожая определяется освещенностью клеток культуры. Экспериментально показано, что для получения биомассы *D. salina* с повышенным содержанием пигментов рекомендуется освещенность – 19 Вт·м<sup>-2</sup>, а для получения максимальной продуктивности, как по биомассе, так и по пигментам – 190 Вт·м<sup>-2</sup>.

Рост продуктивности культуры микроводоросли априори подразумевает рост ассимиляции биогенных элементов из культуральной среды. Переход от стадии накопления биомассы к стадии накопления каротина у культуры *D. salina* возможен только при исчерпании биогенных элементов в среде. Таким образом, оптимизация первой стадии выращивания *D. salina* позволит проводить исследования, а в

дальнейшем, возможно, наладить промышленное производство плотной высокопродуктивной культуры данной микроводоросли.

### Список литературы

1. Абдуллаев А.А. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Теод. и некоторые её физиологические характеристики / А.А. Абдуллаев, В.Е. Семененко // Физиол. раст. – 1974. – Т. 21. – Вып. 6. – С. 1145–1153.
2. Биотехнология культивирования гидробионтов / В.Д. Романенко, Ю.Г. Крот, Л.А. Сиренко, В.Д.Соломатина – Киев, 1999. – 264 с.
3. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Теод. / Н. П. Масюк. – К. : Наук. думка, 1973. – 487 с.
4. Growth and biochemical composition of four *Dunaliella* strains to be used in aquaculture. / A. Vasquez-Suarez, M. Guevara, G. Salazar [et al] // Bol. Cent. Invest. Biol. (Maracaibo). – 2007. – Vol. 41, No 2. – P. 181–194.
5. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor / M. Garcia-Gonzalez, J. Moreno, J. C. Manzano [et al] // J. Biotechnol. – 2005. – Vol. 115. – P. 81–90.
6. Zhu Y. H. Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of  $\beta$ -carotene / Y. H. Zhu, J. G. Jiang // Eur. Food Res. Technol. – 2008. – Vol. 227. – P. 953–959.
7. Боровков А. Б. Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Теод.: автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.17 «Гидробиология» / А. Б. Боровков. – Севастополь, 2008. – 28 с.
8. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре : автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. биол. наук : спец. 03.00.02 «Биофизика» / Р. П. Тренкеншу. – Красноярск, 1984. – 28 с.
9. Тренкеншу Р. П. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. / Р. П. Тренкеншу, В. Н. Белянин // Биология моря. – 1979. – № 51. – С. 41–46.
10. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – К. : Наук. думка, 1975. – 247 с.
11. Wellburn A. R. The Spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution / A. R. Wellburn // J. Plant Phys. – 1994. – Vol. 144. – P. 307–313.
12. Мурадян Е. А. Влияние экстремально высокой концентрации CO<sub>2</sub> на функциональное состояние фотосинтетического аппарата и обмен липидов *Dunaliella salina* : автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Физиология и биохимия растений»/ Е.А.Мурадян. – Москва, 2003. – 27 с.
13. Семененко В. Е. Параметрическое управление биосинтезом бета-каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры / В. Е. Семененко, А. А. Абдуллаев // Физиология растений. – 1980. – Т. 27, № 1. – С. 31–41.
14. Ben-Amotz A. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta) / A. Ben-Amotz // J. Plant. Physiol. – 1987. – Vol. 131. – P. 479–487.
15. Finenko Z. Z. Phytoplankton carbon to chlorophyll a ratio: Response to light, temperature and nutrient limitation / Z. Z. Finenko, N. Hoepffner, R. Williams, S. A. Piontkovski // Морс. эколог. журн. – 2003. – Т. 2, No 2. – С. 40–64.
16. Levasseur, M. Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources / M. Levasseur, P. A. Thompson, P. J. Harrison // J. Phycoll. – 1993. – Vol. 29. – P. 587–595.
17. Loeblich L. A. Photosynthesis and pigment influenced by light intensity and salinity in the halophilic *Dunaliella salina* (Chlorophyta) / L. A. Loeblich // J. Mar. Biol. Ass. U.K. – 1982. – Vol. 62. – P. 493–508.
18. Ruecker J. Responses of carotenoids and chlorophylls to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae / J. Ruecker, J. G. Kohl, K. Kaiser // Arch. Hydrobiol. Suppl. – 1995. – Vol. 108, No 77. – P. 51–65.

19. Финенко З.З. Пигменты микроводорослей / Под ред. Ю.Н. Токарева, З.З. Финенко, Н.В. Шадрина; НАН Украины, Институт биологии южных морей. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – С. 237–267.
20. Фотодеструкция фотосинтетических пигментов цианобактерий / С.И. Погосян, М.Н. Мерзляк, Ю.Н. Кауров и др. // II съезд биофизиков России. – М., 1999. (раздел 14: Фотобиология).
21. Упитис В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Рига : Зинатне, 1983. – 320 с.
22. Лелеков А. С. Моделирование роста и биосинтеза морских микроводорослей в квазинепрерывной культуре : автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.17 «Гидробиология» / А. С. Лелеков. – Севастополь, 2009. – 26 с.

**Боровков А.Б. Продукційні характеристики квазібезперервної культури *Dunaliella salina* при різній освітленості / А.Б. Боровков, І.Н. Гудвілович // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 29-38.**

Проведена порівняльна оцінка впливу світлового фактора на продуктивність, швидкість накопичення пігментів інтенсивної культури *Dunaliella salina* і відносний вміст пігментів в її клітинах. Варіювали освітленість робочої поверхні культиваторів – 19, 80 і 190 Вт/м<sup>2</sup>. Максимальна продуктивність культури спостерігалася у варіанті з найбільшою поверхневою освітленістю і складала 0,77 г·л<sup>-1</sup>·доба<sup>-1</sup> по біомасі та 6,6 мг·л<sup>-1</sup>·доба<sup>-1</sup> по каротиноїдам. Максимальний вміст фотосинтетичних пігментів у біомасі *D. salina* відзначено при поверхневій освітленості 19 Вт/м<sup>2</sup>.

Експериментально показано, що рівень освітленості робочої поверхні культиватора істотно впливає як на швидкість росту культури микроводорості, так і на накопичення пігментів в її клітинах.

**Ключові слова:** *Dunaliella salina*, освітленість, продуктивність, вміст пігментів.

## **PRODUCTION CHARACTERISTICS OF SEMICONTINUOUS CULTURES *DUNALIELLA SALINA* TEOD. UNDER DIFFERENT IRRADIANCE**

***Borovkov A.B., Gudvilovich I.N.***

*Institute of Biology of Southern Seas of NASU, Sevastopol, Ukraine  
E-mail: spirit2000@ua.fm*

Irradiance conditions for the microalgae growth are the factors, which define its productivity with no limits in mineral nutrition elements.

The aim of research was study of surface irradiance influence on pigments content and on productivity characteristics of microalgae *D. salina*. The culture was grown in semicontinuous regime, specific flow rate was 0,32 day<sup>-1</sup>. The irradiance of cultivators' operational surface was varied – 19, 80 and 190 Watt·m<sup>-2</sup>. Comparative estimation of irradiance factor influence on productivity, accumulation of pigments and pigments content in cells of microalgae *D. salina* was conducted.

It was shown by experiment that irradiance level of cultivator's operational surface has considerable effect on culture density, growth rate, and also on pigments accumulation in cells of microalgae *D. salina*. Surface irradiance increase by a factor of 2,4 (from 80 to 190 Watt·m<sup>-2</sup>) caused 1,7 times culture density growth (from 1,42±0,11 to 2,40±0,11 g DWFA·l<sup>-1</sup>), and decrease by a factor of 4,2 (from 80 to 19 Watt·m<sup>-2</sup>) led to 3,2 times culture density diminution (from 1,42±0,11 to 0,45±0,04 g DWFA·l<sup>-1</sup>), what indicates that culture density under defined conditions was limited only to irradiation intensity.

It was shown, that relative content of chlorophyll *a* in *D. salina* cells decreased 1,7 times (from  $3,62 \pm 0,27$  to  $2,16 \pm 0,23$  % DWFA) and chlorophyll *b* content decreased 1,9 times (from  $0,86 \pm 0,13$  to  $0,46 \pm 0,09$  % DWFA) with the surface irradiation enhancement by a factor of 10. As for the total amount of carotenoids, a tendency to its relative content reduction (from  $1,08 \pm 0,13$  to  $0,88 \pm 0,13$  % DWFA) was registered during experiment with the surface irradiation intensification. Probably, specific cells irradiance changed slightly with the 5,3 times increase of culture density, which has not caused photo protectors part growth.

It was experimentally shown that surface irradiance increase by a factor of 10 caused 5 times increase in *D. salina* productivity of biomass (from  $0,14 \pm 0,04$  to  $0,77 \pm 0,10$  g DWFA $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ day $^{-1}$ ), 2,6 times increase in productivity of chlorophyll *a* (from  $6,44 \pm 0,67$  to  $16,85 \pm 1,26$  mg $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ day $^{-1}$ ), 2 times increase in productivity of chlorophyll *b* (from  $1,74 \pm 0,23$  to  $3,42 \pm 0,60$  mg $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ day $^{-1}$ ), and 3 times increase in productivity of total carotenoids (from  $2,10 \pm 0,08$  to  $6,61 \pm 0,50$  mg $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ day $^{-1}$ ). Highest culture productivity was observed with the most intensive irradiation and made up  $0,77$  g $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ day $^{-1}$  for biomass and  $6,6$  mg $\cdot$ l $^{-1}$  $\cdot$ day $^{-1}$  for carotenoids. Maximum content of photosynthetic pigments in *D. salina* biomass was marked by irradiation  $19$  Watt $\cdot$ m $^{-2}$ .

It was demonstrated that *D. salina* pigments productivity increase accounted for the biomass productivity growth, due to decrease of relative pigments content with the surface irradiation enhancement.

**Keywords:** *Dunaliella salina*, semicontinuous culture, irradiance, productivity, pigments content.

#### References

1. Abdullayev A. A. and Semenko V. E., Intensive culture of *Dunaliella salina* Teod. and its some physiological characteristics, *Physiol. plants*, **21**, 1145 (1974).
2. Romanenko V. D., Krot Yu. G., Sirenko L. A., Solomatina V. D., *Biotechnology of hydrobionts cultivation*, p. 264 (Institute of Hydrobiology of NASU, 1999).
3. Masyuk N. P., *Morphology, systematization, ecology, geographical distribution of genus Dunaliella Teod.*, p. 487 (Scient. Thought, 1973).
4. Vasquez-Suarez A., Guevara M., Salazar G., Arredondo-Vega B., Cipriani R., Lemus N., Lodeiros C., Growth and biochemical composition of four *Dunaliella* strains to be used in aquaculture, *Bol. Cent. Invest. Biol.*, **41**, 181 (2007).
5. Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Manzano J. C., Florencio F. J., Guerrero M. G., Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor, *J. Biotechnol.*, **115**, 81 (2005).
6. Zhu Y. H., Jiang J. G., Continuous cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactor for the production of  $\beta$ -carotene, *Eur. Food Res. Technol.*, **227**, 953 (2008).
7. Borovkov A. B. Dynamics of pigments and growth of microalgae in chemostat for example *Dunaliella salina* Teod., 28 p. (Ribest, Sevastopol, 2008).
8. Trenkenshu R. P. Growth and photoenergy characteristics of marine microalgae in a dense culture, 28 p (Institute of Physics press, Krasnoyarsk, 1984).
9. Trenkenshu R. P., Belyanin V. N., Influence of mineral nutrients on the productivity of algae *Platymonas viridis* Rouch., *Mar. Biol.* – **51**, 41 (1979).
10. Sirenko L. A. *Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice*, p. 247 (Scient. Thought, 1975).
11. Wellburn A. R. The Spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Phys.*, **144**, 307 (1994).

12. Muradyan E. A. Effect of extremely high CO<sub>2</sub> concentration on the functional state of the photosynthetic apparatus and lipid metabolism *Dunaliella salina*, 27 p. (MSU, Moscow, 2003).
13. Semenenko V. E., Abdullayev A. A., Parametric control of the beta-carotene biosynthesis in *Dunaliella salina* cells in mass culture, *Plant. physiol.*, **27**, 31 (1980).
14. Ben-Amotz A. Effect of irradiance and nutrient deficiency on the chemical composition of *Dunaliella bardawil* Ben Amotz and Avron (Volvocales, Chlorophyta), *J. Plant. Physiol.*, **131**, 479 (1987).
15. Finenko Z. Z., Hoepffner N., Williams R., Piontkovski S. A., Phytoplankton carbon to chlorophyll a ratio: Response to light, temperature and nutrient limitation, *Mar. J. Ecol.*, **2**, 40 (2003).
16. Levasseur M., Thompson P. A., Harrison P. J., Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources, *J. Phycol.*, **29**, 587 (1993).
17. Loeblich L. A., Photosynthesis and pigment influenced by light intensity and salinity in the halophilic *Dunaliella salina* (Chlorophyta), *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **62**, 493 (1982).
18. Ruecker J. J., Kohl G., Kaiser K., Responses of carotenoids and chlorophylls to variations of growth-limiting factors in three filamentous blue-green algae, *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, **108**, 51 (1995).
19. Tokarev Yu. N., Finenko Z. Z., Shadrin N. V., *Black Sea microalgae*, 172 p. (EKOSI- Hydrophysics, 2008).
20. Pogosyan S. I., Merzlyak M. N., Kaurov Yu. N., Lehimena L., Davletshina L. N., Photodestruction of photosynthetic pigments of cyanobacteria, *Abstracts of II Congress of Russian biophysicists*. – (MSU, Moscow, 1999).
21. Upitis V. V. Macro- and micronutrients in the optimization of mineral nutrition microalgae, 320 p. (Zinatne, 1983).
22. Lelekov A. S. Modelling of growth and biosynthesis of sea microalgae in semicontinuous culture, 26 p. (DigitPrint, Sevastopol, 2009).

Поступила в редакцию 12.01.2014 г.

УДК 577.152.34:612.62:616

## ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОГО И ОПУХОЛЕВОГО ЭНДОМЕТРИЯ

*Вовчук И.Л.*

*Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, Одесса, Украина  
E-mail: irvov@mail.ru*

Исследовано влияние катионов двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированной и опухолевых тканей эндометрия женщин. Установлено, что исследованные катионы двухвалентных металлов проявляли ингибирующее действие на активность карбоксипептидазы А как непораженного, так и опухолевого эндометрия, однако величина ингибирующего воздействия была неодинаковой. Фермент, выделенный из доброкачественной опухоли эндометрия наиболее чувствителен к воздействию катионов двухвалентных металлов.

**Ключевые слова:** карбоксипептидаза А, опухоль, эндометрий.

### ВВЕДЕНИЕ

Лизосомальная карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1), которая гидролизует аминокислоты с С-конца (за исключением аргинина, лизина и пролина) выделена в высокоочищенном состоянии из некоторых тканей человека: поджелудочной железы [1, 2], легких [3], кожи [3] и почек [4].

Согласно исследованиям некоторых авторов катионы тяжелых металлов, такие как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  оказывают ингибирующее действие на активацию и каталитическую активность протеаз, в то время как влияние  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  - малоэффективно [5–8].

По литературным данным большинство карбоксипептидаз являются либо классическими металлоферментами, либо металлозависимыми пептидазами, для проявления активности которых необходимы определенные катионы одно- или, чаще всего – двухвалентных металлов [9–11].

Для большинства известных карбоксипептидаз ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  являются активаторами, а ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , в большинстве случаев – стабилизатором активности фермента [9–12]. Однако, данные о структуре и физико-химических свойствах выделенных ферментов в большинстве случаев неполные.

В связи с этим цель наших исследований состояла в изучении влияния солей двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из ткани немалигнизированного эндометрия, доброкачественной и злокачественной опухолей эндометрия женщин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования был предоставлен патоморфологической лабораторией Одесского областного онкологического диспансера. Патоморфологическую и гистологическую верификацию диагнозов по требованиям ВОЗ [13] проводили гистологи сертифицированной и лицензированной патоморфологической лаборатории Одесского областного онкологического диспансера. Взятие анатомических материалов для исследований, соблюдение этических и правовых норм согласно: Хельсинской декларации (1964 г.), Конвенции о защите прав и достоинств человека в связи с использованием достижений биологии и медицины (Конвенция о правах человека и биомедицине 1996 г.), закона Украины «О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку» (1999 г.) обеспечивалось медицинским учреждением, предоставляющим материал для исследования, согласно договору о совместных исследованиях.

Для исследования влияния катионов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированного и опухолевого эндометрия, 0,1 мл раствора фермента и 0,1 мл раствора катиона в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М инкубировали в течение 60 мин при температуре 37 °С. Об эффективности действия катионов судили по величине гидролиза 2,0 мМ карбобензоксиглутамилфенилаланина за 30 мин инкубации при 37 °С при рН 5,2 [14, 15]. Использовали водные растворы солей двухвалентных металлов: хлоридов  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и ацетатов -  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Ингибирование либо активирование фермента выражали в процентах по отношению к его активности в пробе без катиона двухвалентного металла.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Стьюдента [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что при оптимальном значении рН 5,2 активность карбоксипептидазы А немалигнизированного эндометрия и доброкачественной опухоли эндометрия снижалась в присутствии катионов, являющихся наиболее распространенными активаторами или стабилизаторами металлоферментов (рис. 1). Все исследованные катионы двухвалентных металлов проявляли ингибирующее действие на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного эндометрия, фермента доброкачественной и злокачественной опухоли эндометрия.

В отличие от фермента немалигнизированного эндометрия и фермента доброкачественной опухоли эндометрия, активность фермента, выделенного из злокачественной опухоли эндометрия повышалась в 1,8 раза в присутствии ионов свинца и в 2,4 раза – в присутствии ионов цинка.

Наиболее чувствительной к воздействию как ионов тяжелых металлов так и к воздействию металлов-активаторов и стабилизаторов является карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли эндометрия, активность которой в присутствии этих модификаторов снижалась в среднем на 51,0 % (рис. 1). Активность карбоксипептидазы А немалигнизированного эндометрия на 16,7 % снижалась в присутствии  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , а остальные катионы, включая и катионы тяжелых



металлов проявляли более выраженное ингибирующее действие и снижали активность фермента на 44,4 – 94,4 % (рис.1).

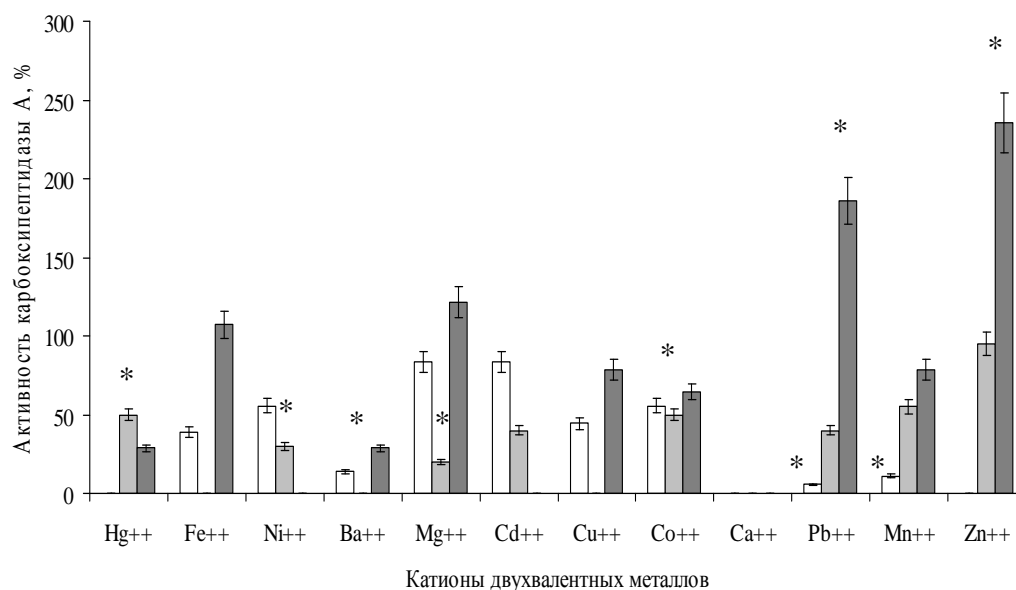


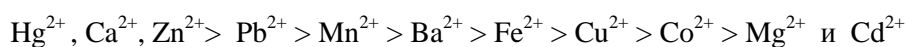
Рис. 1. Влияние катионов двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного и опухолевого эндометрия (n = 6)

*Примечание:* активность фермента представлена в % по отношению показателям контроля (0,1 мл раствора фермента без катионов, прогретый 60 минут при 37°C), принятым за 100%; P < 0,05 по отношению к контролю. □ – немалигнизированный эндометрий; ▒ – доброкачественная опухоль; ■ – злокачественная опухоль.

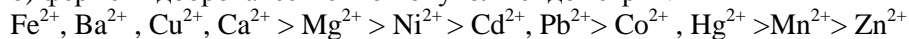
Активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли эндометрия значительно снижалась в присутствии Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> и Ba<sup>2+</sup>, (в среднем на 76,7 %), а ингибирующий эффект остальных катионов не превышал 21,4 – 35,7 % (рис. 1).

В ряду катионов чувствительность карбоксипептидазы А эндометрия к действию катионов двухвалентных металлов снижается:

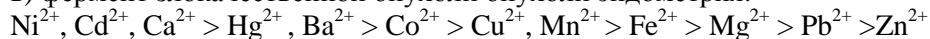
а) фермент немалигнизированного эндометрия:



б) фермент доброкачественной опухоли эндометрия:



в) фермент злокачественной опухоли эндометрия:



Полученные нами результаты частично совпадают с результатами исследований других авторов [17, 18, 19], которые установили усиленную сорбцию ионов никеля гепатоцитами крыс [18] и показали, что активность карбоксипептидазы А кишечника крыс снижается в присутствии ионов кадмия [19].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют сделать заключение, что катионы исследованных двухвалентных металлов негативно влияют на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного и опухолевого эндометрия. Фермент, выделенный из доброкачественной опухоли эндометрия наиболее чувствителен к воздействию катионов двухвалентных металлов и металлов-модификаторов. Активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли эндометрия увеличивается в 2,0 – 2,5 раза в присутствие ионов  $Pb^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ .

### Список литературы

1. Marinkovic D.V. Studies of human carboxypeptidase A purification and properties from human pancreas / D. V. Marinkovic, J. N. Marinkovic // *Biochem. Med.* – 1975. – Vol. 14, No 1. – P. 125 – 134.
2. Moulard M. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase A / M. Moulard, T. Michon, B. Kerfelec [et al.] // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 261, No 1. – P. 179-183.
3. Goldstein S. M. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, J. T. Kealey [et al.] // *J. Clin. Invest.* - 1989. - V. 83, No 5. - P. 1630-1636.
4. Michel A. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A / A.Michel, J. Nortier, A. Humblet [et al.] // *Peptides.* – 1998. – Vol. 19. –No 5. – P. 907–912.
5. Stack S. The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen / S.Stack, M. Gonzalez-Gronow, S.V. Pizzo // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 1991. – Vol. 284, No 1. – P. 58–62.
6. McGrath M. E. Structure of an engineered, metal-actuated switch in trypsin / M.E. McGrath, B.L.Haymore, N.L. Summers [et al.] // *Biochemistry.* – 1993. – Vol. 32, No 8. – P. 1914–1919.
7. Nowak P. Effects of metal ions on activity of plasmin / P. Nowak, A. Zgirski // *Biological Trace Element Research.* – 2003. – Vol. 93, No 1–3. – P. 87–94.
8. Соколовская Л. И. Индукция каталитической активности плазминогена моноклональным антителом IV-1с в присутствии двухвалентных катионов металлов и  $\alpha 2$  плазминогена / Л.И.Соколовская, А. Ю. Сломинский, Г. Л. Волков // *Биохимия.* – 2006. – Т. 71, № 6. – С. 778–785.
9. Пилявская А. С. Выделение и свойства карбоксипептидазы *Streptomyces Griseus*: дисс. канд. биол. наук : 03.00.04 / Пилявская Анна Соломоновна. – К., 1977. – 133 с.
10. Austin B. P. The substrate specificity of *Metarhizium anisopliae* and *Bos taurus* carboxypeptidases A: insights into their use as tools for the removal of affinity tags / B. P. Austin, J. Tözsér, P. Bagossi [et al.] // *Protein Expression and Purification.* – 2011. – Vol. 77, No 1. – P. 53–61.
11. Reznik S. E. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding / S. E. Reznik, L. D. Friker // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2001. – Vol. 58, No 12–13. – P.1790–1804.
12. Колодзейская М. В. Пептидазы / М. В. Колодзейская, А. С. Пилявская. – Киев: Наук. Думка, 1982. – 176 с.
13. Хмельницкий О. К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний / О.К. Хмельницкий – Санкт-Петербург: Сотис, 1994. – С. 155–300.
14. Bradshaw R.A. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / R.A. Bradshaw, K.A. Walsh, H. Neurath // *Biochemistry.* – 1971. – Vol. 10, No 6. – P. 951–961.

15. Олешко Г. И. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г.И. Олешко, Т. И. Ярыгина, Е. В. Зорина [и др.] // Фармация. – 2011. – № 3. – Р. 14–17.
16. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич - К.: Морион, 2000. — 320 с.
17. Alonso-del-Rivero M. A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases / M. Alonso-del-Rivero, S.A. Trejo, M. Rodríguez de la Vega [et al.] // FEBS J. – 2009. – Vol. 276, № 17. – P. 4875 – 4890.
18. Shimada H. The effects of sulfhydryl blockers and metal ions on nickel accumulation by rat primary hepatocyte cultures / H. Shimada, T. Funakoshi, T. Inoue [et al.] // Toxicology Letters. – 2000. – Vol. 118, № 1 – 2. – P. 87 – 92.
19. Eriyamremu G. E. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium / G. E. Eriyamremu, S. O. Asagba, E.C. Onyeneke [et al.] // Biometals. - 2005. – Vol. 18, № 1. – P. 1 – 6.

**Вовчук І.Л.** Вплив катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази а немалігнізованого та пухлинного ендометрія / І.Л. Вовчук // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 39-45.

Досліджено вплив катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А, яка була отримана із немалігнізованої та пухлинних тканин ендометрія жінок. Встановлено, що досліджені катіони двовалентних металів проявляли інгібуючу дію на активність карбоксипептидази А як неуразженого, так і пухлинного ендометрія, однак впотужність інгібуючого впливу була неоднаковою. Фермент, який був виділений із доброякісної пухлини ендометрія найбільш чутливий до впливу катіонів двовалентних металів.

**Ключові слова:** карбоксипептидаза А, пухлина, ендометрій.

## INFLUENCE OF CATIONS OF BIVALENT METALS ON ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE A NON MALIGNANT AND TUMOR ENDOMETRIUM

*Vovchuk I.L.*

*Odessa National University of I.I. Mechnikov, Odessa, Ukraine  
E-mail: irvov@mail.ru*

For the majority of known carboxypeptidases ions Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> are activators, and ions Ca<sup>2+</sup>, in most cases – the stabilizer of activity of enzyme. However, data on structure and physical and chemical properties of the purified enzymes in most cases the inexact.

The purpose of researches - studying of influence of salts of divalent metals on activity of a carboxypeptidase A, purified from nonmalignant tissues, benign and malignant tumors of endometrium of women. Effectiveness of effect of cations determined by hydrolysis 2,0 mm carbobenzoxyglutamylphenylalanine at 30 min an incubation at 37 °C at pH 5,2. The inhibition or activation of enzyme expressed as a percentage in relation to its activity in test without cation of divalent metal. Statistical processing of results carried out by means of a student criterion.

Influence of cations of divalent metals on activity of carboxypeptidase A purified from non malignant and tumour tissues of endometrium of women was investigated. Investigational cations of divalent metals inhibited activity of carboxypeptidase A as the

non malignant, so tumour endometrium, however much a size of influence was different. Unlike of enzyme from nonmalignant endometrium and enzyme of a benign tumor of endometrium, activity of the enzyme purified from a malignant tumor of endometrium increased by 1,8 times in the presence of ions of  $Pb^{2+}$  and by 2,4 times – in the presence of  $Zn^{2+}$  ions.

The most sensitive to influence as ions of heavy metals and to influence of metals activators and stabilizers is carboxypeptidases A of benign tumor of endometrium which activity in the presence of these modifiers decreased on the average by 51,0%. Activity of a carboxypeptidase A of nonmalignant endometrium decreased by 16,7% in the presence of  $Cd^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  and other cations, including cations of heavy metals showed more expressed inhibiting action and reduced activity of enzyme by 44,4 – 94,4%. Activity of a carboxypeptidase A of malignant tumor of endometrium considerably decreased in the presence of  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  (on the average for 76,7%) and the inhibiting effect of other cations did not exceed 21,4 – 35,7%.

Enzyme which purified from the tumour of endometrium most sensible to influence of cations of bivalent metals. Activity of a carboxypeptidase A of malignant tumor of endometrium increases by 2,0 – 2,5 times in presence of ions of  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ .

**Keywords:** carboxypeptidase A, tumor, endometrium

#### References

1. Marinkovic D.V. Marinkovic J.N. Studies of human carboxypeptidase A purification and properties from human pancreas, *Biochem. Med.*, **14**, 125 (1975).
2. Moulard M., Michon T., Kerfelec B., Chapus C. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase Aю, *FEBS Lett.*, **261**, 179 (1990).
3. Goldstein S.M. Kaempfer C.E., Kealey J.T., Wintroub B.U. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization, *J. Clin. Invest.*, **83**, 1630 (1989).
4. Michel A., Nortier J., Humblet A., Paradis C., De Prez E., Deschodt-Lanckman M. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A, *Peptides.*, **19**, 907 (1998).
5. Stack S., Gonzalez-Gronow M., Pizzo S.V. The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen, *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, **284**, 58 (1991).
6. McGrath M.E., Haymore B.L., Summers N.L., Craik C.S., Fletterick R.J. Structure of an engineered, metal-actuated switch in trypsin, *Biochemistry.*, **32**, 1914 (1993).
7. Nowak P., Zgirska A. Effects of metal ions on activity of plasmin, *Biological Trace Element Research.*, **93**, 87 (2003).
8. Sokolovskaya L.I., Slominskiy A.Yu., Volkov G.L. Induction of the catalytic activity of plasminogen by monoclonal antibody IV-Ic in presence of bivalent metal cations and  $\alpha_2$  antiplasmin, *Biochemistry.*, **71**, 778 (2006).
9. Pilyavskaya A. S. Purification and characterization carboxypeptidase A from Streptomyces Griseus: Diss. for the cand. of boil., 133 (1977)
10. Austin B.P., Tözsér J., Bagossi P., Tropea J.E., Waugh D.S. The substrate specificity of Metarhizium anisopliae and Bos taurus carboxypeptidases A: insights into their use as tools for the removal of affinity, *Protein Expression and Purification.*, **77**, 53 (2011).
11. Reznik S.E., Friker L.D. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding, *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **58**, 1790 (2001).
12. Kolodzeiskaya M.V., Pilyavskaya A.S. Peptidase, Kiev: Science., 1982, 176 p.
13. Khmelnytsky O.K. Patomorfological diagnostics of gynaecological disease, St. Petersburg: Sotic, 1994, 300 p.
14. Bradshaw R.A., Walsh K.A., Neurath H. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A, *Biochemistry.*, **10**, 951 (1971).

15. Zorina E.V., Reshetnikova M.D., Oleshko G.I. Yarygina T.I. Development of a unified procedure to measure the sum of free amino acids in raw medicinal plant materials and extraction preparation, *Pharmatsiya.*, **3**, 14 (2011).
16. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statistics methods in mediko-biologics researches with the use of Excel, K.: Morion, 2000, 320 p.
17. Alonso-del-Rivero M., Trejo S.A., Rodríguez de la Vega M., González Y., Bronsoms S., Canals F., Delfín J., Diaz J., Aviles F.X., Chávez MA. A novel metalcarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*--a step into the invertebrate world of proteases, *FEBS J.*, **276**, 4875 (2009).
18. Shimada H., Funakoshi T., Inoue T., Kojima S. The effects of sulfhydryl blockers and metal ions on nickel accumulation by rat primary hepatocyte cultures, *Toxicology Letters.*, **118**, 87 (2000).
19. Eriyamremu G.E., Asagba S.O., Onyeneke E.C., Adaikpoh M.A. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium, *Biometals.*, **18**, 1 (2005).

*Поступила в редакцию 12.01.2014 г.*

**УДК 612.82:612.014.4**

## **АДАПТАЦІЙНІ РЕАКЦІЇ НЕЙРОСИНАПТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕРГОТРОПНОЇ ЗОНИ ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЛУЖНОГО РАЦІОНУ**

*Заєць Н.С.<sup>1</sup>, Ляшенко В.П.<sup>1</sup>, Бурцева Д.О.<sup>1</sup>, Лукашев С.М.<sup>2</sup>, Мельнікова О.З.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара;*

<sup>2</sup>*Науково-консультативний та лікувально-діагностичний центр Головна біль,  
Дніпропетровськ, Україна;*

<sup>3</sup>*Запорізький державний медичний університет, Запоріжжя, Україна.*

*E-mail: \_nz\_8@ukr.net*

Встановлено, що в умовах лужного раціону, активація адаптаційних реакцій нейросинаптичної активності ерготропної зони гіпоталамуса щурів проявляється в модуляції синхронізуючих та десинхронізуючих процесів, які відбуваються у стійких змінах абсолютної та нормованої потужності електрогіпоталамограми (ЕГтГ) щурів. Виразна десинхронізація ЕГтГ з переважання бета-подібної активності наприкінці експерименту найімовірніше пов'язана з підвищенням частоти пресинаптичного квантування та зменшенням зворотного захоплення медіатора в синаптичних структурах заднього гіпоталамуса. Також розглядаються інші механізми явищ, що спостерігались.

**Ключові слова:** абсолютна потужність, нормована потужність, кислотно-лужна рівновага, водневий показник, ерготропна зона гіпоталамуса, електрогіпоталамограма.

### **ВСТУП**

Однією з сучасних наукових проблем фізіології є дослідження закономірностей процесів адаптації та гомеостазу при дії на організм різноманітних чинників середовища [1].

Встановлено, що центральною ланкою нервової системи яка реагує на дію ушкоджуючого агенту є гіпоталамус. Він входить до ієрархічно організованої системи відділів головного мозку, яка реалізує вісцеральні функції, має найважливіше функціональне значення у формуванні фізіологічної відповіді на вплив зовнішніх подразників, а також бере участь у формуванні цілісних актів поведінки. З цієї точки зору у гіпоталамусі виділяють ерготропні і трофотропні зони, при подразненні яких виникають такі самі ефекти, що і при подразненні симпатичної та парасимпатичної системи. Хоча вказані зони гіпоталамуса не мають чітких меж, більшість дослідників вважає, що гіпоталамічні механізми інтеграції ерготропних реакцій реалізуються переважно в задній його частині. При цьому, функціонування цих систем може бути виявлено у параметрах просторової та частотної організації фонові імпульсної активності при тонкому статистичному аналізі методом багатомірної статистики [2, 3]. Центри гіпоталамуса характеризуються управлінням всіма основними гомеостатичними процесами. Вони

володіють вираженою вибірковістю збудження в залежності від різних змін кислотно-лужного стану який обумовлює сукупність фізико-хімічних та фізіологічних процесів, що забезпечують відносну сталість концентрації іонів водню в рідинах організму [4, 5].

Водневий показник (рН) є життєво важливою константою. Незначні зміни рН рідин організму здатні складати суттєву загрозу, зумовлену зміною активності ферментних систем та порушень інтенсивності і спрямованості ряду метаболічних перетворень різних сполук, транспорту і синтезу метаболітів, перебігу біоенергетичних процесів тощо [6, 7].

Зсув рН залежить від багатьох факторів, один з яких є перманентні компоненти раціону - електролітні домішки, основним джерелом яких є вода з різним водневим показником; вона надходить в організм щоденно і є найважливішим реакційним середовищем, що виконує роль основного пластичного елемента організму. На сьогоднішній день існує безліч кількості суджень та рекомендацій, щодо рН води щоденного раціону і питного водолікування та її дії на організм [8–10]. Однак єдиної думки не існує.

Виходячи з цього, метою даної роботи було як розкриття деяких механізмів регуляції рН так і показати зміни функціонального стану центральної нервової системи при певному значенні водневого показника в перманентних компонентах раціону. Це може допомогти в вирішенні важливих питань діагностики і лікуванні гострих порушень водного, електролітного та кислотно-лужного балансу та при розробці норм гігієнічних вимог до якості питної води.

## **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Експерименти були проведені відповідно з існуючими міжнародними вимогами і нормами гуманного відношення до тварин. Дослідження проведено на нелінійних білих щурах самцях, вагою на початку експерименту 125-140 г. Тварин було поділено на 2 групи. В першу групу ввійшли контрольні тварини (n=44), які перебували за фізіологічних умов і звичайного раціону харчування і питному режиму. Щури другої групи (n=66) тривало вживали гідрокарбонат натрію (NaHCO<sub>3</sub>). Його тварини отримували як безпосередньо в їжу так і з питною водою. Розрахунок кількості NaHCO<sub>3</sub> проводився за принципом 4,9 г на 1 кг (LD50=4,9 г/кг).

У щурів досліджувальних груп відводили електрогіпоталамограму (ЕГТГ) від ерготропної зони гіпоталамусу. Реєстрацію такої активності здійснювали в умовах гострого експерименту через кожні 2 тижні впродовж всього періоду спостережень, тривалість якого дорівнювала 22 тижня. Хірургічна підготовка до відведення ЕГТГ виконувалась після внутрішньоочеривинного введення 20 мг/кг кетаміну та 50 мг/кг тіопенталу натрію. Після фіксації тварин у стереотаксичному приладі і трепанації їх черепу у задню і передню зони гіпоталамусу вводили уніполярний електрод (ніхром, діаметр 100 мкм, лакова ізоляція за винятком кінчика) згідно координатам атласу головного мозку щурів [11]. Референтний електрод закріплювали на вушній раковині тварини.

Електричну активність ерготропної зони гіпоталамусу реєстрували за допомогою поліграфу ПБЧ-01 (Україна), з'єднаному через АЦП з комп'ютером, в

якому записи запам'ятовували у цифровому вигляді. Подальшу їх обробку здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Eksperiment» (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, м. Київ) та «Mathcad 14.0». Аналізували абсолютні потужності (мкВ<sup>2</sup>) хвиль електричної активності ерготропної зони гіпоталамусу у межах загальноприйнятих частотних діапазонів. Статистичну обробку результатів у тварин всіх груп проводили за допомогою програми Origin 6.0 Professional методом парних порівнянь. Достовірність різниць між двома середніми величинами визначали за t-критерієм Стьюдента ( $P < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження електричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів під тривалою дією лужних компонентів раціону дозволило виявити деякі механізми регуляції рН та певні зміни функціонального стану центральної нервової системи.

Аналіз електричної активності ерготропної зони гіпоталамусу (рис. 1) показав, що у тварин контрольної групи реєструвались відносно регулярні, близькі до синусоїдальних коливань біопотенціали, які не мали істотних змін протягом всього експерименту.

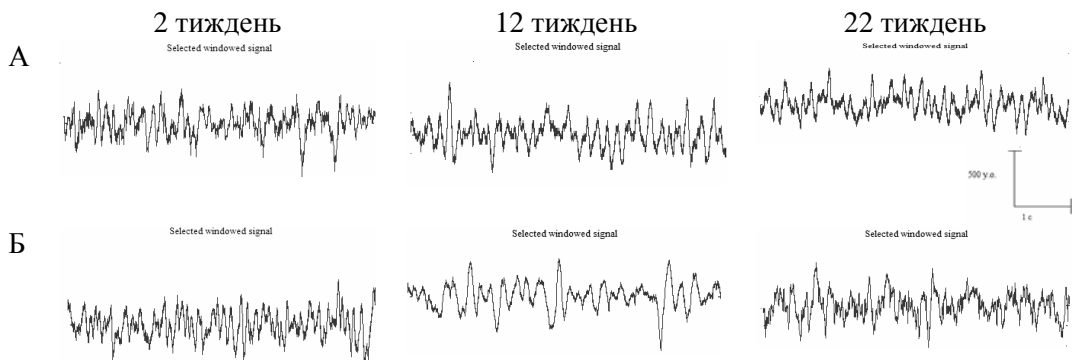


Рис. 1. Нативний запис сумарної електричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів через 2, 12, 22 тижні дослідження.

*Примітка.* А – тварин контрольної групи; Б – тварин, що вживали гідрокарбонат натрію.

У щурів, які знаходились під тривалою дією гідрокарбонату натрію на початку та наприкінці експерименту (рис. 1) спостерігалась, у порівнянні з контрольною групою, модуляція ритмічності протікання хвильових процесів з заміщенням впорядкованої синхронної хвильової активності, коливаннями менш регулярними з різною тривалістю, що характеризує активацію десинхронних процесів ЕГГ. Через 12 тижнів дослідження відмічалось більш синхронна активність, яка була результатом сумарії в часі амплітуд синфазних коливань.

Подальша статистична обробка всіх електричних сигналів показала, що основним компонентом ЕГГ в ерготропній зоні гіпоталамусу у тварин 2 групи була дельта-подібна активність (рис. 2). У динаміці абсолютної потужності дельта-активності досить чітко можна виділити два піки – через 12 та 22 тижні від початку



експерименту, які становили відповідно  $1754,15 \pm 75,45$  % та  $2396,27 \pm 145,37$  % контролю. Слід зазначити, що на початку дослідження спостерігалась тенденція до зменшення абсолютної потужності. Через 6 тижнів величина вказаного показника у частотному діапазоні домінуючої дельта-подібної активності складала  $27,06 \pm 1,81$ % контрольного значення. Надалі, майже на всіх тижнях експерименту за виключенням 14 та 18 тижня значення абсолютної потужності тварин, що знаходились під тривалою дією гідрокарбонату натрію була достовірно більшою відносно контролю.

Динаміка абсолютної потужності у тета-діапазоні досліджуваної структури (рис. 2) тварин, які знаходились під тривалою дією гідрокарбонату натрію, була подібною до динаміки показників у дельта-діапазоні. Абсолютна потужність тета-подібних хвиль на початку дослідження зменшувалась та сягала  $71,89 \pm 1,69$ % контрольного значення. Через 8-12 тижнів спостерігалось її суттєве підвищення, що достовірно перевищувало значення контрольної групи. Наприкінці дослідження 22 тиждень значення абсолютної потужності буди максимальними і становили  $1856,27 \pm 184,22$ % контролю.

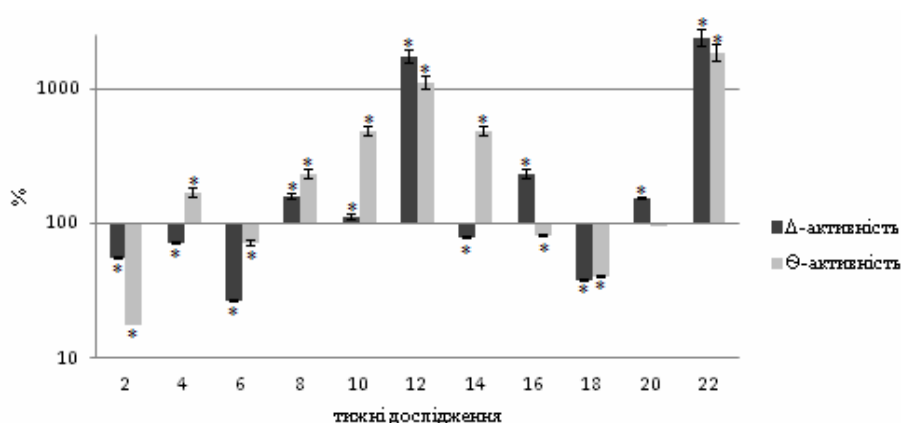


Рис. 2. Зміни абсолютних потужностей низькочастотних хвиль біоелектричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів, що вживали гідрокарбонат натрію відносно значень цього показника у тварин контрольної групи у відповідні тижні спостереження, %.

Зірочки над стовпчиками – достовірні зміни потужностей біоелектричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів, що вживали гідрокарбонат натрію відносно контролю за критерієм Манна-Уїтні ( $p < 0,05$ )

На початку експерименту (2-6 тиждень) абсолютна потужність ЕГТГ щурів, що знаходились під дією лужних компонентів раціону у діапазоні 8-13 Гц (рис. 3) мала тенденцію до зменшення й становила  $14,3 \pm 1,02$ % і  $80,39 \pm 2,41$ % контролю. Та через 8-12 тижнів значення абсолютної потужності зростали й були достовірно більшим за значення контрольної групи щурів. Наприкінці експерименту (14-20 тиждень) відбувалось суттєве зменшення показника, що був достовірно менший контрольних

значень. Але на 22 тижні дослідження аналізований показник був максимальним та становив  $4558,33 \pm 200,34\%$  контролю.

Значення абсолютної потужності ерготропної зони гіпоталамуса щурів у діапазоні 14-30 Гц (рис. 3) експериментальної групи, були достовірно більшими ( $P < 0,05$ ) за контроль протягом всього дослідження. Виключенням були 10 та 16 тижні, де абсолютна потужність сягала  $3,11 \pm 0,06\%$  та  $26,21 \pm 0,29\%$  контрольних значень. Наприкінці експерименту цей показник сягав своїх максимальних значень та становив  $23667,61 \pm 476,23\%$  контролю.

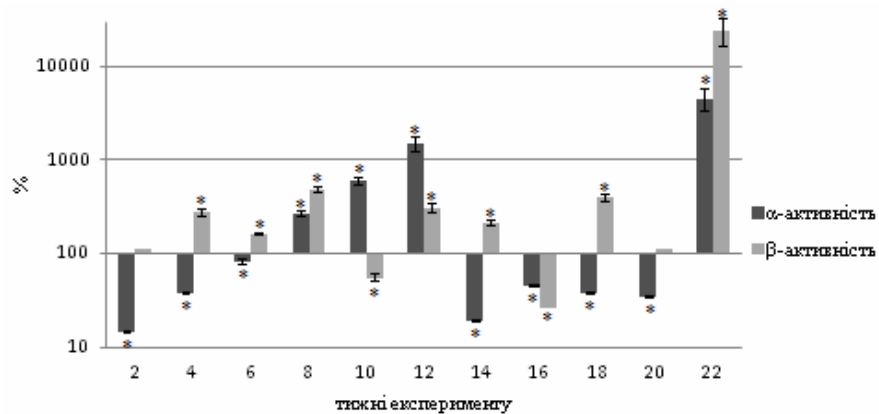


Рис. 3. Зміни абсолютних потужностей високочастотних хвиль біоелектричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів, що вживали гідрокарбонат натрію відносно значень цього показника у тварин контрольної групи у відповідні тижні спостереження, %.

Зірочки над стовпчиками – достовірні зміни потужностей біоелектричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів, що вживали гідрокарбонат натрію відносно контролю за критерієм Манна-Уїтні ( $p < 0,05$ )

Аналіз динаміки показників нормованої потужності (рис. 4) електричної активності заднього гіпоталамусу щурів показав, що нормовані показники сумарної електричної активності щурів контрольної групи суттєво не змінювались майже у всіх частотних діапазонах. Виключенням слугувала бета-подібна активність, нормований показник якої через 12 тижнів дослідження був максимальним і становив 3%.

Динаміка досліджуваного показника у дельта-діапазоні у щурів, які знаходились під тривалою дією гідрокарбонату натрію, мала тенденцію до зменшення, однак вона була більшою за значення щурів контрольної групи, за виключенням останніх тижнів дослідження.

Нормовані значення потужності у тета-діапазоні збільшувались, але були достовірно нижчими за значення тварин контрольної групи.

Значення аналізованого показника у діапазоні 8-13 Гц протягом експерименту мали тенденцію до збільшення, та достовірно перевищували значення контролю, виключенням слугував 2 тиждень дослідження.

Дослідження показника нормованої потужності у діапазоні 14-30 Гц дозволило виявити таку динаміку: на початку та наприкінці експерименту аналізований показник у щурів що знаходились під дією лужних компонентів раціону, був достовірно більшим за значення контролю, та на 20 тижні сягав своїх максимальних значень і становив  $30,28 \pm 1,13$  %. Через 12 тижнів дослідження його значення були мінімальними і не перевищували результату контрольної групи тварин.

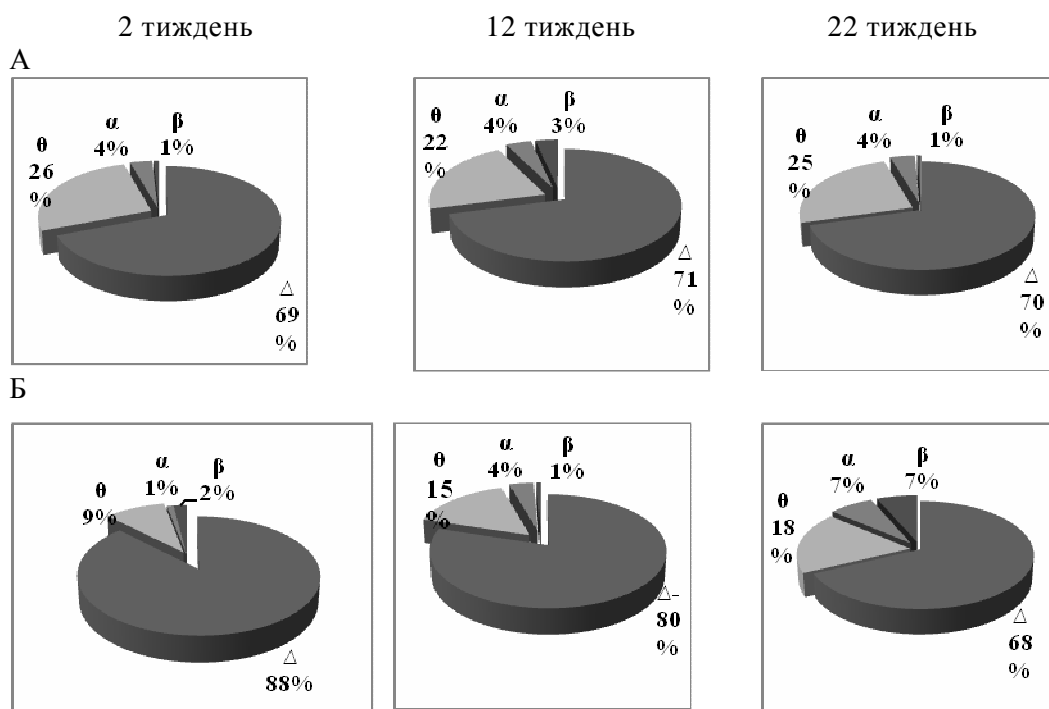


Рис. 4. Динаміка показників нормованої потужності біоелектричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів через 2, 12, 22 тижні дослідження. Примітка: А - тварин контрольної групи; Б - тварин, що вживали гідрокарбонат натрію.

Така динаміка абсолютної та нормованої потужності низькочастотних хвиль електричної активності ерготропної зони гіпоталамусу щурів може свідчити на нашу думку про активацію синхронізуючих систем мозку на 12 та 14 тижні, ці процеси можуть бути показником активації метаболізму, що посилюють адаптаційно-компенсаторні процеси. Певний рівень синхронізації систем мозку є необхідною умовою його надійності. При дефектності гальмівних механізмів на той же об'єм аферентного припливу мозкові системи реагують синхронною відповіддю набагато більших популяцій нейронів, а в свою чергу нейрони, що генерують більш масивні і синхронні залпи потенціалів дії обумовлюють більш масивні нейрони

наступних каскадів. Найважливіша роль тут належить неспецифічним лімбіко-ретикулярним структурам, що містить на всіх рівнях ядра з активними гальмівними механізмами і ГАМК-чутливими рецепторами [2].

Натомість, така динаміка високочастотних хвиль електричної активності досліджуваної структури, на початку та наприкінці експерименту говорить про те, що активуючі системи ерготропної зони гіпоталамусу викликають десинхронізацію електричної активності. Відомо, що активуючі системи заднього гіпоталамусу можуть викликати десинхронізацію електричної активності навіть при повному порушенні мезенцефалічної ретикулярної формації, хоча в нормі, безсумнівно, функціонують разом. Ефекти стимуляції гіпоталамусу, при цьому, будуть сильніше виражені у поведінці та у електричній активності лімбічних структур [2].

Отримані результати в ході проведення експерименту дозволили встановити такі закономірності. Домінуючим ритмом впродовж всього часу дослідження залишався дельта-ритм. В період з 2-10 тижнів спостерігалось зменшення його відсотку на фоні збільшення альфа та бета-активності. Така динаміка свідчить про десинхронізацію ЕГтГ, що виражається появою високочастотної, низькоамплітудної, нерегулярної за частотою електричної активності. Надалі відмічається збільшення дельта-ритму за рахунок зниження альфа-активності, це може говорити про активність синхронізуючих ритмоутворюючих систем мозку. Також слід зазначити, що з 12 тижня спостерігалось поступове збільшення бета-ритму, що тривало до кінця експерименту і сягало максимальних значень на 20 тижні. Така активність наприкінці експерименту у діапазоні 14-30 Гц свідчить про виразну десинхронізацію електричної активності ерготропної зони щурів, що знаходились під дією лужних компонентів.

На нашу думку, виразна десинхронізація електричної активності ерготропної зони гіпоталамуса щурів з переважанням бета-подібної активності найімовірніше пов'язана з підвищенням частоти пресинаптичного квантування та зменшення зворотного захоплення медіатора в синаптичних структурах заднього гіпоталамуса з піком амплітуди даного ритму на останньому тижні експерименту. Щодо дельта та тета-подібної активності, то вони відображають нормальну стабільну енергетику нейропередачі, а відновлення їх представленості на 12 і 22 тижнях пов'язані з переодичним енергодефіцитом медіаторсинтезуючих систем в період вироблення адаптаційних реакцій. Це може бути пов'язано як з безпосередньою дією лужних компонентів раціону, що впливають на зміни гомеостатичних констант, так і з тим, що цей фактор може бути активатором адаптаційних реакцій, які знаходять своє відображення в модуляції нейропередач в ерготропній зоні гіпоталамуса.

### **ВИСНОВКИ**

1. У щурів, що знаходились під впливом лужного раціону спостерігалась модуляція активності електрогіпоталамограми.
2. Домінуючим ритмом ЕГтГ в обох групах щурів залишався дельта-ритм впродовж всього часу дослідження.

3. На початку та наприкінці експерименту у щурів експериментальної групи має місце виразна десинхронізація електричної активності ерготропної зони гіпоталамуса щурів з переважанням бета-подібної активності через 20 тижнів дослідження.
4. З 10 по 12 тижень експерименту спостерігалась активність синхронізуючих ритмоутворюючих систем мозку, яка пов'язана зі збільшенням потужності дельта-діапазону за рахунок зниження потужності альфа-активності.

#### Список літератури

1. Агаджанян Н.А. Стресс, физиологические и экологические аспекты адаптации, пути коррекции / Н.А. Агаджанян, С. В. Нотова. – Оренбург : ИПК ГОУ ОГУ, 2009. – 274 с.
2. Зенков Л. Р. Клиническая электроэнцефалография (с элементами эпилептологии) / Л.Р.Зенков, 4-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2011. – 368 с.
3. Воробьева Т.М. Электрическая активность мозга (природа, механизмы, функциональное значение) / Т.М. Воробьева, С. П. Колядко // Экспериментальная и клиническая медицина. – 2007. – № 2. – С. 4–11.
4. Ying Z. Hypothalamic stimulation enhances hippocampal BDNF plasticity in proportion to metabolic rat / Z. Ying, A. Covalin, J. Judy [et al] // Brain Stimul. – 2012. – Vol.5, № 4. – P. 642 – 646.
5. Васильев Ю.Г. Гомеостаз и пластичность мозга : монография / Ю.Г. Васильев, Д.С. Берестов. – Ижевск : ФГБОУ ВПО Ижевская ГСХА, 2011. – 216 с.
6. Сидоров А.В. Регуляция и модуляция нейронных функций при колебаниях уровня pH / А.В. Сидоров // Вестник Белорусского государственного университета. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2008. – № 3. С. 67 – 72.
7. Obara M. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses / M. Obara, M. Szeliga, J. Albrecht // Neurochem Int. – 2008. – Vol. 52, № 6. – P. 905 – 919.
8. Казанцева Т.В. Сучасні аспекти діагностики та лікування хворих на метаболічний синдром/ Т.В. Казанцева, С.В. Білецький, Н.А. Шевцова, Т.М Трипадуш.// Буковинський медичний вісник. – 2008. – Том 12, № 4. – С. 138 – 142.
9. Соколова Л.К. Метаболічний синдром: клініка, критерії діагностики, принципи терапії / Л.К. Соколова // Ж. практ. лікаря. – 2005. – № 1. – С. 44–47.
10. Khan V.V. Quinapril, an ACE inhibitor, reduces markers of oxidative stress in the metabolic syndrome / V.V.Khan, S.Sola, W.B.Lauten // Diabetes care. – 2004. – Vol. 27. – P. 1712-1715
11. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates – 5-th edition / G. Paxinos, C. Watson. – New York, 5th ed: Academic Press, 2005. – 367 p.
12. Дергунов А.В. Нарушение электролитного обмена в тканях крыс при дегидратации и гипергидратации/ А.В.Дергунов, В.М. Хмара, Г.П. Гусев// Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2012 – № 2 (28). – С. 140-143
13. Sławuta P. Comparison of the utility of the classic model (the Henderson-Hasselbach equation) and the Stewart model (Strong Ion Approach) for the diagnostics of acid-base balance disorders in dogs with right sided heart failure / P. Sławuta, K. Glińska-Suchocka // Pol J Vet Sci. – 2012. – V. 15, № 1. – P. 119 – 24.

**Заец Н.С.** Адаптационные реакции нейросинаптической активности эрготропной зоны гипоталамуса крыс в условиях щелочного рациона / Н.С. Заец, В.П. Ляшенко, Д.О. Бурцева, С.Н. Лукашев, О.З. Мельникова // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014 – Т. 27 (66), № 1. – С. 46-55.

Установлено, что в условиях щелочного рациона, активация адаптационных реакций нейросинаптической активности эрготропной зоны гипоталамуса крыс проявляется в модуляции синхронизирующих и десинхронизирующих процессов, которые отражаются в устойчивых изменениях абсолютной и нормированной мощности электрогипоталамограммы крыс. Выразительная десинхронизация ЭГГ с преобладание бета-подобной активности в конце эксперимента скорее

связана с повышением частоты пресинаптического квантования и уменьшением обратного захвата медиатора в синаптических структурах заднего гипоталамуса. Также рассматриваются другие механизмы наблюдающихся явлений.

**Ключевые слова:** абсолютная мощность, нормированная мощность, кислотно-щелочное равновесие, водородный показатель, эрготропная зона гипоталамуса, электрогипоталамограмма.

## **ADAPTIVE REACTIONS OF NEYROSYNAPTICAL ACTIVITY OF ERGOTROPIC AREA OF THE HYPOTHALAMUS OF RATS IN RESPONSE TO ALKALINE RATION**

*Zayets N.S.<sup>1</sup> Lyashenko V.P.<sup>1</sup>, Burtseva D.O.<sup>1</sup>, Lukashev S.M.<sup>2</sup>, Melnikova O.Z.<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>*Dnipropetrovsk National University Oles' Gonchar;*

<sup>2</sup>*The Scientifically-consultative and curatively-diagnostic center is a headache, Dnipropetrovsk, Ukraine;*

<sup>3</sup>*Zaporizhzhya state medical university, Zaporizhzhya, Ukraine.*

*E-mail: \_nz\_8@ukr.net*

Adaptive reactions of neyrosynaptical activity of ergotropic area of the hypothalamus of rats in response to alkaline regime was studied with the help abduction elektrohipotalamohramy. The study was conducted on nonlinear white male rats, which were divided into 2 groups. In the first group included control animals (n = 44) who were under physiological conditions. The rats of the second group (n = 66) continued to consume sodium bicarbonate (NaHCO<sub>3</sub>) in a dose of 4.9 g per 1 kg. Elektrohipotalamogramy registration was carried out in conditions of acute experiment every 2 weeks during the observation period, the duration of which is 22 weeks. The results obtained during the experiment allowed establishing the following regularities. Dominant rhythm throughout the study period was delta rhythm. Between 2-10 weeks there was a reduction of its interest, with increased alpha and beta activity. Such dynamics shows desynchronization EGtG that expressed the advent of high-frequency, low-amplitude, frequency irregular electrical activity. In the future, there is an increase of delta - rhythm by reducing alpha - activity; it may indicate the activity of synchronizing processes. It should also be noted that with 12 weeks there was a gradual increase in beta - rhythm, which lasted until the end of the experiment and reached maximum values at 20 weeks. Such activity at the end of the experiment in the range of 14 – 30 Hz indicates expressive desynchronized of electrical activity of ergotropic area of the hypothalamus of rats which were under the influence of alkaline components. In our opinion, expressive desynchronization of electrical activity of ergotropic area of the hypothalamus of rats with a predominance of beta - rather like activity is associated with increased frequency and quantization reduce the presynaptic reuptake of the neurotransmitter in the synaptic structures of the posterior hypothalamus, with a peak amplitude of this rhythm in the last week of the experiment. Delta and theta activity, stable energy reflect normal neurotransmission, and the restoration of their representation at 12 and 22 weeks are associated with periodic energy shortages mediator synthesizing systems during the development of adaptive responses. This may be due both to the direct action of alkaline components of the diet that influence changes homeostatic constants, and also with this

factor may be an activator of adaptive responses that are reflected in the modulation of neurotransmission in the ergotropic area of the hypothalamus.

**Keywords:** absolute power, normalized power, acid-base balance, pH, ergotropic area of the hypothalamus, elektrogipotalamograma.

#### References

1. Aghajanian N.A. Stress, physiological and ecological aspects of adaptation, ways of correction / N.A.Aghajanian, S.V. Notova. - Orenburg: IPK SEI OSU, 2009. - 274 p.
2. Zenkov L.R. Clinical electroencephalography (with elements epileptology) / L.R. Zenkov, 4th ed. - M.: MEDpress Inform 2011. - 368.
3. Vorobyova T.M. Electrical brain activity (nature, mechanisms, functional significance) / T.M.Vorobyova, S.P. Kolyadko // Experimental and Clinical Medicine. - 2007. - № 2. - P. 4-11.
4. Ying Z. Hypothalamic stimulation enhances hippocampal BDNF plasticity in proportion to metabolic rat / Z. Ying, A. Covalin, J. Judy [et al] // Brain Stimul. - 2012. - Vol.5, № 4. - P. 642 - 646.
5. Y.G. Vasilyev Homeostasis and brain plasticity: monograph / Y.G Vasiliev, D.S. Berastau. - Izhevsk: VPO Izhevsk State Agricultural Academy, 2011. - 216.
6. Sidorov A.V. Regulation and modulation of neural functions with fluctuations in pH / A.V. Sidorov // Bulletin of the Belarusian State University. Ser. 2 Chemistry. Biology. Geography. - 2008. - № 3. P. 67 - 72.
7. Obara M. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses / M. Obara, M. Szeliga, J. Albrecht // Neurochem Int. - 2008. - Vol.52, № 6. - P. 905 - 919.
8. Kazantsev T.V. Modern aspects of diagnosis and treatment of metabolic syndrome / T.V. Kazantsev, S.V. Beletsky, N.A. Shevtsova, T.M. Trypadush. // Bukovina Medical Journal. - 2008. - Vol. 12, № 4. - S. 138 - 142.
9. Sokolov L.K. Metabolic syndrome: clinical features, diagnostic criteria, principles of therapy / L.K. Sokolova // Pract. doctor. - 2005. - № 1. - P. 44-47.
10. Khan B.V. Quinapril, an ACE inhibitor, reduces markers of oxidative stress in the metabolic syndrome / B.V.Khan, S.Sola, W.B.Lauten // Diabetes care. - 2004. - Vol. 27. - P. 1712-1715
11. Paxinos G. The rat brain in stereotaxic coordinates - 5-th edition / G. Paxinos, C. Watson. - New York, 5th ed: Academic Press, 2005. - 367 p.
12. Dergunov A.V. Violation of electrolyte metabolism in rat tissues under dehydration and hydration / A.V. Dergunov, V.M. Khmara, G.P. Gusev // Actual problems of transport medicine. - 2012 - № 2 (28). - P. 140-143.
13. Sławuta P. Comparison of the utility of the classic model (the Henderson-Hasselbach equation) and the Stewart model (Strong Ion Approach) for the diagnostics of acid-base balance disorders in dogs with right sided heart failure / P. Sławuta, K. Glińska-Suchocka // Pol J Vet Sci. - 2012. - V. 15, № 1. - P. 119 - 24.

*Поступила в редакцію 16.01.2014 г.*

**УДК 502.5:576.353**

## **МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ALLIUM CERA L. ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ ПЕСТИЦИДОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

*Ибрагимова Э.Э.*

*Республиканское высшее учебное заведение «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь, Украина  
E-mail: evelina\_biol@mail.ru*

В статье приведены результаты исследования митотической активности клеток корневой меристемы *Allium cera* L. при совместном действии пестицидов и тяжелых металлов. Установлено, что тяжелые металлы в высоких концентрациях совместно с остаточными количествами пестицидов вызывают выраженное негативное цитотоксическое воздействие на тест-систему *Allium cera* L., проявляющееся в ингибировании митотической активности клеток корневой меристемы.

**Ключевые слова:** митоз, тяжелые металлы, пестициды, *Allium cera* L.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Современное сельское хозяйство является одним из основных источников антропогенного загрязнения. По мнению Гниненко Н.В. с соавторами [1], сложившаяся система земледелия на черноземах степной зоны Украины привела к значительному уменьшению содержания гумуса, ухудшению структуры и других агрономических параметров почв. Многие исследователи отмечают, что при интенсивном ведении земледелия преобладающим фактором почвообразования становится антропогенный [2]. В связи с этим исследование почвы как основного фонового субстрата, обуславливающего мутационный процесс в растительных организмах, представляет значительный научный и практический интерес. Абдурахмановой А.А. [3] для индикации мутагенной активности загрязненных почв, подвергавшихся в течение длительного времени воздействию пестицидов и минеральных удобрений, использовались корешки лука и хлопчатника. Почвы, в которых остаточные количества пестицидов превышали ПДК, оказывали сильное мутагенное действие на семена исследованных тест-растений. Автор отмечает, что тест-система лука более чувствительна к мутагенам, чем хлопчатник. Аналогичное исследование было проведено Butani J.V. и Shukla P.T. [4], изучавшими цитологию корня лука при действии фунгицидов (карбендазим, манкоцеб, тридеморф), инсектицидов (монокротофос, оксидиметонметил, хинальфос) и гербицидов (оксифлуортен, флухлоралин, алахлор), используя рекомендуемые и более высокие дозы. При действии всех пестицидов, кроме карбендазима, отмечено уменьшение процента прорастания обработанных семян и снижение митотического индекса.



Ингибирование митоза зависело от продолжительности воздействия и концентрации пестицида. Arif M. и Vahidy A.A. [5] при оценке генотоксического действия фунгицидов нимрода и дитана на митотический процесс меристематических корней *Allium cepa* L. также указывают, что при повышении концентрации изученных препаратов наблюдалось снижение митотического индекса, увеличение доли аномалий: полиплоидии, К-митоза, нарушений метафазы. Частота встречаемости нарушений положительно коррелировала с увеличением концентрации пестицидов и продолжительностью их действия. Аналогичное исследование с использованием корешков *Allium cepa* L. проводилось для изучения действия органофосфорного пестицида малатиона, который снижал частоту деления клеток, что проявлялось в нарушении митотического цикла и снижении митотического индекса [6]. Интересным остается вопрос влияния пестицидов в малых концентрациях на процесс деления клеток тест-культур. Также мало изученным остается совместное влияние остаточных количеств пестицидов и тяжелых металлов, содержащихся в почвах, на растения, так как большое количество агроценозов сосредоточено вдоль автотрасс, в результате чего загрязнение почв тяжелыми металлами неизбежно.

В связи с этим цель исследования заключалась в определении митотической активности клеток корневой меристемы *Allium cepa* L. при совместном воздействии остаточных количеств пестицидов и тяжелых металлов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нами был проведен анализ загрязнения сельскохозяйственных почв Крыма остаточными количествами пестицидов (байлетон, БИ-58, инсегар) и тяжелыми металлами (медь, цинк, свинец). Для исследования были выбраны следующие территории, расположенные вдоль автотрасс с различной интенсивностью движения: I – Бахчисарайский район (с. Брянское) – низкая интенсивность движения, II – пригородная зона г. Алушты – средняя загруженность, III – Симферопольский район (с. Кольчугино) – высокая интенсивность движения автотранспорта. Методы определения тяжелых металлов (ТМ) и остаточных количеств пестицидов (ОКП), а также их содержание описаны в предыдущей публикации [7]. Контролем служили почвенные образцы с территорий, находящихся на значительном расстоянии от техногенных источников, в качестве фоновых (Ф) использовались образцы почв придорожной зоны автотрасс с интенсивным движением автотранспорта. В исследованных почвенных образцах сельскохозяйственных угодий обнаружены ОКП (байлетон, БИ-58, инсегар) в количествах ниже ПДК, ТМ (свинец и медь) – выше ПДК. Содержание ТМ в почвах: Симферопольский район > Алушта > Бахчисарайский район > Фон. В фоновых образцах концентрация ТМ – в пределах ПДК.

Для биотестирования отобранных в указанных районах почвенных образцов использовали тест-систему лука. Для анализа семена лука высевали в кюветы с почвами исследуемых сельскохозяйственных угодий. Проращивание семян проводили при температуре 22<sup>0</sup> С в темноте. На третьи сутки проросшие семена лука с корешками длиной 0,8–1,5 см фиксировали в уксуснокислом спирте (3:1) в течение 24 ч, после чего переводили в 70%-ный этиловый спирт, где хранили при

температуре + 5<sup>0</sup>С до изготовления препаратов. Цитогенетический анализ осуществляли на временных давленных препаратах по методу Паушевой З.П. [8]. Корешки лука окрашивали ацетолакмоидом с кипячением на водяной бане в течение 10 мин, а затем материал переносили на 5 мин в 45%-ную уксусную кислоту. Мацерацию проводили в хлоралгидрате.

Токсичность поллютантов на тканевом уровне оценивали по изменению митотического индекса, который выражали в процентах (%). Для этого на препаратах подсчитывали число митозов в определенном количестве срезов; отдельно учитывали общее число клеток на этих же срезах. Затем определяли отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном срезе и умножали на 100. Митотический индекс (*MI*) в клетках тест-культуры определяли по формуле:

$$MI = \frac{П + М + А + Т}{И + П + М + А + Т} \cdot 100 \quad \text{где}$$

*П* – количество клеток корневой меристемы на стадии профазы;

*М* – количество клеток корневой меристемы на стадии метафазы;

*А* – количество клеток корневой меристемы на стадии анафазы;

*Т* – количество клеток корневой меристемы на стадии телофазы;

*И* – количество клеток корневой меристемы на стадии интерфазы [8].

Относительную длительность каждой фазы митоза (%) рассчитывали по формуле, для профазы она выглядит следующим образом:

$$П = \frac{П \cdot 100}{П + М + А + Т}$$

Исследования проводили в четырехкратной повторности. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета прикладных программ “Microsoft Excel 2000”. Достоверность различий данных определяли с помощью t-критерия Стьюдента [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ митотической активности клеток корневой апикальной меристемы *A. сера*, пророщенных в почвах, загрязненных ТМ и ОКП позволил установить прогрессирующее снижение митотического индекса по мере возрастания концентраций загрязняющих веществ. В I и II вариантах исследования (ТМ+ОКП) митотический индекс снижался в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем и в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с фоновыми (ТМ) значениями, в III зоне (ТМ+ОКП) – в 1,3 ( $p < 0,001$ ) и 1,2 ( $p < 0,001$ ) раза соответственно. Наряду с изменением митотического индекса по всем вариантам исследования было обнаружено достоверное, по сравнению с контрольным вариантом, различие в процентном соотношении фаз митотического цикла (рис. 1).

МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ ...

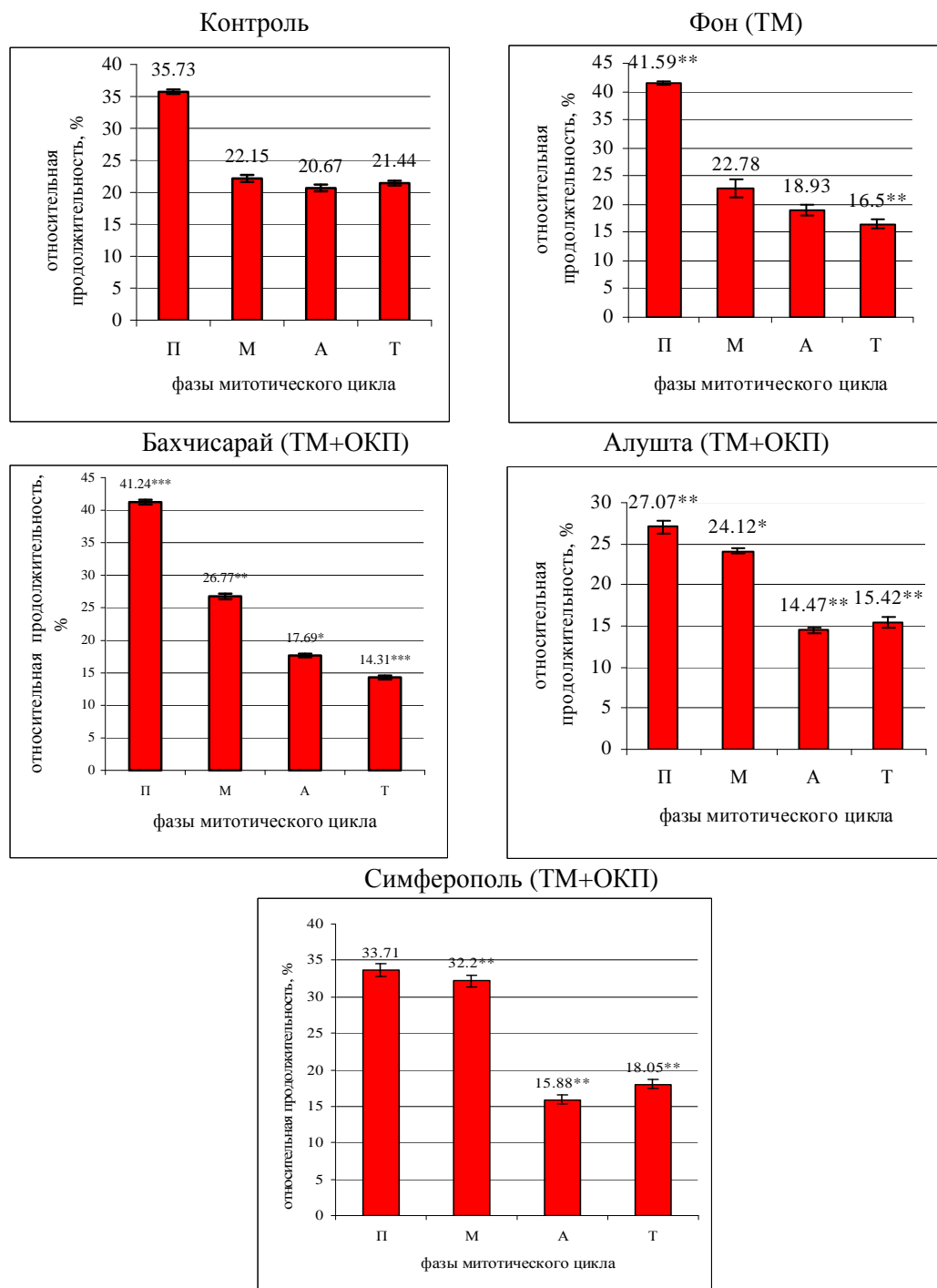


Рис. 1. Доля (%) профаз, метафаз, анафаз и телофаз среди делящихся клеток корневой меристемы семян *Allium cepa* L., пророщенных в субстратах с различным содержанием ТМ и ОКП и в контроле (\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ )

При не изменяющемся существенно значении митотического индекса в фоновом варианте (ТМ) на 16,40% ( $p < 0,01$ ) увеличивалось количество клеток на стадии профазы за счет снижения доли клеток, находящихся на стадии телофазы на 23,04% ( $p < 0,01$ ). По-видимому, формирование профазного блока инициируется наличием ТМ в фоновых почвенных образцах. В I варианте (ТМ+ОКП) исследования было обнаружено увеличение общего количества клеток, находящихся на стадии профазы на 15,42% ( $p < 0,001$ ) и метафазы на 20,85% ( $p < 0,01$ ) за счет снижения доли анафаз на 14,41% ( $p < 0,05$ ) и телофаз на 33,25% ( $p < 0,001$ ) среди делящихся клеток по сравнению с контрольным вариантом, то есть формировался профазно-метафазный блок. Очевидно, что на продолжение клеточного цикла поллютанты II и III вариантов исследования оказывали более существенное влияние, чем в I варианте, что выражалось в достоверном изменении доли фаз митотического цикла. В частности, во II варианте исследования регистрировалось снижение процентного содержания профаз на 24,24% ( $p < 0,01$ ), анафаз – 30,00% ( $p < 0,01$ ) и телофаз – 28,08% ( $p < 0,01$ ) при увеличении метафаз на 8,89% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1).

В III варианте исследования (ТМ+ОКП) количество клеток на стадии профазы не отличалось от контрольного варианта ( $p > 0,05$ ), однако достоверно возрастало на стадии метафазы – 10,05% ( $p < 0,01$ ) при снижении анафаз – 4,79% ( $p < 0,01$ ) и телофаз – 3,39% ( $p < 0,01$ ), т. е. имело место формирование метафазного блока.

Таким образом, в фоновых почвах (ТМ) наблюдалось формирование профазного блока в клетках корневой меристемы *A. sepa*. Поллютанты почв I зоны (ТМ+ОКП) индуцировали формирование профазно-метафазного блока при существенном снижении доли ана-телофаз. При увеличении содержания загрязняющих веществ в почвах II и III зоны (ТМ+ОКП) было обнаружено достоверное увеличение процентного содержания метафаз при снижении общего количества клеток на стадии профазы, анафазы и телофазы. Таким образом, при повышении концентраций загрязняющих веществ в исследованных почвах, наблюдалось увеличение количества клеток на стадии профазы и метафазы при соответствующем уменьшении ана-телофазных клеток, а также снижение митотической активности клеток апикальной меристемы корешков лука. Полученные данные согласуются с положением [10], что дифференциальная чувствительность фаз клеточного цикла к химическим мутагенам осложняет не только задачу выявления механизмов действия на клетки изучаемых факторов, но и оценку силы их влияния. Снижение митотического индекса и различие в процентном соотношении фаз митоза в исследованных опытных вариантах (ТМ+ОКП) по сравнению с контролем и фоном (ТМ) по-видимому, может свидетельствовать о том, что имеет место синергизм ОКП и ТМ, так как при их совместном влиянии наблюдалось ингибирование митотической активности клеток апикальной меристемы лука.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Остаточные количества пестицидов (байлетон, БИ-58, инсегар) и тяжелые металлы (медь, цинк, свинец) оказывают комплексный цитотоксический эффект, проявляющийся в снижении митотического индекса клеток апикальной меристемы корешков *Allium sepa* L.

2. Тяжелые металлы и остаточные количества пестицидов оказывают более выраженное ингибирующее действие на частоту митоза в клетках *Allium cepa* L., чем отдельно присутствующие в среде выращивания растений тяжелые металлы.
3. В клетках корневой меристемы семян, пророщенных в фоновых почвах (ТМ), наблюдалось формирование профазного блока. Поллютанты почв I зоны (ТМ+ОКП) индуцировали формирование профазно-метафазного блока при существенном снижении доли ана-телофаз. При увеличении содержания загрязняющих веществ в почвах II и III зоны (ТМ+ОКП) было обнаружено достоверное увеличение процентного содержания метафаз при снижении общего количества клеток на стадии профазы, анафазы и телофазы.

#### Список литературы

1. Гниненко Н.В. Некоторые аспекты эволюции черноземов при их длительном интенсивном сельскохозяйственном использовании / Н.В. Гниненко, Е.В. Коваленко, В.И. Чабан, С.П. Клявзо // Почвоведение. – 1998. – № 6. – С. 732–738.
2. Абдурахманова А.А. Мутагенное действие многолетнего внесения в почву пестицидов и минеральных удобрений на семена хлопчатника и лука / А.А. Абдурахманова // Генет. эффекты антропог. загряз. среды в Зарафшанской долине. Сбор. науч. тр. – Самарканд: СамГУ, 1989. – С. 20–26.
3. Узунов К. Тежки метали (Mn, Pb, Zn, Cu) в почви и растения в Софийската котловина / К. Узунов, В. Захариева, В. Коларова, В. Драгостинова, Й. Узунов // Геохим., минерал. и петрол. – 1996. – Т. 31. – С. 103–123.
4. Butani J.V. Cytological effects of pesticides on onion (*Allium cepa* L.) root tip / Butani J.V., Shukla P.T. // Gujarat. Agr. Univ. Res. J. – 1994. – Vol. 20, № 1. – P. 60–65.
5. Arif M. Toxicity of fungicides Nimrod and Dithane M-45 on mitotic cells of *Allium cepa* L. / Arif M., Vahidy A. A. // Phillip. J. Sci. – 1996. – Vol. 125, № 4. – P. 271–289.
6. Priya E. Genotoxic effect of an organophosphorous pesticide on *Allium* root meristems in vivo / Priya E., Joyce S., Gowrishankar B., Rajaiah D. // Indian J. Exp. Biol. – 1996. – Vol. 34, № 4. – P. 320–324.
7. Ибрагимова Э.Э. Экологическая и фитотоксическая оценка загрязнения сельскохозяйственных почв Крыма пестицидами и тяжелыми металлами / Э.Э. Ибрагимова // Ученые записки Таврического нац-го ун-та им. В.И. Вернадского (серия «Биология, химия»). – 2007. – Т. 20 (59). – № 2. – С. 16–25.
8. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М.: Колос 1980. – 304 с.
9. Плохинский Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – М.: МГУ, 1970. – 367 с.
10. Евсеева Т.И. Токсические и цитогенетические эффекты, индуцируемые у *A. cepa* низкими концентрациями Cd и <sup>232</sup>Th / Т.И. Евсеева, Т.А. Майстренко, С.А. Гераськин, Е.С. Белых, Е.В. Казакова // Цитол. и генетика. – 2005. – № 5. – С. 73–80.

**Ибрагимова Е.Е. Мітотична активність клітин кореневої меристеми *Allium cepa* L. при спільній дії пестицидів і важких металів / Е.Е. Ібрагимова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 56–63.**

У статті приведені результати дослідження мітотичної активності клітин кореневої меристеми *Allium cepa* L. при спільній дії пестицидів і важких металів. Встановлено, що важкі метали у високих концентраціях спільно із залишковими кількостями пестицидів викликають виражену негативну цитотоксичну дію на тест-систему *Allium cepa* L., що проявляється в інгібуванні мітотичної активності клітин кореневої меристеми.

**Ключові слова:** митоз, важкі метали, пестициди, *Allium cepa* L.

**MITOTICAL ACTIVITY OF CELLS OF ROOT MERISTEMS OF *ALLIUM CEPA* L. AT THE UNITED ACTION OF PESTICIDES AND HEAVY METALS**

*Ibragimova E.E.*

*Republican higher educational establishment is the “Crimean engineer-pedagogical university”,  
Simferopol, Ukraine  
E-mail: evelina\_biol@mail.ru*

The article deals with the results of research of mitotical activity of cells of root meristems of *Allium cepa* L. which are driven at the action of heavy metals, and also at the united action of remaining amounts of pesticides and heavy metals. The analysis of contamination of agricultural soils of Crimea was conducted by the remaining amounts of pesticides (bayleton, BI-58, insegar) and heavy metals (copper, zinc, lead). For research the next territories located along motorways with different intensity of motion were chosen: I – the Bakhchisarai district (p. Bryanskoe) is subzero intensity of motion, II – is a suburban zone Alushta is a middle work-load, III – the Simferopol district (p. Colchugino) is high intensity of motion of motor transport. In the investigational soil standards of agricultural lands found out the remaining amounts of pesticides (bayleton, BI-58, insegar) in amounts below maximum possible concentrations, heavy metals (lead and copper) – higher maximum possible concentrations.

Research results showed that the remaining amounts of pesticides (RAP) and heavy metals (HM) rendered a complex citotoxicity effect showing up in the decline of mitotical index of cages of meristems of counterfoils of *Allium cepa* L.

Heavy metals and remaining amounts of pesticides render more expressed inhibition operating on frequency of mitosis in the cells of *A. cepa*, what separately being in an environment growing of plants heavy metals.

In the cells of root meristems of seed growing in soils, containing heavy metals only, there was forming of prophase block. Pollutants of soils of I zone (RAP+HM) induced forming of prophase-metaphasis block at the substantial decline of stake of anaphase and telophase. At the increase of maintenance of contaminants in soils of II and III of zone (RAP+HM) it was found out the reliable increase of percentage of metaphas at the decline of general amount of cells on the stage of prophase, anaphase and telophase. Thus, heavy metals in high concentrations together with the remaining amounts of pesticides, cause the expressed negative cytotoxicity affecting on *A. cepa* showing up in inhibition of mitotical activity of cells of root meristemes.

**Keywords:** mitosis, heavy metals, pesticides, *Allium cepa* L.

**References**

1. Gnyenko N.V., Kovalenko E.V., Chaban V.I., Klayvzo C.P. Some aspects of evolution of black earth at their protracted intensive agricultural use // Soil Science. – 1998. – № 6. – P. 732–738.
2. Abdurachmanova A.A. Mutagene action of the long-term bringing in soil of pesticides and mineral fertilizers on the seed of cotton plant and bow // The Genetic effects of anthropogenic contamination of environment in Zarafchans to the valley. Collection of scientific works. Samarkand: SamSU, 1989. – P. 20–26.
3. Uzunov K., Zacharieva V., Kolarova V., Dragostinova V., Uzunov I. Heavy metals (Mn, Pb, Zn, Cu) in soils and plants of the Sofia valley // Geochemistry and mineralogy. – 1996. – Vol. 31. – P. 103–123.

4. Butani J.V., Shukla P.T. Cytological effects of pesticides on onion (*Allium cepa* L.) root tip / Gujarat. Agr. Univ. Res. J. – 1994. – Vol. 20, № 1. – P. 60–65.
5. Arif M., Vahidy A. A. Toxicity of fungicides Nimrod and Dithane M-45 on mitotic cells of *Allium cepa* L. // Phillip. J. Sci. – 1996. – Vol. 125, № 4. – P. 271–289.
6. Priya E., Joyce S., Gowrishankar B., Rajaiah D. Genotoxic effect of an organophosphorous pesticide on *Allium* root meristems in vivo // Indian J. Exp. Biol. – 1996. – Vol. 34, № 4. – P. 320–324.
7. Ibragimova E.E. Ecological and phytotoxic estimation of contamination of agricultural soils of Crimea by pesticides and heavy metals // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, Chemistry. – 2007. – Vol. 20 (59). – № 2. – P. 16–25.
8. Pausheva Z.P. Practical work on cytology of plants. – М.: Ear, 1980. - 304 p.
9. Plochynckiy N.A. Biometrics. – М.: MSU, 1970. – 367 с.
10. Ewseeva T.I., Maysterenko T.A., Gerascin S.A., Bealuh E.S., Cazacova E.W. Toxic and cytogenetic effects induced at *A. cepa* by the subzero concentrations of Cd and <sup>232</sup>Th // Cytology and genetics. – 2005. – № 5. – P. 73–80.

Поступила в редакцию 22.01.2014 г.

**УДК 577.121:963**

## **ПОКАЗНИКИ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ В ЕРИТРОЦИТАХ ХВОРИХ НА ЕРИТРЕМІЮ**

*Йолкіна Н.М.<sup>1</sup>, Коношенко С.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> *Кримський факультет Запорізького національного університету, Сімферополь, Україна*

<sup>2</sup> *Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, Сімферополь, Україна*

*E-mail: nataleiolkina@gmail.com*

Показано, що в еритроцитах хворих на еритремію спостерігаються зміни у системі синтезу оксиду азоту, які ведуть до переваги неокисного, аргіназного метаболізму над окисним, NO-синтазним метаболізмом L-аргініну і до обмеження накопичення NO-аніонів.

Разом із тим, простежується збільшення вмісту в еритроцитах високомолекулярних продуктів нітрозилування, що може мати певний вплив на структурно-функціональний стан еритроцитарних протеїнів.

**Ключові слова:** еритроцити, система синтезу оксиду азоту, аргіназа, NO-синтази, NO-аніони, низькомолекулярні і високомолекулярні продукти нітрозилування, еритремія.

### **ВСТУП**

За багатьох захворювань відбувається посилення перебігу вільно-радикальних реакцій, що призводить до розвитку оксидативного стресу, залежного від активних форм кисню [1-3].

Разом із тим, за останні роки накопичилося багато даних щодо тісної взаємодії продукції вільних радикалів кисню та оксиду азоту [4]. Дослідження останнього десятиріччя показали, що оксид азоту (NO) є одним із універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму з надзвичайно широким спектром біологічної дії [5]. Зокрема, відомо, що в оптимальних концентраціях NO поліпшує ендотеліальну функцію периферичних судин, позитивно впливає на активність деяких протеїніназ, а також може бути інгібітором каспаз, пригнічувати індукцію апоптозу [6, 7]. Але синтез оксиду азоту у надмірних концентраціях може бути причиною нітрозативного стресу, що викликається активними формами азоту, перш за все, пероксинітритом і продуктом його деградації діоксидом азоту [4].

Певним маркером нітрозативного стресу вважається також утворення нітрозотіолів, зокрема, продуктів нітрозилування протеїнів [4].

Все це свідчить про доцільність вивчення процесів, які стосуються метаболізму оксиду азоту, його синтезу і використання в клітинах різного типу як за умов норми, так й за умов патології.

Оскільки за рядом захворювань в патологічний процес залучаються еритроцити [8, 9], метою цієї роботи було вивчення окремих показників системи синтезу оксиду азоту і процесів нітрозилування в еритроцитах хворих на еритремію.



## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень слугували еритроцити практично здорових людей (25 донорів станції переливання крові) та хворих на еритремію (11 осіб, середній вік 55 років). У кожній групі співвідношення чоловіків та жінок було приблизно однаковим. Кров брали на базі Кримського онкологічного центру при їх вступі до стаціонару, перед початком лікування.

Гемоліз еритроцитів здійснювали у рівному об'ємі дистильованої води, взяв за основу метод Драбкіна [10].

Стан системи синтезу оксиду азоту оцінювали, вивчаючи показники гемолізатів, що характеризують інтенсивність неокисного (аргіназного) та окисного (NO-синтазного) метаболізму L-аргініну.

Інтенсивність неокисного метаболізму L-аргініну оцінювали, визначаючи активність аргінази [11]. Інтенсивність окисного перетворення L-аргініну, що супроводжується синтезом оксиду азоту *de novo*, оцінювали за активністю ізоферментів NO-синтаз – кальцій-залежної, конститутивної (cNOS) і кальцій-незалежної індукцибельної (iNOS) синтази [12].

Відсоткову долю активності cNOS (% cNOS) відповідно сумарної активності NO-синтаз визначали за формулою:

$$\% \text{ cNOS} = \text{cNOS} \cdot 100\% / \text{сума активностей NOS}.$$

Поряд із цим, в гемолізатах еритроцитів визначали вміст стабільних метаболітів оксиду азоту – нітрит-аніонів ( $\text{NO}_2^-$ ) і нітрат-аніонів ( $\text{NO}_3^-$ ) [13].

Для оцінки процесів нітрозильовання визначали вміст низькомолекулярних і високомолекулярних нітрозотіолів [14].

В усіх дослідах використовували спектрофотометричні методи біохімічного аналізу.

Одержані експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

З літератури відомо [4], що при різних патологіях активність кальцій-залежної, конститутивної синтази оксиду азоту (cNOS) є порівняно низькою, але зростає активність кальцій-незалежної, індукцибельної синтази (iNOS), яка в багатьох клітинах індукується запальними цитокінами, інтерлейкіном  $\beta$ , інтерфероном  $\gamma$ . Активація конститутивної NOS здійснюється підвищенням внутрішньоклітинного вмісту  $\text{Ca}^{2+}$  і конститутивно протеїнкіназою B, яка знаходиться під контролем інсулінової сигнальної системи чи сфінгомелінового сигнального каскаду [4, 15].

Як показали результати наших досліджень, в еритроцитах хворих на еритремію суттєво знижується інтенсивність конститутивного синтезу оксиду азоту.

Активність кальцій-залежної конститутивної синтази оксиду азоту визначена на 89% меншою порівняно з контрольною групою донорів (таблиця). Водночас, інтенсивність індукцибельного синтезу оксиду азоту значно зростає. Активність кальцій-незалежної синтази оксиду азоту збільшувалась у 2,0 рази порівняно з контрольною групою.

Таблиця

Показники системи синтезу оксиду азоту і процесів нітрозилювання в еритроцитах хворих на еритремію (відсоткова доля відносно показника контрольної групи<sup>\*</sup>);  $M \pm m$

Показники	Обстежені групи	
	Контрольна група	Хворі на еритремію
cNOS	100 ± 15,0	10,9 ± 0,4 <sup>**</sup>
iNOS	100 ± 16,4	200,1 ± 33,0 <sup>**</sup>
Аргіназа	100 ± 8,0	285,0 ± 33,0 <sup>**</sup>
Arg/NOS	100 ± 17,0	384,0 ± 39,0 <sup>**</sup>
$NO_2^-$	100 ± 18,0	112,0 ± 16,0
$NO_3^-$	100 ± 16,0	78,0 ± 10,0
НМНТ	100 ± 11,3	70,5 ± 9,0
ВМНТ	100 ± 13,5	436,0 ± 62,0 <sup>**</sup>

Примітка: <sup>\*</sup> – контроль – 100%;

<sup>\*\*</sup> – вірогідність відміни показника відносно контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Доля фізіологічного конститутивного синтезу оксиду азоту в еритроцитах практично здорових людей складала, в середньому, 66% від сумарного синтезу оксиду азоту, тоді як у хворих на еритремію спостерігалось виражене зниження даного показника – до 9,3% від показника контрольної групи.

Оскільки субстратом для NO-синтаз є L-аргінін було важливим дати оцінку неокисного метаболізму цієї амінокислоти, здатної перетворюватися ферментом аргіназою до сечовини та орнітину. Було встановлено, що активність аргінази в еритроцитах хворих на еритремію достовірно зростає: у 2,9 разу порівняно з контрольною групою, що свідчить про активізацію неокисного, аргіназного метаболізму, який конкурує з окисним NO-синтазним метаболізмом L-аргінину. Співвідношення неокисного та окисного метаболізму L-аргінину (Arg/NOS) достовірно зростало в еритроцитах хворих: у 3,8 разу порівняно з контрольною групою.

Вивчення пулів стабільних метаболітів оксиду азоту (нітрит- і нітрат-аніонів) показало, що їх вміст зазнає незначні зміни, які простежуються на рівні тенденції для  $NO_2^-$ . Вміст  $NO_3^-$  в еритроцитах хворих достовірно збільшувався на 22,0 % порівняно з контрольною групою. Це може свідчити або про гальмування процесів окиснення NO (на тлі достатньо високої активності індукцйбельної синтази оксиду азоту), або про більш активне використання NO в інших реакціях метаболізму оксиду азоту, зокрема, в реакціях утворення нітрозотіолів.

Вивчення вмісту в еритроцитах низькомолекулярних і високомолекулярних продуктів нітрозилування показало, що у хворих на еритремію спостерігається суттєве зростання рівня високомолекулярних нітрозотіолів (ВМНТ): у 4,36 разу порівняно з контрольною групою (таблиця). Вміст низькомолекулярних нітрозотіолів (НМНТ) був на 30,0 % менше.

Оскільки головним представником низькомолекулярних нітрозотіолів є нітрозоглутатіон [4], можна допустити можливість вивільнення глутатіону з процесів нітрозилування для більш активного його використання еритроцитами за умов патології у відновлювальних реакціях.

Разом із тим, досить виражене збільшення вмісту в еритроцитах хворих високомолекулярних нітрозотіолів свідчить про активний перебіг процесів, що ведуть до утворення різних продуктів хімічної модифікації протеїнів, головним чином, гемоглобіну. Нітрозилування гемоглобіну можна було б оцінювати як один з механізмів регуляції його спорідненості до кисню, утворення оксигенованої форми (за умов нітрозилування по залізу гемової групи).

Отже, одержані дані свідчать про те, що за еритремії в еритроцитах відбуваються метаболічні перебудови, які пов'язані з системою синтезу оксиду азоту і ведуть до переваги інтенсивності неокисного, аргіназного метаболізму над інтенсивністю окисного, NO-синтазного метаболізму L-аргініну. Зміни у системі синтезу оксиду азоту разом із відповідними особливостями в утворенні низькомолекулярних і високомолекулярних продуктів нітрозилування можуть мати певне значення, впливаючи на генерування в еритроцитах хворих активних форм азоту, на рівень відновлювальних еквівалентів у формі глутатіону, а також, що цілком імовірно, на функціональний стан окремих протеїнів, зокрема, гемоглобіну.

#### ВИСНОВКИ

1. В еритроцитах хворих на еритремію відбуваються зміни у системі синтезу оксиду азоту, що ведуть до переваги неокисного, аргіназного метаболізму над окисним, NO-синтазним метаболізмом L-аргініну, а також до обмеження накопичення NO-аніонів.
2. За еритремії в еритроцитах змінюється співвідношення низькомолекулярних і високомолекулярних продуктів нітрозилування: суттєво збільшується вміст високомолекулярних нітрозотіолів, що може вплинути на структурно-функціональний стан еритроцитарних протеїнів.
3. Зміни у системі синтезу оксиду азоту, які простежуються в еритроцитах хворих на еритремію, можуть мати певне компенсаторне значення, впливаючи на генерування активних форм азоту і підтримку рівня відновлювальних еквівалентів у формі глутатіону.

#### Список літератури

1. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5-18.
2. Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс при воспалении / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков // Усп. совр. биол. – 1997. – Т. 117, № 2. – С. 155-169.

3. Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньшиков, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин // Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
4. Сагач В.Ф. Пригнічення оксидативного та нітрозативного стресу як механізм кардіо- і вазопротекторної дії екдистерону за умов експериментального цукрового діабету I типу / В.Ф. Сагач, Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба, О.Д. Присяжна // Фізіол. журн. – 2008. – Т. 54, № 5. – С. 46-54.
5. Аكوпова О.В. Оксид азоту пригнічує відкриття мітохондріальної пори і збільшує кальцієву ємність мітохондрій in vivo / О.В. Аكوпова, А.В. Коцюруба, Ю.П. Ткаченко, В.Ф. Сагач // Фізіол. журн. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 3-11.
6. Ping P. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric-oxide-induced and ischemia-induced preconditioning / P. Ping, H. Takano, J. Zhang et al // Circulat. Res. – 1999. – V. 84. – P. 587-604.
7. Li J. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes / J. Li, C.A. Bombeck, S. Yang, Y.M. Kim, T.R. Billiar // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 17325-17333.
8. Ёлкина Н.М. Энзиматическая активность эритроцитов человека при ишемической болезни сердца в условиях развития окислительного стресса / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко, И. Шашуа // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. – Серия: Биология, химия. – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С. 124-128.
9. Новицкий В.В. Белковый спектр мембран эритроцитов у больных раком легкого и с опухолями головы и шеи / В.В. Новицкий, В.Е. Гольберг, М.В. Колосова и др. // Бюл. эксперим. биол. и медиц. – 1999. – Прил. 1. – С. 18-20.
10. Drabkin D. A simplified technique for large scale crystallization myoglobin and haemoglobin in the crystalline / D. Drabkin // Arch. biochem. – 1949. – V. 21. – P. 224-226.
11. Шугалей В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В.С. Шугалей, А.С. Козина // Физиол. журн. СССР. – 1977, № 8. – С. 1199-1202.
12. Chin S.Y. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats / S.Y. Chin, K.N. Pandey, S.J. Shi et al // Amer. J. Physiol. – 1999. – V. 277, N 5. – P. 797-804.
13. Green L.L. Analysis of nitrate, nitrite and [N+5]-nitrate in biological fluids / L.L. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski et al // Anal. Biochem. – 1982. – V. 126, N 1. – P. 131-138.
14. Gerdal D. Inhibition of the catalytic activity of alkoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc / D. Gerdal, A.J. Cederbaum // Biochemistry. – 1996. – V. 35, N 50. – P. 16186-16194.
15. Villa Bianca R. Sphingosine 1-phosphate induced endothelial nitric-oxide synthase activation through phosphorylation in human corpus cavernosum / R. Bianca Villa, R. Sorrentino, C. Imbimbo et al // J. Pharmacol. Exp. Therap. – 2006. – V. 316, N 2. – P. 703-708.

**Ёлкина Н.М. Показатели метаболизма оксида азота в эритроцитах больных эритремией / Н.М. Ёлкина, С.В. Коношенко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014 – Т. 27 (66), № 1. – С.64-70.**

Показано, что в эритроцитах больных эритремией наблюдаются изменения в системе синтеза оксида азота, которые ведут к преобладанию неокислительного, аргиназного метаболизма над окислительным, NO-синтазным метаболизмом L-аргинина и к ограничению накопления NO-анионов. Вместе с этим, прослеживается увеличение содержания в эритроцитах высокомолекулярных продуктов нитрозилирования, что может влиять на структурно-функциональное состояние эритроцитарных протеинов.

**Ключевые слова:** эритроциты, система синтеза оксида азота, аргиназа, NO-синтазы, NO-анионы, низкомолекулярные и высокомолекулярные продукты нитрозилирования, эритремия.

## INDEXES OF NITRIC OXIDE METABOLISM IN ERYTHROCYTES OF PATIENTS WITH ERYTHRAEMIA

Yolkina N.M.<sup>1</sup>, Konoshenko S.V.<sup>2</sup><sup>1</sup>Crimea faculty of Zaporogie National University, Simferopol, Ukraine<sup>2</sup>Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine

E-mail: nataleiolkina@gmail.com

Elucidation of the molecular basis of various diseases and pathological states of human organism is one of the most significant problems of medicine and biology [1-3]. It is known, that the ways of production of free radicals of oxygen and nitric oxide are closely binded [4]. The synthesis of nitric oxide over standard level may causes nitrosative stress, that is binded with active forms of nitric oxide, for example, peroxinitrite and nitric dioxide [4]. The formation of nitrosothiols is one of the markers of nitrosative stress also [4, 5]. Given that in some diseases erythrocytes are involved in pathological process [6, 7], the aim the present work was to study the indexes of the system of nitric oxide synthesis and nitrosylation in erythrocytes under erythraemia. The materials for the study were the erythrocytes of healthy subjects (control group) and patients with erythraemia. The erythrocytes were hemolised by distilled water. In hemolisesates of erythrocytes was determined the content of NO-anions ( $NO_2^-$  and  $NO_3^-$ ) [8], low-molecular and high-molecular products of nitrosylation [9] and the activity of arginase [10], cNOS and iNOS [11]. It has been shown, that in erythrocytes of patients with erythraemia the system of nitric oxide synthesis is changed. The metabolism of L-arginine by arginase prevails over oxidative metabolism with NO synthesis (was 284% higher when compared to control group). The activity of  $Ca^{2+}$ -dependent NO-synthase was 89% less when compared to control group. The activity of  $Ca^{2+}$ -independent nitric oxide synthase was risen (100% higher when compared to control group). The activity of arginase was risen also (290% higher when compared to control group). The accumulation of NO-anions in erythrocytes of patients was limited. The level of low-molecular products of nitrosylation was 30 % less when compared to control group. It is known that nitrosoglutatione is one of the main low-molecular products of nitrosylation [4]. The lowering of the content of low-molecular products in erythrocytes of patients with erythraemia may be as index of releasing of glutatione from processes of nitrosylation for it more active utilization in reductive reactions. At the same time, the content of high-molecular products of nitrosylation was risen (336% higher when compared to control group). So far as the high-molecular products of nitrosylation are, in the main, nitrosylated proteins [4], these changes in erythrocytes of patients with erythraemia may have certain influence on structural-functional state of erythrocyte proteins; in particular, of haemoglobin. The changes that are observed in the system of nitric oxide synthesis in erythrocytes may have influence on generation of nitric active forms and level of reductated glutatione also.

Thus, under erythraemia the metabolic changes are realized in erythrocytes, the development of nitrosative stress is accompanied by realization of some compensative reactions.

**Keywords:** erythrocytes, system of nitric oxide synthesis, arginase, NO-synthases, NO-anions, low-molecular and high-molecular products of nitrosylation, erythraemia.

**References**

1. Dubinina E.E., Pustigina A.V., Oxidative modification of proteins, its importance in pathological states, Ukr. biochem. J., **80**, **6**, 5 (2008).
2. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Oxidative stress under inflammation, Impr. mod. biol., **117**, **2**, 155 (1997).
3. Menshikov E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Oxidative stress: pathological states and diseases, 284 p. (ARTA, Novosibirsk, 2008).
4. Sagach V.F., Korkach U.P., Kotsuruba A.V., Prysyzhna O.D., The inhibition of oxidative stresses by ecdysterone as the mechanism of the cardio- and vasoprotective action at type I diabetes, Physiol. J., **54**, **5**, 46 (2008).
5. Akopova O.V., Kotsuruba A.V., Tkachenko U.P., Sagach V.F., Nitric oxide suppresses permeability, transition pore opening and enhances calcium uptake in mitochondria in vivo, Physiol. J., **51**, **3**, 3 (2005).
6. Yolkina N.M., Konoshenko S.V., Shashua I., Enzym activity of human erythrocytes under ischemic heart disease, Scientific Notes Taurida National V.I. Vernadsky University, **24** (**63**), **2**, 124 (2011).
7. Novitski V.V., Goldberg V.E., Kolosova M.V., Protein spector of erythrocyte membranes of patients with lung cancer and tumours of head and neck, Bul. experim. biol. and med., **suppl. 1**, 18 (1999).
8. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J., Analysis of nitrate, nitrite and [N<sup>+3</sup>]-nitrate in biological fluids, Anal. Biochem., **126**, **1**, 131 (1982).
9. Gerdal D., Cederbaum A.J., Inhibition of the catalytic activity of alcoholdehydrogenase by NO is associated with S-nitrosylation and the release of zinc, Biochemistry, **35**, **50**, 16186 (1996).
10. Shugaley V.S., Kozina A.S., Content of urea and arginase activity in rats organs under acclimatization for cold, USSR Physiol. J., **8**, 1199 (1977).
11. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J., Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup> – depended NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats, Amer. J. Physiol., **277**, **5**, 797 (1999).

*Поступила в редакцію 16.01.2014 г.*

**УДК 639.123**

## **СОВРЕМЕННОЕ ОХОТНИЧЬЕ ХОЗЯЙСТВО КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФАУНЫ**

*Корж А.П.*

*Запорожский национальный университет, Запорожье, Украина  
E-mail: 312922@rambler.ru*

Современное охотничье хозяйство в своей деятельности опирается на подходы, свойственные сельскому и лесному хозяйствам, в частности экономическую эффективность. Охотничьи угодья превращаются в квазиприродные экосистемы, неспособные к обеспечению собственного гомеостаза. Ответная реакция охотничьих животных состоит в процессах синантропизации, перестройки популяционной структуры и прочих нежелательных явлениях.

**Ключевые слова:** синантропизация, фауна, управление популяциями, биотехния, интенсификация.

Вопросы рационального природопользования в последнее время приобретают первоочередное значение в оптимизации взаимодействия человека и биосферы. Состояние биоразнообразия Украины в результате воздействия антропогенных факторов является критическим и находится на грани достижения фазы необратимости в плане своих изменений [1].

Сейчас признается чрезвычайная сила действия антропогенных факторов, которая может вызывать микро- и макроэволюционные последствия. Одним из наиболее ощутимых результатов подобных влияний является исчезновение видов [2–4]. Ускорение утраты биоразнообразия в мире происходит из-за деградации и фрагментации среды обитания, изменения климата, чрезмерной эксплуатации природных популяций и т.д. [5–7]. Из-за взаимозависимости между видами в экосистемах, утраты отдельных видов могут приводить к каскадам повторных вымираний [8, 9]. В то же время, значительно меньшее внимание стали уделять последствиям непосредственной эксплуатации популяций [10].

Многими специалистами XX век считается переломным в отношениях человека и природы, что не обошло стороной и охотничье хозяйство. Количество охотников постоянно растет, что особенную выраженность имеет в развитых странах с высокой плотностью населения. Экстенсивные методы ведения охотничьего хозяйства в угодьях большинства европейских стран уже давно исчерпали себя [11, 12].

Популяции эксплуатируемых видов подвергаются двойному воздействию: они обитают в преобразованных человеческой деятельностью условиях и ощущают непосредственное преследование со стороны человека во время промысла. Поэтому они заслуживают особого внимания со стороны специалистов [3, 10]. Подобное

двойное воздействие свойственно не только умеренному поясу, где охота издавна пользуется особой популярностью, но даже таким экзотическим регионам как Амазония [13].

Одним из наиболее показательных является состояние копытных, общая численность которых в России оказалась как минимум на порядок ниже оптимальной [14]. Приблизительно такую же численность имеют Франция, Швеция и Германия на значительно меньших территориях, а объемы добычи в этих странах большие в 6 – 15 раз. При этом считается, что причины скудности дичи являются многофакторными, а главными выступают антропогенное воздействие и влияние хищников [15]. Так, количество крупных хищников в России в отдельных местностях даже превышает число жертв [16].

Существует мнение, что непромысловые утраты копытных в несколько раз превышают объемы добычи охотников. Одной из основных причин падения численности при этом считается преобразование структуры популяции и уничтожение репродуктивного ядра [17].

Во многих случаях во время охоты не учитываются особенности популяций охотничьих животных – в степной маргинальной популяции лося Украины имеется огромное количество одиноких особей, в том числе и в период размножения. Именно это является причиной низкого прироста поголовья при объемах изъятия, превышающих возобновление [18].

В последнее время происходят существенные изменения как структуры ареалов, так и динамики численности отдельных видов, чему способствует активная хозяйственная деятельность человека [19]. В то же время, считается доказанным, что приостановление охоты не предотвращает исчезновение видов, а лишь замедляет данный процесс. Сегодня существуют значительно более эффективные способы управления состоянием популяций проблемных видов для восстановления их численности [20].

Предполагается, что в охотничье хозяйство необходимо внедрять современные экологические принципы управления популяциями охотничье-промысловых животных, которые должны осуществляться на популяционном, биогеоценологическом и ландшафтном уровнях. Конечной же целью подобного управления является добыча максимально возможного количества животных при минимальных совокупных затратах без нарушения способности популяций восстанавливать свою численность [21].

В то же время, не так много работ поднимает вопросы о последствиях данной интенсификации. Поэтому целью нашей работы является анализ последствий современных форм ведения охотничьего хозяйства для природных экосистем.

Общепринятым считается положение, что интенсификация охотничьего хозяйства предусматривает подход, при котором воспроизводство охотничьих животных приобретает значение главного производственного процесса с тенденцией на расширенное воспроизводство. Главной же производственной задачей в этом случае является дичеразведение, формирование желательной структуры населения животных, управление численностью и другие биотехнические мероприятия [12].



Интенсификация охотничьего хозяйства должна неразрывно сочетать в себе экономические методы, проведение биотехнических мероприятий, рационализацию добычи охотничьих животных. В последнем случае имеется в виду создание такой структуры и плотности населения животных, которые максимально способствовали бы повышению продуктивности их популяций [22].

Биотехния считается важным средством научно обоснованной перестройки и создания биогеоценозов, характеризующихся высокой, устойчивой продуктивностью. Биотехния разрабатывает методы направленного воздействия как на среду обитания диких животных, так и на их популяции [11].

Биотехническое воздействие – направленная акция, рассчитанная на повышение получаемой от охоты продукции. Наряду с этим должна осуществляться и другая цель – экологическая, то есть сохранение устойчивого функционирования природных экологических систем. Поэтому критериями биотехнического воздействия должны быть целенаправленность, эффективность и экологическая допустимость [23].

В то же время, существует мнение, что рассмотрение биотехнических мероприятий преимущественно с точки зрения воспроизводства, может нанести охотничьему хозяйству ущерб. По мнению данных авторов, в этом случае интересы охотничьего хозяйства вступают в противоречия с другими природопользователями [24].

Таким образом, среди задач биотехнии наиболее важными следует считать: 1) достижение популяциями эксплуатируемых видов точки насыщения (экологического оптимума); 2) нивелирование популяционных волн, вызывающих колебания численности данных видов; 3) реализация животными биотического потенциала и формирование значительного «резерва популяции», используемого во время охоты.

Однако, еще А. Леопольд [20] говорил о том, что предел насыщения редко когда реализуется в природе. Идеи нецелесообразности накопления ресурсов животных поддерживают и другие авторы [12]. В отношении нивелирования популяционных волн следует отметить, что это касается только неперiodических волн и колебаний численности в результате чрезвычайных происшествий. Периодические же волны, вызванные сезонными процессами, из которых наибольшее практическое значение имеют воспроизводство (желательно расширенное) и изъятие части животных во время охоты, при этом только увеличиваются. Однако наличие сукцессионных процессов делает подобное нивелирование неперiodических популяционных волн невозможным даже теоретически.

На наш взгляд, одним из негативных последствий применения биотехнических мероприятий является создание культиватора в понимании В.Е. Заики [25]. В этом случае, снятие лимитирования одновременно по многим факторам означает оптимизацию экосистемы «в угоду» интересующему нас компоненту. В крайнем случае подобных преобразований человек фактически заменяет экосистему новой.

Уже достаточно давно известны результаты влияния активной эксплуатации на естественные популяции животных. Считается, что промысел выступает одним из наиболее важных факторов элиминации у эксплуатируемых видов – ежегодно из

подобных популяций изымается по усредненным оценкам количество животных равное или даже большее годового прироста. При этом бытует мнение, что все изымаемые особи идентичны по своим характеристикам, а изъятие не носит избирательного характера [3, 10].

В то же время, имеется целая серия наблюдений, свидетельствующая о существенных изменениях структуры популяций охотничьих животных из-за избирательности разных способов охоты. Из наиболее общих механизмов формирования направленности элиминации указываются: пространственный (неоднородность ареала), временной, этологический и собственно избирательная элиминация (как осознанный отбор определенных особей) [26].

В соответствии с данными Я.С. Русанова [27], избирательность в изъятии животных обуславливается в первую очередь отличиями их поведения. Большинство охот опирается на три наиважнейшие поведенческие особенности: реакцию на угрозу, активность перемещения по угодьям и склонность к объединению с себе подобными. Из-за поведенческих отличий разновозрастных и разнополых особей, разные способы охоты вызывают неодинаковые изменения в структуре популяций соответствующих видов.

Одним из последствий охоты может быть увеличение в популяции дичи количества самцов – считается также, что подобный эффект преобладания самцов над самками наблюдается в любой популяции при негативных влияниях условий среды [20].

В данном случае, изменения биологии активно эксплуатируемых животных следует рассматривать не только прямым результатом воздействия человека, но и ответной реакцией популяций. В первую очередь это касается появления тенденций к развитию r-стратегии, проявляющейся в измельчании особей, повышении их плодовитости и т.д. По всей видимости, человек, выполняя функцию «универсального хищника», вызывает соответствующую ответную реакцию в эксплуатируемых популяциях.

Так, в разных систематических группах позвоночных, активно эксплуатируемых человеком, наблюдаются общие процессы изменения их биологических особенностей: измельчание особей, смещение сроков полового созревания, сокращение или увеличение плодовитости, увеличение ранней постнатальной смертности молодняка, изменение уровня фенотипической и генотипической изменчивости, смещение сроков миграционной активности, появления молодняка и т.д. Подобные процессы перестройки структуры популяций свойственны так же и рыбному хозяйству даже в случае использования безвыборочного лова [3, 27 – 29].

Еще одним результатом воздействий человека оказывается процесс синантропизации, охватывающий практически все виды животных, что особенно характерно для Европы. Свойственен он и охотничьим видам, которые все больше тяготеют к угодьям, кардинально преобразованным человеком. Это обуславливается не только естественными процессами, но и направленным воздействием человека (рис.) [19].

Таким образом, человек искусственно преобразовывает экосистемы, перераспределяя в них энергетические потоки. По большому счету, данная деятельность во многом напоминает ведение сельского хозяйства, более того, она опирается на его последние достижения.

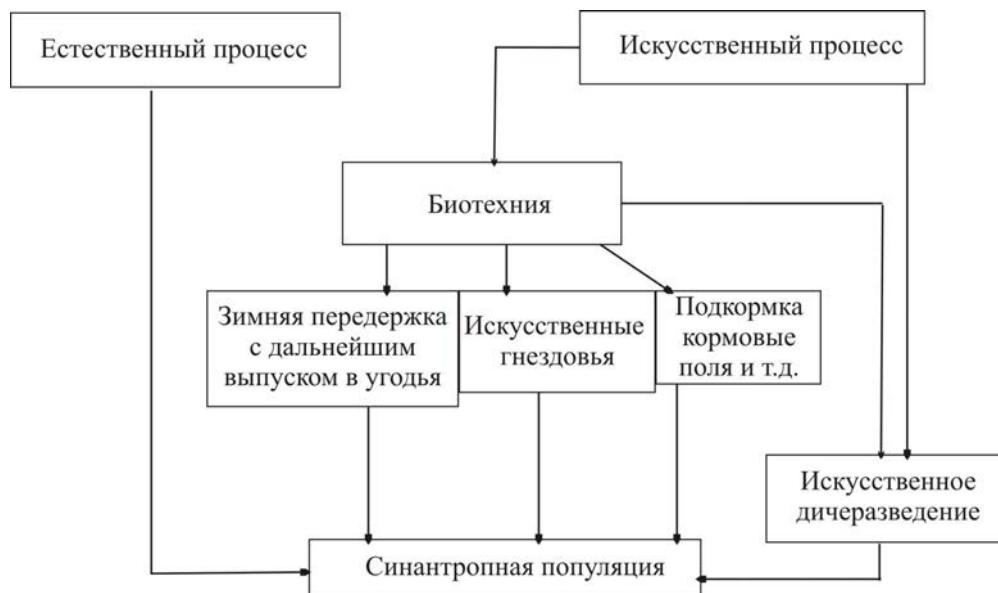


Рис. Схема формирования синантропных популяций, предусматривающая значительное влияние человека [30]

Так, по мнению Н.Ф. Реймерса [31], экологически оптимальная плотность животных в угодьях является переменной величиной, образуя своеобразные сукцессии. Они подобны агросукцессиям: каждая культура требует определенных условий для роста. Специальными приемами можно добиться повышения продуктивности, однако устранение последних никогда не даст подобных результатов.

Переход к интенсивным методам ведения охотничьего хозяйства способствует более быстрому процессу синантропизации охотничьих животных. В результате, возрастает зависимость последних от человека и утрачивается способность к поддержанию популяционного гомеостаза. С другой стороны, преобразованные экосистемы утрачивают прежнюю структуру и становятся более нестабильными. Так, уничтожение или сильное ограничение влияния хищников как конкурентов человека за охотничью продукцию нарушает механизм межвидовой борьбы за существование и ослабляет популяции жертв (охота далеко не всегда дает полноценную замену действия хищников). Так же последние в случае всплеск численности могут подорвать свою кормовую базу, нарушив экосистему в целом.

Повышая продуктивность экосистем, мы не только уменьшаем их способность к самоподдержанию, но и способствуем повышенному проникновению синантропов

на новые, освоенные человеком места. Особое значение приобретает направленное переселение видов, получившее особую популярность в XX веке. Наиболее печальным примером может быть акклиматизация американской норки, которая стала вытеснять европейскую [32, 33].

Многие виды, в том числе и охотничьих животных, селятся рядом с человеком, включая современные мегаполисы. В некоторых случаях, как например крупные копытные, хищники, подобное соседство оказывается не только неприятным, но и опасным.

Таким образом, современные охотничьи угодья мы не имеем права рассматривать как естественные экосистемы. По сути, нами создаются и поддерживаются квазиприродные структуры, неспособные к самоподдержанию гомеостаза. Благодаря интенсификации и активному применению биотехнических мероприятий, охотничье хозяйство в современном понимании ничем не отличается от сельского или лесного хозяйства – это такое же производство, требующее соответствующей организации. Если прежние формы охотничьего хозяйства могли рассматриваться как своеобразный сбор «дани» с естественных угодий, то сейчас оно требует в первую очередь создания и поддержания популяций охотничьих видов в удовлетворительном состоянии. Это свидетельствует о невозможности полноценного существования соответствующих экосистем без вмешательства человека (либо требует его полного отсутствия). Определяющей же степень человеческого влияния на отдельные природные образования пока является экономическая эффективность, что не всегда способствует повышению устойчивости данных структур.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, современное охотничье хозяйство в своей деятельности опирается на подходы, свойственные сельскому и лесному хозяйствам, определяющими которых является экономическая эффективность. Охотничьи угодья превращаются в квазиприродные экосистемы, неспособные к обеспечению собственного гомеостаза. Ответная реакция охотничьих животных состоит в процессах синантропизации, перестройки популяционной структуры и прочих нежелательных явлениях. В дальнейшем предполагается более детальное рассмотрение отдельных феноменов влияния охотхозяйственной деятельности на фауну.

#### Список литературы

1. Мовчан Я.І. Збереження біотичного різноманіття України (методологія, теорія, практика) / Я.І. Мовчан // Автореф. дис. ...д.б.н.: 03.00.16. – екологія. – Дніпропетровськ, 2009. – 54 с.
2. Fonseca C.R. The Silent Mass Extinction of Insect Herbivores in Biodiversity Hotspots / C.R. Fonseca // Conservation Biology. – 2009. – V. 23, № 6. – P. 1507 – 1515.
3. Рожков Ю.И. Микроэволюционный процесс / Ю.И. Рожков, А.В. Проняев. – М.: Из-во Центральной научно-исследовательской лаборатории охотничьего хозяйства и заповедников, 1994. – 364 с.

4. Understanding the biodiversity consequences of habitat change: the value of secondary and plantation forests for neotropical dung beetles / T.A. Gardner, M.I.M. Hernández, J. Barlow, C.A. Peres // *Journal of Applied Ecology*. – 2008. – V. 45, № 3. – P. 883 – 893.
5. Mechanisms driving change: altered species interactions and ecosystem function through global warming / [L. W. Traill, M. L. M. Lim, N. S. Sodhi, C. J. A. Bradshaw] // *Journal of Animal Ecology* – 2010. – V. 79, № 5. – P. 937 – 947.
6. Hanski I. The world that became ruined / I. Hanski // *European Molecular Biology Organization. Special issue*. – 2008 a. – Vol. 9. – P. 34 – 36.
7. Climate effects on population fluctuations of the white-throated dipper *Cinclus cinclus* / [A.L.K. Nilsson, E. Knudsen, K. Jerstad, O.W. Røstad, B. Walseng, T. Slagsvold, N.C. Stenseth] // *Journal of Animal Ecology*. – 2011. – V. 80, № 1. – P. 235 – 243.
8. de Visser S. The Serengeti food web: empirical quantification and analysis of topological changes under increasing human impact / de Visser S., Freymann B., Olff H. // *Journal of Animal Ecology*. – 2011. – V. 80, № 4. – P. 465 – 475.
9. Хански И. Ускользящий мир: Экологические последствия утраты местообитаний / И. Хански. Пер. с англ. В.И. Ланцова. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2010. – 340 с.
10. Проняев А.В. Искусственные бессознательный отбор в промысловых популяциях / А.В. Проняев, Ю.И. Рожков // *Вестник охотоведения*. – 2012. – Т. 9, № 1. – С. 29 – 41.
11. Гаврин В.Ф. Задачи научного охотоведения в развитии охотничьего хозяйства / В.Ф. Гаврин // *Охотоведение – М.: Лесная промышленность, 1972. – С. 5 – 31.*
12. Павлов М.П. Условия повышения роли биотехнии в интенсификации охотхозяйственного производства / М.П. Павлов // *Вопросы интенсификации охотничьего хозяйства. – М.: Из-во ЦНИЛ Главохоты, 1988. – С. 30 – 47.*
13. Modelling the long-term sustainability of indigenous hunting in Manu National Park, Peru: landscape-scale management implications for Amazonia / [T. Levi, G. H. Shepard Jr, J. Ohl-Schacherer, C.A. Peres, D. W. Yu ] // *Journal of Applied Ecology*. – 2009. – V. 46, № 4. – P. 804 – 814.
14. Дежкин В.В. Охота и рыболовство в США и России – материал для размышлений / В.В. Дежкин // *Россия в окружающем мире: 2004 (Аналитический ежегодник).. – М.: Модус – К – Этерна, 2005. – С. 151 – 179.*
15. Дёжкин В. Концептуальные основы рационального ресурсопользования в охотничьем хозяйстве России / В. Дёжкин, А. Данилкин, В. Кузякин // *Национальный охотничий журнал Охота. – 2009. – № 7. – С. 2 – 7.*
16. Данилкин А.А. Управление ресурсами охотничьих животных: принципы и методы / А.А. Данилкин // *Вестник охотоведения. – 2009. – Т. 6, № 1. – С. 56 – 64.*
17. Данилкин А. Ресурсы копытных. Парадоксы управления / А. Данилкин // *Национальный охотничий журнал Охота. – 2008. – № 1. – С. 2 – 5.*
18. Волох А.М. Екологічне регулювання чисельності лося у південній частині України / А.М. Волох // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2002. – Вип. 30. – С. 49 – 54.*
19. Панов Г. Динаміка ареалів та чисельності напівводяних хутрових звірів в Україні у другій половині ХХ століття / Г. Панов // *Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2002. – Вип. 30. – С. 119 – 132.*
20. Leopold A. *Game Management* / A. Leopold – New York: Scribner, 1933. – 481 s.
21. Фертиков В.И. Совершенствование охотничьего хозяйства РСФСР / В.И. Фертиков // *Вопросы интенсификации охотничьего хозяйства. – М.: Из-во ЦНИЛ Главохоты, 1988. – С. 4 – 12.*
22. Петрашов В.В. Интенсификация охотничьего хозяйства биотехническими методами / В.В. Петрашов // *Вопросы интенсификации охотничьего хозяйства. – М.: Из-во ЦНИЛ Главохоты, 1988. – С. 62 – 81.*
23. Чесноков Н.И. Биотехния: вопросы теории / Н.И. Чесноков // *Вопросы интенсификации охотничьего хозяйства. – М.: Из-во ЦНИЛ Главохоты, 1988. – С. 48 – 61.*
24. Романов Ю.М. Охрана природы и биотехния при осушении земель / Романов Ю.М., Козлова М.В., Мазин Л.Н. // *Вопросы интенсификации охотничьего хозяйства. – М.: Из-во ЦНИЛ Главохоты, 1988. – С. 105 – 114.*
25. Заика В. Е. Емкость среды – содержание понятия и его применение в экологии / В.Е. Заика // *Экология моря. – 1981. – Вып. 7. – С. 3 – 9.*

26. Проняев А.В. Механизмы образования искусственного бессознательного отбора в промысловых популяциях / А.В. Проняев, Ю.И. Рожков // Вестник охотоведения. – 2012. – Т. 9, № 1. – С. 42 – 54.
27. Русанов Я.С. Влияние охоты на структуру популяций дичи / Я.С. Русанов // Автореф. дис. ... д.б.н. – Свердловск, 1975. – 46 с.
28. Mysterud A. Maturation trends in red deer females over 39 years in harvested populations / Mysterud A., Yoccoz N.G., Langvatn R. // Journal of Animal Ecology. – 2009, № 78. – p. 595 – 599.
29. Габузов О.С. Основы искусственного дичеразведения и разведения редких видов животных (теоретические и прикладные аспекты): автореф. дис. на соискание учен. степени докт-ра биол. наук спец. 06.02.06 – Звероводство и охотоведение (охотоведение) / О.С. Габузов – М., 1992. – 44 с.
30. Валькович В.М. Интродукция искусственно выращенных птиц в природу / В.М. Валькович // Разведение ценных и редких видов животных – М.: Из-во ЦНИЛ Главохоты РСФСР, 1987. – С. 119 – 130.
31. Реймерс Н.Ф. Экологические сукцессии и промысловые животные / Н.Ф. Реймерс // Охотоведение. – М.: Лесная промышленность, 1972. – С. 67 – 108.
32. Терновский Д.В. О межвидовых отношениях между куньими / Д.В. Терновский // Охота и охотничье хозяйство. – 1980. – №5. – С. 17.
33. Кораблев Н.П. Интродукция и целостность вида / Кораблев Н.П., Кораблев М.П., Кораблев П.Н. // Целостность вида у млекопитающих (изолирующие барьеры и гибридизация). Материалы конференции. – М.: Товарищество научных изданий КМК. – 2010. – С. 43.

**Корж О.П.** Сучасне мисливське господарство як одна з причин перетворення фауни / О.П. Корж // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 71-80.

Сучасне мисливське господарство у своїй діяльності спирається на підходи, властиві сільському та лісовому господарствам, зокрема економічну ефективність. Мисливські угіддя перетворюються на квазіприродні екосистеми, нездатні до забезпечення власного гомеостазу. Відповідна реакція мисливських тварин полягає в процесах синантропізації, перебудови популяційної структури та інших небажаних явищах.

**Ключові слова:** синантропізація, фауна, управління популяціями, біотехнія, інтенсифікація.

## **MODERN HUNTING AS ONE OF THE CAUSES OF TRANSFORMATION OF FAUNA**

*Korzh A.P.*

*Zaporizhzhya National University, Zaporizhzhya, Ukraine  
E-mail: 312922@rambler.ru*

Issues of environmental management recently have acquired paramount importance in optimizing the interaction between man and the biosphere. An emergency action force of anthropogenic factors, which may cause micro-and macroevolution consequences now is recognized. One of the most tangible results of these influences is the disappearance of species.

Populations of exploited species undergo a double impact: they live in the transformed by human activity conditions and feel the direct persecution by man during a trade. It is believed that the intensification of hunting provides an approach where the reproduction of game animals becomes the main value of the production process with a tendency for the expanded reproduction. The basis of such intensification should be biotechnology.

However, the removal of the limitation on many factors simultaneously means the optimization of the ecosystem "to please" component with interests us. In an extreme case of such transformations people actually replace the ecosystem by a new one.

In different taxonomic groups of vertebrates, actively exploited by man, there are common change of processes their biology: degeneration of individuals, shift timing of puberty, reducing or increasing of fertility and early postnatal mortality of the young, changes in phenotypic and genotypic variability, a shift of terms of migration activity, the emergence of the young etc.

Man artificially transforms ecosystems, redistributing the energy flows. This activity is like a farming, moreover, it relies on its recent achievements.

Thus, we have no right to regard modern hunting grounds as a natural ecosystem. In fact, we have created and maintained kvazinalural structure incapable of self-maintenance of homeostasis. The response reaction of game animals is synanthropization processes, restructuring of the population structure and other undesirable phenomena. It testifies to the impossibility of a full-fledged existence of the relevant ecosystems without human intervention (or requires a full absence).

**Keywords:** sinanthropic, fauna, population management, biotechny, intensification.

### References

1. Movchan Ya.I. Preserving of biological diversity of Ukraine (methodology, theory and practice) / Abstract. Thesis. Dr. ...: 03.00.16. – Ecology. 54 p (Dnepropetrovsk, 2009).
2. Fonseca C.R. The Silent Mass Extinction of Insect Herbivores in Biodiversity Hotspots, *Conservation Biology*, **23**, 1507 – 1515 (2009).
3. Rozhkov Y.I., Pronyaev A.V. Microevolutionary process, 364 p. (Moscow, 1994).
4. Gardner T.A., Hernández M.I.M., Barlow J., Peres C.A. Understanding the biodiversity consequences of habitat change: the value of secondary and plantation forests for neotropical dung beetles, *Journal of Applied Ecology*, **45**, 883 – 893 (2008).
5. Traill L.W., Lim M.L.M., Sodhi N.S., Bradshaw C.J.A. Mechanisms driving change: altered species interactions and ecosystem function through global warming, *Journal of Animal Ecology*, **79**, 937 – 947 (2010).
6. Hanski I. The world that became ruined, *European Molecular Biology Organization. Special issue*, **9**, 34 – 36 (2008).
7. Nilsson A.L.K., Knudsen E., Jerstad K., Røstad O.W., Walseng B., Slagsvold T., Stenseth N.C. Climate effects on population fluctuations of the white-throated dipper *Cinclus cinclus*, *Journal of Animal Ecology*, **80**, 235 – 243 (2011).
8. de Visser S., Freymann B., Olff H. The Serengeti food web: empirical quantification and analysis of topological changes under increasing human impact, *Journal of Animal Ecology*, **80**, 465 – 475 (2011).
9. Hanski I. *Whispered World: Ecological Consequences of habitat loss*, 340 p. (Moscow, 2010).
10. Pronyaev A.V., Rozhkov Y.I. Unconscious artificial selection in field populations, *Bulletin of hunting*, **9**, 29 – 41 (2012).
11. Gavrin V.F. Scientific tasks in the development of hunting, *Game management*, 5 – 31 (1972).
12. Pavlov M.P. Terms of enhancing the role of biotechnology in the production intensification of hunting, *Questions intensification of hunting*, 30 – 47 (Moscow, 1988).
13. Levi T., Shepard G.H., Ohl-Schacherer Jr.J., Peres C.A., Yu D.W. Modelling the long-term sustainability of indigenous hunting in Manu National Park, Peru: landscape-scale management implications for Amazonia, *Journal of Applied Ecology*, **46**, 804 – 814 (2009).
14. Dezhkin V.V. Hunting and Fishing in the United States and Russia - food for thought, *Russia in the outside world: 2004 (Analytical Annual)*, 151 – 179 (2005).

15. Dezhkin V., Danilkin A., Kuzyakin V. Conceptual bases of rational resource use in hunting of Russia, *National Hunting magazine*, **7**, 2 – 7 (2009).
16. Danilkin A.A. Resource management of game animals: principles and methods, *Bulletin of hunting*, **6**, 56 – 64 (2009).
17. Danilkin A. Resources of ungulates. Paradoxes of management, *National Journal of hunting*, **1**, 2 – 5 (2008).
18. Volokh A.M. Environmental regulation of moose in southern Ukraine, *Bulletin of Lviv University. Biology Series*, **30**, 49 – 54 (2002).
19. Panov G. Dynamics of habitat and number of florwater fur-bearing animals in Ukraine in the second half of the twentieth century, *Bulletin of Lviv University. Biology Series*, **30**, 119 – 132 (2002).
20. Leopold A. *Game Management* 481 p. (Scribner, 1933).
21. Fertikov V.I. Improvement of Hunting in RSFSR, *Questions intensification of hunting*, 4 – 12 (1988).
22. Petrashov V.V. Intensification of Hunting biotechnology methods, *Questions intensification of hunting*, 62 – 81 (1988).
23. Chesnokov N.I. Biotechnology: Theory, *Questions intensification of hunting*, 48 – 61 (1988).
24. Romanov Y., Kozlov M.V., Mazin L.N. Nature conservation and land drainage in biotechnology, , *Questions intensification of hunting*, 105 – 114 (1988).
25. Zaika V.E. Capacity of environment – content of the concept and its application in ecology, *Ecology of Sea*, **7**, 3 – 9 (1981).
26. Pronyaev A.V., Rozhkov Y.I. Mechanisms of formation of artificial unconscious selection in field populations, *Bulletin of hunting*, **9**, P. 42 – 54 (2012).
27. Rusanov Ya.S. Hunting pressure on the structure of populations of game, *Abstract dis. Dr.*, 46 p. (Sverdlovsk, 1975).
28. Mysterud A., Yoccoz N.G., Langvatn R. Maturation trends in red deer females over 39 years in harvested populations, *Journal of Animal Ecology*, **78**, 595 – 599 (2009).
29. Gabuzov O.S. Fundamentals of artificial game propagation and breeding of rare species (theoretical and applied aspects): Thesis on scientific, *Doctoral degree Biology. 06.02.06 - Fur farming and hunting*, 44 p. (Moscow 1992).
30. Valkovich V.M. Introduction of farmed birds in nature, *Breeding of valuable and rare species of animals*, 119 – 130 (1987).
31. Reimers N.F. Ecological succession and commercial animals, *Game management*, 67 – 108 (1972).
32. Ternovski D.V. About interspecific relationship between mustelids, *Fishing and hunting*, **5**, 17 (1980).
33. Korablyov N.P., Korablyov M.P., Korablyov P.N. Introduction and the integrity of the form, *Integrity of mammalian species (insulating barriers and hybridization) Proceedings*, 43 (Moscow, 2010).

Поступила в редакцию 21.01.2014 г.



**УДК 612.822.3+612.825.5**

**ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЕЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ  
АМИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА  
ЖИВОТНОГО СО СПЕКТРАЛЬНОЙ МОЩНОСТЬЮ РИТМОВ ЭЭГ,  
ОТВЕДЕННОЙ В СИММЕТРИЧНЫХ ОТВЕДЕНИЯХ ДВУХ ПОЛУШАРИЙ**

*Куличенко А.М.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: alexander.kulichenko@gmail.com*

В хронических опытах исследовали различия в связях активности нейронов аминергических структур ствола головного мозга со спектральной мощностью (СМ) частотных компонентов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) бодрствующей кошки, отведенной в симметричных локусах. Выявленные различия указывают на возможность оценки участия нейрохимических систем мозга в формировании межполушарной асимметрии ЭЭГ. Обсуждаются возможные механизмы наблюдаемых особенностей связей активности нейронов аминергических структур ствола головного мозга кошки со спектральной мощностью (СМ) частотных компонентов электроэнцефалограммы.

**Ключевые слова:** корреляции, межполушарная асимметрия, ЭЭГ.

**ВВЕДЕНИЕ**

Существование закономерной связи между асимметрией электрофизиологических показателей и функциональным состоянием головного мозга отмечают многие авторы [1-3]. Однако механизмы межполушарной асимметрии (МПА) ЭЭГ изучены недостаточно. Как на предполагаемый источник формирования функциональной асимметрии указывают на биохимическую асимметрию мозга [4, 5, 6]. Суть этого явления в том, что анатомически симметричные участки мозга по химическому составу отличны друг от друга [7] прежде всего, количественно. Например, в мозге обнаружено разное распределение по полушариям катехоламинов и нейромедиаторов [8]. Считается, также, что МПА может быть связана с асимметричным выделением нейромедиаторов в коре полушарий. Поэтому важным аспектом изучения нейрофизиологических механизмов обеспечения МПА является уточнение характера участия глубинных аминергических систем в формировании этого фундаментального свойства ЦНС. Исследования связи активности нейромодуляторных систем мозга с характеристиками ЭЭГ, могут расширить круг задач эффективного использования данного метода в диагностике заболеваний, связанных с нарушениями их функционирования.

Причины преимущественной активации правого или левого полушария достаточно сложны. По гипотезе Доброхотовой и Брагиной (1977) [9], в настоящее

время поддержанной и другими авторами, левое и правое полушария асимметрично связаны с различными подкорковыми центрами. Одним из подходов к изучению этой проблемы является анализ особенностей отражения в частотном спектре ЭЭГ активности аминергических структур ствола головного мозга. Ранее в рамках единого методического подхода было проведено изучение участия аминергических структур ствола головного мозга в формировании частотного состава ЭЭГ [10, 11, 12]. Однако анализ различий в связях активности нейронов аминергических структур ствола головного мозга кошки со спектральной мощностью (СМ) частотных компонентов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) бодрствующей кошки, отведенной в симметричных отведениях двух полушарий не проводился. Актуальность исследования взаимодействия различных нейромедиаторных систем определяется не только задачами, связанными с пониманием механизмов деятельности мозга, но и необходимостью разработки фармакологических средств коррекции разного рода нейропатологий.

Цель работы заключалась в доказательстве участия медиаторных систем в формировании межполушарной асимметрии и исследовании особенностей отражения в частотном составе ЭЭГ взаимодействия между этими системами.

Для решения поставленной цели нами выдвинуты следующие задачи: провести анализ связей спектральной мощности (СМ) ритмов ЭЭГ симметричных областей коры больших полушарий с активностью аминергических нейронов ствола головного мозга животных.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Все эксперименты выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123 от 18 марта 1986 г.).

Динамику пространственно-временной организации электрической активности полушарий мозга животных в условиях сеансов ЭЭГ-ОС изучали на 7-и кошках обоего пола массой 2,5–4,0 кг.

Перед каждой серией опытов животных обучали спокойно сидеть в течение длительного времени в специальном фиксирующем гамаке, расположенном в звукоизолированной камере. Животных предварительно оперировали под наркозом (нембутал 40 мг/кг, внутривенно). Все оперативные действия проводили с соблюдением принципов асептики и антисептики. Сквозь трепанационное отверстие (диаметр 2.5 мм) в соответствии с координатами атласа Ф. Рейнозо-Суареца [13] в мозг животных вводили направляющую канюлю из нержавеющей стали, через которую в дальнейшем выдвигался микроэлектрод. Кончик направляющей канюли в зависимости от задачи исследования располагался в 3–5 мм от одной из трех исследуемых структур ствола головного мозга: вентрального тегмента, А10 (ВТ, 3 животных), голубого пятна, А6 (ГП, 2 кошки) или дорзального ядра шва, В7 (ЯШ, 2 кошки). Данное расстояние от расчетной точки цели выбиралось с целью минимизации повреждений структур-мишеней.

Активные электроды располагали на костях черепа над правой и левой височными областями коры. Референтный электрод располагался в лобной пазухе. После размещения ЭЭГ-электродов поверхность черепа заливали акрилоксидом.

Во время каждого опыта параллельную регистрацию импульсной активности аминергических нейронов с отведением ЭЭГ у бодрствующих кошек проводили в условиях, приближенных к свободному поведению (в состоянии двигательного покоя). Для внеклеточной регистрации импульсной активности нейронов использовали подвижный электрод из серебряного микропровода (диаметр 12 мкм) в стеклянной изоляции (общая толщина 70 мкм).

Потенциалы действия нейронов поступали на вход предварительного усилителя. Затем сигналы фильтровались и усиливались с помощью установки УФУ-БК (производства ЭПМ НИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург).

Полоса пропускания тракта импульсной активности нейронов и ЭЭГ составляла 10-10000 Гц. Сигнал поступал на вход звуковой карты компьютера (частота оцифровки до 4 Гц) и параллельно на монитор для визуального контроля.

ЭЭГ отводили монополярно с помощью электроэнцефалографа "Bioscrypt BST-112" (Германия), сигнал от которого через лабораторный интерфейс SDI-ADC16-16 (выполнен на базе сдвоенного трехканального 10-разрядного аналого-цифрового преобразователя со временем оцифровки 30 мкс ("Saturn Data International", Украина) поступал на вход IBM PC. Частота оцифровки суммарной электрической активности неокортекса составляла 200 Гц.

Указанная методика позволяла проводить записи нейронной активности и ЭЭГ у каждого животного в течение 1–2 мес. Данные эксперимента обрабатывались off-line с помощью компьютерной программы "EEG Mapping 3", разработанной Е.М. Зинченко. Для обработки выбирали безартефактные записи длительностью 60 с. В процессе обработки запись ЭЭГ, разбивалась на 30 эпох величиной 2,0 с и подвергалась спектральному анализу на основе быстрого преобразования Фурье. Выделяли следующие частотные компоненты: 1–3, 4–7, 8–13, 14–30 и 31–48 Гц (дельта-, тета-, альфа-, бета- и гамма-ритмы соответственно), по которым рассчитывали их значения СМ.

Для расчета коэффициента корреляции ( $r$ ) между показателями ФИА ДА-, НА-, и СТ- нейронов и спектральной мощностью ритмов ЭЭГ использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. С целью выявления различий между процентами позитивных связей активности нейронов аминергических структур ствола головного мозга кошки со спектральной мощностью (СМ) частотных компонентов электроэнцефалограммы (ЭЭГ) бодрствующей кошки, отведенной в симметричных отведениях использовали односторонний Т-критерий Стьюдента для выборочных долей.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0.

Остальные подробности методики изложены в предыдущих работах [10–12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментов была зарегистрирована активность 256 моноаминергических нейронов, 46 из которых на основании описанных выше критериев отнесли к дофаминергическим нейронам, 50 – к норадренергическим и 52 – к серотонинергическим.

Параллельно с отведением активности таких нейронов, потенциалы действия (ПД) которых были, как правило, трехфазными и длительными (не менее 2.5 мс), регистрировалась активность единиц с короткими (порядка 1 мс) двухфазными или практически однофазными ПД. Записи активности таких клеток не включались в исследованную группу предположительно моноаминергических нейронов.

Настоящее исследование проводилось с учетом следующего допущения. Мы предположили, что в условиях относительного покоя как левая так и правая части исследованных глубинных структур головного мозга (ВТ, ГП, ЯШ) имеют близкую активность. Присутствие различий в количестве значимых позитивных связей частоты их активности с показателями ЭЭГ, регистрируемой в симметричных локусах, может свидетельствовать об асимметричности влияния данных нейронных популяций.

Анализ связи частоты ФИА ДА-нейронов ВТ со СМ ритмов ЭЭГ, отведенной от ипсилатерального (слева) и контралатерального (справа) височных локусов позволил выявить преобладание позитивных статистически значимых корреляций со СМ альфа- и бета-ритмов ЭЭГ (рис. 1).

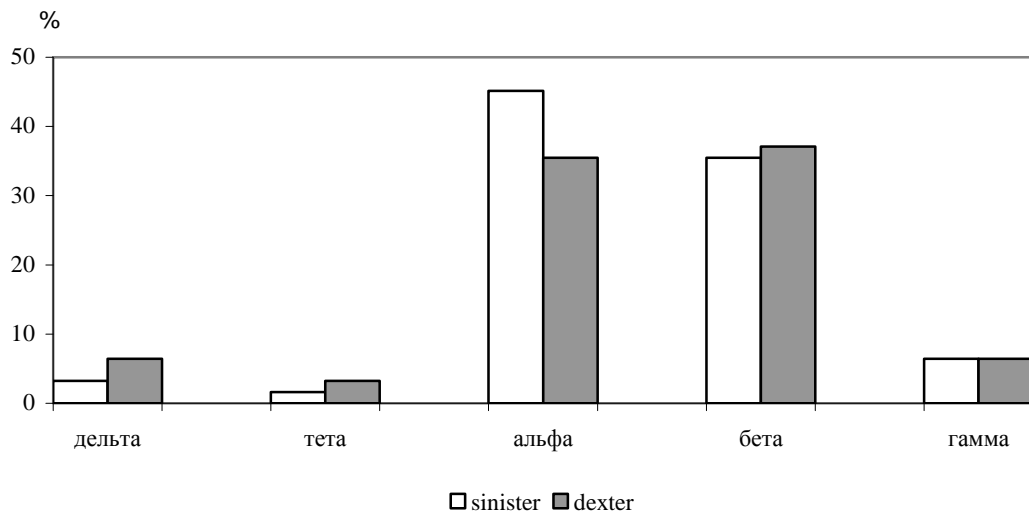


Рис. 1. Относительное количество исследованных дофаминергических нейронов (%), проявляющих достоверные положительные корреляционные связи со спектральной мощностью ритмов ЭЭГ, зарегистрированной в ипсилатеральном левом (sinister) и контралатеральном правом (dexter) отведениях.

Частота ФИА ДА-нейронов ВТ коррелировала в 45 % со СМ альфа-ритма, зарегистрированном в левом височном локусе и в 36 % – в правом. Корреляции частоты ФИА ДА-нейронов ВТ со СМ бета-ритма, зарегистрированного в височных отведениях были примерно одинаковы и составили 36 % в ипсилатеральном отведении и 37 % – в контралатеральном.

В результате анализа связи частоты ФИА НА-нейронов ГП со СМ ритмов ЭЭГ, отведенной от симметричных височных локусов выявлено преобладание положительных статистически значимых корреляций со СМ альфа- и дельта-ритмов ЭЭГ (рис. 2).

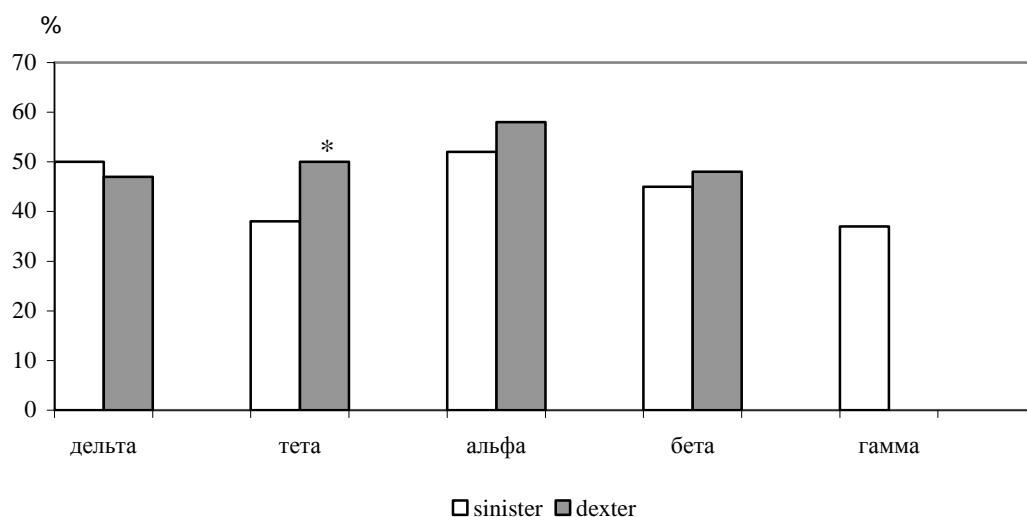


Рис. 2. Относительное количество исследованных норадренергических нейронов (%), проявляющих достоверные положительные корреляционные связи со спектральной мощностью ритмов ЭЭГ, зарегистрированной в ипсилатеральном левом (sinister) и контралатеральном правом (dexter) отведениях.

При этом, частота ФИА НА-нейронов ГП коррелировала в 38 % со СМ тета-ритма, зарегистрированном в левом височном локусе и в 50 % – в правом. Корреляции частоты ФИА НА-нейронов ВТ со СМ альфа-ритма, зарегистрированного в височных отведениях были примерно одинаковы и составили 53 % в ипсилатеральном отведении и 58 % – в контралатеральном.

Обращает внимание превалирование позитивных статистически значимых связей ФИА СТ-нейронов ЯШ со СМ бета-ритма ЭЭГ. Корреляции частоты ФИА СТ-нейронов ВТ со СМ бета-ритма, зарегистрированного в височных отведениях были примерно одинаковы и составили 48 % в левом височном локусе и 68 % – в правом. Не менее выраженными явились различия в количестве значимых связей частоты ФИА СТ-нейронов ЯШ со СМ альфа-ритма. Со СМ альфа-ритма, зарегистрированном в левом височном локусе частота ФИА коррелировала в 34 %, а в правом – в 53 % (рис. 3).

Сравнительный анализ позитивных корреляций частоты ФИА ДА-нейронов со СМ альфа-ритма ЭЭГ выявил их некоторое превалирование (на уровне тенденции) в левом височном отведении по сравнению с правым на 9,7 %. Данный факт можно объяснить тем, что нейронная активность отводилась от ипсилатерального ВТ, который ипсилатерально иннервирует неокортекс [14]. Кроме того, имеются данные о преобладании содержания дофамина в левом полушарии [15]. На левополушарную асимметрию содержания дофамина, также, указывали Springer и Deutsch [16].

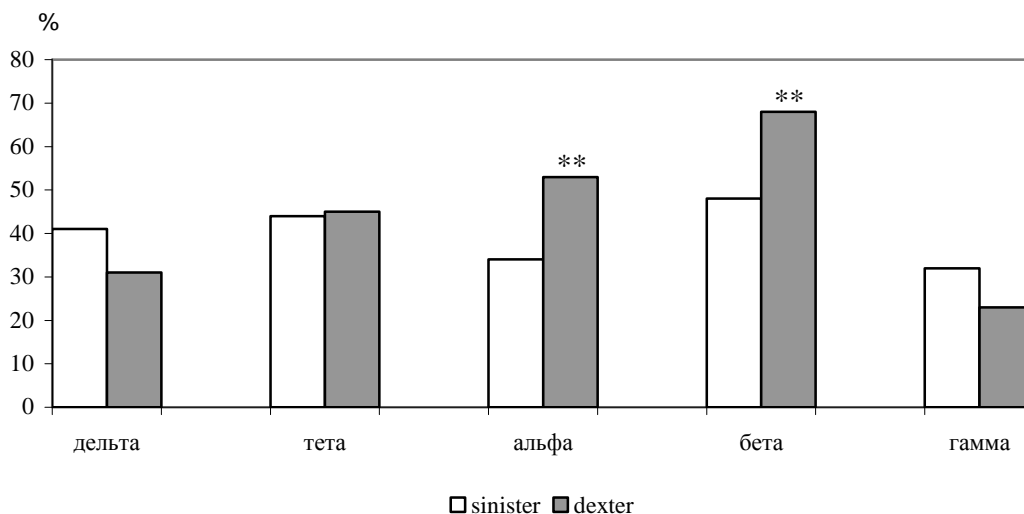


Рис. 3. Относительное количество исследованных серотонинергических нейронов (%), проявляющих достоверные положительные корреляционные связи со спектральной мощностью ритмов ЭЭГ, зарегистрированной в ипсилатеральном левом (sinister) и контралатеральном правом (dexter) отведениях.

Формированию более обширной нейрональной сети левого полушария может способствовать, по-видимому, доминирование в этом полушарии более широкого спектра основных нейромедиаторных путей – ацетилхолин-, дофамин- и ГАМКергических [17], включающих, возможно, глутаматергический (недавними исследованиями продемонстрирована левосторонняя латерализация соответствующей системы кортико-стриатного отдела мозга [18]).

Анализ позитивных корреляций частоты ФИА НА-нейронов со СМ тета-ритма ЭЭГ позволил выявить статистически значимое ( $p < 0,05$ ) (односторонний Т-критерий Стьюдента) преобладание (на 12 %) связей в контралатеральном височном отведении. Данный эффект, по-видимому, объясняется спецификой мозговой активности животного, обусловленной состоянием спокойного бодрствования и согласуется со сведениями о преобладании в правом полушарии НА-путей [17].

Обращают на себя внимание значительное превалирование позитивных связей частоты ФИА СТ-нейронов со СМ альфа- и бета-ритмов ЭЭГ выявил их

статистически значимое ( $p < 0,01$ ) (односторонний Т-критерий Стьюдента) превалирование в правом височном отведении по сравнению с левым на 19 и 20% соответственно. Данный результат согласуются с заключением авторов [19] о наличии связи активности правого полушария с модуляцией серотонинергической системы.

Следует напомнить, что условия проведения настоящего эксперимента предполагают относительно низкий уровень бодрствования животного. В работах Кураева Г.А. с соавторами [20], посвященных исследованию межполушарных отношений на разных уровнях цикла бодрствование–сон, говорится о повышении уровня межполушарной синхронизации при снижении уровня бодрствования. Согласно Г.Н. Болдыревой, сглаживание межполушарных различий биопотенциалов при снижении уровня бодрствования происходит за счет уменьшения в доминантной полушарии преобладающей сочетанности альфа- и бета-диапазонов [21]. В работах В.Ф. Фокина [22] по исследованию межполушарных характеристик ЭЭГ здоровых людей было установлено, что при отсутствии специфической стимуляции, стойкого доминирования полушарий сохраняющегося при смене функциональных состояний не выявлялось. Автор [22] обращает внимание на то, что при некоторых функциональных состояниях головного мозга выявляется статистически значимая функциональная межполушарная асимметрия при, при иных – нет. Данный факт объясняется тем, что динамика межполушарной асимметрии меняется лишь при значимых сдвигах функционального состояния, например, таких как переход от спокойного состояния к стрессу, при этом полушарное доминирование может снижаться вплоть до инверсии [1]. Анализ динамической асимметрии показывает, что этот феномен не может существовать без наличия подкорковой асимметрии. Впервые обратили на это внимание Доброхотова и Брагина (1977) [9], позже была создана схема, отражающая предполагаемую асимметрию связей ретикулярной формации ствола преимущественно с левым полушарием [23]. Эти представления позволяют объяснить многие свойства динамической асимметрии, но пока не подтверждены морфологически.

Структурно-функциональная организация ФМА является многоуровневой, причем основные блоки обладают различной стабильностью: от устойчивых корковых до более гибких, подкорковых, связанных с работой неспецифических, активирующих систем мозга и ВНС. Для этих неспецифических систем характерным является их динамический характер. Данные системы могут оказывать возбуждающее или тормозное влияние либо непосредственно на активность специализированных нейронов.

В свете полученных результатов и литературных данных можно сделать вывод, о том, что в условиях спокойного бодрствования обнаруживаются различные, характерные для каждой из изученных нами медиаторных систем особенности композиции функциональных взаимоотношений проекционных зон коры мозга. Обнаруженные особенности связей в ЭЭГ логично оценить как важные дополнительные характеристики системной деятельности мозга, которые могут

быть использованы для объективной оценки психоэмоционального напряжения и эффективности сеансов ЭЭГ-ОС.

В целом, можно сделать заключение, что электроэнцефалограмма предоставляет возможность неинвазивного (при экспериментах на человеке) исследования динамических аспектов взаимодействия нейромедиаторных систем и может служить адекватным и эффективным методом для оценки участия нейрхимических систем мозга в механизмах МПА.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выявлены различия в связях активности нейронов аминергических структур ствола головного мозга кошки со спектральной мощностью (СМ) частотных компонентов электроэнцефалограммы.
2. Особенностью позитивных корреляций частоты ФИА НА-нейронов со СМ тета-ритма ЭЭГ является статистически значимое ( $p < 0,05$ ) (односторонний Т-критерий Стьюдента) преобладание (на 12 %) связей в правом височном отведении.
3. Статистически значимое ( $p < 0,01$ ) превалирование позитивных связей частоты ФИА СТ-нейронов со СМ альфа- и бета-ритмов ЭЭГ правого височного отведения по сравнению с левым на 19 и 20% соответственно.
4. Представленные данные показывают перспективность применения ЭЭГ-подхода для анализа участия нейромедиаторных систем мозга в механизмах межполушарной асимметрии.

#### Список литературы

1. Фокин В. Ф. Динамическая функциональная асимметрия как отражение функциональных состояний / В. Ф. Фокин // Асимметрия. – 2007. – Т. 1, №1. – С. 4-9.
2. Болдырева Г. Н. Межцентральные отношения ЭЭГ как отражение системной организации мозга человека в норме и патологии / Г. Н. Болдырева Л. А. Жаворонкова, Е. В. Шарова И. С. Добронравова // Журнал высшей нервной деятельности. – 2003. – Т. 53, №4. С. 391-401.
3. Леутин В. П. Психофизиологические механизмы адаптации и функциональная асимметрия мозга / В. П. Леутин, Е. И. Николаева. – Новосибирск, 1988. – 193 с.
4. Glick S. D. Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain / S. D. Glick, D. A. Ross, L. V. Hough // Brain Res. – 1982. – Vol. 234, No 1. – P. 53-63.
5. Cernáček J. Biochemical and electrophysiological correlations of functional asymmetry of the brain / J. Cernáček // Bratisl Lek Listy. – 1989. – Vol. 90, No 6. – P. 458-461.
6. Луценко В. К., Карганов М. Ю. Биохимическая асимметрия мозга / В. К. Луценко, М. Ю. Карганов // Биохимия. – 1985 – Т. 4, № 2. – С. 197-213.
7. Вартамян Г. А., Клементьев Б. И. Проблемы химической асимметрии мозга / Г. А. Вартамян, Б. И. Клементьев // Физиол. чел. – 1988. – Т. 14, № 2. – С. 297-313.
8. Брагина Н. Н., Доброхотова Т. А. Функциональные асимметрии человека / Н. Н. Брагина, Т. А. Доброхотова. – М.: Медицина, 1980. – 240 с.
9. Доброхотова Т. А. Функциональная асимметрия и психопатология очаговых поражений головного мозга / Т. А. Доброхотова, Н. Н. Брагина. – М.: Медицина, 1977. – 358 с.
10. Фокина Ю. О. Взаимосвязь активности дофаминергических нейронов вентрального тегмента с ритмами электроэнцефалограммы / Ю. О. Фокина, А. М. Куличенко, В. Б. Павленко // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия: «Биология, химия» – 2006. – Т. 19 (58), № 4. – С. 195-200.



11. Куличенко А. М. Связь между активностью моноаминергических нейронов ствола мозга и спектральной мощностью ритмов ЭЭГ бодрствующей кошки / А. М. Куличенко, Ю. О. Дягилева (Фокина), О. И. Колотилова, В. Б. Павленко // Журнал высшей нервной деятельности. – 2013. – Т. 63, № 5. – С. 579-588.
12. Куличенко А. М. Изменения межцентральных связей в ЭЭГ животного при проведении сеансов обратной связи по схеме альфа/тета-протокола / А. М. Куличенко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 70-84.
13. Reinoso-Suarez F. Topographischer Hirnatlas der Katze (Für Experimental-physiologische Untersuchungen). Darmstadt. – 1961. – 74 p.
14. Porrino L. J. Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP / L. J. Porrino, P. S. Goldman-Rakic // J. Comp. Neurol. – 1982. – Vol. 10 (205), No 1. – P. 63-76.
15. Flor-Henry P. Mood, the right hemisphere and the implications of spatial information perceiving systems / P. Flor-Henry // Research Communication Psychology, Psychiatry and Behavior. – 1983. – Vol. 8, No 2. – P. 143-170.
16. Vaskovsky V. E. Universal reagent for phospholipid analysis / V. E. Vaskovsky, E. V. Kostetsky, I. M. Vasendin // J. Chromatogr. – 1975. – Vol. 1. – P. 129-141.
17. Flor-Henry P. Observations, reflections and speculations on the cerebral determinants of mood and on the bilaterally asymmetrical distributions of the major neurotransmitter systems / P. Flor-Henry // Acta Neurol. Scand. Suppl. – 1986. – Vol. 109. – P. 75-89.
18. Capper-Loup C., Hemispheric lateralization of the corticostriatal glutamatergic system in the rat / C. Capper-Loup, D. Rebell, A. Kaelin-Lang // J. Neural. Transm. – 2009. – Vol. 116, No 9. – P. 1053-1057.
19. Симерницкая Э. Г. Нейропсихологический анализ межполушарной асимметрии / Э. Г. Симерницкая, Л. О. Бадоян. – М.: Наука, 1986. – 206 с.
20. Кураев Г. А. Межполушарные отношения на разных стадиях цикла бодрствование – сон человека / Кураев Г. А., Сунцова Н. В. // Физиология человека. – 1998. – Т4, №5. – С. 72-79.
21. Болдырева Г. Н. Межцентральные отношения ЭЭГ как отражение системной организации мозга человека в норме и патологии / Г. Н. Болдырева, Л. А. Жаворонкова, Е. В. Шарова, И. С. Добронравова // Журнал высшей нервной деятельности. – 2003. – Т. 53, №4. – С. 391-401.
22. Фокин В. Ф. Центральное-периферическая организация функциональной моторной асимметрии: Дис. д-ра биол. наук. М. 1982. – 460 с.
23. Жаворонкова Л. А. Правши – левши: межполушарная асимметрия биопотенциалов мозга человека / Л. А. Жаворонкова. – Краснодар: Экоинвест, 2009. – 240 с.

**Куличенко О.М. Особливості зв'язків активності нейронів амінергічних структур стовбура головного мозку тварини з спектральної потужністю ритмів ЕЕГ, відведеної в симетричних відведеннях двох півкуль / О.М. Куличенко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 81-92.**

У хронічних досліджах досліджували відмінності в зв'язках активності нейронів амінергічних структур стовбура головного мозку з спектральної потужністю (СП) частотних компонентів електроенцефалограми (ЕЕГ) бодрствующей кішки, відведеної в симетричних локусах. Виявлені відмінності вказують на можливість оцінки участі нейрохімічних систем мозку у формуванні міжпівкульної асиметрії ЕЕГ. Обговорюються можливі механізми спостережуваних особливостей зв'язків активності нейронів амінергічних структур стовбура головного мозку кішки з СП частотних компонентів ЕЕГ.

**Ключові слова:** кореляції, міжпівкульна асиметрія, ЕЕГ, дофамін, норадреналін, серотонін.

**RELATION PECULIARITIES BETWEEN BRAIN STEM AMINERGIC NEURONAL ACTIVITY AND SPECTRAL POWER OF EEG RHYTHMS IN ANIMALS RECORDED SYMMETRICALLY IN BOTH HEMISPHERES**

*Kulichenko A.M.*

*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine  
E-mail: alexander.kulichenko@gmail.com*

Interhemispheric asymmetry (IHA) is thought to be connected with asymmetrical neurotransmitter releasing in brain cortex. That's why it is very important, in the context of studying the neurophysiological mechanisms underlying IHA, to specify the role of basic aminergic systems in forming this CNS fundamental property. Among other approaches there is one consisting in the analysis of how the activity of brain stem aminergic structures (namely, ventral tegmentum (VT), locus coeruleus (LC), and raphe nuclei (RN) containing dopaminergic (DA), noradrenergic (NA) and serotonergic (ST) neurons, respectively) could modulate the EEG rhythmical properties.

This work's goal was to prove the participation of aminergic systems in the formation of hemispheric asymmetry and discover the ways in which these processes could modify the EEG rhythmical activity. Our task was to analyze the correlation between spectral power (SP) of EEG rhythms in symmetrically located cortex areas and the activity level of DA, NA and ST neurons of brain stem in animals.

Each trial consisted of parallel recording of EEG and impulse activity of aminergic neurons in waking cats under conditions close to their normal behavior (resting state).

Our assumption was that under condition of relative rest both left and right deep brain aminergic structures would have nearly similar activity. While having different numbers of significant positive correlations between their activity frequency and EEG indices registered in symmetrical loci could be evidence of asymmetrical influence of these neuronal populations.

EEG spectral analysis was done for the following frequency bands: delta (1–3 Hz), theta (4–7 Hz), alpha (8–13 Hz), beta (14–30 Hz) and gamma (31–48 Hz). Current SP for each was calculated. To analyze statistical dependence between the variables we used Spearman's rank correlation coefficient.

Comparative analysis of positive correlations between DA background impulse activity (BIA) frequency and alpha SP showed their predominance for the left temporal lead on a trend level (9,7%). This phenomenon can be corroborated with the data of morphological studies showing DA predominance in left hemisphere.

Analysis of positive correlations for NA BIA frequency and EEG theta SP showed significant (one-tailed T-test,  $p < 0,05$ ) predominance (12%) of dependencies for contralateral temporal lead. This effect is considered to be determined by the specifics of animal's brain activity in resting state and complies with the known fact of stronger NA-paths in right hemisphere.

Of interest is the essential prevalence of positive dependencies between ST BIA frequency and EEG alpha (19%) and beta (20%) SP in right temporal area compared to the left one (one-tailed T-test,  $p < 0,01$ ). These results are in conformity with the known data that left

hemisphere activity is modulated by catecholaminergic system while right one – by ST-system.

The obtained results allow us to conclude that there exist different patterns of functional interrelations in cortical projection areas under condition of resting wakefulness for each neurotransmitter system we studied. The discovered peculiarities of EEG activity as it is connected with aminergic systems could be of help in determining important additional characteristics of brain system work useful for objective evaluation of psychoemotional strain and efficacy of EEG biofeedback sessions.

**Keywords:** correlations, cerebral electroencephalographic asymmetry, dopaminergic, noradrenergic, serotonergic.

### References

1. Fokin V.F., Dinamicheskaya funktsionalnaya asimmetriya kak otrazhenie funktsionalnykh sostoyaniy, *Asimmetriya*, **1**, 1, 4 (2007).
2. Boldyireva G.N., Zhavoronkova L.A., Sharova E.V., Dobronravova I.S., Mezhsentralnyie otnosheniya EEG kak otrazhenie sistemnoy organizatsii mozga cheloveka v norme i patologii, *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti*, **53**, 4, 391 (2003).
3. Leutin V.P., Nikolaeva E.I., Psihofiziologicheskie mehanizmy adaptatsii i funktsionalnaya asimmetriya mozga (1988).
4. Glick SD, Ross DA, Hough LB., Lateral asymmetry of neurotransmitters in human brain, *Brain Res.*, **234**, 1, 53 (1982).
5. Cernáček J., Biochemical and electrophysiological correlations of functional asymmetry of the brain, *Bratisl. Lek. Listy*, **90**, 6, 458 (1989).
6. Lutsenko V.K., Karganov M.Yu., Biohimicheskaya asimmetriya mozga, *Biohimiya*, **4**, 2, 197 (1985).
7. Vartanyan G.A., Klementev B.I., Problemy himicheskoy asimmetrii mozga, *Fiziol. chel.*, **14**, 2, 97 (1988).
8. Bragina N.N., Dobrohotova T.A., Funktsionalnyie asimmetrii cheloveka (Meditsina, 1980).
9. Dobrohotova T.A., Bragina N.N., Funktsionalnaya asimmetriya i psihopatologiya ochagovykh porazheniy golovnoy mozga (Meditsina, 1977).
10. Fokina Yu.O., Kulichenko A.M., Pavlenko V.B., Vzaimosvyaz aktivnosti dofaminergicheskikh neyronov ventralnogo tegmentuma s ritmami elektroentsefalogrammy, *Scientific Notes of Taurida National V.I. Vernadsky University. Series: "Biology,chemistry"*, **19**, (58), 4, 195 (2006).
11. Kulichenko A.M., Dyagileva (Fokina) Yu.O., Kolotilova O.I., Pavlenko V.B., Correlation between brain stem aminergic neuronal activity and EEG patterns in a wakeful cat, *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti*, **63**, 5, 579 (2013).
12. Kulichenko A.M., EEG intercentral connections changes in animal during eeg biofeedback sessions under alpha/theta protocol, *Scientific Notes of Taurida National V.I. Vernadsky University. Series: "Biology,chemistry"*, **26** (65), 4, 70 (2013).
13. Reinoso-Suarez F. Topographischer Hirnatlas der Katze (Für Experimental-physiologische Untersuchungen) (1961).
14. Porrino L.J., Goldman-Rakic P.S., Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP, *J Comp Neurol.*, **10**; 205, 1, 63 (1982).
15. Flor-Henry P., Mood, the right hemisphere and the implications of spatial information perceiving systems, *Research Communication Psychology, Psychiatry and Behavior.*, **8**, 2, 143 (1983).
16. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.V., Vasendin I.M., Universal reagent for phospholipid analysis, *J.Chromatogr.*, **1**, 129 (1975).
17. Flor-Henry P., Observations, reflections and speculations on the cerebral determinants of mood and on the bilaterally asymmetrical distributions of the major neurotransmitter systems, *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, **109**, 75 (1986).

18. Capper-Loup C., Rebell D., Kaelin-Lang A., Hemispheric lateralization of the corticostriatal glutamatergic system in the rat, *J. Neural. Transm.*, **116**, 9, 1053 (2009).
19. Simernitskaya E.G. Badolyan L. O. Neyropsihologicheskiy analiz mezhpolutsharnoy asimmetrii (Nauka, 1986).
20. Kuraev G.A., Suntsova N.V. mezhpolutsharnyye otnosheniya na raznyih stadiyah tsikla bodrstvovanie – son cheloveka // *Fiziologiya cheloveka*, **4**, 5, 72 (1998).
21. Boldyireva G.N., Zhavoronkova L.A., Sharova E.V., Dobronravova I.S. Mezhtsentralnyie otnosheniya EEG kak otrazhenie sistemnoy organizatsii mozga cheloveka v norme i patologii// *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti*, **53**, 4, 391 (2003).
22. Fokin V.F. Tsentralno-perifericheskaya organizatsiya funktsionalnoy motornoj asimmetrii: Dis. d-ra biol. nauk (1982).
23. Zhavoronkova L.A. Pravshi – Levshi: mezhpolutsharnaya asimmetriya biopotentsialov mozga cheloveka (2009).

*Поступила в редакцию 28.01.2014 г.*

**УДК 581.522+582.594**

## **РЕПРОДУКТИВНОЕ УСИЛИЕ И РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТАКТИКИ ВИДОВ РОДА *CEPHALANTHERA* RICH. В КРЫМУ**

*Кучер Е.Н.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: evgenia.kucher@gmail.com*

Приведены результаты исследования особенностей репродуктивного усилия и характера аллокации фитомассы у видов рода *Cephalanthera* Rich. в фазах цветения и плодоношения. Установлена широкая вариабельность средних значений изучаемых показателей, обусловленная различиями в системах скрещивания орхидей. Факультативно автогамная *C. damasonium* характеризуется значительным вкладом фитомассы в цветки, но число семязачатков, приходящихся на единицу фитомассы особи этого вида невелико. Репродуктивные тактики аллогамных орхидей различаются в зависимости от эффективности опыления. Низкая результативность плодообразования *C. longifolia* определяет незначительный вклад фитомассы в цветки и большую потенциальную семенную продуктивность. Высокая эффективность опыления *C. rubra* сопряжена с развитием соцветия и вспомогательных репродуктивных структур.

**Ключевые слова:** репродуктивное усилие, репродуктивная тактика, орхидеи, *Cephalanthera*, Крым.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Виды растений, принадлежащие к одному роду, часто резко отличаются особенностями биологии и экологии, каждый вид обладает специфическими механизмами регулирования репродуктивной способности и особенностями репродуктивной стратегии [1, 2]. Важными показателями репродуктивной стратегии и тактики растений служат репродуктивное усилие и характер аллокации фитомассы [4, 5]. Для эколога особый интерес представляет выяснение особенностей жизненного цикла и окружающей среды, которые делают выгодной трату большей или меньшей доли ресурсов на размножение [6].

С целью изучения вариабельности репродуктивного усилия среди видов одного рода нами определены значения восьми аллометрических параметров у трех видов рода *Cephalanthera* Rich. в фазах цветения и плодоношения.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Исследования проводились в популяциях *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce, *C. longifolia* (L.) Fritsch и *C. rubra* (L.) Rich. на территории Горного Крыма.

Особи из популяций изымались в фазах цветения и плодоношения методом полной откопки и отмывки [7]. Фракции особей (корни, листья, цветонос, цветки, плоды, брактен) сушили до абсолютно сухого состояния. Вес фракций определялся взвешиванием на аналитических весах типа «W» Metnonex.

Поверхность листьев и брактей измерялась по верхней стороне. Подсчет семязачтков и семян производился по методике, специально разработанной для орхидей [8]. Репродуктивное усилие оценивалось согласно Ю.А. Злобину [9].

Определены значения параметров фитомассы: общая ( $W$ , г), подземных органов ( $W_{\text{подз. орг.}}$ , г), фотосинтезирующих органов ( $W_{\text{ф/с}}$ , г), листьев ( $W_l$ , г), цветоноса ( $W_{\text{цветоноса}}$ , г), брактей ( $W_{\text{брактей}}$ , г), репродуктивных структур ( $W_g$ , г), всех цветков или плодов ( $W_{\text{п}}$  или  $W_{\text{фр}}$ , г), а также такие параметры как число семязачтков, семян ( $N_{\text{см.}}$ , шт), площадь фотосинтезирующей поверхности ( $A$ ,  $\text{см}^2$ ).

В качестве аллометрических параметров оценивались: репродуктивное усилие I–IV ( $RE_I$ , г/г;  $RE_{II}$ , г/см<sup>2</sup>;  $RE_{III}$ , шт/г;  $RE_{IV}$ , шт/см<sup>2</sup>), фотосинтетическое усилие (LWR) и площадь фотосинтезирующей поверхности на единицу фитомассы (LAR, см<sup>2</sup>/г).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование аллометрических параметров у видов рода *Cephalanthera* обнаружило довольно широкую вариабельность средних значений репродуктивного усилия как в фазе цветения, так и плодоношения (табл. 1 и 2). В фазе цветения наименьшие значения вклада в органы репродукции по отношению к общей фитомассе и площади фотосинтезирующей поверхности имеет *C. longifolia*. Но значения числа семязачтков, приходящихся на единицу фитомассы и площади фотосинтезирующей поверхности, ниже всех у *C. damasonium*. *C. longifolia* характеризуется самыми высокими значениями фотосинтетического усилия и площади фотосинтезирующей поверхности, относящейся к общей фитомассе.

**Таблица 1**  
**Значение аллометрических параметров у видов рода *Cephalanthera* Rich. в фазе цветения**

Параметры	<i>C. damasonium</i>	<i>C. longifolia</i>	<i>C. rubra</i>
$RE_I = W_{\text{п}}/W$ , г/г	0,052±0,005	0,027±0,003	0,041±0,004
$RE_I = W_g/W$ , г/г	0,147±0,013	0,087±0,007	0,150±0,013
$RE_{II} = W_{\text{п}}/A$ , г/см <sup>2</sup>	0,0014±0,0001	0,0006±0,0001	0,0013±0,0001
$RE_{II} = W_g/A$ , г/см <sup>2</sup>	0,0041±0,0004	0,0020±0,0002	0,0052±0,0005
$RE_{III} = N_{\text{см}}/W$ , шт/г	26368,7±2485,8	40388,5±3263,0	34282,7±3371,0
$RE_{IV} = N_{\text{см}}/A$ , шт/см <sup>2</sup>	689,1±60,3	762,4±69,6	1064,1±104,2
LWR = $W_{\text{ф/с}}/W$ , г/г	0,095±0,007	0,126±0,009	0,113±0,010
LAR = $A/W$ , см <sup>2</sup> /г	37,9±2,4	50,9±3,8	38,1±4,0

В фазе плодоношения в зависимости от способа определения репродуктивного усилия расположение видов по величине параметров меняется. В большинстве случаев наибольшие значения имеет *C. damasonium*, но фотосинтетическое усилие и отношение площади фотосинтезирующей поверхности к общей фитомассе у этого вида самые низкие.

Таблица 2

Значение аллометрических параметров у видов рода *Cephalanthera* Rich. в фазе плодоношения

Параметры	<i>C. damasonium</i>	<i>C. longifolia</i>	<i>C. rubra</i>
$RE_I = W_{fr}/W$ , г/г	0,108±0,010	0,042±0,005	0,039±0,004
$RE_{II} = W_g/W$ , г/г	0,216±0,016	0,128±0,012	0,294±0,030
$RE_{III} = W_{fr}/A$ , г/см <sup>2</sup>	0,0050±0,0005	0,0010±0,0002	0,0005±0,0001
$RE_{IV} = W_g/A$ , г/см <sup>2</sup>	0,0110±0,0011	0,0028±0,0003	0,0042±0,0004
$RE_{V} = N_{sm}/W$ , шт/г	18443,5±1831,4	7638,7±854,6	12077,5±1614,6
$RE_{VI} = N_{sm}/A$ , шт/см <sup>2</sup>	879,3±88,9	159,0±17,5	147,1±15,9
$LWR = W_{ф/c}/W$ , г/г	0,066±0,003	0,142±0,013	0,285±0,028
$LAR = A/W$ , см <sup>2</sup> /г	22,7±2,0	51,8±4,9	86,1±8,4

Отсутствие единообразия в иерархии видов по значению аллометрических параметров объясняется влиянием в разные фазы годового цикла особенностей консортивных связей каждого вида. *C. longifolia* отличается наименьшим вкладом пластических веществ в органы репродукции и всю надземную часть (рис. 1, 2). В то же время потенциальная семенная продуктивность у нее самая высокая [10]. Такая ситуация обусловлена исключительно аллогамной системой скрещивания орхидеи, характеризующейся факультативной мимикрией. Изучение экологии опыления этого вида, проведенное в Израиле [11], показало, что *C. longifolia* привлекает насекомых из рода *Halictus* Latr., кормовым растением которых служит *Cistus salviiifolius* L.. Цветки ладанника и орхидного обнаруживают определенное сходство: контраст белых лепестков *Cistus salviiifolius* с массой желтых тычинок повторяется и у *C. longifolia*. Желто-оранжевое пятно на губе у цветков орхидеи создается своеобразными гребневидными выростами. Диаметр сосочков, расположенных на гребневидных выростах, практически совпадает с диаметром пыльцы ладанника, и в десяти процентах случаев посещения цветков орхидеи самки насекомых производят скребущие движения по сосочкам. Пчела одурманивается выделениями цветка и на непродолжительное время (примерно на минуту) задерживается. В этот момент к ее телу прочно прикрепляются затронутые при движении поллинии. При совместном произрастании с *Cistus salviiifolius* процент плодоношения *C. longifolia* в Израиле увеличивается с 0-5 (в отсутствии кормового растения) до 68. В Крыму *C. longifolia* также опыляется пчелами из рода *Halictus* [10], но *Cistus salviiifolius* на территории полуострова не произрастает. Родственный *Cistus tauricus* C. Presl обладает розовым венчиком, что, вероятно, исключает мимикрическое сходство. В настоящее время данные о кормовом растении видов *Halictus*, которые опыляли бы и орхидею, отсутствуют. По-видимому, опыление обеспечивается за счет аттракции «неопытных» самок насекомых. Поэтому процент плодоношения *C. longifolia* в Крыму (от 0 до 4%) близок к таковому в случае произрастания орхидеи в Израиле без модельного растения. По данным В.В. Назарова [10], коэффициент продуктивности генеративного побега (отношение реальной семенной продуктивности к

потенциальной) значительно ниже, чем у *C. damasonium* и *C. rubra*, и составляет всего 0,088. В целом для вида плодообразование колеблется в зависимости от условий освещенности и погоды в момент цветения очень резко – от 0 до 82%, в среднем – 26% [12, 13-15]. Особи *C. longifolia* «экономят» на образовании генеративных органов, развитии семязачатков, так как вероятность опыления невелика, но семенное размножение обеспечивается высокой реальной семенной продуктивностью одного плода (коэффициент продуктивности цветка – 0,768) [10]. Низкая эффективность опыления определяет и низкие значения реального репродуктивного усилия. Таким образом, репродуктивная тактика *C. longifolia* характеризуется невысоким репродуктивным усилием одного репродуктивного эпизода, но число репродуктивных эпизодов в онтогенезе значительно (по нашим данным периодичность цветения составляет 1,3 года).

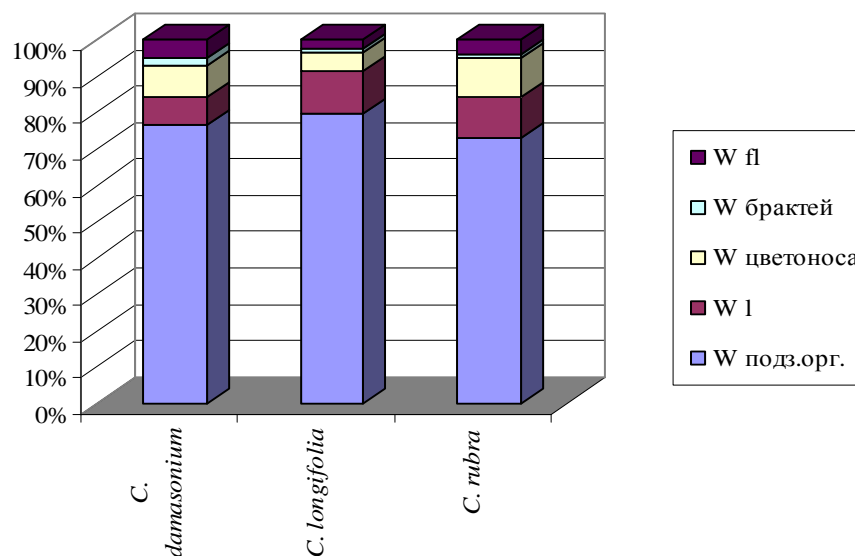


Рис. 1. Аллокация фитомассы у видов рода *Cephalanthera* Rich. в фазе цветения.

*C. damasonium* – факультативно автогамный вид [10] и продолжительность цветения цветка значительно короче, чем у *C. longifolia* и *C. rubra*. На третий-четвертый день с момента раскрытия цветка наблюдается прорастание пыльцы непосредственно в гнездах пыльника и извлечь поллинии уже невозможно. Набухание и прорастание пыльцы связано с проникновением за счет капиллярных явлений в область поллиниев слизи с рыльца. Околоцветник закрывается, преграждая вход насекомым. По мнению многих исследователей [16, 17] развитие автогамного способа опыления у орхидных связано с дефицитом соответствующих опылителей. В случае с *C. damasonium* следует отметить, что цветки ее схожи по морфологии с аллогамной *C. longifolia*, но произрастание под пологом древесно-кустарникового яруса препятствует опылению. В местообитаниях с хорошей



освещенностью изредка цветки *C. damasonium* посещаются пчелами из рода *Halictus*. Но аллогамное опыление возможно лишь в течение двух-трех дней с момента распускания цветка.

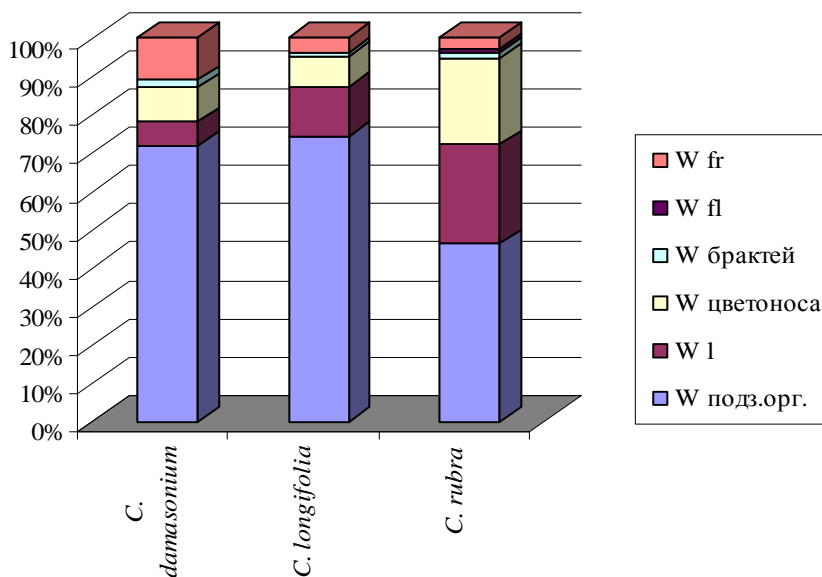


Рис. 2. Аллокация фитомассы у видов рода *Cephalanthera* Rich. в фазе плодоношения.

Аналогия между видовой парой *C. longifolia* – *C. damasonium* и ксеногамно-автогамной парой *Isotria verticilata* (Muhlenderd ex Willdenow) Rafinesgue – *I. medeoloides* (Pursh) Rafinesgue, описанной Л. Мехрхоффом [17], приводит к выводу, что автогамия у *C. damasonium* возникла недавно и еще не оформилась морфологически. Полученные нами данные относительно репродуктивного усилия этой орхидеи свидетельствуют о достаточно глубокой «перестройке» репродуктивной сферы растения. Поскольку число вызревших плодов у *C. damasonium* выше, чем у остальных видов рода, наибольший относительный вклад фитомассы в формирование цветков среди видов рода (см. рис. 1) «оправдывается» высоким значением реального репродуктивного усилия. Так как вероятность опыления близка к 100%, число семязачатков на единицу фитомассы и площади фотосинтезирующей поверхности наименьшее, но каждый из них хорошо развит [10].

*C. rubra*, также как и *C. longifolia*, – аллогамный безнектарный вид, но эффективность опыления выше, что связано с присутствием в местообитаниях кормовых растений опылителей. Цветки *C. rubra* сходны с цветками видов *Campanula* L.. В Швеции эта орхидея опыляется самцами пчел *Chelostoma fuliginosum* Pz. и *Ch. campanularum* Kirby за счет имитации кормового растения *Campanula persicifolia* L. [18]. Отмечается не только морфологическое сходство орхидеи с колокольчиком, но и идентичность спектрального состава отражаемого

лепестками света в видимом для пчел диапазоне. В Крыму *C. rubra* посещается пчелами: *Chelostoma distinctum* Stockhert., *Ch. fuliginosum* и *Ch. florissomne* L.. Насекомые трофически связаны с тремя видами колокольчиков: *Campanula taurica* L., *C. bononiensis* L. и *C. trachelium* L. [19].

В результате значительного сходства с цветками «вознаграждающих» растений в соцветии *C. rubra* может опыляться до 90% цветков, а коэффициент продуктивности генеративного побега имеет среднее значение для видов рода [10]. В связи с этим у *C. rubra* вклад фитомассы в органы репродукции в фазе цветения выше, чем у аллогамной *C. longifolia*, и почти равен *C. damasonium*. Вероятно, *C. rubra* менее тесно связана с грибом по сравнению с облигатно микотрофной *C. longifolia* [13, 20], поэтому созревание плодов в большей мере обеспечивается питательными веществами за счет фотосинтеза (фотосинтетическое усилие и отношение площади фотосинтезирующей поверхности к общей фитомассе выше, чем у остальных видов рода) (см. табл. 2, рис. 2). Развитие органов фотосинтеза обуславливает самые низкие значения числа семян на единицу площади фотосинтезирующей поверхности. Число семян на единицу фитомассы в результате высокой эффективности опыления больше, чем у *C. longifolia*.

Из всего вышесказанного следует, что различия в репродуктивных тактиках видов рода *Cephalanthera*, выражающиеся во вкладе фитомассы в репродуктивные и вегетативные органы, в относительной семенной продуктивности ( $RE_{III}$ ), а также в периодичности цветения, определяются особенностями их биоценотических связей.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Сравнительный анализ репродуктивного усилия и аллокации фитомассы трех видов рода *Cephalanthera* Rich. позволил обнаружить широкую вариабельность средних значений исследуемых показателей как в фазе цветения, так и плодоношения.
2. Выявленные отличия исследуемых видов в особенностях репродукции обусловлены различиями в системах скрещивания орхидей. Факультативно автогамная *C. damasonium* характеризуется значительным вкладом фитомассы в цветки, но число семязачатков, приходящихся на единицу фитомассы особи этого вида невелико. Репродуктивные тактики аллогамных орхидей различаются в зависимости от эффективности опыления. Низкая результативность плодообразования *C. longifolia* определяет незначительный вклад фитомассы в цветки и большую потенциальную семенную продуктивность. Высокая эффективность опыления *C. rubra* сопряжена с развитием соцветия и вспомогательных репродуктивных структур.

#### Список литературы

1. Primack R. B. Components of reproductive effort and yield in goldenrods / R. B. Primack, A.R. Rittenhouse, P. V. August // Amer. J. Bot. – 1981. – Vol. 68, No 6. – P. 855-858.
2. Abrahamson W. G. Growth form and reproductive effort in goldenrods (*Solidago*, *Compositae*) / W.G. Abrahamson, M. D. Gadgil // Amer. Natur. – 1973. – Vol. 107, No 6. – P. 651-661.
3. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

4. Голубець М. Стратегія популяцій рослин у природних і антропогеннозмінених екосистемах Карпат / М. Голубець, Й. Царик. – Львів: Євросвіт, 2001. – 160 с.
5. Марков М. В. Репродуктивное усиление у растений / М. В. Марков, Е. Н. Плещинская // Журн. общ. биологии. – 1987. – Т. 48, № 1. – С. 77-83.
6. Пианка Э. Эволюционная экология / Э. Пианка. – М.: Мир, 1981. – 400 с.
7. Тарановская М. П. Методы изучения корневых систем / М. П. Тарановская. – М.: Сельхозгиз, 1957. – 215 с.
8. Назаров В. В. Методика подсчета мелких семян и семянчиков (на примере сем. *Orchidaceae*) / В.В. Назаров // Бот. журн. – 1989. – Т. 74, № 5. – С. 1194.
9. Злобин Ю. А. Принципы и методы изучения ценологических популяций растений: Учебно-методическое пособие / Ю. А. Злобин. – Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1989. – 146 с.
10. Назаров В. В. Репродуктивная биология орхидных Крыма: автореферат на соискание учен. степени кандидата биол. наук / В. В. Назаров. – СПб: РАН, 1995. – 26 с.
11. Dafni A. Pollination in *Orchis* and related genera: evolution from reward to deception / A. Dafni // *Orchid biology. Reviews and perspectives, IV.* – Ithaca ect.: Cornell Univ. Press. – 1987. – P. 81-104.
12. Dafni A. The flower biology of *Cephalanthera longifolia* (Orchidaceae) – pollen imitation and facultative floral mimicry / A. Dafni, Y. Ivri // *Plant Syst. and Evol.* – 1981. – Vol. 137, No 4. – P. 529-542.
13. Вахрамеева М. Г. Пыльцеголовник длиннолистный / М. Г. Вахрамеева, Т. И. Варлыгина, П.В. Куликов // Биол. флора Моск. области. – М.: Аргус, - 1996. – Вып. 12. – С. 48-60.
14. Шибанова Н. Л. Исследование некоторых редких видов орхидей в заказнике «Предуралье» / Н.Л. Шибанова // Международная научная конференция «Охраняемые природные территории. Проблемы выявления, исследования, охраны систем»: тез. докл. – Пермь, 1994. – С. 31-33.
15. Шибанова Н. Л. Распространение и биология цветения некоторых видов орхидей Пермской области / Н. Л. Шибанова, Я. В. Долматова // Симпозиум «Проблемы репродуктивной биологии растений»: тез. докл. – Пермь, 1996. – С. 223-235.
16. Pijl L. van der. Pollination mechanisms in orchid / L. van der. Pijl, C. Dodson. – Coral Gables: Univ. Miami Press, 1966. – 244 p.
17. Mehrhoff L. A. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae) / L. A. Mehrhoff // *Amer. J. Bot.* – 1983. – Vol. 70, No 10. – P. 1444-1453.
18. Nilsson L. A. Mimesis of bellflower (*Campanula*) by the red orchid *Cephalanthera rubra* / L. A. Nilsson // *Nature.* – 1983 - Vol. 305, No 5937. – P. 799-800.
19. Назаров В. В. Участие пчел рода *Chelostoma* Latr. (Hymenoptera, Megachilidae) в опылении мимикрирующих видов *Cephalanthera rubra* (Z.) Rich. и *Campanula taurica* Juz. в Крыму / В. В. Назаров, С. П. Иванов // Энтомол. обозр. – 1990. – Т. 9, № 3. – С. 534-537.
20. Burgeff H. Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanzen / H. Burgeff. – Jena: Fischer, 1936. – 312 s.

**Кучер Є.М. Репродуктивне зусилля і репродуктивні тактики видів роду *Cephalanthera* Rich. в Криму / Є.М. Кучер // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 93-101.**

Наведено результати дослідження особливостей репродуктивного зусилля і характеру аллокації фітомаси у видів роду *Cephalanthera* Rich. у фазах цвітіння і плодоношення. Встановлено широка варіабельність середніх значень досліджуваних показників, обумовлена відмінностями в системах схрещування орхідей. Факультативно автогамная *C. damasonium* характеризується значним внеском фітомаси в квітки, але число семязачатков, що припадають на одиницю фітомаси особини цього виду невелика. Репродуктивні тактики аллогамних орхідей розрізняються залежно від ефективності запилення. Низька результативність плодоутворення *C. longifolia* визначає незначний внесок фітомаси в квітки і велику потенційну насінневу продуктивність. Висока ефективність запилення *C. rubra* сполучена з розвитком суцвіття і допоміжних репродуктивних структур.

**Ключові слова:** репродуктивне зусилля, репродуктивна тактика, орхідеї, *Cephalanthera*, Крим.

**REPRODUCTIVE EFFORT AND REPRODUCTIVE TACTICS SPECIES OF THE  
GENUS *CEPHALANTHERA* RICH. IN CRIMEA**

*Kucher E.N.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

*E-mail: evgenia.kucher@gmail.com*

Plant species belonging to the same genus often differ sharply characteristics of biology and ecology. Important indicators of reproductive plant's strategies and tactics are the reproductive effort and nature allocation phytomass.

In order to study the variability of reproductive effort among species of the same genus we have determined the values of eight allometric parameters in three species of the genus *Cephalanthera* Rich. phases of flowering and fruiting.

The studies were conducted in populations *Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce, *C. longifolia* (L.) Fritsch and *C. rubra* (L.) Rich. on the territory of the Crimean Mountains. As allometric parameters were evaluated: reproductive effort I-IV ( $RE_I$ ,  $RE_{II}$ ,  $RE_{III}$ ,  $RE_{IV}$ ), photosynthetic effort (LWR) and photosynthetic surface area per unit of a biomass (LAR). The lowest contribution's meaning to the organs of reproduction in the connection to the total biomass of photosynthetic surface area and has a *C. longifolia* in the flowering stage. But the value of the number of ovules per unit area and biomass of photosynthetic surface below in *C. damasonium*. *C. longifolia* is characterized the highest values of photosynthetic efforts and photosynthesizing surface area related to the total phytomass. In the fruiting phase, depending on the method of determining the location of reproductive efforts kinds largest parameter changes. In most cases, the most important is *C. damasonium*, but photosynthetic effort and photosynthetic surface area ratio to the total biomass of this species are the lowest.

Identified differences in the features of the studied species reproduction due to differences in mating systems of orchids. Optional autogamous *C. damasonium* characterized by a significant contribution to the biomass of flowers, but the number of ovules per unit biomass of individuals of this species is small. Reproductive tactics allogamous orchids vary depending on the efficiency of pollination. Low efficiency of fruit *C. longifolia* defines a minor contribution to the biomass of flowers and a greater potential seed production. High efficiency of pollination *C. rubra* is associated with the development of inflorescence and assisted reproductive structures.

**Keywords:** reproductive effort, reproductive tactics, orchids, *Cephalanthera*, Crimea.

**References**

1. Primack R.B., Rittenhouse A.R., August P.V., Components of reproductive effort and yield in goldenrods, *Amer. J. Bot.*, **68**, 855 (1981).
2. Abrahamson W.G., Gadgil M.D., Growth form and reproductive effort in goldenrods (*Solidago, Compositae*), *Amer. Natur.*, **107**, 651 (1973).
3. Lakin G.F., *Biometrics*, 352 p. (Higher School, Moscow, 1990).
4. Holubets M., Tsaryk J., *The plants populations' strategy in natural and antropogennochanging Carpathians ecosystems*, 160 p. (Yevrosvit, Lviv, 2001).

5. Markov M.V., Pleshchinskaya E.N., Reproductive effort in plants, *J. of Gen. Biol.*, **48**, 77 (1987).
6. Pianka E., *Evolutionary ecology*, 400 p. (Mir, Moscow, 1981).
7. Taranovskaya M.P., *Methods of studying root systems*, 215 p. (Selkhozgiz, Moscow, 1957).
8. Nazarov V.V., Method of calculation of small seeds and ovules (for example, fam. *Orchidaceae*), *Bot. J.*, **74**, 1194 (1989).
9. Zlobin Y.A., *Principles and methods of studying the coenotic plant populations*, 146 p. (Kazan State University, Kazan, 1989).
10. Nazarov V.V., *Reproductive biology of the orchid in Crimea*, 26 p. (RAS, Saint-Petersburg, 1995).
11. Dafni A. Pollination in *Orchis* and related genera: evolution from reward to deception, *Orchid biology. Reviews and perspectives*, **4**, 81 (1987).
12. Dafni A., The flower biology of *Cephalanthera longifolia* (Orchidaceae) – pollen imitation and facultative floral mimicry, *Plant Syst. and Evol.*, **137**, 529 (1981).
13. Vahrameeva M.G., Varlygina T.I., Kulikov P.V., *Cephalanthera longifolia*, *Biol. flora of the Moscow region*, **12**, 48 (1996).
14. Shibanova N.L., Study of some rare species of orchids in the reserve "Urals", *Abstracts of International Scientific Conference "Protected Natural Areas. Problem identification, research, protection systems"*, (Perm, 1994), p. 31.
15. Shibanova N.L., Dolmatova Y.V., Distribution and biology of flowering some orchids' species Perm Region, *Abstracts of Symposium "Problems of Reproductive Biology of Plants"*, (Perm, 1996), p. 223.
16. Pijl L. van der, *Pollination mechanisms in orchid*, 244 p. (Univ. Miami Press, Coral Gables, 1966).
17. Mehrhoff L.A., Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae), *Amer. J. Bot.*, **70**, 1444 (1983).
18. Nilsson L.A., Mimesis of bellflower (*Campanula*) by the red orchid *Cephalanthera rubra*, *Nature*, **305**, 799 (1983).
19. Nazarov V.V., Ivanov S.P., Participation bees kind *Shelostoma* Latr. (Hymenoptera, Megachilidae) in the pollination of mimicking species *Cephalanthera rubra* (Z.) Rich. and *Campanula taurica* Juz. In Crimea, *Entomol. Review*, **9**, 534 (1990).
20. Burgeff H., *Samenkeimung der Orchideen und Entwicklung ihrer Keimpflanze*, 312 s. (Fischer, Jena, 1936).

Поступила в редакцию 26.01.2013

**УДК 612.223. 612.766.1**

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГАЗООБМЕНА ЧЕЛОВЕКА ВО ВРЕМЯ ИНТЕНСИВНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГАЗОВОЙ СРЕДЫ**

*Найдич С.И.*

*Крымский инженерно-педагогический университет, Симферополь, Украина  
E-mail: tournesi@rambler.ru*

Выявлено, что экспериментальное улучшение функционального состояния аппарата внешнего дыхания за счет добавления во вдыхаемый воздух небольших концентраций кислорода и углекислого газа приводит к увеличению парциального давления углекислого газа в альвеолярном воздухе на протяжении всего времени работы на велоэргометре со ступенчато-возрастающей мощностью до полного утомления. Кроме того, снижение парциального давления углекислого газа в альвеолярном воздухе в определенный момент мышечной деятельности происходит при большей мощности нагрузки по сравнению с обычной газовой средой, что при сопоставлении с динамикой дыхательного коэффициента и неметаболического излишка  $\text{CO}_2$  свидетельствует о меньших нарушениях кислотно-основного состояния внутренней среды организма.

**Ключевые слова:** мышечная деятельность, внешнее дыхание, работоспособность.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Изучение проблемы сохранения высокой физической работоспособности человека в экстремальных условиях его жизнедеятельности составляет одно из актуальных направлений научных исследований в современной физиологии и спортивной медицине.

Известно, что при физической работе в организме человека наряду с недостатком кислорода нарастает дефицит  $\text{CO}_2$ , так как интенсивная мышечная деятельность сопровождается истощением бикарбонатной емкости тканей, элиминацией буферной углекислоты и развитием метаболического ацидоза [1]. Показано, что при увеличении парциального давления  $\text{CO}_2$  во вдыхаемом воздухе при неизменной концентрации кислорода, происходит более значительное поглощение углекислого газа плазмой крови, в результате чего образуется большое количество угольной кислоты и бикарбонатов [2]. Следовательно, теоретически существует возможность управления буферной емкостью крови и регуляции рН посредством подбора соответствующего парциального давления  $\text{CO}_2$  во вдыхаемом воздухе. Мышечная деятельность в условиях гиперкапнии изучалась сравнительно мало [3–5], а исследования в условиях гиперкапнии-гипероксии и вовсе были единичными [6, 7].

Целью настоящего исследования было изучение влияния на организм человека различных газовых смесей, в целях выявления особенностей газообмена и кислотно-основного состояния при физическом утомлении.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях принимали участие 12 квалифицированных спортсменов (средний возраст  $16,8 \pm 0,8$  года, рост  $166,7 \pm 2,0$  см, масса тела  $60,3 \pm 1,6$  кг, жизненная емкость легких (ЖЕЛ) -  $4250 \pm 80$  мл, максимальное потребление кислорода (МПК) -  $68,4 \pm 2,8$  мл/мин/кг). После проведения 4 тренировочных занятий на велоэргометре все они были включены в программу исследований. Было проведено 3 серии исследований. В I серии определяли данные в естественных атмосферных условиях. Во II серии обследуемые лица дышали газовой смесью, содержащей 1 %  $\text{CO}_2$  и 34 %  $\text{O}_2$ . В III серии применяли гипероксическую газовую смесь (34 %  $\text{O}_2$ ). Спортсмены выполняли работу на велоэргометре ВЭ-02 со ступенчато-возрастающей (каждая ступенька 3 минуты) мощностью до полного утомления. Во всех обследованиях функции внешнего дыхания изучались в открытой системе методом Дугласа-Холдена. С помощью химического газоанализатора определяли концентрацию  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$  в выдыхаемом и альвеолярном воздухе. По общепринятой методике рассчитывали потребление кислорода, выделение углекислого газа, дыхательный коэффициент, парциальное давление углекислого газа и кислорода в альвеолярном воздухе. Дыхательные объемы приводились к альвеолярным условиям (ВTPS), а показатели газообмена – к условиям стандартной атмосферы (STPD). Кроме того, на 3-й минуте после окончания тестирования определяли показатели кислотно-основного состояния (КОС) крови в капиллярной крови методом эквивалентности на микроанализаторе ОР-210/3. По номограмме находили напряжение углекислого газа в крови ( $p\text{CO}_2$ ), количество буферных оснований (ВВ), концентрацию нелетучих кислот (ВЕ), общее количество химически связанного и физически растворенного углекислого газа ( $t\text{CO}_2$ ).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании интегральных показателей критериев газообмена - потребления кислорода и выделения углекислого газа (таблица 1) отмечались следующие особенности.

В условиях гипероксии потребление кислорода достоверно превышало соответствующий показатель нормоксии при нагрузке 350 ватт. Кроме того, линейная зависимость между  $\text{VO}_2$  и мощностью физической нагрузки нарушалась при 350 ваттах, в то время как во время работы в обычных условиях экспоненциальный прирост  $\text{VO}_2$  наступал при нагрузке 300 ватт. При обогащении вдыхаемого воздуха кислородом его дефицит при этой же нагрузке был достоверно меньше, что могло способствовать увеличению объема выполненной работы.

Высокий уровень потребления кислорода, наблюдаемый во время мышечной работы в среде с повышенной концентрацией кислорода, обеспечивался за счет значительного прироста потребления  $\text{O}_2$  на каждый литр вентилируемого легкими воздуха. На рис. 1 показана динамика процентной величины утилизации кислорода вдыхаемого воздуха ( $\text{FeO}_2$ ) при работе в разных газовых средах. Достоверные

различия по сравнению с обычными условиями проявлялись уже при нагрузке 150 ватт и составляли соответственно  $4,6 \pm 0,2$  и  $4,2 \pm 0,1\%$  ( $p < 0,05$ ), а при нагрузке 350 ватт –  $4,5 \pm 0,1$  и  $4,1 \pm 0,2\%$  ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 1.**  
Динамика потребления кислорода ( $V_{O_2}$ ) и выделения углекислого газа ( $V_{CO_2}$ ) у спортсменов во время работы на велоэргометре в разных газовых средах

Показатели	Условия	50 ватт	100 ватт	150 ватт	200 ватт	250 ватт	300 ватт	350 ватт
$V_{O_2}$ , мл/мин	20,9% $O_2$	1029±22	1342±29	1757±35	2171±46	2529±51	3048±69	3541±83
	34% $O_2$	1101±25	1402±31	1800±37	2135±40	2606±59	3127±84	*3975±99
	1% $CO_2$ +34% $O_2$	1090±20	1392±27	1812±33	2201±46	2541±60	3081±79	*3770±91
$V_{CO_2}$ , мл/мин	20,9% $O_2$	815±18	1098±23	1469±33	1848±41	2226±60	2725±81	3449±112
	34% $O_2$	810±16	1052±21	*1397±30	*1708±45	2193±63	2749±86	*3711±156
	1% $CO_2$ +34% $O_2$	824±19	1073±24	1446±31	1807±49	*2160±67	2798±89	3483±129

Примечание: \* – различия статистически достоверны по сравнению с обычными условиями

Это свидетельствует о возросшей эффективности дыхания, что, по-видимому, способствовало проявлению функциональной недостаточности внешнего дыхания позже, чем в обычных условиях – при нагрузке 300 и 250 ватт, соответственно. При дыхании гиперкапнически-гипероксической газовой смесью стимулирующий эффект был менее выражен и процентная величина утилизации кислорода вдыхаемого воздуха достоверно не различалась с условиями нормоксии.

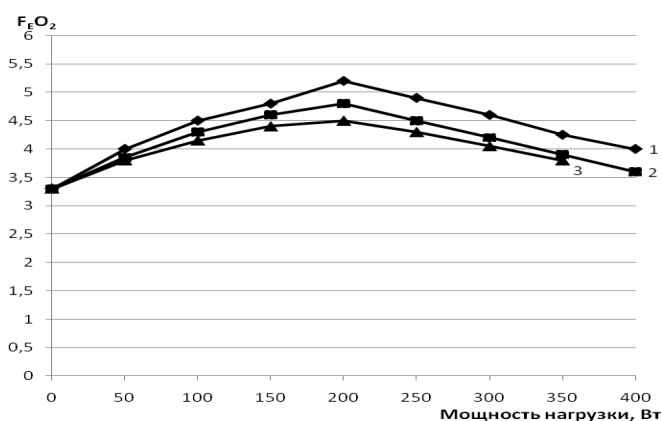


Рис. 1. Динамика процентной величины утилизации кислорода ( $F_e O_2$ ) у спортсменов во время работы на велоэргометре в разных газовых средах.

Примечание: 1 - смесь 34%  $O_2$ ; 2 – смесь 1%  $CO_2$ +34%  $O_2$ ; 3 - воздух



Благоприятное влияние повышенной концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе на систему внешнего дыхания и метаболические процессы отражалось и на газовом составе альвеолярного воздуха. На Рис. 2 показана динамика парциального давления углекислого газа в альвеолярном воздухе (РАСО<sub>2</sub>) во время работы на велоэргометре до полного утомления в различных газовых средах.

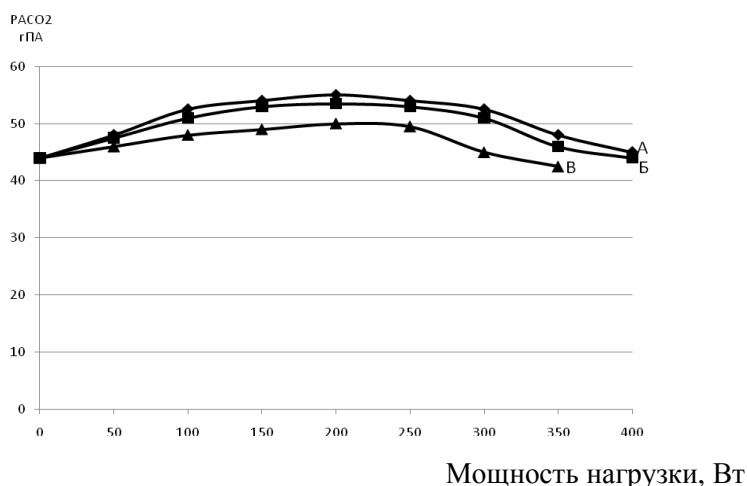


Рис. 2. Динамика парциального давления углекислого газа в альвеолярном воздухе (РАСО<sub>2</sub>) у спортсменов во время работы на велоэргометре в разных газовых средах.

Примечание: А - смесь 34% O<sub>2</sub>; Б – смесь 1% CO<sub>2</sub>+34% O<sub>2</sub>; В - воздух

Как видно из рисунка, уже при нагрузке 50 ватт значение РАСО<sub>2</sub> в условиях гипероксии было больше по сравнению с обычными условиями и составляло соответственно  $51,2 \pm 0,4$  и  $48,1 \pm 0,5$  гПа ( $p < 0,05$ ). В дальнейшем, повышение РАСО<sub>2</sub> во время дыхания воздухом с повышенной концентрацией кислорода продолжалось до нагрузки мощностью 200 ватт и стабильно удерживалось до нагрузки 300 ватт, лишь затем существенно снижаясь. При работе в обычных условиях стабильный уровень РАСО<sub>2</sub> сохранялся до нагрузки 250 ватт, затем наблюдалось его резкое падение. При этом максимальная величина РАСО<sub>2</sub> в условиях гипероксии была на 8,1% ( $p < 0,05$ ) больше, чем соответствующие величины в условиях нормоксии, а в момент прекращения работы разница достигла 10,8% ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, полученные данные говорят о том, что экспериментальное улучшение функционального состояния аппарата внешнего дыхания за счет добавления во вдыхаемый воздух небольших концентраций кислорода и углекислого газа, приводит к увеличению парциального давления углекислого газа в альвеолярном воздухе на протяжении всего времени работы на велоэргометре со ступенчато-возрастающей мощностью до полного утомления. Кроме того, его снижение в определенный момент мышечной деятельности происходит при большей мощности нагрузки, что при сопоставлении с динамикой дыхательного

коэффициента и неметаболического излишка  $\text{CO}_2$  свидетельствует и о меньших нарушениях кислотно-основного состояния внутренней среды организма. Подтверждением этому могут служить величины КОС крови у спортсменов на 3-й минуте после прекращения работы на велоэргометре (таблица 2). Достоверные различия величин рН –  $7,260 \pm 0,002$  и  $7,224 \pm 0,003$  усл.ед. ( $p < 0,05$ ), количества буферных оснований –  $39,9 \pm 0,04$  и  $35,0 \pm 0,4$  ммоль/л ( $p < 0,05$ ), концентрации нелетучих кислот –  $7,3 \pm 0,03$  и  $12,2 \pm 0,3$  ммоль/л ( $p < 0,05$ ), соответственно в условиях гипероксии и нормоксии, свидетельствуют о более глубоких сдвигах внутренней среды организма при дыхании атмосферным воздухом, хотя объем выполненной работы был меньше. Схожий характер изменений показателей кислотно-основного состояния артериальной крови наблюдался и после работы в условиях гиперканически-гипероксической газовой среды.

**Таблица 2.**  
**Показатели кислотно-основного состояния крови у спортсменов после работы на велоэргометре в разных газовых смесях**

Показатели	На 3-й минуте после работы на велоэргометре в разных газовых средах		
	20,9% $\text{O}_2$	34% $\text{O}_2$	1% $\text{CO}_2$ +34% $\text{O}_2$
рН, усл. ед.	$7,224 \pm 0,003$	$7,260 \pm 0,002$	$7,240 \pm 0,005$
ВВ, ммоль/л	$35,0 \pm 0,4$	$39,9 \pm 0,4$	$37,0 \pm 0,3$
ВЕ, ммоль/л	$- 12,2 \pm 0,3$	$- 7,3 \pm 0,3$	$- 11,1 \pm 0,3$
р $\text{CO}_2$ , гПа	$35,5 \pm 0,3$	$38,5 \pm 0,4$	$36,0 \pm 0,4$

Ингаляция газовыми смесями с повышенным содержанием кислорода и углекислого газа приводила к увеличению максимальных величин потребления кислорода по сравнению с обычными условиями, что могло способствовать повышению уровня физической работоспособности обследуемых спортсменов. На Рис. 3 показаны соотношения величин МПК и объема выполненной работы до отказа во время мышечной деятельности в разных газовых средах. Из рисунка видно, что при экспериментальном повышении уровня МПК на 22,6% ( $p < 0,01$ ) с помощью гипероксической газовой смеси объем выполненной работы возрос на 20,0% ( $p < 0,01$ ). Дыхание смесью 1%  $\text{CO}_2$  +34%  $\text{O}_2$  увеличило МПК на 16,4% ( $p < 0,01$ ), при этом возросла на 10,7% ( $p < 0,05$ ) и работоспособность.

Материалы наших исследований показали, что кратковременное дыхание гипероксической газовой смесью сопровождалось умеренным повышением легочной вентиляции и газообмена. Потребление кислорода увеличивалось за весь период ингаляции в среднем на 37%, выделение углекислого газа не изменялось по сравнению с данными, отмеченными в нормальных атмосферных условиях. Дыхательный коэффициент уменьшался до  $0,445 \pm 0,001$  отн. ед., что свидетельствовало о ретенции метаболического  $\text{CO}_2$ . Однако парциальное давление углекислого газа в крови все время оставалось стабильным и не выходило за пределы физиологической нормы. Следовательно, физиологические реакции саморегуляции газового состава внутренней среды организма обеспечивают

накопление и распределение метаболической углекислоты в органах и тканях без повышения  $p_a\text{CO}_2$ . Основной емкостью для углекислого газа может быть жидкость организма, способная поглощать молекулярный  $\text{CO}_2$  и переводить его в химически связанное состояние. Главная роль в перераспределении  $\text{CO}_2$  между органами и тканями отводится кровотоку, так как в условиях полного насыщения гемоглобина кислородом основными способами перемещения  $\text{CO}_2$  становятся его физическое растворение в плазме и повышение скорости кровообращения [8]. По мере повышения оксигенации гемоглобина, сродство его по кислороду увеличивается. В таком случае почти весь гемоглобин оказывается выключенным из прежнего функционального ритма по оксигенации-дезоксигенации крови и становится неспособным транспортировать кислород и углекислый газ [9, 10]. В условиях гипероксии может происходить снижение тканевых обменных процессов по причине падения утилизации кислорода вследствие его сосудосуживающего действия и замедления капиллярного кровотока [11].

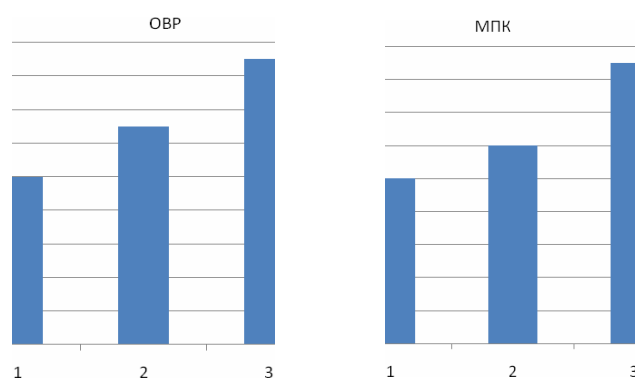


Рис. 3. Показатели максимального потребления кислорода (МПК) и объема выполненной работы (ОВР) у спортсменов во время мышечной деятельности в разных газовых средах

Примечание: 1 – воздух; 2 – смесь 1%  $\text{CO}_2$ +34%  $\text{O}_2$ ; 3 - смесь 34%  $\text{O}_2$

Дыхание гиперкапнически-гипероксической газовой смесью имело некоторые отличительные способности. Прежде всего, экономизация аппарата внешнего дыхания проявлялась только при нагрузках умеренной интенсивности. По-видимому, вследствие этого диапазон линейной зависимости показателей внешнего дыхания от мощности физической нагрузки был таким же, как и в условиях нормоксии. Тем не менее, облегченные условия кислородного снабжения скелетных мышц за счет повышенного содержания кислорода в газовой смеси приводили к увеличению МПК на 16,4% ( $p<0,01$ ), что также могло отразиться на объеме выполненной работы, который возрос на 9,7% ( $p<0,05$ ). Вторым фактором, влияющим на уровень физической работоспособности обследуемых во время работы на велоэргометре в гиперкапнически-гипероксической газовой среде, возможно, было то, что в условиях интенсивных физических нагрузок повышенная

концентрация углекислого газа во вдыхаемом воздухе в определенной мере уменьшала расходование эндогенного  $\text{CO}_2$  вследствие гипервентиляции легких. Это могло способствовать повышению буферной емкости крови и увеличению продолжительности работы на велоэргометре до отказа. Об этом свидетельствуют более высокие значения  $\text{PACO}_2$  на протяжении всего периода работы и величины кислотно-основного состояния артериальной крови на 3-й минуте после окончания тестирования. Кроме того, наблюдалась более высокая эффективность кровообращения, что также могло повысить физическую работоспособность.

Известно при этом, что даже небольшое повышение содержания  $\text{CO}_2$  во вдыхаемом воздухе при неизменной концентрации кислорода, сопровождается снижением газообмена, угнетением функций центральной и периферической нервной системы [12], развитием дыхательного ацидоза, лимитирующего физическую работоспособность людей [13, 14]. Однако малые концентрации  $\text{CO}_2$  во вдыхаемом воздухе способствуют ускорению восстановления физической работоспособности спортсменов в период между стартами [15].

Дыхание газовой смесью, содержащей 1 %  $\text{CO}_2$  и 34 %  $\text{O}_2$ , сопровождалось в наших исследованиях увеличением легочной вентиляции без изменения напряжения углекислого газа в альвеолярном воздухе и обеспечивалось в большей мере увеличением дыхательного объема, а не частоты дыхания. Регуляция газового состава крови в этих условиях способствовала накоплению  $\text{CO}_2$ , ускорению восстановления ионов водорода и показателей кислотно-основного состояния. Реакции усиления легочной вентиляции в состоянии покоя во время дыхания газовыми смесями, содержащими 1,0- 1,5%  $\text{CO}_2$  в кислороде, без повышения  $p_a\text{CO}_2$  отмечались ранее многими авторами [16, 17]. Увеличение содержания кислорода в газовой смеси приводило к повышению чувствительности аппарата внешнего дыхания к малым концентрациям  $\text{CO}_2$  [18] и увеличению кровообращения благодаря сосудорасширяющему действию углекислого газа [19]. Наши же исследования показали, что и во время напряженной мышечной деятельности проявляется эффективность функций внешнего дыхания под влиянием измененной газовой среды.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Экспериментальное улучшение функционального состояния аппарата внешнего дыхания за счет добавления во вдыхаемый воздух небольших концентраций кислорода и углекислого газа приводит к увеличению парциального давления углекислого газа в альвеолярном воздухе на протяжении всего времени работы на велоэргометре со ступенчато-возрастающей мощностью до полного утомления.
2. Снижение парциального давления углекислого газа в альвеолярном воздухе в определенный момент мышечной деятельности происходит при большей мощности нагрузки по сравнению с обычной газовой средой, что при сопоставлении с динамикой дыхательного коэффициента и неметаболического излишка  $\text{CO}_2$  свидетельствует о меньших нарушениях кислотно-основного состояния внутренней среды организма.

Список литературы

1. Агаджанян Н.А. Физиологическая роль углекислоты и работоспособности человека. / Агаджанян Н.А., Красников Н.П., Полуниин И.Н. – Изд.: АРМА, Москва-Астрахань-Нальчик, 1995 - 188 с.
2. Агаджанян Н.А. Функции организма в условиях гипоксии и гиперкапнии / Н.А. Агаджанян, А.И. Елфимов – Москва: Медицина, 1986. – 269 с.
3. Бреслав И.С. Регуляция дыхания. / И.С. Бреслав, В.Д. Глебовский – Ленинград: Наука, 1980 – 280 с.
4. Михайлов В.В. Дыхание спортсмена / Михайлов В.В. – Москва: ФИС, 1983. – 103с.
5. Агаджанян Н.А. Оценка функционального состояния спортсмена в условиях измененной газовой среды / Н.А. Агаджанян, Н.П. Красников // Теория и практика физической культуры. – 1985. – № 3. – С. 19-21.
6. Красников Н.П. Значение газообменной функции легких и кислотно-основного состояния крови в механизме повышения работоспособности и развития мышечного утомления : автореферат дисс. на соиск. учен. степ. док. биол. наук. / Красников Н.П. – М., 1995. – 37 с.
7. Найдич С.И. Исследование функций внешнего дыхания при интенсивной мышечной деятельности в условиях нормоксии, гипероксии и гиперкапнии-гипероксии : автореферат дисс. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. / Найдич С.И. – Москва, 1988. – 32 с.
8. Jenning D., Lauracis A. Resp. Physiol., 1982. – Vol. 49. – P. 335–369.
9. Жиронкин А.Г. Кислород: Физиологическое и токсическое действие / Жиронкин А.Г. – Л., 1972. – 170 с.
10. Иржак Л.И. Дыхательная функция крови в условиях гипероксии. / Иржак Л.И., Гладилов В.В., Мойсеенко Н.А. – Москва, 1985. – 175 с.
11. Коваленко Е.А. Кислород тканей при экстремальных факторах полета / Е.А. Коваленко, И.Н. Черняков – Москва: Наука, 1972. – 263 с.
12. Маршак М.Е. Физиологическое значение углекислоты / Маршак М.Е. – М., 1969. – 144 с.
13. Глазков В.А. Кислотно-щелочное состояние крови при дыхании гиперкапническими газовыми смесями / В.А. Глазков, И.Н. Черняков // Космическая биол. – 1975 – Т. 9, № 2. – С. 20–27.
14. Guillerm R., Radziszewski E. / J. Physiol. – 1972. – Vol. 345. – P. 92.
15. Анисимов Е.А. Использование вдыхания кислорода и карбогена по прописке 40% O<sub>2</sub> + 2% CO<sub>2</sub> + 58% азота для ускорения восстановления работоспособности у спортсменов между соревновательными нагрузками / Е.А. Анисимов // Учен. записки Моск. обл. педагог. ин-та им. Н.К. Крупской, 1968. – Т. 206. – С. 44–48.
16. Anthonisen N., Dhingra S. / Resp. Physiol., 1978. – Vol. 32. – P. 335-344.
17. Cummin A., Iyave V. Sanders K. / J. Physiol. – 1983. – Vol. 340. – P. 17-18.
18. Брандис С.А. Функциональные изменения в организме при многочасовом дыхании газовыми смесями с высоким содержанием кислорода и углекислого газа в покое и во время работы / С.А. Брандис, В.Н. Пиловицкая // Физиол. журн. СССР, 1962. – Т. 48. – С. 455–562.
19. Власов Ю.А. Кровообращение и газообмен человека / Власов Ю.А. – Новосибирск: Наука., 1992. – 317 с.

**Найдич С.І. Дослідження показників газообміну людини під час м'язової діяльності в умовах зміненого газового середовища / С.І. Найдич // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 102-111.**

Виявлено, що експериментальне покращення функціонального стану апарату зовнішнього дихання за рахунок зміни газового складу вдихуваного повітря призводить до збільшення парціального тиску вуглекислого газу в альвеолярному повітрі протягом всього часу роботи на велоергометрі із ступінчасто-зростаючою потужністю до повного стомлення. Крім того, зниження парціального тиску вуглекислого газу в альвеолярному повітрі в певний момент м'язової діяльності відбувається при більшій потужності навантаження в порівнянні із звичайним газовим середовищем, що при зіставленні з динамікою дихального коефіцієнта і неметаболичного лишку CO<sub>2</sub> свідчить і про менші порушення кислотно-основного стану внутрішнього середовища організму.

**Ключові слова:** мускульна діяльність, зовнішнє дихання, працездатність.

**RESEARCH OF INDEXES OF INTERCHANGE OF GASES OF MAN DURING  
MUSCULAR ACTIVITY IN THE CONDITIONS OF THE CHAGED GAS  
ENVIRONMENT**

*Naidych S.I.*

*Crimean Engineer-Pedagogical University, Simferopol, Crimea, Ukraine  
E-mail: tournesi@rambler.ru*

The aim of this study was to study the influence of different gaseous mixtures on human body in order to find out the specifics of gas exchange and acid-base balance in case of bodily fatigue.

The material of the study showed that a short-term breathing in of a hyperoxia mixture was accompanied with a moderate elevation of pulmonary ventilation and gas exchange. Oxygen consumption demonstrated an average increase by 37% throughout the entire inhalation period, while carbon dioxide liberation did not change as compared with the data registered in normal atmospheric conditions. The respiratory coefficient dropped as low as  $0.445 \pm 0.001$  relative units, which testified to a metabolic CO<sub>2</sub> retention. However, the partial pressure of carbon dioxide in blood remained stable all the time and did not exceed the physiological standard.

In our study, the breathing in of a gaseous mixture containing 1% of CO<sub>2</sub> and 34% of O<sub>2</sub> was accompanied with an increase in pulmonary ventilation without change of carbon dioxide tension in alveolar air and was provided mainly due to an increase in breathing capacity, rather than due to a respiratory rate increase. The regulation of the gas composition of blood in these conditions contributed to CO<sub>2</sub> accumulation, accelerated hydrogen ion regeneration and acid-base balance parameters. This could favor the enhancement of the buffer capacity of blood and increase in length of work on a bicycle ergo meter as far as one could go. This is evidenced by higher values of PACO<sub>2</sub> throughout the entire period of work and arterial blood acid-base balance parameters in the 3<sup>rd</sup> minute after finishing the test.

The reactions of pulmonary ventilation enhancement at rest during the breathing in of gaseous mixtures containing 1.0-1.5% of CO<sub>2</sub> in oxygen, with no increase in p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> were noted earlier by other authors. As for our study, it showed that the efficiency of external respiration is manifested also during an intensive muscle performance. In addition, the decline of PACO<sub>2</sub> in certain moment of muscular activity takes place at greater power of loading as compared to an ordinary gas environment, that at comparison with the dynamics of respiratory coefficient and ExcCO<sub>2</sub> testifies and about less violations of the acid-basic state of internal environment of organism.

**Keywords:** muscular activity, exterior breathing, capacity.

References

1. Agadganiyan N.A. et. al., Physiological role of carbonic acid and capacity of man, ARMA, 188p. (Moscow, 1995).
2. Agadganiyan N.A., Elfymov A.I., Functions of organism in the conditions of hypoxia and hypercapnia, Medicine, 269p. (Moscow, 1995).
3. Breslav I.S., Glebovsky V.D., Breathing adjusting, Nauka, 220p. (Leningrad, 1980).
4. Mykhaylov V.V., Breathing of sportsman, FIS, 103p. (Moscow, 1983).
5. Agadganiyan N.A., Krasnikov N.P., Estimation of the functional state of sportsman in the conditions of the changed gas environment, 19, Teor. and Pract. F.C., 3 (1985).
6. Krasnikov N.P. A value of interchange of gases function of lungs and acid-basic state of blood is in the mechanism of increase of capacity and development of muscular fatigue, FNU, 37 p.,(Moscow, 1995).
7. Naidych S.I., Research of functions of the external breathing at intensive muscular activity in the conditions of нормоксии, hyperoxias and hypercapnias-hyperoxias, FNU, 32 p.,(Moscow, 1988).
8. Jenning D., Laupacis A. / Resp. Physiol., 1982. – Vol. 49. – P. 335 – 369.
9. Jyronkyn A.,G. Oxygen: the physiological and toxic action., NSU, 182 p.,( Leningrad, 1972).
10. Yrgak L.I. at.all., Medicine, 176 p. (Moscow, 1995).
11. Kovalenko E.A., Cherniyakov I.N., Oxygen of fabrics at the extreme factors of flight., Nauka, 263p. (Moscow, 1972).
12. Marshak M. E., Physiological value of carbonic acid., Nauka, 163p. (Moscow, 1969).
13. Glazcov V.A., Cherniyakov I.N., Acid-base balance of blood at breathing of hypercapnia by gas mixtures, 20, J. Sp. Biol., Vol.9, 2 (1975).
14. Guillerm R., Radziszewski E. // J. Physiol. – 1972. – Vol. 345. – P. 92.
15. Anysimov E.A. Use of breathing in oxygen and carbogenum on registration of 40% O<sub>2</sub> + 2% CO<sub>2</sub> + 58% N<sub>2</sub> for the acceleration of renewal of capacity for sportsmen between the competition loading., 335, Scientific Notes of Moscow Pedagog. Inst. 68. , Vol. 206 (1968).
16. Anthonisen N., Dhingra S. // Resp. Physiol., 1978. – Vol. 32. – P. 335-344.
17. Cummin A., Iyave V. Sanders K. // J. Physiol. – 1983. – Vol. 340. – P. 17-18.
18. Brandis S.A., Pylovitskaya V.N., Functional changes in an organism at the hours-long breathing by gas mixtures with high maintenance of oxygen and carbon dioxide at peace and during work., 455, J. Physiol., Vol.48, (1962).
19. Vlasov Y.A., Circulation of blood and interchange of gases of man., Nauka, 317p. (Novosibirsk, 1992).

*Поступила в редакцию 18.01.2014 г.*

**УДК 578.52 + 577.216.9 + 632.951.1 + 632.951.2**

**СОВРЕМЕННЫЕ ИНСЕКТИЦИДЫ: ИХ ПРЕИМУЩЕСТВА,  
НЕДОСТАТКИ И ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ДНК-ИНСЕКТИЦИДОВ  
(ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ)**

*Оберемок В.В., Зайцев А.С.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: genepcr@mail.ru*

Данный обзор посвящен современным инсектицидам и предпосылкам создания нового препарата на основе коротких фрагментов антиапоптозных генов вирусов ядерного полиэдрома – ДНК-инсектицидов. Показаны преимущества и недостатки химических инсектицидов и биологических препаратов. Сделан вывод, что ДНК-инсектициды способны объединить в себе наилучшие качества современных инсектицидов: доступность с быстроедействием от химических инсектицидов и избирательность в действии от биологических препаратов.

**Ключевые слова:** химические инсектициды, биологические препараты, ДНК-инсектициды.

Несмотря на то, что каждый день появляются новые инсектициды для защиты растений, затраты на защиту все же повышаются, часть потерь от вредных насекомых находится почти на одном и том же уровне – около 30% предурожайной части и 10% послепроурожайной части продукции [1]. В основном сложившаяся ситуация объясняется возникновением у насекомых устойчивости к инсектицидам. Принимая во внимание быстрый рост населения на фоне ежегодного сокращения посевных площадей и существенные потери от вредных организмов, большинство специалистов считают, что серьезной альтернативы инсектицидам на сегодня нет [2], так как они помогают сохранить 20% всего урожая [3]. Также невозможно переоценить роль инсектицидов в предупреждении вирусных и протозойных заболеваний [4]. Чего стоит тот факт, что переносимые москитами заболевания, среди которых малярия, жёлтая лихорадка, энцефалит, филяриатоз и другие, распространены в более чем 100 странах мира. При этом, например, только от малярии каждый год погибает 781 000 человек, и лишь при помощи инсектицидов можно реально снизить уровень смертности от болезней, передающихся насекомыми [5].

**1. КЛАССИФИКАЦИЯ СОВРЕМЕННЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ, ИХ  
ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ**

Инсектициды можно разделить на две большие группы: химические инсектициды и биологические препараты. Химические инсектициды включают в себя неорганические инсектициды (сера, соединения мышьяка, криолит) и



органические инсектициды (ДДТ, дихлофос, карбарил, дельтаметрин, имидаклоприд). Химические инсектициды действуют быстро [6] и являются доступными [4, 7]. Преимущество химических инсектицидов заключается в возможности их быстрого применения в тех случаях, когда возникает необходимость незамедлительного уничтожения размножившихся в большом количестве насекомых-вредителей. Недостатками химических инсектицидов являются отсутствие избирательности в действии [4] и длительный период полураспада, который может длиться годами в зависимости от условий среды (температуры, рН, освещённости, микробного состава почвы) [8-10].

Химические инсектициды действуют быстро, потому что это небольшие молекулы, которые, обладая сродством к определённому компоненту клетки, отключают его функциональную активность. По сути, проникновением химического инсектицида в клетку управляют законы физики и химии [11]: диффузия и чаще всего слабое химическое взаимодействие. Таким образом, если имеется небольшой участок билипидного слоя мембраны без других компонентов углеводной и белковой природы, то, например, гидрофобная молекула ДДТ легко проникнет через него в клетку как насекомого, так и млекопитающего, не проявляя избирательности. Крупные по размерам бактерии и вирусы попадают в клетки через сложные механизмы взаимодействия с рецепторами цитоплазматической мембраны, которые обычно являются видоспецифичными для каждого отдельного микропатогена [12]. Дальнейший эффект химического инсектицида зависит от его встречи с целевой молекулой в клетке. То есть, если химический инсектицид способен проникнуть в клетку насекомого, а создают именно такие инсектициды, то скорость и амплитуда действия инсектицида будет зависеть от его концентрации. Например, для карбаматов и фосфорорганических инсектицидов целевой молекулой является ацетилхолинэстераза [13, 14], способствующая нормальной передаче нервных импульсов на мышечные волокна насекомого. Если доза инсектицида высока, то ацетилхолинэстераза быстро выходит из строя и насекомое погибает от последствий паралича мышц, если доза мала – последствия воздействия наступают медленно. У биологических препаратов, например бакуловирусных, совсем другая «философия». Их вирулентность (способность заражать) и патогенность полностью зависят от генетики микропатогена. Например, из-за мутаций (преимущественно делеций и инсерций) гена 25К вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) непарного шелкопряда (НШ), вирус формирует небольшое количество полиэдров [15] и хуже передаёт инфекцию внутри популяции насекомого-вредителя. Различные мутации гена *plcR*, плейотропного регулятора транскрипции многих других генов *Bacillus thuringiensis*, резко снижает цитотоксические свойства этой бактерии [16]. Но для вирусов и бактерий генетика может оказаться как их слабостью, так и их силой.

К биологическим препаратам преимущественно относятся инсектициды на основе вирусов, бактерий и грибов. Биологические препараты избирательны, но действуют медленно [1, 6, 17] и их дорого [18] или относительно дорого [19] производить. В основе избирательности биологических препаратов лежит специализация патогена на определённом виде насекомого-вредителя или на узком круге близкородственных видов [1, 20]. Это связано с тем, что микропатоген для

размножения в клетках насекомого-хозяина вынужден преодолеть барьеры в виде перитрофической мембраны эпителиальных клеток кишечника, цитоплазматической мембраны клетки, иммунной системы насекомого [21] и подчинить себе основные системы жизнеобеспечения клетки-хозяина, такие как биосинтез белка, апоптоз-антиапоптозную систему, энергетический обмен [12, 22, 23]. Все эти барьеры видоспецифичны, так как их реализация закодирована в уникальном геноме каждого отдельного вида насекомого, который постоянно и изолированно от других видов изменяется. Например, в геноме вирусов ядерного полиэдроза насекомых, имеются антиапоптозные гены (IAP-гены) [24, 25]. Антиапоптозные гены вирусов обладают своей уникальной последовательностью азотистых оснований, в которых закодирована уникальная последовательность аминокислот в антиапоптозных белках. Антиапоптозные белки, в свою очередь, будут максимально эффективными только для одной пары системы взаимоотношений вирус-хозяин. Это связано с тем, что в ходе коэволюции в каждой отдельной паре взаимоотношений вирус-хозяин, у вируса остаются антиапоптозные белки, которые наиболее эффективно задерживают развитие апоптоза клеток насекомого-хозяина, создавая возможность вирионам размножиться в них [26, 27]. Легко представить, что, например, антиапоптозные белки ВЯП НШ будут менее эффективны против апоптозных белков клеток совки-ипсилон, чем непарного шелкопряда. В связи с этим, перспективным направлением исследований сегодня является разработка ДНК-инсектицидов на основе коротких фрагментов антиапоптозных генов вирусов ядерного полиэдроза насекомых [28-30], которые будут действовать путём блокировки экспрессии этих генов с помощью механизмов схожими с РНК-интерференцией [31, 33] и ДНК-интерференцией [32], а также технологиями применения антисмысловых олигонуклеотидов [34, 35]. Филогенетический анализ показал, что в ходе эволюции антиапоптозные гены, как и многие другие гены, были заимствованы вирусами ядерного полиэдроза у их хозяев и являются гомологичными им [20, 26]. Это может пригодиться на практике. Например, в настоящее время нет полной геномной последовательности непарного шелкопряда, но секвенирована последовательность генома ВЯП НШ [36]. В такой ситуации вирусная ДНК может дать ценную информацию о некоторых жизненно важных генах вируса, которые имеют клеточное происхождение, например антиапоптозных генах. Последовательность этих генов может быть использована для борьбы с насекомым. Перспектива такого подхода четко видна на практике, поскольку она обеспечивает инсектицидный эффект с меньшими усилиями. Например, вместо дорогого бакуловирусного препарата можно использовать небольшие участки вирусного генома и получить тот же результат. Такие препараты будут избирательными в действии, так как последовательность генома разных видов насекомых уникальна. Таким образом, можно подбирать фрагменты нуклеиновых кислот, которые будут обладать эффективным инсектицидным действием только против одного вида насекомого-вредителя и безвредны для других членов экосистемы. Предпосылки и перспективы создания ДНК-инсектицидов будут рассмотрены во второй части статьи.

Микробиопрепараты на основе *Bacillus thuringiensis* также обладают высокой специфичностью и эффективно действуют преимущественно на личинок насекомых из отрядов чешуекрылых, двукрылых, жёсткокрылых и перепончатокрылых. Препараты на основе *Bacillus thuringiensis* являются безвредными для энтомофагов и нецелевых насекомых. Они также безопасны для растений, рыб, теплокровных животных [1, 37].

Дороговизна производства биологических препаратов связано с необходимостью культивирования целевых насекомых, их дальнейшим заражением, сбором урожая микропатогена и приготовлением препарата [38]. Конечно, себестоимость такого препарата будет дороже по сравнению со среднестатистическим химическим инсектицидом [18, 19]. Хотя некоторые авторы [6] не согласны с таким мнением и считают биологические препараты экономически более выгодными. Они связывают это с тем, что создание, токсикологическое оценивание и маркетинг химических инсектицидов являются более дорогими, поэтому биологические препараты с этой точки зрения являются экономически более выгодными в применении. Тем не менее, они соглашаются с тем, что контроль с помощью химических инсектицидов является более быстрым, и в отсутствие устойчивости, гарантирован высокий и предсказуемый уровень смертности насекомых [6].

Медленное действие биологических препаратов связано с тем, что микропатогены, в отличие от химических инсектицидов, преследуют цель воспроизвестись в клетках насекомого-хозяина. В связи с этим, микропатогены не стремятся уничтожить насекомое сразу, а используют ресурс его клеток для размножения. Бактериальные препараты приводят к гибели насекомых в течение 1-6 дней [39], вирусные – 4-7 дней и более [40]. Исследователи стараются повысить скорость инфекционного процесса, вызываемого микроэнтомопатогенами. Например, повышению скорости действия бакуловирусных биопрепаратов посвящено большое количество исследований, связанных с генетическими модификациями вирусов [41].

Кроме этого, имеются специфические недостатки, присущие отдельным классам биопрепаратов. Например, недостатками биопрепаратов на основе *Bacillus thuringiensis* является то, что они не эффективны против насекомых, питающихся внутри тканей растения [1], их активное действие зависит от высокой пищевой активности целевого насекомого, что наблюдается при температуре не ниже 18°C [42]. Кроме того, такие препараты инактивируются при высокой температуре и освещенности (за исключением стабильного экзотоксина) [1]. В этой связи, вирусы ядерного полиэдроза насекомых более адаптированы к условиям «вне организма». Происходящие из вирусных полиэдров вирионы, передающие инфекцию от насекомого к насекомому, устойчивы к различным факторам окружающей среды. Это возможно благодаря устойчивому белку полиэдрину, образующему матрикс полиэдров, в который погружены вирионы [43, 44]. Но не только целые вирусные частицы можно использовать для контроля численности насекомых, а и фрагменты ДНК вирусов. Это звучит также неожиданно, как если бы стало известно, что ДДТ способен кодировать аминокислотную последовательность белков. Так возможно ли создать ДНК-инсектициды? Попробуем разобраться в данном вопросе.

## 2. ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ДНК-ИНСЕКТИЦИДОВ

Новым классом инсектицидов для борьбы с насекомыми-вредителями могут стать биопрепараты на основе коротких одноцепочечных ДНК-фрагментов вирусов ядерного полиэдроза – ДНК-инсектициды [28-30]. ДНК-инсектициды способны вызывать гибель целевых насекомых-вредителей по механизмам схожими с ДНК-интерференцией [32] и РНК-интерференцией [31, 33, 45], а также с технологиями применения антисмысловых олигонуклеотидов на основе РНК и ДНК [34, 35]. Данные явления схожи по своему механизму действия.

Рассмотрим явление РНК-интерференции, как пример посттранскрипционной блокировки экспрессии генов, подробнее. РНК-интерференцию открыли Эндрю Файр и Крейг Мелло в 1998 г. в экспериментах с круглым червем *Caenorhabditis elegans* [31]. РНК-интерференция – процесс подавления экспрессии гена на стадии транскрипции и трансляции при помощи двухцепочечной (дц) РНК-копии соответствующего гена [46]. В итоге синтез соответствующего белка блокируется. На ранних этапах РНК-интерференции происходит разрезание двухцепочечного фрагмента РНК ферментом *dicer* (РНК-аза III-го типа) на более короткие фрагменты длиной 20-30 п.н. [47, 48]. Далее эти короткие фрагменты объединяются с белками из семейства *argonaute* [49]. Формируются комплексы RISC (RNA-induced silencing complex, РНК-индуцированный блокирующий комплекс) и RITS (RNA-induced transcriptional silencing, РНК-индуцированная блокировка транскрипции), содержащие короткий фрагмент антисмысловой РНК [46]. Данные комплексы блокируют экспрессию генов на стадии транскрипции и трансляции, присоединяясь комплементарно и блокируя или деградируя пре-мРНК и мРНК (рис. 1).

Возможна и последующая системная РНК-интерференция, вызываемая клетками, в которых началась первичная РНК-интерференция [50]. Таким образом, прерывается биосинтез определённой белковой молекулы. Тонкие детали данного процесса в данный момент изучены недостаточно. Процессы РНК-интерференции обнаружены в клетках многих эукариот [51]: у животных, растений и грибов. Система РНК-интерференции играет важную роль в защите клеток от вирусов, транспозонов, а также в регуляции развития, дифференцировки и экспрессии генов организма [48]. РНК-интерференция обладает высокой специфичностью и эффективностью [52].

Таким образом, если мы хотим заблокировать определённый ген по механизму РНК-интерференции, то мы создаём его полную копию или её часть в виде двухцепочечной РНК и вносим в клетку. Конечно, если нам нужно заблокировать экспрессию гена на стадии трансляции белка, а не транскрипции, то лучше вносить двухцепочечную молекулу РНК, состоящую из антисмысловой последовательности и комплементарной ей смысловой последовательности, повторяющей мРНК гена. Это поможет исключить интронные последовательности и повысить эффективность РНК-интерференции.

В случае коротких одноцепочечных (оц) ДНК, предполагается их действие в качестве антисмысловых олигонуклеотидов, когда запускаются процессы, которые похожи на поздние этапы РНК-интерференции. Известно, что у бакуловирусов есть многочисленные участки генома, где транскрипты образуются с обеих цепей ДНК. Образованные антисмысловые и смысловые РНК, способны формировать дцРНК и

могут быть вовлечены в регуляцию собственных генов и генов хозяина по механизму РНК-интерференции, или напрямую, по механизму антисмысловых олигонуклеотидов [20, 53]. Таким образом, короткие оцДНК-фрагменты фактически могут повторять природные механизмы с той разницей, что будут формироваться не дцРНК, а гибриды ДНК-РНК.

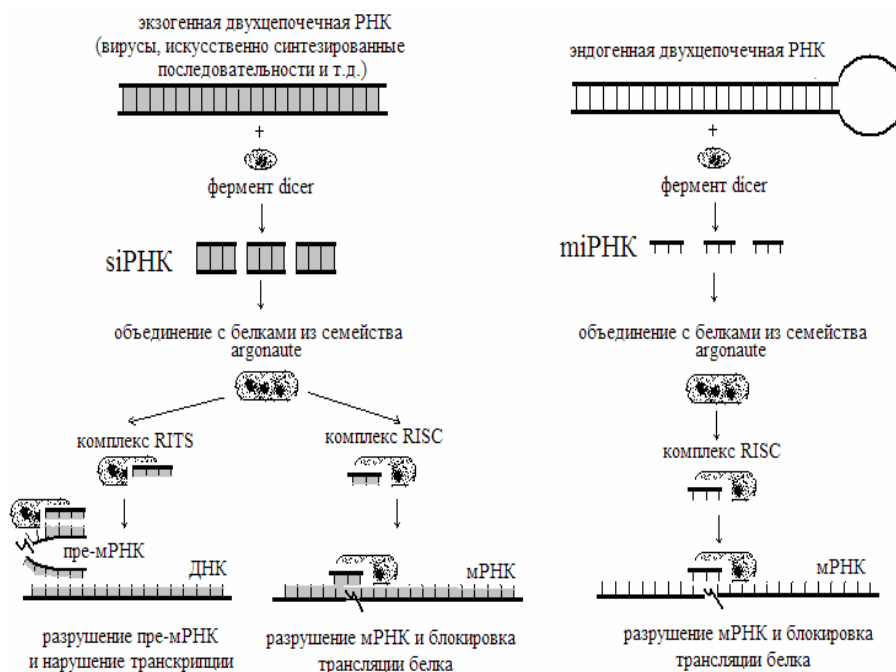


Рис. 1. Схема РНК-интерференции.

Для тестирования возможности использования оцДНК-фрагментов бакуловирусов против насекомых-вредителей, можно использовать различные фрагменты функционально важных генов для системы взаимоотношений вирус-хозяин, например антиапоптозных. И необходимо при этом, чтобы антиапоптозные гены вируса были гомологичны таковым генам хозяина. В процессе эволюции некоторые вирусы, в том числе бакуловирусы, «научились» бороться с преждевременной гибелью зараженных ими клеток. У таких вирусов есть специальные антиапоптозные белки [24, 25], которые либо сами препятствуют действию клеточных апоптозных белков, либо так изменяют активность клеточных генов, что баланс сил сдвигается в сторону клеточных антиапоптозных белков [54]. Бакуловирусы имеют два класса антиапоптозных генов, P35 и IAP-гены, которые могут заблокировать апоптоз в клетках хозяина [23, 55, 56]. Филогенетический анализ IAP-генов позволил выдвинуть гипотезу, что эти гены были получены вирусами от их хозяев. Захват антиапоптозных генов бакуловирусами происходил как минимум дважды в ходе эволюции [26]. Если антиапоптозные гены вируса

являются гомологичными генам хозяина, то введение таких антисмысловых РНК-или ДНК-фрагментов вируса должно вызывать апоптоз клеток насекомого из-за блокировки синтеза антиапоптозных белков.

Действие оцДНК или оцРНК-фрагментов вируса, скорее всего, не будет ограничиваться механизмом блокировки генов в клетке хозяина. Например, для фрагментов РНК известно, что они способны катализировать следующие процессы [57, 58]: а) создание и разрушение ковалентных связей, в том числе и между нуклеотидами; б) некоторые специализированные молекулы РНК могут катализировать изменения в других молекулах РНК, разрезая нуклеотидную последовательность в определенном месте; в) РНК может вырезать часть своей собственной последовательности, сшивая при этом свои концы. Исходя из большого сходства в строении между РНК и ДНК, можно прогнозировать, что подобные каталитические свойства могут иметь и ДНК-фрагменты вируса. Кроме этого, для нуклеиновых кислот характерно сродство к белкам и ферментам [59], при котором возможно снижение или прекращение их каталитической функции.

Хотя можно подбирать уникальные последовательности фрагментов ДНК для отдельного насекомого-вредителя, не исключено нанесение вреда ДНК-инсектицидами нецелевым насекомым и другим организмам. Данное предположение нужно проверить на практике.

В виду наличия нуклеаз в кишечнике насекомых, одним из целесообразных и удобных способов нанесения ДНК-инсектицидов является внешняя обработка [45]. Известно, что наличие развитой эпикутикулы ограничивает проницаемость покровов для многих инсектицидов [60], но хлорорганические и другие контактные инсектициды могут растворяться в кутикулярном воске. Растворенный в воске инсектицид легко проникает в организм насекомого через наиболее проницаемые участки покровов. Такими участками, играющих роль «входных ворот» для растворенного яда, служат межсегментные мембраны, основания щетинок и очень тонкие участки эпикутикулы над нервными окончаниями. В процессе проникновения инсектицидов через покровы большое значение имеет способность хитина абсорбировать органические молекулы. Как показали опыты с очищенным хитином, он хорошо поглощает инсектицид из водной суспензии [61]. Проникновение веществ через кутикулу, вероятно, регулируется пассивным транспортом. Одна из основных действующих сил в данном случае обусловлена градиентом концентрации проникающего вещества.

Сложные молекулы растворенного вещества проникают сквозь гидрофобную кутикулу насекомых с меньшей скоростью, чем более простые молекулы растворителя, а неполярные быстрее, чем полярные. Сквозь кутикулу в клетки могут попадать и более крупные по размерам вирусные частицы [62]. Например, при нанесении раствора с вирусом ядерного полиэдроса ( $10^7$  мкл с титром  $2 \times 10^7$  пол/мл) на грудные дыхальца 8-суточных гусениц хлопковой совки получили урожай  $15,2 \times 10^9$  полиэдров в 13-суточном возрасте,  $12,8 \times 10^8$  полиэдров с предкуколки и  $1,49 \times 10^8$  полиэдров с куколки на момент их гибели [63]. Известно, что трахеи насекомых, открывающиеся дыхальцами, заканчиваются звездчатыми клетками, из которых к каждой клетке организма насекомого подходят трахеолы, которые поставляют

клеткам кислород. Вдоль трахеол вирусные частицы могут проникать в любой орган [62]. Также показано, что для пиретроидов основным путём проникновения в тело насекомого являются дыхальца [64]. Описанный механизм попадания в организм насекомого может быть характерен и для оцДНК-фрагментов.

Второй важный вопрос – проникновение оцДНК-фрагментов внутрь клетки. В модельных системах через искусственные мембраны вещества переносятся вдоль градиента концентраций за счет диффузии к установлению равенства концентраций, а точнее до достижения термодинамического равновесия (пассивный транспорт) [65]. Но сравнительно крупные и отрицательно заряженные фрагменты оцДНК будут очень медленно проникать в клетку через гидрофобный билипидный слой мембраны путём диффузии. Проникновение в клетку оцДНК может происходить, вероятно, двумя различными путями, установленными для дцРНК: трансмембранное канал опосредованное поглощение, показанное на *Caenorhabditis elegans*, и эндоцитоз опосредованное поглощение, показанное на клеточной линии S2 дрозофилы [45, 52]. Эксперименты по РНК-интерференции продемонстрировали, что отрицательно заряженные дцРНК способны проникать через кутикулу круглых червей [66] и насекомых [45]. Эти эксперименты показывают, что, несмотря на дополнительные барьеры, поглощение дцРНК всем телом насекомых возможно [45, 67]. Индукцию РНК-интерференции при местном применении дцРНК можно объяснить попаданием их во внутренние ткани через систему трахей [68]. В случае ДНК-инсектицидов, оцДНК имеют помимо гидрофильной части (полярный сахаро-фосфатный остов) и гидрофобную (азотистые основания), которая может помочь им проникнуть через неполярный гидрофобный билипидный слой мембран клеток насекомого.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исходя из сказанного выше, становится понятным, что наименьший вред инсектицидов будет наносить окружающей среде, если он ей знаком и если есть пути его быстрого распада. Кроме этого он должен быть избирательным в действии и функционально выводить из строя только определённый вид насекомого. Таким потенциалом обладают ДНК-инсектициды. Во-первых, ДНК-инсектициды не обладают длительным периодом полураспада, так как во всех клетках есть пути синтеза и деградации нуклеиновых кислот. Во-вторых, ДНК-инсектициды обладают способностью избирательно передавать информацию (сигнал) к гибели вредителя, например, по механизму РНК-интерференции [31, 33] или антисмысловых олигонуклеотидов [34, 35]. То есть, подобрав специфическую комбинацию азотистых оснований, можно выводить из строя какой-либо функционально важный ген у отдельного вида насекомого. По сути, ДНК-инсектициды являются первыми химическими инсектицидами с «интеллектом», которые будут «думать», перед тем как действовать. Нам первыми в мире удалось показать и запатентовать возможность успешного применения коротких одноцепочечных фрагментов антиапоптозных генов вирусов ядерного полиэдроса в качестве ДНК-инсектицидов [28, 29], обладающими потенциалом стать эффективным средством защиты растений. ДНК-инсектициды способны объединить в себе наилучшие качества современных инсектицидов: доступность с быстродействием от химических

инсектицидов и избирательность в действии от биологических препаратов. По сути, Природа дала нам в руки универсальный «язык» всего живого – нуклеиновые кислоты. И при помощи нуклеиновых кислот можно решать большое количество задач, то есть «разговаривать» с Природой. Таким образом, сегодня в руках человека нуклеиновые кислоты превращаются в активный инструмент воздействия на клетку. И подтверждением этому является идея разработки инсектицидов на основе нуклеиновых кислот [28, 29, 30, 33, 68], которая активно начала развиваться в последние несколько лет и возможно, что в течение ближайшего десятилетия будет создан первый такой препарат для сельского и лесного хозяйства.

### Список литературы

1. Sanchis V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review / V. Sanchis // *Agronomy for Sustainable Development*. - 2011. - Vol. 31. - P. 217-231.
2. Webster J.P.G. Estimating the Economic Benefits of Alternative Pesticide Usage Scenarios: Wheat Production in the United Kingdom / J.P.G. Webster, R.G. Bowles, N.T. Williams // *Crop Production*. - 1999. - Vol. 18. - P. 83-89.
3. Oerke E.C. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection / E.C. Oerke, H.W. Dehne // *Crop Protection*. - 2004. - Vol. 23. - P. 275-285.
4. Aktar W. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards / W. Aktar, D. Sengupta, A. Chowdhury // *Interdisc Toxicol*. - 2009. - Vol. 2, № 1. - P. 1-12.
5. Ghosh A. Plant extracts as potential mosquito larvicides / A. Ghosh, N. Chowdhury, G. Chandra // *The Indian J. Medical Research*. - 2012. - Vol. 135. P. 581-598.
6. Bale J.S. Biological control and sustainable food production / J.S. Bale, J.C. van Lenteren, F. Bigler // *The Philosophical Transactions of the Royal Society*. - 2008. - Vol. 363. - P. 761-776.
7. Walker K. Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control / K. Walker // *Medical and Veterinary Entomology*. - 2000. - Vol. 14. - P. 345-354.
8. Wheatley G.A. Residues of chlorinated hydrocarbon insecticides in some farm soils in England / G.A. Wheatley, J.A. Hardman, A.H. Strickland // *Plant Pathology*. - 1962. - Vol. 11. - P. 81-90.
9. Ragnarsdottir K.V. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides / K.V. Ragnarsdottir // *J. Geological Society*. - 2000. - Vol. 157. - P. 859-876.
10. Krupke C.H. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields / C.H. Krupke, G.J. Hunt, B.D. Eitzer, G. Andino, K. Given // *PLoS ONE*. - 2012. - 7: e29268.
11. Jensen S.E. Insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* / S.E. Jensen // *Integrated Pest Management Reviews*. - 2000. - Vol. 5, № 2. - P. 131-146.
12. Rohrmann G.F., *Baculovirus Molecular Biology*, (National Library of Medicine, 2008).
13. Fukuto T.R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides / T.R. Fukuto // *Environ Health Perspect*. - 1990. - Vol. 87. - P. 245-254.
14. Yang M. Increased activity and reduced sensitivity of acetylcholinesterase associated with malathion resistance in a field population of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* / M. Yang, J. Zhang, K. Y. Zhu, T. Xuan, X. Liu, Y. Guo, E. Ma // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. - 2008. - Vol. 91. - P. 32-38.
15. Bischoff D.S. Molecular analysis of an enhancing gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus / D.S. Bischoff, J.M. Slavicek // *J. Virology*. - 1997. - Vol. 71. - P. 1097-1106.
16. Slamti L. Distinct Mutations in PlcR Explain Why Some Strains of the *Bacillus cereus* Group Are Nonhemolytic / L. Slamti, S. Perchat, M. Gominet, G. Vilas-Bôas, A. Fouet, M. Mock, V. Sanchis, J. Chaufaux, M. Gohar, D. Lereclus // *J. Bacteriology*. - 2004. - Vol. 186, № 11. - P. 3531-3538.
17. Rosell G. Biorational insecticides in pest management / G. Rosell, C. Quero, J. Coll, A. Guerrero // *J. Pesticide Science*. - 2008. - Vol. 33. - P. 103-121.
18. Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera / F. Moscardi // *The Annual Review of Entomology*. - 1999. - Vol. 44. - P. 257-289.



19. Rowe G.E. Bioprocess Developments in the Production of Bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis* / G.E. Rowe, A.M. Margaritis // *Critical Reviews in Biotechnology*. - 1987. - Vol. 6, No.4. - P. 87-127.
20. Rollie J.C. Baculoviruses: Sophisticated Pathogens of Insects / J.C. Rollie, A.L. Passarelli // *PLoS Pathogens*. - 2013. - 9(11): e1003729.
21. Asser-Kaiser S. Sex linkage of CpGV resistance in a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) / S. Asser-Kaiser, D.G. Heckel, J.A. Jehle // *J. of Invertebrate Pathology*. - 2010. - Vol. 103. - P. 59-64.
22. Katsuma S. The baculovirus uses a captured host phosphatase to induce enhanced locomotory activity in host caterpillars / S. Katsuma, Y. Koyano, W. Kang, R. Kokusho, S.G. Kamita, T. Shimada // *PLoS Pathogens*. - 2012. - 8: e1002644.
23. Ikeda M. Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells / M. Ikeda, H. Yamada, R. Hamajima, M. Kobayashi // *J. Virology*. - 2013. - Vol. 435. - P. 1-13.
24. Srinivasula S.M. IAPs: what's in a name? / S.M. Srinivasula, J.D. Ashwell // *Molecular Cell*. - 2008. - Vol. 30, № 2. - P. 123-135.
25. Ikeda M. Baculovirus IAP1 induces caspase-dependent apoptosis in insect cells / M. Ikeda, H. Yamada, H. Ito // *J. General Virology*. - 2011. - Vol. 9, № 2. - P. 2654-2663.
26. Hughes A.L. Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts / A.L. Hughes // *Infection, Genetics and Evolution*. - 2002. - Vol. 2. - P. 3-10.
27. Herniou E.A. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts / E.A. Herniou, J.A. Olszewski, D.R. O'Reilly, J.S. Cory // *J. Virology*. - 2004. - Vol. 78. - P. 3244-3251.
28. Оберемок В.В. ДНК-маркери у вивченні взаємовідносин між вірусом ядерного поліедрозу та його хазяїном непарним шовкопрядом: автореферат. ... канд. біол. наук : 03.00.06 / вірусологія / Володимир Володимирович Оберемок. - К., 2011. – 22 с.
29. Patent of Ukraine for useful model № 36445. "Method of elimination of phyllophagous insects from order Lepidoptera" / V.V. Oberemok // applicant and patentee Taurida National V.I. Vernadsky University. – № u 2008 0674; Decl. 19.05.2008; Publ. 27.10.2008. – Bull. 20.
30. Oberemok V.V. Pioneer Evaluation of the Possible Side Effects of the Dna Insecticides on Wheat (*Triticum Aestivum* L.) / V.V. Oberemok, A.S. Zaytsev, P. Nyadar, N. Levchenko, H. Shiyntum, O. Omelchenko // *International J. of Biochemistry and Biophysics*. - 2013. - Vol. 1, № 3. - P. 57-63.
31. Fire A. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* / A. Fire, S. Xu, M. Montgomery, S. Kostas, S. Driver, C. Mello // *Nature*. - 1998. - Vol. 391. - P. 806-811.
32. Kawai-Toyooka H. DNA interference: a simple and efficient gene silencing system for high-throughput functional analysis in the fern *Adiantum* / H. Kawai-Toyooka, C. Kuramoto, K. Orui, K. Motoyama, K. Kikuchi, T. Kanegae, M. Wada // *Plant & Cell Physiology*. - 2004. - Vol. 45. - P. 1648-1657.
33. Wang Y. Second generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control / Y. Wang, H. Zhang, H. Li, X. Miao // *PLoS ONE*. - 2011. - 8(6): e 0018644.
34. Weiss B. Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes / B. Weiss, G. Davidkova, L.W. Zhou // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 1999. - Vol. 55. - P. 334-358.
35. Lu X. Antisense-mediated inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by use of an HIV type 1-based vector results in severely attenuated mutants incapable of developing resistance / X. Lu, Q. Yu, G.K. Binder, Z. Chen, T. Slepishkina, J. Rossi, B. Dropulic // *J. Virology*. - 2004. - Vol. 78. - P. 7079-7088.
36. Kuzio J. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar* / J. Kuzio, M.N. Pearson, S.H. Harwood, C.J. Funk, J.T. Evans, J. Slavicek, G.F. Rohrmann // *J. Virology*. - 1999. - Vol. 253. - P. 17-34.
37. De Maagd R.A. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world / R.A. De Maagd, A. Bravo, N. Crickmore // *Trends in Genetics*. - 2001. - Vol. 17. - P. 193-199.
38. Moscardi F. Microbes and microbial technology / F. Moscardi, M.L. De Souza, M.E. de Batista Castro, M.L. Moscardi, B. Szewczyk. - Springer, 2011. - 516 p.
39. Moazami N. Biopesticides production / N. Moazami // *Agriculture and Biology J. of North America*. - 2012. - Vol.3, № 7. - P. 271-279.

40. Stewart L.M.D. Construction of an improved baculovirus insecticides containing an insect-specific toxin gene / L.M.D. Stewart, M. Hirst, F. López, A.T. Merryweather, P.J. Cayley, R.D. Possee // *Nature*. - 1991. - Vol. 352. - P. 85-88.
41. Inceoglu A.B. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook / A.B. Inceoglu, S.G. Kamita, B.D. Hammock // *Adv. Virus Res.* - 2006. - Vol. 68. - P. 322-327.
42. Белов Д.А. Химические методы и средства защиты растений в лесном хозяйстве и озеленении / Д.А. Белов. - М. : МГУЛ, 2003. - 128 с.
43. Coulibaly F. The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses / F. Coulibaly, E. Chiu, S. Gutmann, C. Rajendran, P.W. Haebel, K. Ikeda, H. Mori, V.K. Ward, C. Schulze-Briese, P. Metcalf // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2009. - Vol. 106. - P. 22205-22210.
44. Chiu E. Insect virus polyhedra, infectious protein crystals that contain virus particles / E. Chiu, F. Coulibaly, P. Metcalf // *Current Opinion in Structural Biology*. - 2012. - Vol. 22. - P. 234-240.
45. Yu N. Christiaens O. Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions / N. Yu, O. Christiaens, J. Liu, J. Niu, K. Cappelle, S. Caccia, H. Huvenne, G. Smagghe // *Insect Science*. - 2013. - Vol. 20. - P. 4-14.
46. Tomoyasu Y. Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium* / Y. Tomoyasu, S.C. Miller, S. Tomita, M. Schoppmeier, D. Grossmann, G. Bucher // *Genome biology*. □ 2008. - 9(1): R10.
47. Carmell M.A. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing / M.A. Carmell, G.J. Hannon // *Nature Structural & Molecular Biology*. - 2004. - Vol.11, № 3. - P. 214-218.
48. Obbard D.J. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements / D.J. Obbard, K.H. Gordon, A.H. Buck, F. Jiggins // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. - 2009. - Vol. 364. - P. 99-115.
49. Parker J.S. Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs / J.S. Parker, D. Barford // *Trends in Biochemical Sciences*. - 2006. - Vol. 31. - P. 622-630.
50. Timmons L. Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans* / L. Timmons, H. Tabara, C.C. Mello, A.Z. Fire // *Cellular and Molecular Biology*. - 2003. - Vol. 14, № 7. - P. 2972-2983.
51. Mello C.C. Revealing the world of RNA interference / C.C. Mello, D.J. Conte // *Nature*. - 2004. - Vol. 431. - P. 338-342.
52. Huvenne H. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review / H. Huvenne, G. Smagghe // *J. Insect Physiology*. - 2010. - Vol. 56. - P. 227-235.
53. Jayachandran B. RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus / B. Jayachandran, M. Hussain, S. Asgari // *J. Virology*. - 2012. - Vol. 86. - P. 13729-13734.
54. Агол В.И. Как вирусы вызывают болезни / В.И. Агол // *Сорос. обр. журн.* - 1997. - № 9. - С. 27-31.
55. Bertin J. Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus induced CED □ 3/ICE□like protease / J. Bertin, S.M. Mendrysa, D. J. La Count, S. Gaur, G.F. Krebs, R.C. Armstrong, K.J. Tomaselli, P.D. Friesen // *J. Virology*. - 1996. - Vol. 70, №9. - P. 6251-6259.
56. Manji G. A. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P35 to prevent programmed cell death / G.A. Manji, R.R. Hozar, D.J. La Count, P.D. Friesen // *J. Virology*. - 1997. - Vol. 71. - P. 4509-4516.
57. Shechner D.M. The Structural Basis of RNA□Catalyzed RNA Polymerase / D.M. Shechner, D.P. Bartel // *Nature Structural and Molecular Biology*. - 2011. - Vol. 18, № 9. - P. 1036-1042.
58. Cech T.R. RNA as an enzyme / T.R. Cech // *Scientific American*. - 1986. - Vol. 255. - P. 64-75.
59. Cai Y.H. Advances in the study of protein-DNA interaction / Y.H. Cai, H. Huang // *Amino Acids*. - 2012. - Vol. 43. - P. 1141-1146.
60. Scott J.G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, strategies and pitfalls / J.G. Scott. - New York : Chapman and Hall, 1989. - P. 39-57.
61. Тыщенко В.П. Физиология насекомых / В.П. Тыщенко. - М. : Высшая школа, 1986. - 330 с.
62. Бахвалов С.А. Вирозы насекомых. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / С.А. Бахвалов, В.В. Глупова. - М. : Круглый год, 2001. - 736 с.
63. Sugiura M. Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids / M. Sugiura, Y. Horibe, H. Kawada, M. Takagi // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. - 2008. - Vol. 91, № 3. - P. 135-140.

64. Kalia V. Optimization of production of nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* throughout larval stages / V. Kalia, S. Chaudhari, G.J. Gujar // *Phytoparasitica*. - 2001. - Vol. 29, № 1. - P. 23-28.
65. Кагава Я. Биомембраны / Я. Кагава. - М. : Высшая школа, 1985. - 303 с.
66. Maeda I. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi / I. Maeda, Y. Kohara, M. Yamamoto, A. Sugimoto // *Current Biology*. - 2001. - Vol. 11. - P. 171-176.
67. Pridgeon J.W. Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti* / J.W. Pridgeon, L. Zhao, J.J. Becnel, D.A. Strickman, G.G. Clark, K.J. Linthicum // *Journal of Medical Entomology*. - 2008. - Vol. 45. - P. 414-420.
68. Gu L. Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies / L. Gu, D.C. Knipple // *Crop Protection*. - 2013. - Vol. 45. - P. 36-40.

**Оберемок В.В. Сучасні інсектициди: їх переваги, недоліки та передумови до створення ДНК-інсектицидів / В.В. Оберемок, О.С. Зайцев // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С.112-126.**

Даний огляд присвячено сучасним інсектицидам та передумовам створення нового препарату на основі коротких фрагментів антиапоптозних генів вірусів ядерного поліедроза комах – ДНК-інсектицидів. Показано переваги і недоліки хімічних інсектицидів і біологічних препаратів. Зроблено висновок, що ДНК-інсектициди здатні об'єднати в собі найкращі властивості сучасних інсектицидів: доступність з швидкою дією від хімічних інсектицидів і вибірковість у дії від біологічних препаратів.

**Ключові слова:** хімічні інсектициди, біологічні препарати, ДНК-інсектициди.

## THE MODERN INSECTICIDES: THEIR ADVANTAGES, DISADVANTAGES AND PRECONDITIONS FOR THE CREATION OF DNA INSECTICIDES (REVIEW)

*Oberemok V.V., Zaitsev A.S.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine  
E-mail: genepcr@mail.ru*

This paper is devoted to modern insecticides and the preconditions for the creation of new biopreparations based on short fragments of anti-apoptosis genes of nuclear polyhedrosis viruses termed as DNA insecticides. Both advantages and disadvantages of the modern insecticides are shown in this review. Chemical insecticides are very fast in action while the main disadvantages are their non-specificity in action and the lengthy period of half-life that can last up to several decades. Biological preparations are selective but slow in action and relatively expensive. It is concluded that DNA insecticides are able to manifest the sum of the best characteristics of the modern insecticides: fastness and cheapness of chemical insecticides and safety from baculoviral preparations. Many investigations suggest that the viral anti-apoptosis genes originate from the eukaryotic cells. The relationships between baculoviruses and their insect hosts are subject to coevolution; this should lead to long-term evolutionary effects such as the specialization of these pathogens for their hosts, and the ability to affect their biochemical reactions through expression of homologous anti-apoptotic genes. Thus, if anti-apoptosis genes of a virus are homologous to the host anti-apoptosis genes then application of fragments of viral anti-apoptosis genes is supposed to interfere with pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways in the gypsy moth cells (for example, via mechanisms characteristic for the action of antisense oligonucleotides). The consequences of such application of viral anti-apoptosis gene fragments may be the blocking of anti-

apoptosis proteins synthesis, the high level of apoptosis of affected cells and as a result, the death of a pest insect. Besides this, every species has its own unique sequence of anti-apoptosis genes and it seems possible to create the most effective and selective DNA insecticides for certain species that will manifest the highest effect on a target insect and provide harmlessness to other members of an ecosystem. Generally speaking, the influence of single-stranded DNA fragments on apoptosis or cellular cycle is an innovative branch of biology. It suggests that DNA could demonstrate the ability to coordinate particular cellular pathways, not only as a part of a genome but also as fragments of it. Some authors are close to this idea but they are mostly concentrated on the phenomenon of RNA interference and the use of relatively long double-stranded RNA fragments. The idea described in this article is novel and patented in Ukraine, and there is no available data in scientific literature about research testing the influence of very short viral single-stranded DNA fragments of anti-apoptosis genes that could work as DNA insecticides.

**Keywords:** chemical insecticides, biological preparations, DNA insecticides.

### References

1. Sanchis V., From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review, *Agronomy for Sustainable Development*, **31**, 217 (2011).
2. Webster J.P.G., Bowles R.G., Williams N.T., Estimating the Economic Benefits of Alternative Pesticide Usage Scenarios: Wheat Production in the United Kingdom, *Crop Production*, **18**, 83 (1999).
3. Oerke E.C., Dehne H.W., Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection, *Crop Protection*, **23**, 275 (2004).
4. Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A., Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards, *Interdisc Toxicol*, **2** (1), 1 (2009).
5. Ghosh A., Chowdhury N., Chandra G., Plant extracts as potential mosquito larvicides, *The Indian J. Medical Research*, **135**, 581 (2012).
6. Bale J.S., Van Lenteren J.C., Bigler F., Biological control and sustainable food production, *The Philosophical Transactions of the Royal Society*, **363**, 761 (2008).
7. Walker K., Cost-comparison of DDT and alternative insecticides for malaria control, *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 345 (2000).
8. Wheatley G.A., Hardman J.A., Strickland A.H., Residues of chlorinated hydrocarbon insecticides in some farm soils in England, *Plant Pathology*, **11**, 81 (1962).
9. Ragnarsdottir K.V., Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides, *J. Geological Society*, **157**, 859 (2000).
10. Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G., Given K., Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields, *PLoS ONE*, **7**, e29268 (2012).
11. Jensen S.E., Insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, *Integrated Pest Management Reviews*, **5** (2), 131 (2000).
12. Rohrmann G.F., *Baculovirus Molecular Biology* (National Library of Medicine, 2008).
13. Fukuto T.R., Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides, *Environ Health Perspect*, **87**, 245 (1990).
14. Yang M., Zhang J., Zhu K.Y., Xuan T., Liu X., Guo Y., Ma E., Increased activity and reduced sensitivity of acetylcholinesterase associated with malathion resistance in a field population of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis*, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **91**, 32 (2008).
15. Bischoff D.S., Slavicek J.M., Molecular analysis of an enhancing gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus, *J. Virology*, **71**, 1097 (1997).
16. Slamti L., Perchat S., Gominet M., Vilas-Bôas G., Fouet A., Mock M., Sanchis V., Chaufaux J., Gohar M., Lereclus D., Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are Nonhemolytic, *J. Bacteriology*, **186** (11), 3531 (2004).

17. Rosell G., Quero C., Coll J., Guerrero A., Biorational insecticides in pest management, *J. Pesticide Science*, **33**, 103 (2008).
18. Moscardi F., Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera, *The Annual Review of Entomology*, **44**, 257 (1999).
19. Rowe G.E., Margaritis A.M., Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*, *Critical Reviews in Biotechnology*, **6** (4), 87 (1987).
20. Rollie J.C., Passarelli A.L., Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects, *PLoS Pathogens*, **9**, e1003729 (2013).
21. Asser-Kaiser S., Heckel D.G., Jehle J.A., Sex linkage of CpGV resistance in a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.), *J. of Invertebrate Pathology*, **103**, 59 (2010).
22. Katsuma S., Koyano Y., Kang W., Kokusho R., Kamita S.G., Shimada T., The baculovirus uses a captured host phosphatase to induce enhanced locomotory activity in host caterpillars, *PLoS Pathogens*, **8**, e1002644 (2012).
23. Ikeda M., Yamada H., Hamajima R., Kobayashi M., Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells, *J. Virology*, **435**, 1 (2013).
24. Srinivasula S.M., Ashwell J.D., IAPs: what's in a name?, *Molecular Cell*, **30** (2), 123 (2008).
25. Ikeda M., Yamada H., Ito H., Baculovirus IAP1 induces caspase-dependent apoptosis in insect cells, *J. General Virology*, **9** (2), 2654 (2011).
26. Hughes A.L., Evolution of inhibitors of apoptosis in baculoviruses and their insect hosts infection, *Genetics and Evolution*, **2**, 3 (2002).
27. Herniou E.A., Olszewski J.A., O'Reilly D.R., Cory J.C., Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts, *J. Virology*, **78**, 3244 (2004).
28. Oberemok V.V. (2001) DNA markers in the study of the relationship between nuclear polyhedrosis virus and its host *lymantria dispar*. Sum. cand. biol. sciences, KNU Kiev.
29. Oberemok V.V. *Method of elimination of phylophagous insects from order Lepidoptera Patent of Ukraine for useful model*. Patent UA, № 36445, Decl. 19.05.2008, Publ. 27.10.2008. Bull. 20.
30. Oberemok V.V., Zaytsev A.S., Nyadar P., Levchenko N., Shiyntum H., Omelchenko O., Pioneer Evaluation of the possible side effects of the DNA insecticides on wheat (*Triticum Aestivum* L.), *International J. of Biochemistry and Biophysics*, **1** (3), 57 (2013).
31. Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C., Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, **391**, 806 (1998).
32. Kawai-Toyooka H., Kuramoto C., Orui K., Motoyama K., Kikuchi K., Kanegae T., Wada M., DNA interference: a simple and efficient gene-silencing system for high-throughput functional analysis in the fern *Adiantum*, *Plant & Cell Physiology*, **45**, 1648 (2004).
33. Wang Y., Zhang H., Li H., Miao X., Second generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control, *PLoS ONE*, **8** (6), e 0018644 (2011).
34. Weiss B., Davidkova G., Zhou L.W., Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes, *Cellular and Molecular Life Sciences*, **55**, 334 (1999).
35. Lu X., Yu Q., Binder G.K., Chen Z., Slepushkina T., Rossi J., Dropulic B., Antisense-mediated inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by use of an HIV type 1-based vector results in severely attenuated mutants incapable of developing resistance, *J. Virology*, **78**, 7079 (2004).
36. Kuzio J., Pearson M.N., Harwood S.H., Funk C.J., Evans J.T., Slavicek J., Rohrmann G.F., Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*, *J. Virology*, **253**, 17 (1999).
37. De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N., How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world, *Trends in Genetics*, **17**, 193 (2001).
38. Moscardi F., De Souza M.L., De Batista Castro M.E., Moscardi M.L., Szewczyk B. *Microbes and microbial technology*. 516 p.(Springer, 2011).
39. Moazami N., Biopesticides production, Agriculture and Biology, *J. of North America*, **3** (7), 271 (2012).
40. Stewart L.M.D., Hirst M., López F., Merryweather A.T., Cayley P.J., Possee R.D., Construction of an improved baculovirus insecticides containing an insect-specific toxin gene, *Nature*, **352**, 85 (1991).
41. Inceoglu A.B., Kamita S.G., Hammock B.D., Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook, *Adv. Virus Res.*, **68**, 322 (2006).
42. Belov D.A. *Chemical methods and pesticides in forestry and landscaping*. 128p.(MGUL, 2003).
43. Coulibaly F., Chiu E., Gutmann S., Rajendran C., Haebel P.W., Ikeda K., Mori H., Ward V.K., Schulze-Briese C., Metcalf P., The atomic structure of baculovirus polyhedra reveals the independent

- emergence of infectious crystals in DNA and RNA viruses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 22205 (2009).
44. Chiu E., Coulibaly F., Metcalf P., Insect virus polyhedra, infectious protein crystals that contain virus particles, *Current Opinion in Structural Biology*, **22**, 234 (2012).
  45. Yu N., Christiaens O., Liu J., Niu J., Cappelle K., Caccia S., Huvenne H., Smaghe G., Delivery of dsRNA for RNAi in insects: an overview and future directions, *Insect Science*, **20**, 4 (2013).
  46. Tomoyasu Y., Miller S.C., Tomita S., Schoppmeier M., Grossmann D., Bucher G., Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*, *Genome biology*, **9** (1), R10 (2008).
  47. Carmell M.A., Hannon G.J., RNase III enzymes and the initiation of gene silencing, *Nature Structural & Molecular Biology*, **11** (3), 214 (2004).
  48. Obbard D.J., Gordon K.H., Buck A.H., Jiggins F., The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **364**, 99 (2009).
  49. Parker J.S., Barford D., Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs, *Trends in Biochemical Sciences*, **31**, 622 (2006).
  50. Timmons L., Tabara H., Mello C.C., Fire A.Z., Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*, *Cellular and Molecular Biology*, **14** (7), 2972 (2003).
  51. Mello C.C., Conte D.J., Revealing the world of RNA interference, *Nature*, **431**, 338 (2004).
  52. Huvenne H., Smaghe G., Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review, *J. Insect Physiology*, **56**, 227 (2010).
  53. Jayachandran B., Hussain M., Asgari S., RNA interference as a cellular defense mechanism against the DNA virus baculovirus, *J. Virology*, **86**, 13729, (2012).
  54. Agol V.I., How viruses cause disease, *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*, **9**, 27 (1997).
  55. Bertin J., Mendrysa S.M., La Count D.J., Gaur S., Krebs G.F., Armstrong R.C., Tomaselli K.J., Friesen P.D., Apoptotic suppression by baculovirus P35 involves cleavage by and inhibition of a virus induced CED-3/ICE-like protease, *J. Virology*, **70** (9), 6251 (1996).
  56. Manji G.A., Hozar R.R., La Count D.J., Friesen P.D., Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor P35 to prevent programmed cell death, *J. Virology*, **71**, 4509 (1997).
  57. Shechner D.M., Bartel D.P., The structural basis of RNA-catalyzed RNA polymerase, *Nature Structural and Molecular Biology*, **18** (9), 1036 (2011).
  58. Cech T.R., RNA as an enzyme, *Scientific American*, **255**, 64 (1986).
  59. Cai Y.H., Huang H., Advances in the study of protein-DNA interaction, *Amino Acids*, **43**, 1141 (2012).
  60. Scott J.G., *Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, strategies and pitfalls* (Chapman and Hall, 1989).
  61. Tyshchenko V.P. *Insect Physiology*. 330 p. (Vysshaja shkola, 1986).
  62. Bahvalov S.A. Glupova V.V. *Virozy insects. Pathogens of insects: structural and functional aspects*. 736 p. (Kruglyj god, 2001).
  63. Sugiura M., Horibe Y., Kawada H., Takagi M., Insect spiracle as the main penetration route of pyrethroids, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **91** (3), 135 (2008).
  64. Kalia V., Chaudhari S., Gujar G.J., Optimization of production of nucleopolyhedrovirus of *Helicoverpa armigera* throughout larval stages, *Phytoparasitica*, **29** (1), 2328 (2001).
  65. Kagava Y. *Biomembrane* 303p. (Vysshaja shkola, 1985).
  66. Maeda I., Kohara Y., Yamamoto M., Sugimoto A., Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi, *Current Biology*, **11**, 171 (2001).
  67. Pridgeon J.W., Zhao L., Becnel J.J., Strickman D.A., Clark G.G., Linthicum K.J., Topically applied AaeIAP1 double-stranded RNA kills female adults of *Aedes aegypti*, *J. Medical Entomology*, **45**, 414 (2008).
  68. Gu L., Knipple D.C., Recent advances in RNA interference research in insects: Implications for future insect pest management strategies, *Crop Protection*, **45**, 36 (2013).

Поступила в редакцию 05.02.2014 г.

**УДК 633/635:58**

## **СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ**

*Омельченко А.В., Юркова И.Н., Жижина М.Н.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: omelav@ukr.net*

В работе исследовано стимулирующее действие наночастиц серебра на рост и развитие растений пшеницы. Установлено, что замачивание семян в растворах наночастиц серебра с концентрацией 0,01-1,0 мг/дм<sup>3</sup> стимулирует интенсивность дыхания, энергию прорастания и всхожесть семян, а также накопление биомассы сухого вещества корней и надземной части проростков пшеницы. Максимальная стимуляция накопления биомассы проростков во всех вариантах отмечалась в корнях.

**Ключевые слова:** наночастицы, серебро, пшеница, рост и развитие.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Одним из перспективных направлений исследований в настоящее время является применение нанотехнологий в растениеводстве [1–3]. В повышении урожайности и качества сельскохозяйственных культур большое значение приобретают биогенные металлы в коллоидном состоянии (наночастицы). К наиболее широко используемым коммерческим наноматериалам можно отнести наночастицы серебра [4–6]. В отличие от ионного серебра наночастицы менее токсичны, обладают пролонгированным действием и не требуют применения больших доз для достижения необходимого биологического эффекта [7].

Анализ литературных данных показывает, что влияние наночастиц серебра на сосудистые растения исследуют, главным образом, в связи с токсическим действием их высоких концентраций [8, 9].

Биологическая активность наночастиц зависит от их размера, формы и способа получения. Наиболее токсичными являются наночастицы серебра размером менее 10 нм [10, 11]. Показано, что токсичность высоких концентраций наносеребра, стабилизированного гуммиарабиком, при прорастании семян водно-болотных растений была значительно выше, чем у наночастиц с поливинилпирролидоном. Эта зависимость сохранялась и после посадки проростков в почву [12]. Наночастицы серебра размером 100 нм в концентрации 100 и 500 мг/л ингибировали прирост биомассы и транспирацию у *Cucurbita pepo* [13].

Обработка семян кукурузы, огурцов и томатов наносеребром в концентрации 0,5 г/л оказывала негативное действие на рост корней и надземной части, а также содержание белка и ДНК [14]. Однако до настоящего времени в научной литературе существуют лишь отдельные данные, указывающие на влияние наночастиц серебра на физиолого-биохимические процессы, протекающие в растениях [15].

Целью данной работы было исследование стимулирующего действия наночастиц серебра на рост и развитие растений пшеницы.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами для проведения исследований служили семена озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Одесская 267 и разработанная ранее водорастворимая бактерицидная нанобиокомпозиция серебра [16]. При синтезе наночастиц серебра использовали нитрат серебра «ч.д.а.» и альгинат натрия (натриевая соль альгиновой кислоты, BioChemika), который не только позволяет получать высокостабильную водорастворимую композицию наночастиц серебра с узким распределением по размерам, но и обладает широким спектром биологической активности. Поэтому такой метод получения наночастиц можно отнести к «зеленой нанохимии». Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Фотовосстановление катионов  $\text{Ag}^+$  проводили на воздухе при температуре 20 °С. В качестве источника света использовали ртутную лампу высокого давления ДРШ-250.

В работе исследовали влияние различных концентраций наночастиц серебра на прорастание семян, прирост биомассы корней и надземной части проростков, интенсивность дыхания, а также накопление серебра в семенах.

Для определения всхожести и прироста биомассы проростков семена замачивали в растворах нанобиосеребра с концентрацией 0,01; 0,1; 1,0 и 10,0 мг/дм<sup>3</sup> в течение 4-х часов, а затем помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри и проращивали 7 дней в термостате при температуре 24 °С. Энергию прорастания и всхожесть семян определяли на 3 и 7 сутки [17]. Биомассу проростков корней и надземной части измеряли гравиметрическим методом на 7 сутки, фиксируя растительный материал в течение 5 мин при 110 °С и доводя его до постоянной массы при 60 °С. Интенсивность дыхания прорастающих семян определяли по методу Бойсен-Йенсену через 24 и 48 часов [17].

Содержание серебра в семенах после замачивания в растворах наночастиц серебра исследовали методом атомно-абсорбционной спектроскопии (Сатурн-4 ЭПАВ) после озоления в муфельной печи при температуре 400-450 °С. Дальнейший анализ осуществляли с электротермической атомизацией.

Эксперименты проводили в 3-кратной биологической и 6-7 кратной аналитической повторностях. Статистическую обработку полученных результатов проводили по Г.Ф. Лакину [18], в таблицах и на рисунках представлены средние арифметические значения и их стандартные ошибки.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Набухание семян является важным этапом, необходим для активации ферментов, так как сухие семена содержат только связанную воду [19]. Как показано ранее, наночастицы серебра в концентрации 0,01-10,0 мг/дм<sup>3</sup> не оказывало негативного действия на процесс набухания семян, а его наибольшая скорость отмечалась до 16 ч во всех вариантах опыта, что соответствует максимальной ферментативной активности [20].



При обработке семян пшеницы наносеребром в том же интервале концентраций интенсивность дыхания через 24 часа увеличилась на 20,0-60,2 %, а через 48 часов – на 8,5-33,3 % по сравнению с контролем. Через 48 часов показатели дыхания во всех вариантах возрастали. При этом, максимальное увеличение наблюдалось при концентрации наносеребра 1,0 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 1).



Рис. 1. Влияние наночастиц серебра на интенсивность дыхания прорастающих семян пшеницы.

Дыхание является интегральным показателем изменения энергетических процессов растений. Энергия дыхания используется для ростовых процессов различных синтетических реакций, поглощения элементов минерального питания, передвижения ассимилятов [21]. Поэтому влияние наночастиц серебра на интенсивность дыхания прорастающих семян может быть связано с ускоренной мобилизацией запасных органических веществ в клетках. Это также может зависеть от увеличения содержания в органах растения ИУК и соотношения ИУК/АБК. Положительную роль ауксина в дыхательном обмене отмечали ряд авторов [23].

На начальном этапе взаимодействия наночастиц серебра с семенами происходит их адгезия на поверхности. В дальнейшем серебро проникает через семенную оболочку в глубь семени. Поэтому, представление о роли наночастиц серебра в изменении метаболизма на ранних стадиях онтогенеза было бы неполным без анализа их содержания в прорастающих семенах.

Данные, представленные на рисунке 2, показывают, что накопление серебра в семенах после их замачивания в растворах нанобиосеребра увеличивается в зависимости от его концентрации в растворе и составляет 0,007-1,2 мг/кг сухого вещества.

При исследовании влияния наночастиц серебра на энергию прорастания и всхожесть семян пшеницы была установлена стимуляция этих процессов (табл. 1). Показатели энергии прорастания превышали контрольный вариант на 4,7-9,3 %, а

всхожести – на 7,6-9,3 %. Максимальный эффект обработки семян отмечался в вариантах с концентрацией наносеребра 0,01-1,0 мг/дм<sup>3</sup>.

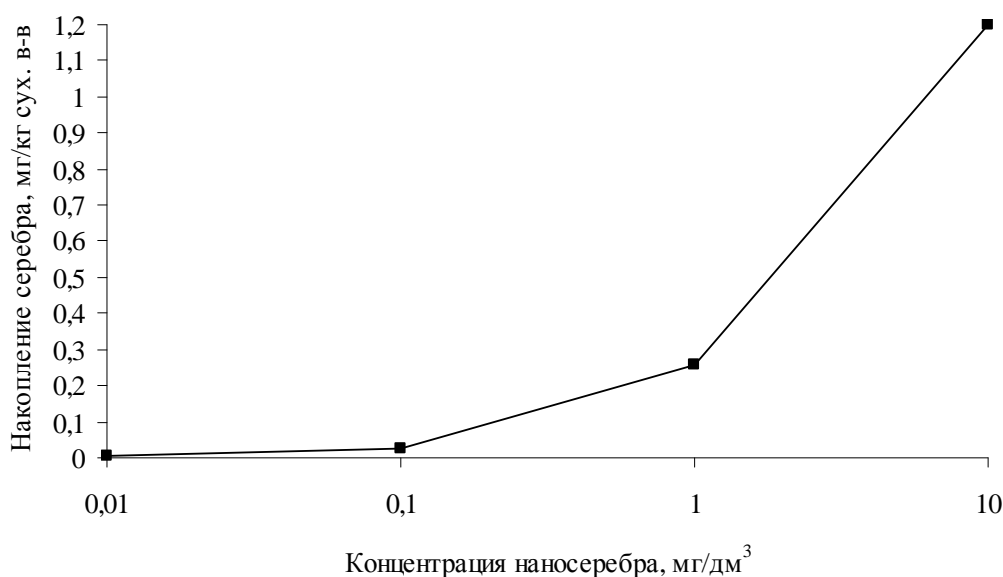


Рис. 2. Накопление наночастиц серебра в семенах пшеницы после 4-х часов замачивания.

Представленные в таблице 1 результаты хорошо коррелировали с накоплением биомассы корней и надземной части проростков пшеницы. При этом более высокое стимулирующее действие наночастицы серебра оказывали на прирост биомассы корней (табл. 2). Это может быть связано с накоплением и поглощением наночастиц корнями [15].

**Таблица 1**  
**Влияние концентрации наночастицы серебра на прорастание семян пшеницы**

Концентрация наносеребра, мг/дм <sup>3</sup>	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %
0	80,3±2,2	83,0±2,5
0,01	89,6±3,4	92,3±3,7
0,1	87,0±1,8	91,0±3,2
1,0	88,3±2,5	92,0±2,6
10,0	85,0±2,8	90,6±3,0

Известно, что стимуляция ростовых процессов наночастицами биометаллов осуществляется при прорастании семян на ранних этапах онтогенеза, оказывая значительное влияние на окислительное фосфорилирование и фотосинтез. Предпосевная обработка семян пшеницы растворами наночастиц металлов мобилизует систему антиоксидантной защиты растений в течение онтогенеза [3].

**Таблица 2**  
**Влияние наночастиц серебра на накопление биомассы 7-дневных проростков пшеницы**

Концентрация наносеребра, мг/дм <sup>3</sup>	Накопление биомассы			
	Масса сухого вещества корней, мг	Масса сухого вещества надземной части, мг	Масса сухого вещества корней, %	Масса сухого вещества надземной части, %
0	3,64±0,03	6,08±0,07	100,0	100,0
0,01	4,07±0,05	6,43±0,09	111,8	105,7
0,1	3,86±0,06	6,36±0,08	106,0	104,6
1,0	3,85±0,04	6,32±0,06	105,7	103,9
10,0	3,53±0,07	5,78±0,08	96,9	95,0

Максимальное увеличение массы сухого вещества корней наблюдалось при концентрации наносеребра 0,01 мг/дм<sup>3</sup> и составляло 11,8 %, а надземной части – 5,7 %. При дальнейшем увеличении концентрации этот эффект снижался, а при 10,0 мг/дм<sup>3</sup> отмечалось угнетение ростовых процессов. Во всех вариантах опыта максимальная стимуляция накопления биомассы наблюдалась в корнях. Можно предположить, что снижение положительного эффекта связано с накоплением в семенах серебра свыше 0,26 мг/кг сухого вещества, которое в этой концентрации оказывает ингибирующее действие на ростовые процессы. Полученные результаты необходимо учитывать при обосновании экологически безопасных агромероприятий с применением наноструктурированных препаратов.

Таким образом, водорастворимая нанобиокомпозиция на основе альгината натрия и серебра может быть использована при обработки семян пшеницы в качестве стимуляторов роста.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что наночастицы серебра в концентрации 0,01-1,0 мг/дм<sup>3</sup> оказывают стимулирующее действие на ростовые процессы пшеницы на ранних этапах онтогенеза, стимулируя энергию прорастания и всхожесть семян, интенсивность дыхания, а также накопление биомассы корней и надземной части проростков пшеницы.

Список литературы

1. Brunner T.I. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica and effect of particle solubility / T.I. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn // *Environ. Sci. and Tech.* – 2006. – V. 40. – P. 4347-4381.
2. Бовсуновський А.М. Нанотехнологія як движущая сила аграрної революції / А.М. Бовсуновський, С.О. Вялий, В.Г. Каплуненко, Н.В. Косинов // *Зерно.* – 2008. – № 11(31). – С. 80-83.
3. Таран Н.Ю. Технологія екологічно безпечного використання нанопрепаратів у адаптивному рослинництві / Н.Ю. Таран, Л.М. Бацманова, К.Г. Лопатько, С.М. Каленська // *Фізика живого.* – 2011. – Т. 19, № 2. – С. 54-58.
4. Chen X. Nanosilver: nanoparticle in medical application / X. Chen, H.J. Schlusener // *Toxicol. Lett.* – 2008. – V. 76. – P. 1-12.
5. Balantrapu K. Silver nanoparticles for printable electronics and biological applications / K. Balantrapu, D. Goia // *J. Mater. Res.* – 2009. – V. 24, No. 9. – P. 2828-2836.
6. Singh R. Medical Application of nanoparticles in Biological Imaging. Cell Labelling, Antimicrobial Agents and Anticancer Nanodrugs / R. Singh, N.H. Singh // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2011. – V. 7, No. 4. – P. 489-503.
7. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> toxicity to *Spirodela polyrhiza* / H. Jiang, M. Li, F.Y. Chang [et al.] // *Environ Toxicol Chem.* – 2012. – V. 31, No. 8. – P. 1880-1886.
8. Choi O. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth / O. Choi, K.K. Deng, N.J. Kim [et al.] // *Water Res.* – 2008. – V. 42. – P. 3066-3074.
9. Chaudhuri A. Effect of Ethylene Synthesis and Perception Inhibitor and ABA on Seed Germination of *Vigna radiata* / A. Chaudhuri, R.K. Kar // *World J. of Agricultural Sciences.* – 2008. – V. 4 (S). – P. 879-883.
10. Чекман І.С. Нанотоксикологія: напрямки досліджень (огляд) / І.С. Чекман, А.М. Сердюк, Ю.І. Кундієв, І.М. Трахтенберг // *Довкілля та здоров'я.* – 2009. – № 1(48). – С. 337.
11. Ірійчук І.Д. Фізіологічні аспекти взаємодії наноматеріалів з клітинами / І.Д. Ірійчук, В.В. Плиська // *Український науково-методичний журнал.* – 2011. – № 4. – С. 168-169.
12. Yin L. Effect of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants / L. Yin, B.P. Colman, B.M. McGill [et al.] // *PloS One.* – 2012. – V. 7, No. 10. – P. 8636-8648.
13. Stampoulis D. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants / D. Stampoulis, S.K. Sinha, J.C. White // *Environ Sci Technol.* – 2009. – V. 43. – P. 9473-9479.
14. Kuamri M. Effect of silver nanoparticle (SNPs) on protein and DNA content to tomato seed (*L. esculentum*), cucumber (*Cucumis sativus*) and maize (*Zea mays*), / M. Kuamri, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran // *IJHGMBMS.* – 2012. – V. 1, No. 1. – P. 7-15.
15. Salama H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.) // *J. Biotechnology.* – 2012. – V. 3, No. 10. – P. 190-197.
16. Пат. 10539 Україна, МКІ7 А 61 К 33/38, А 61 К 31/715. Спосіб отримання водорозчинної бактеріцидної композиції, що містить наночастки срібла / Юркова І. М., Естрела-Льопіс В.Р., Рябушко В. І., Рябушко Л. І. ; заявник та власник патенту Таврійський національний університет імені В. І. Вернадського. – № u2001128682 ; заявл. 13.05.05 ; опубл. 15.11.05. Бюл. № 11.
17. Воскресенская О.Л. Физиология растений: Учебное пособие / О.Л. Воскресенская, Н.П. Грошева, Е.А. Скочилова. – Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2008. – 148 с.
18. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
19. Рогожин В.В. Физиолого-биохимические механизмы прорастания зерновок пшеницы / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета.* – 2011. – № 8 (82). – С. 17-21.
20. Omel'chenko A.V. The investigation of influence of nanobiosilver on wheat germination and silver accumulation in grains / A.V. Omel'chenko, I.N. Yurkova, I.A. Bugara, O.M. Pipiya // *Scientific Notes of Taurida V. Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry.* – 2013. – V. 26 (65), No. 1. – P. 146-152.
21. Labraba X. Effect of foliar applications of silver nitrate and ear removal on dioxide assimilation in wheat flag leaves during grainfilling / X. Labraba // *Field Crops Res.* – 1991. – V. 28. – 149-162.
22. Якушкина Н.И. Роль фитогормонов в адаптации растений к условиям среды / Н.И. Якушкина. – М.: МОПИ, 1985. – 140 с.

23. Puzin T.I. Dynamics of indoleacetic acid in the organs of potato at different stages of ontogeny and for its role in the regulation of growth of the tuber, Bulletin of the Academy of Sciences / T.I. Puzin, I.G. Kirillov, N.I. Yakushkina // Biology Series. – 2000. – V. 2. – P. 170-177.

**Омельченко О.В. Стимулююча дія наночастинок срібла на ріст і розвиток рослин пшениці / О.В. Омельченко, І.М. Юркова, М.М. Жижина // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 127-135.**

У роботі досліджено стимулюючу дію наночастинок срібла на ріст і розвиток рослин пшениці. Встановлено, що замочування насіння в розчинах наночастинок срібла з концентрацією 0,01-1,0 мг/дм<sup>3</sup> стимулює інтенсивність дихання, енергію проростання і схожість насіння, а також накопичення біомаси сухої речовини коренів і надземної частини проростків пшениці. Максимальна стимуляція накопичення біомаси проростків у всіх варіантах відзначалася в корінні.

**Ключові слова:** наночастинки, срібло, пшениця, ріст і розвиток.

## STIMULATING EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF WHEAT

*Omelchenko A.V., Yurkova I.N., Zhizhina M.N.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

*E-mail: omelav@ukr.net*

The aim of this study was to investigate the stimulating effect of silver nanoparticles on the growth and development of wheat.

Objects of study were the seeds of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) (variety Odesskaya 267) and previously developed water-soluble bactericidal nanobiocomposition of silver. During the synthesis of silver nanoparticles sodium alginate was used as a reductant. Sodium alginate not only allows too obtain a highly stable water-soluble composition of the silver nanoparticles but has a broad spectrum of biological activity. Therefore, this method of nanoparticles production can be attributed to the «green nanochemistry». All solutions were prepared with bidistilled water.

In this paper we investigated the effect of different concentrations of silver nanoparticles on seed germination, growth and root biomass of aboveground parts of seedlings, respiration rate, as well as the accumulation of silver in the seeds. To determine the germination and growth of the biomass of seedlings seeds were soaked in solutions of silver nanoparticles with a concentration of 0,01; 0,1; 1,0 and 10,0 mg/dm<sup>3</sup> for 4 hours and then placed on moist filter paper in Petri dishes and germinated 7 days in an incubator at temperature 24 °C. Germinating power and seed germination was determined on 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day. Biomass of seedling roots and aerial parts were measured gravimetrically on the 7<sup>th</sup> day. The plant material was fixed for 5 minutes at 110 °C and it was brought to a constant weight at 60 °C. The respiration rate of germinating seeds was determined by the Boysen-Jensen method after 24 and 48 hours.

The silver content of the seeds after soaking in solutions with silver nanoparticles was examined by atomic absorption spectroscopy (Saturn EPAV 4) after ashing in a muffle furnace at temperature 400-450 °C. Further analysis was performed with electrothermal atomization. It was established that the treatment of wheat seeds with silver nanoparticles

increased respiration rate by 20,0-60,2 % after 48 hours and 8,5-33,3 % after 24 hours in comparison with the control. The maximum increase was observed at concentration of silver nanoparticles 1,0 mg/dm<sup>3</sup>. The accumulation of silver in the seeds after soaking them into the solutions of silver nanoparticles increased depending on the concentration in a solution and was 0,007 -1,2 mg/kg of dry mass.

When studying the effects of silver nanoparticles on the germinating power and seed germination of wheat seeds stimulation of these processes was established. Indicators of germinating power exceeded control group by 4,7-9,3 % and germination of seeds exceeded by 7,6-9,3 %. The maximum effect was observed in the seed treatments with concentration of nanosilver 0,01 -1,0 mg/dm<sup>3</sup>.

The maximum increase of dry mass of roots was observed at concentration of silver nanoparticles 0,01 mg/dm<sup>3</sup> and was 11,8 % whereas for aboveground parts it was 5,7 %. With further increase in the concentration of silver this effect was reduced and finally at concentration 10,0 mg/dm<sup>3</sup> inhibition of growth processes were observed. In all variants of the experiment maximal stimulation of biomass accumulation was observed in the roots. It can be assumed that the reduction of the positive effect is due to the silver overaccumulation in the seeds (more than 0,26 mg/kg of dry mass) which leads to the inhibition of growth processes.

**Keywords:** nanoparticles, silver, wheat, accumulation.

#### References

1. Brunner T.I., Wick P., Manser P., Spohn P. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica and effect of particle solubility, *Environ. Sci. and Tech.*, **40**, 4347–4381 (2006).
2. Bovsunovskiy A.M., Vyalyiy S.O., Kaplunenko V.G. Nanotechnology kak dvizhushchaya sila agrarnoy revolyutsii, *Zerno*, **11** (31), 80–83 (2008).
3. Taran N.Yu. Tehnologiya ekologichno bezpechnogo vikoristannya nanopreparativ u adaptivnomu roslinnitstvi, *Fizika zhivogo*, **19** (2), 54–58 (2011).
4. Chen X., Schlusener H.J. Nanosilver: nano product in medical application, *Toxicol. Lett.*, **76**, 1-12 (2008).
5. Balantrapu K., Goia D. Silver nanoparticles for printable electronics and biological applications, *J. Mater Res.*, **24** (9), 2828–2836 (2009).
6. Singh R., Singh N.H. Medical Application of nanoparticles in Biological Imaging. Cell Labelling, Antimicrobial Agents and Anticancer Nanodrugs, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **7** (4), 489–503 (2011).
7. Jiang H., Li M., Chang F.Y., Li W., Yin L.V. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO<sub>3</sub> toxicity to *Spirodela polyrhiza*, *Environ Toxicol Chem.*, **31** (8), 1880–1886 (2012).
8. Choi O., Deng K.K., Kim N.J., Ross J.L., Surampalli R.Y., Hu Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Res.*, **42**, 3066–3074 (2008).
9. Chaudhuri A., Kar R.K. Effect of Ethylene Synthesis and Perception Inhibitor and ABA on Seed Germination of *Vigna radiata*, *World J. of Agricultural Sciences*, **4** (S), 879–883 (2008).
10. Chekman I.S., Serdyuk A.M., Kundiev Yu.I. Nanotoksikologiya: napryamki doslidzhen (oglyad), *Dovkillya ta zdorov'ya* **48** (1), 3–7 (2009).
11. Irychuk I.D., Pliska, V.V. Fiziologichni aspekti vzaemodiyi nanomaterialiv z klitinami, *Ukrayinskiy naukovo-metodichniy zhurnal*, **4**, 168–169 (2011).
12. Yin L., Colman B.P., McGill B.M., Wright J.P., Bernhardt E.S. Effect of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants, *PLoS One*, **7** (10), 8636–8648 (2012).
13. Stampoulis D., Sinha S.K., White J.C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants, *Environ Sci Technol.*, **43**, 9473–9479 (2009).

14. Kuamri M., Mukherjee A., Chandrasekaran N. Effect of silver nanoparticle (SNPs) on protein and DNA content to tomato seed (*L. esculentum*), cucumber (*Cucumis sativus*) and maize (*Zea mays*), *IJHGMBMS*, **1** (1), 7–15 (2012).
15. Salama H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.), *J. Biotechnology*, **3** (10), 190–197 (2012).
16. Pat. 10539 Ukraina, MKI7 A 61 K 33/38, A 61 K 31/715. Sposib otrimannya vodorozchinnoi bakteritsidnoi kompozitsii, shcho mistit nanochastinki sribla / Yurkova I. M., Estrela-Llopis V. R., Ryabushko V.I., Ryabushko L. I. ; zayavnik ta vlasnik patentu Tavriyskiy natsionalniy universitet imeni V. I. Vernadskogo. – № u200504475 ; zayavl. 13.05.05 ; opubl. 15.11.05. Byul. № 11.
17. Voskresenskaya O.L., Grosheva N.P., Skochilova E.A. *Fiziologiya rasteniy. Uchebnoe posobie* (Yoshkar-Ola, Mar. gos. Universitet, 2008).
18. Lakin, G.F. *Biometriya* (Moscow, High School, 1990).
19. Rogozhin V.V., Rogozhina T.V. Fiziologo-biokhimicheskiye mekhanizmy prorastaniya zernovok pshenitsy, *Vestnik Altayskogo agrarnogo universiteta*, **8** (82), 17–21 (2011).
20. Omel'chenko A.V., Yurkova I.N. Bugara I.A., Papiya O.M. The investigacion of influence of nanobiosilver on wheat germination and silver accumulation in grains, *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. Series: Biology, chemistry*, **26** (1), 146-152 (2013).
21. Labraba X. Effect of foliar applications of silver nitrate and ear removal on dioxide assimilation in wheat flag leaves during grainfilling, *Field Crops Res.*, **28**, 149-162 (1991).
22. Yakushkina N.I. *Rol fitogormonov v adaptatsii rasteniy k usloviyam sredy* (Moskva, MOPI, 1985).
23. Puzin T.I, Kirillov I.G, Yakushkina N.I. Dynamics of indoleacetic acid in the organs of potato at different stages of ontogeny and for its role in the regulation of growth of the tuber, *Bulletin of the Academy of Sciences. Biology Series*, **2**, 170–177 (2000).

Поступила в редакцию 25.01.2014 г.

УДК 577.35

## ВЛИЯНИЕ ТАБАКОКУРЕНИЯ НА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ГЕОМАГНИТНОЙ АКТИВНОСТИ

*Отраднава М.И.<sup>1</sup>, Розачева С.М.<sup>1</sup>, Козлитин А.М.<sup>1</sup>, Вишневский В.В.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., Саратов, Россия*

<sup>2</sup>*Институт проблем математических машин и систем НАН Украины, Киев, Украина  
E-mail: smro13@land.ru*

Исследовано влияние табакокурения на биоэлектрическую активность миокарда практически здоровых людей в условиях нестабильной геомагнитной обстановки. Проведен мониторинг параметров ритмики сердца молодых, здоровых мужчин и женщин, курящих и некурящих. Обнаружено, что табакокурение усиливает чувствительность организма к воздействию гелиогеофизических факторов.

**Ключевые слова:** гелиогеофизические факторы, биофизический мониторинг, табакокурение, сердечно-сосудистая система, коэффициент симметрии Т-зубца,  $K_p$ -индекс.

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большое внимание уделяется изучению влияния солнечной активности и магнитных бурь на биосистемы. Особенно актуальной эта тема становится сейчас, в период резкого увеличения солнечной активности, которое происходит с ритмом приблизительно 11 лет [1]. Известно, что вариации гелиогеофизических факторов воздействуют на живые системы всех уровней организации. На функциональные системы организма человека они оказывают в большей степени биоритмотропные, диссинхронизирующие эффекты [2]. По мнению многих авторов, геомагнитные возмущения не вызывают специфических заболеваний, но из-за разбалансирования систем регуляции организма отягощают имеющиеся функциональные нарушения [3]. Для здорового человека гелиогеомагнитное воздействие несет слабый тренирующий адаптационный эффект и может вообще не ощущаться, так как не превышает адаптационных возможностей организма, или может стать лишь причиной кратковременных расстройств [2].

Основной мишенью воздействия гелиогеофизических факторов является ССС. Эта система, как наиболее реактивная, одна из первых включается в процесс адаптации к экстремальным условиям [3]. Кроме того, ритмика сердца является универсальным отражением реакции организма на любое воздействие со стороны внешней и внутренней среды; она содержит в себе информацию о функциональном состоянии всех звеньев регулирования жизнедеятельности человека, как в норме, так и при различных патологиях [4].



Выявить отклик ССС здорового человека на гелиогеофизические возмущения чрезвычайно сложно, поскольку одновременно человек подвергается воздействию различных факторов окружающей среды. В проекте «Гелиомед» были реализованы длительные мониторинговые исследования состояния ССС работоспособных, практически здоровых людей, проживающих в различных климатических зонах, на разных географических широтах, принадлежащих к разным этническим группам [2, 4]. Полученные длинные ряды данных позволили определить параметры состояния ССС наиболее показательные для оценки эффектов воздействия гелиогеомагнитных факторов на человека: зубцы T, R, комплекс QRS и сегмент ST-T [4].

Ранее нами была определена возможность применения методологии, отработанной в проекте «Гелиомед», для изучения сочетанного действия антропогенных и гелиогеофизических факторов на ССС человека. В качестве антропогенного фактора было выбрано курение, поскольку оно оказывает значительное влияние на функционирование ССС и является признаком, по которому можно легко различать группы людей.

Целью данной работы явилось провести мониторинг параметров ритмики сердца курящих и некурящих мужчин и женщин и выявить значимые отличия в отклике их ССС на изменение геомагнитной активности.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоэлектрическую активность миокарда человека регистрировали с помощью оригинального датчика электрокардиограммы (ЭКГ) первого отведения из семейства «Фазаграф», разработанного Л.С. Файнзильбергом и В.В. Вишневым, г. Киев, Украина ([www.fazagraf.com](http://www.fazagraf.com)). Обработка результатов измерений проводилась централизованно в режиме on-line в Институте проблем математических машин и систем НАН Украины ([www.geliomed.kiev.ua](http://www.geliomed.kiev.ua)).

Отбор добровольцев проводили по результатам психофизиологических тестов (опросник Русалова, опросник Менделеева-Яхина) и ЭКГ первого отведения. Из 50 протестированных женщин были выбраны 12, а из 56 мужчин - 14 с параметрами ЭКГ в пределах возрастной нормы и нормативов, отражающих средний или выше среднего уровни выраженности личностных свойств. Мужчины и женщины были разделены на 2 группы – курящих и некурящих - с равным количеством испытуемых.

Все участники проходили четырехкратную регистрацию параметров ЭКГ первого отведения: сидя в состоянии покоя (1 мин), после стресс-теста, который представляет собой игру в шарики, регулярно меняющие цвета и скорость падения (1 мин), после физической нагрузки в виде 30 приседаний в течение 1 мин и отдыха – 1 мин.

Состояние сердечно-сосудистой системы человека оценивали по коэффициенту симметрии T-зубца (T) на ЭКГ [4].

Производились расчеты среднего значения коэффициента симметрии T-зубца по каждой мониторинговой группе для каждого из состояний:

$$\bar{T}_{ср.} = \frac{\sum_{n=1}^6 T_m}{n}, \quad (1)$$

где  $\bar{T}$  - среднее значение коэффициента симметрии T-зубца;

$T_m$  - коэффициент симметрии Т-зубца кардиограммы человека в одном из состояний;  
 $n$  - количество человек в группе.

Так же были рассчитаны показатели  $\Delta\bar{T}_{\text{физ.}}$  и  $\Delta\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  по формуле:

$$\Delta\bar{T} = \frac{\sum_{i=1}^n (T_i - T_k)}{n}, \quad (2)$$

где  $\Delta\bar{T}$  - среднее значение изменения коэффициента симметрии Т-зубца;

$T_k$  - коэффициент симметрии Т-зубца кардиограммы человека в состоянии покоя;

$T_i$  - коэффициент симметрии Т-зубца кардиограммы человека после физической нагрузки или после стресс-теста;

$n$  - количество человек в группе.

Уровень геомагнитной возмущенности оценивали по значениям  $K_p$ -индекса, полученного из Института космофизических исследований и аэронавтики им. Ю.Г. Шафера СО РАН г. Якутска. Геомагнитную активность принято считать нормальной при  $K_p < 16$ ; повышенной - при  $K_p \geq 16$  [2].

Статистический анализ выполнен в программах Excel 2003 и STATISTICA 6.0. Проверку гипотезы о нормальном распределении проводили по критерию Колмогорова-Смирнова. Уровни статистически значимой разницы между средними значениями выборок установлены с использованием t-критерия Стьюдента и F-критерия Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биофизический мониторинг состояния сердечно-сосудистой системы практически здоровых мужчин и женщин, курящих и некурящих, проводился нами в период наибольшей солнечной активности (весна, осень, 2010-2011 гг.). За 2 года мониторинга создана экспериментальная база из ~5000 ежедневных измерений параметров ССС испытуемых. Определение уровня воздействия гелиогеофизических факторов на человека и группы людей, объединенных двумя признаками (пол и табакокурение), проводили по Т-зубцу на ЭКГ первого отведения, которую снимали ежедневно у каждого участника четыре раза: сидя в состоянии покоя, после стресс-теста, после физической нагрузки и минутного отдыха.

Известно, что Т-зубец характеризует процесс реполяризации миокарда, его изменение свидетельствует о нарушении процесса восстановления организма после нагрузки и сигнализирует о возможности развития патологии ССС. Обработка данного параметра в фазовом пространстве координат (коэффициент симметрии Т-зубца) позволила уйти от субъективизма при проведении длительных биофизических исследований [4].

Были построены временные зависимости  $\bar{T}$  для каждой из групп испытуемых, их соотнесли с уровнем геомагнитной активности, определенной по значению  $K_p$

индекса. Были обнаружены некоторые отличия в биоэлектрической активности миокарда у курящих и некурящих испытуемых, причем с различной степенью выраженности у женщин и мужчин, при физической и эмоциональной нагрузке.

Необходимо было определить, насколько полученные отличия реакции ССС различных групп испытуемых статистически значимы. Поскольку изучаемая система является эргодической, нами была проведена статистическая обработка измерений по временным рядам, т.е. за весь срок эксперимента (95 суток для женщин и 50 суток для мужчин).

На рис. 1 представлены результаты статистической обработки среднего значения коэффициента симметрии Т-зубца на ЭКГ для групп курящих и некурящих женщин в состоянии покоя, после физической и эмоциональной нагрузок. Из графика (рис. 1А) видно, что в состоянии покоя показатель  $\bar{T}$  приблизительно одинаков для обеих исследуемых групп (среднее значение  $\bar{T}_{\text{пок.}}$  для группы некурящих женщин составило 0,485, для курящих – 0,525), что вероятнее всего связано с участием в эксперименте молодых людей с небольшим стажем курения. Обнаружено достоверное увеличение ( $p < 0,05$ ) показателей  $\bar{T}_{\text{физ.}}$  и  $\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  у курящих женщин относительно некурящих на 14% (рис. 1Б) и на 12% (рис. 1В), соответственно.

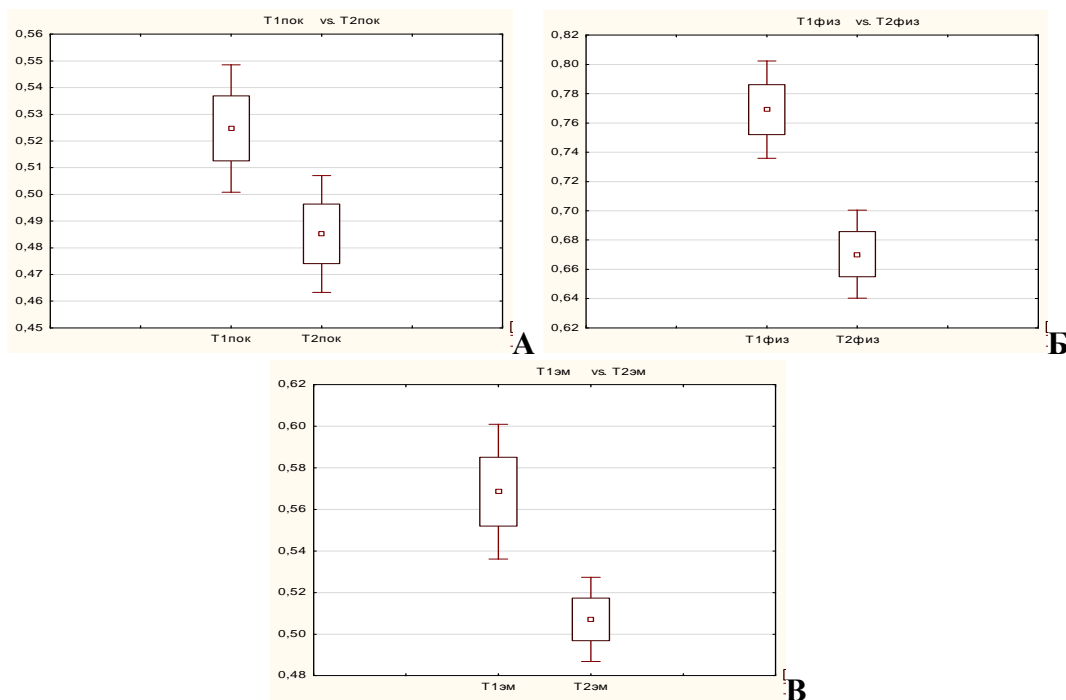


Рис.1. Средние значения коэффициента симметрии Т-зубца на ЭКГ для групп курящих (Т1) и некурящих (Т2) женщин в состоянии покоя (А), после физической (Б) и эмоциональной (В) нагрузок, усл.ед.

Результаты расчетов в программе STATISTICA

Результаты статистической обработки показателя  $\bar{T}$  для групп курящих и некурящих мужчин в состоянии покоя, после физической и эмоциональной нагрузок представлены на рис. 2. Также как у женщин, отличий в показателе в  $\bar{T}_{\text{пок.}}$  у курящих и некурящих мужчин не обнаружено (рис. 2А). Нет статистически значимых отличий и в показателях  $\bar{T}_{\text{физ.}}$  (различия не превышают 3%). Возможно, это связано с хорошей физической подготовкой мужчин, то есть выполнение приседаний не является для их организма нагрузкой, приводящей к каким-либо изменениям. Достоверно значимые отличия показателя  $\bar{T}$  зафиксированы после эмоциональной нагрузки (рис. 2В), причем у курящих мужчин  $\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  на 30% ( $p < 0,05$ ) ниже, чем у некурящих, что может быть обусловлено успокаивающим действием никотина на нервную систему мужчин.

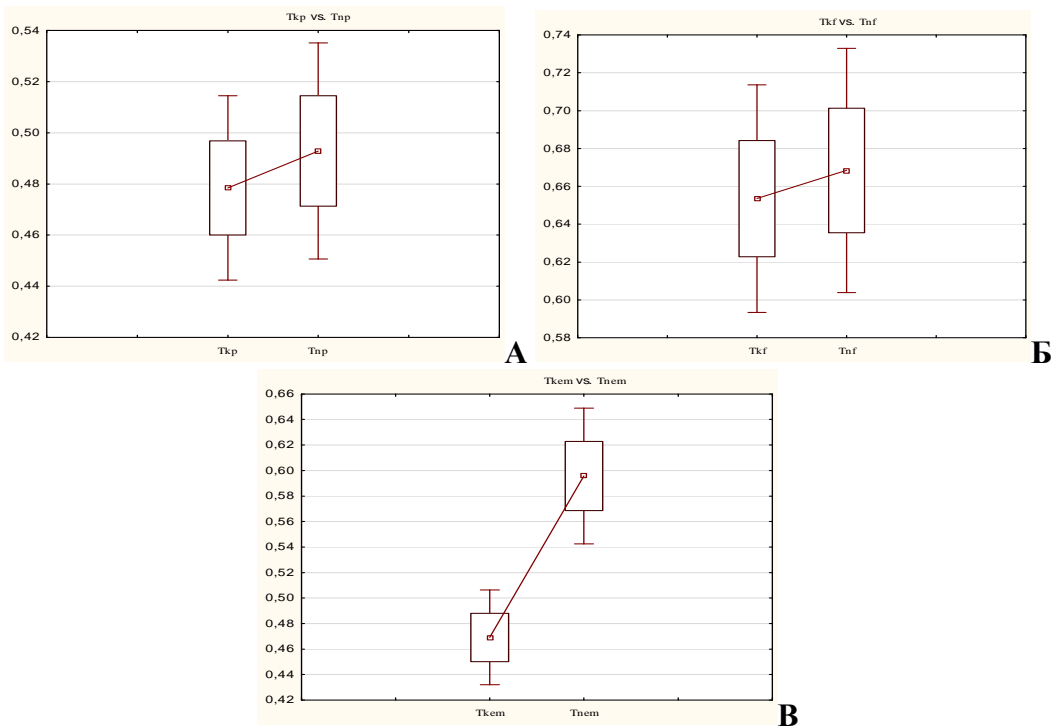


Рис.2. Средние значение коэффициента симметрии Т-зубца на ЭКГ для групп курящих (Тк) и некурящих (Тн) мужчин в состоянии покоя (А), после физической (Б) и эмоциональной (В) нагрузок, усл.ед.

Результаты расчетов в программе STATISTICA

Таким образом, нами доказано, что существуют отличия в отклике ССС у курящих испытуемых относительно некурящих независимо от уровня геомагнитной активности. У курящих женщин обнаружено увеличение показателя  $\bar{T}$  после

физической и эмоциональной нагрузок, у курящих мужчин снижение данного показателя после эмоциональной нагрузки.

Чтобы выявить отличия в отклике ССС курящих и некурящих испытуемых при различных уровнях геомагнитной активности были рассчитаны показатели  $\Delta\bar{T}_{\text{физ.}}$  и  $\Delta\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  (формула 2).

Мы сравнили средние значения  $\Delta\bar{T}_{\text{физ.}}$ ,  $\Delta\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  по модулю, рассчитанные за весь период мониторинга, по нескольким выборкам: 1) курящие женщины (мужчины) в магнитовозмущенные дни ( $K_p \geq 16$ ), 2) курящие женщины (мужчины) в невозмущенные дни ( $K_p < 16$ ), 3) некурящие женщины (мужчины) в магнитовозмущенные дни ( $K_p \geq 16$ ), 4) некурящие женщины (мужчины) в невозмущенные дни ( $K_p < 16$ ). Данные анализа представлены на рис. 3, 4.

Из графиков (рис. 3А) видно, что существуют достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) между  $\Delta\bar{T}_{\text{физ.}}$  у курящих и некурящих женщин при различных уровнях геомагнитной активности. У курящих данный показатель выше в среднем на 35-40%. Но достоверных отличий между  $\Delta\bar{T}_{\text{физ.}}$  для каждой из групп в магнитовозмущенные и невозмущенные дни не обнаружено.

Из рис. 3Б следует, что в период нормальной ( $K_p < 16$ ) и повышенной ( $K_p \geq 16$ ) геомагнитной активности средние значения  $\Delta\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  по модулю для курящих и некурящих женщин достоверно отличаются ( $p < 0,05$ ). Но у курящих женщин разница между коэффициентом симметрии Т-зубца в состоянии покоя и после стресс-теста значительно больше, чем у некурящих. И только у курящих женщин обнаружены статистически значимые отличия (в 2 раза) между  $\Delta\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  в магнитовозмущенные и невозмущенные дни.

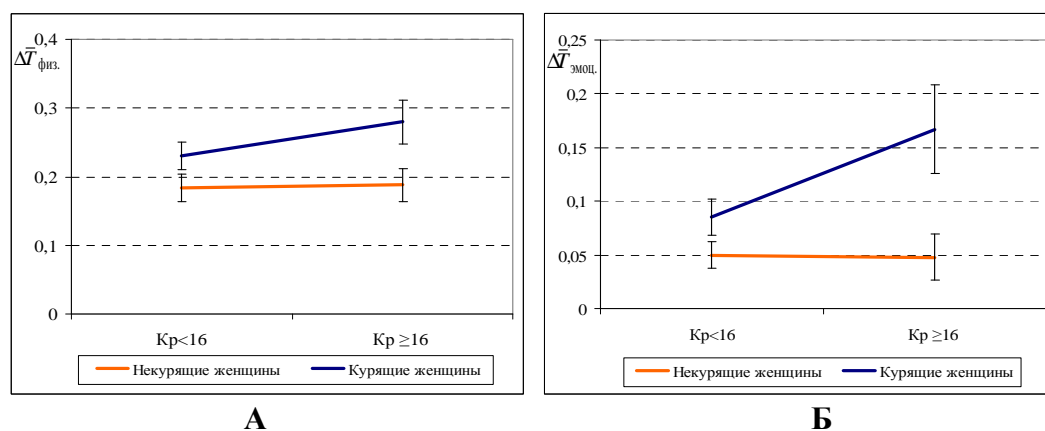


Рис. 3. Зависимость среднего значения изменения коэффициента симметрии Т-зубца на ЭКГ ( $\Delta\bar{T}$ , усл. ед.) после физической нагрузки (А) и после эмоциональной нагрузки (Б) относительно состояния покоя для групп курящих и некурящих женщин, рассчитанного за весь срок эксперимента (95 дней), от уровня геомагнитной активности ( $K_p$ -индекс, отн. ед.)

Из графиков (рис. 4А) видно, что существуют достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) между  $\Delta\bar{T}_{\text{физ.}}$  у курящих и некурящих мужчин в магнитовозмущенный период (у курящих данный показатель ниже в среднем на 38%). Достоверные отличия (в 2 раза) между  $\Delta\bar{T}_{\text{физ.}}$  в магнитовозмущенные и невозмущенные дни обнаружены только для группы курящих мужчин.

Из рис. 4Б следует, что в период нормальной геомагнитной активности ( $K_p < 16$ ) средние значения  $\Delta\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  по модулю для некурящих мужчин незначительно выше данного показателя у курящих. При повышенной геомагнитной возмущенности эти значения значимо отличаются ( $p < 0,05$ ), у курящих мужчин  $\Delta\bar{T}_{\text{эмоц.}}$  ниже (на 40%), чем у некурящих.

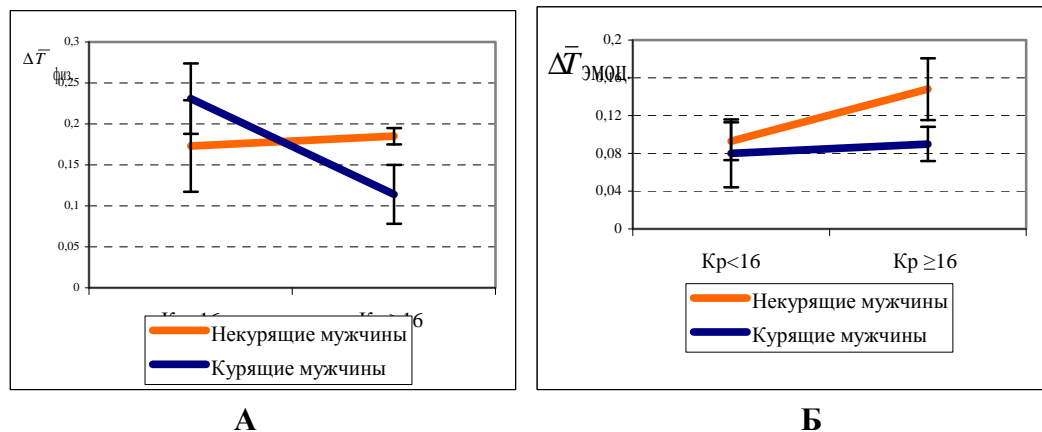


Рис. 4. Зависимость среднего значения изменения коэффициента симметрии Т-зубца на ЭКГ ( $\Delta\bar{T}$ , усл. ед.) после физической нагрузки (А) и после эмоциональной нагрузки (Б) относительно состояния покоя для групп курящих и некурящих мужчин, рассчитанного за весь срок эксперимента (50 дней), от уровня геомагнитной активности ( $K_p$ -индекс, отн. ед.)

Таким образом, нами установлено, что курение изменяет биоэлектрическую активность миокарда в большей степени в период геомагнитной возмущенности, в этот период увеличивается риск развития патологий ССС именно у курящих людей.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлены отличия в отклике ССС у курящих испытуемых относительно некурящих после физической и эмоциональной нагрузок независимо от геомагнитной обстановки.
2. Только у курящих испытуемых отмечены достоверные отличия в показателе изменения коэффициента симметрии Т-зубца после физической и эмоциональной нагрузок относительно состояния покоя в магнитовозмущенный период по сравнению с невозмущенным периодом.
3. Доказано, что табакокурение усиливает чувствительность организма к воздействию гелиогеофизических факторов.

Список литературы

1. Владимирский Б.М. Космическая погода и наша жизнь / Б.В. Владимирский, Н.А. Темурьянц, В.С. Мартынюк. - Век-2, Фрязино, 2004. – 224 с.
2. Биотропное воздействие космической погоды (по материалам российско-украинского мониторинга «Гелиомед» 2003-2010) / Под ред. М.В. Рагульской. - М., Киев. – СПб: ВВМ, 2010. – 312 с.
3. Агаджанян Н.А. Медико-биологические эффекты геомагнитных возмущений / Н.А. Агаджанян, В.Н. Ораевский, И.И. Макарова, Х.Д. Канониди. - М.: ИЗМИРАН, 2001. - С.47-50.
4. Вишневецкий В. В. Влияние солнечной активности на морфологические параметры ЭКГ сердца здорового человека / В.В. Вишневецкий, М.В. Рагульская, Л.С. Файнзильберг // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. - №3. – С. 3- 12.

**Отрадна М.І. Вплив тютюнопаління на біоелектричну активність міокарда практично здорових людей при різних рівнях геомагнітної активності / М.І. Отрадна, С.М. Рогачова, А.М. Козлітін, В.В. Вишневецький // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 136-144.**

Досліджено вплив тютюнопаління на біоелектричну активність міокарда практично здорових людей в умовах нестабільної геомагнітної обстановки. Проведено моніторинг параметрів ритміки серця молодих, здорових чоловіків і жінок, що палять і не палять. Виявлено, що тютюнопаління посилює чутливість організму до впливу геліогеофізичних факторів.

**Ключові слова:** геліогеофізичних фактори, біофізичний моніторинг, тютюнопаління, серцево-судинна система, коефіцієнт симетрії Т-зубця, Кр-індекс.

**IMPACT OF SMOKING ON BIOELECTRIC ACTIVITY OF THE MYOCARDIUM OF PRACTICALLY HEALTHY PEOPLE At DIFFERENT LEVELS OF GEOMAGNETIC ACTIVITY**

*Otradnova M.I.<sup>1</sup>, Rogacheva S.M.<sup>1</sup>, Kozlitin A.M.<sup>1</sup>, Vishnevsky V.V.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Saratov State Technical University named after Gagarin Y.A., Saratov, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Mathematical Machines and Systems Problems of NAS, Kiev, Ukraine*

*E-mail: smro13@land.ru*

Biophysical monitoring of the cardiovascular system (CVS) of healthy men and women, smokers and non-smokers, was conducted in the period of maximum solar activity (spring, fall 2010-2011). During this experiment period there were carried out about 4983 measurements.

The purpose of monitoring was to investigate the dependence of the bioelectrical myocardium activity of smoking men and women on the geomagnetic activity level. The original electrocardiogram (ECG) sensor was used (<http://www.fazagraf.com>). For each participant ECG readings were taken for 4 times: when sitting at a rest, after the stress test, after physical exercises and after a rest for 1 min. Condition of bioelectrical myocardium activity was evaluated by the coefficient of symmetry of the T-wave (T) on an electrocardiogram. Average change of the coefficient of symmetry of T-wave was calculated by the formula:

$$\Delta \bar{T} = \frac{\sum_{n=1}^6 (T_i - T_k)}{n},$$

where  $\Delta \bar{T}$  - the average change of the coefficient of symmetry of T-wave;

$T_k$  – the coefficient of symmetry of T-wave for a person in a state of rest;  
 $T_i$  - the coefficient of symmetry of T-wave for a person after the physical exercises ( $T_{phys.}$ ) or after the stress test ( $T_{emot.}$ );  
 $n$  - quantity of people in the group.

The temporary dependences of parameters  $\Delta\bar{T}_{phys.}$  and  $\Delta\bar{T}_{emot.}$  for each group of humans were built, they were compared with the geomagnetic activity, which was determined using by  $K_p$ -index. Significant differences were detected in the bioelectrical myocardium activity of smoking and non-smoking people with varying degrees of severity among women and men, after physical and emotional stress, during perturbed and unperturbed days.

It was necessary to determine if the difference in reaction of cardiovascular system of various groups is significant or not. Since the system under study is ergodic, we performed a statistical analysis of measurements using the time series, i.e. for the entire duration of the experiment (95 days for women and 50 days for men). The calculations were made by the help of Excel 2003 and STATISTICA 6.0.

There was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between  $\Delta\bar{T}_{phys.}$  of smoking and non-smoking women in days with different levels of geomagnetic activity. Smokers had this parameter higher by nearly 35-40%. However, significant differences between  $\Delta\bar{T}_{phys.}$  for each group in disturbed and undisturbed days were not found. It was determined that the average values modulo  $|\Delta\bar{T}_{emot.}|$  for smoking and non-smoking women differ significantly ( $p < 0.05$ ) both in periods of normal ( $K_p < 16$ ) and high ( $K_p \geq 16$ ) geomagnetic activity, by 1.7 and 3.5 times, accordingly. But only for women-smokers statistically significant differences (2-fold) between  $\Delta\bar{T}_{emot.}$  in disturbed and undisturbed days were proved.

For smokers men there were discovered: the inverse dependence of  $\Delta\bar{T}_{phys.}$  on the level of geomagnetic activity; significant differences in the body's response to physical activity in relation to non-smoking men (less than 62%) in the period of unstable geomagnetic conditions ( $K_p \geq 16$ ); the decrease of reactions in response to stress-test.

Thus, we have determined that smoking alters the bioelectric activity of the myocardium to a greater extent during geomagnetic disturbances, hence in such days the risk of cardiovascular pathologies among smokers is increased.

**Keywords:** heliogeophysical factors, biophysical monitoring, smoking, cardiovascular system, the coefficient of T-wave symmetry, the  $K_p$ -index.

## References

1. Vladimirskiy B.M., Temur'yants N.A., Martynyuk V.S. *Kosmicheskaya pogoda I nasha zhizn'* [Space weather and our life]. Fryazino, 2004 p. [in Russian].
2. *Biotropnoe vozdeistvie kosmicheskoi pogody* [Biotropic effects of space weather], eds. M.V. Ragul'skaya. Moscow, Kiev, Saint Petersburg, 2010, 312 p. [in Russian].
3. Agadzhanyan N.A., Oraevskiy V.N., Makarova I.I., Kanonidi Kh.D. *Mediko-biologicheske efekty geomagnitnykh vozmushchenii* [Mediko-biological effects of geomagnetic disturbances]. Moscow, 2001, pp. 47-50. [in Russian].
4. Vishnevskiy V.V., Fainzil'berg L.S., Ragul'skaya M.V. *Biomeditsinskie tekhnologii i radioelektronika* [Biomedical technologies and radioelectronics]. 2003, no. 3 pp.3-12. [in Russian].

Поступила в редакцию 15.01.2014 г.



**УДК 579.64:581.14(635.63)**

## **ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

*Ржевская В.С., Отурина И.П., Теплицкая Л.М.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: viktoriyar45@mail.ru*

Изучены морфолого-культуральные и некоторые физиолого-биохимические свойства выделенных из природных источников штаммов молочнокислых бактерий, обладающих антагонистической активностью по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, высокой ферментативной активностью, устойчивостью к агрессивным факторам среды. Исследовано влияние молочнокислых бактерий на прорастание семян и скорость роста огурцов сортов Конкурент и Феникс. Показано, что эффективность стимуляции ростовых процессов под влиянием молочнокислых бактерий зависит как от биологических особенностей и концентрации бактериальной культуры, так и от специфических характеристик сортов исследуемых растений.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, огурцы, прорастание семян, ростовые процессы.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Проявление положительного влияния микроорганизмов на жизнедеятельность растений различно [1 – 3]. В практике выращивания сельскохозяйственных растений накоплен большой материал, убедительно подтверждающий эффективность использования различных микроорганизмов, в частности, ризосферных азотфиксирующих [4, 5] и фосфатмобилизующих бактерий [6] для стимуляции роста и развития растений [7 – 11]. Менее изучена в этом направлении группа разнообразных молочнокислых бактерий [12 – 14], одной из сред обитания которых является почва и ризосфера растений.

Молочнокислые бактерии синтезируют разнообразные биологически активные вещества: органические кислоты, этанол, углекислоту, ферменты. Характерное свойство молочнокислых бактерий – их способность продуцировать вещества с антибиотической активностью [15 – 20], что позволяет им проявлять выраженный антагонизм в отношении различных микроорганизмов, в том числе и фитопатогенных. В настоящее время одним из перспективных и востребованных направлений в сельскохозяйственной микробиологии является скрининг штаммов молочнокислых бактерий, обладающих как антифунгальным, так и фитостимулирующим свойствами. Такие штаммы – основа эффективных и экологически безопасных микробиологических препаратов, которые могут быть использованы для защиты растений и стимуляции процессов их жизнедеятельности.

В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилось изучение некоторых физиолого-биохимических и ростстимулирующих свойств штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из природной среды обитания.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования служили штаммы молочнокислых стрептобацилл *Lactobacillus casei* 6 и *Lactobacillus plantarum* 20, а также стрептококков *Lactococcus lactis* 4/6. Выделение, идентификацию и изучение морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств молочнокислых бактерий проводили по стандартным методикам [12, 21]. Штаммы стрептобактерий *L. casei* 6, *L. plantarum* 20 выращивали на питательной среде MRS, штамм стрептококка *L. lactis* 4/6 – на среде S [12]. Чистые культуры микроорганизмов имели титр  $1 \times 10^7$  КОЕ, из которого готовили три разведения – 1:100, 1:200 и 1:1000.

В качестве тест-объектов служили семена огурцов (*Cucumis sativus* L.) сортов Конкурент и Феникс, которые проращивали в кюветах, содержащих жидкие культуры микроорганизмов в указанных разведениях при температуре 25 °С. В контрольном варианте семена проращивались на отстоянной водопроводной воде. Энергию прорастания семян определяли на 3-и сутки, всхожесть – на 7-е сутки с момента замачивания семян [22].

Исследование влияния молочнокислых бактерий на рост огурцов проводилось при выращивании растений в условиях лабораторно-вегетационного опыта в водной культуре. При анализе величин морфометрических показателей длину корня и побега в контрольном варианте принимали за 100 %.

Полученные результаты статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ *Microsoft Office*.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *Lactobacillus plantarum* 20 выделен из силосного зерна. Морфологически – это тонкие длинные неподвижные одиночные или парные неспорообразующие грамположительные палочки. *L. plantarum* 20 на твердых питательных средах образует круглые колонии белого цвета. Профиль колоний выпуклый, край волнистый. По штриху рост умеренный, видна цепь изолированных колоний. В жидких питательных средах образуют однородную суспензию.

Штамм *Lactobacillus casei* 6 выделен из самоквасных домашних кисломолочных продуктов. Морфологически – это короткие толстые неподвижные неспорообразующие грамположительные палочки, собранные в короткие цепочки. *L. casei* 6 на твердых питательных средах образует круглые полупрозрачные колонии белого цвета. Профиль колоний выпуклый, край ровный. По штриху рост умеренный, видна цепь изолированных колоний. В жидких питательных средах образуют однородную суспензию.

Штамм *Lactococcus lactis* 4/6 изолирован из эпифитной сферы растений. Морфологически – это неспорообразующие, неподвижные, грамположительные слегка овальные кокки, расположенные парами или в коротких цепочках по 4-6 клеток. *L. lactis* 4/6 на твердых питательных средах образует круглые точечные

колонии, белого цвета. Колонии плоские, гладкие, полупрозрачные, край ровный. По штриху рост умеренный, видна цепь изолированных колоний. В жидких питательных средах образуют однородную суспензию.

Метаболизм молочнокислых стрептобактерий *Lactobacillus plantarum 20* и *Lactobacillus casei 6* бродильный, но они могут расти и в присутствии кислорода (факультативные анаэробы). Исследуемые штаммы рода *Lactobacillus* являются гомоферментативными, способны к росту в средах с углеродсодержащими соединениями, что может положительно сказываться на их интеграции с растением и совместном функционировании в системе бактерии – растение – фитопатогены [23]. *L. casei 6* сбраживает фруктозу, мальтозу, глюкозу, галактозу, манит, сорбит, маннозу, сахарозу; не сбраживает арабинозу, рамнозу, рафинозу, ксилозу. *L. plantarum 20* сбраживает фруктозу, галактозу, глюкозу, маннозу, сорбит, маннит, рафинозу, сахарозу, лактозу, мальтозу. Арабинозу и рамнозу *L. plantarum 20* не сбраживает.

Изучение влияния на исследуемые молочнокислые бактерии фенола, желчи, хлористого натрия и этилового спирта показало, что исследуемые штаммы способны противостоять химически агрессивным факторам среды (табл. 1).

**Таблица 1**

**Устойчивость молочнокислых бактерий к химически агрессивным факторам среды**

Фактор среды	Штаммы молочнокислых бактерий		
	<i>L. casei 6</i>	<i>L. plantarum 20</i>	<i>L. lactis 4/6</i>
	Концентрация в среде культивирования, %		
фенол	0,4	0,4	0,2
желчь	50	50	40
хлорид натрия	16	16	6
этанол	34	28	30

Как следует из данных табл. 1, бактерии рода *Lactobacillus* продолжали расти в присутствии 0,4 %-ной концентрации фенолов в среде культивирования. *L. lactis 4/6* проявил меньшую фенолоустойчивость – максимальная концентрация фенолов, при которой наблюдался рост данного штамма, составила всего 0,2 %. У штаммов лактобацилл отмечена и более высокая желчеустойчивость, они росли при 50 %-ной концентрации желчи в среде, а стрептококк – лишь при 40 %. Исследуемые молочнокислые бактерии были достаточно спиртоустойчивыми: штамм *L. lactis 4/6* выдерживал 30 %-ную концентрацию этанола в среде, *L. plantarum 20* – 28 %. Самую высокую степень спиртоустойчивость проявил штамм *L. casei 6* – его рост продолжался при 34 %-ной концентрации этилового спирта в среде культивирования. Бактерии рода *Lactobacillus* оказались и достаточно солеустойчивыми: рост клеток наблюдался при 16 % натрия хлористого в среде культивирования, стрептококк развивался при более низкой концентрации поваренной соли – 6 %.

Таким образом, изученные физиолого-биохимические свойства (достаточно высокая степень феноло- спирто- желчеустойчивости) является доказательством приспособленности изучаемых микроорганизмов к агрессивным химическим факторам среды. Высокая степень солеустойчивости свидетельствует о том, что исследуемые штаммы молочнокислых бактерий можно использовать даже на засоленных почвах.

Для детальной характеристики особенностей метаболизма исследуемых штаммов молочнокислых бактерий изучалась степень их ферментативной активности (табл. 2).

**Таблица 2**

**Физиолого-биохимические свойства молочнокислых бактерий**

Физиолого-биохимические свойства	Штаммы молочнокислых бактерий		
	<i>L. casei 6</i>	<i>L. plantarum 20</i>	<i>L. lactis 4/6</i>
амилолитическая активность	–	–	+
липолитическая активность	+	+	+
протеолитическая активность	+	+	–
выделение аминокислот	валин	лейцин	лейцин, валин, глутаминовая кислота

У микроорганизмов выделенных штаммов обнаружен разный уровень протеолитической активности, проявляющийся в гидролизе белков на олиго- и полипептиды. Исследования показали, что молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus* расщепляли казеин: зона гидролиза у штамма *L. plantarum 20* составила 5 мм, у *L. casei 6* – 4 мм, у штамма *L. lactis 4/6* протеолиз отсутствовал. У обоих штаммов лактобацилл амилолитическая активность не выявлена, у штамма *L. lactis 4/6* зона гидролиза крахмала составила  $6,0 \pm 0,2$  мм. У всех исследованных штаммов молочнокислых бактерий выявлена слабая липолитическая активность.

Достаточно высокий уровень метаболической активности выявлен у штамма *L. lactis 4/6*. Проведенный хроматографический анализ показал, что эти бактерии выделяли в среду культивирования наибольшее количество свободных аминокислот (лейцин, валин, глутаминовая кислота).

Все исследуемые штаммы сбраживали обезжиренное молоко с образованием гомогенного сгустка. Посевы в молоко позволили выявить у изучаемых бактерий разную степень кислотообразования. Титруемая кислотность у *L. lactis 4/6* составила 72 °Т, у *L. plantarum 20* – 55 °Т, у *L. casei 6* – 90 °Т. Все исследуемые штаммы створаживали молоко с метиленовой синью и восстанавливали лакмусовое молоко.

Рост штамма *L. plantarum 20* наблюдался при значениях рН 4,0 – 9,0, штамма *L. casei 6* – при рН 4,0 – 7,0, штамма *L. lactis 4/6* – при 6,0 – 8,0. Штамм *Lactococcus lactis 4/6* на кровяном агаре не вызывал гемолиз крови.

Изучение степени антибиотикорезистентности молочнокислых бактерий представляется особенно интересным, поскольку в настоящее время в качестве почвенных органических удобрений вносят птичий помет и навоз крупного рогатого скота, которые содержат антибиотики, подавляющие развитие почвенной микрофлоры или микроорганизмов, входящие в состав биопрепаратов. Степень чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам, наиболее часто используемым в ветеринарии, определяли дискодиффузным методом, измеряя диаметры зон задержки роста (ДЗЗР).

Молочнокислые бактерии *L. casei* 6 и *L. plantarum* 20 были наименее чувствительны к действию офлоксацина. По отношению к тетрациклину, спирамицину, тилозину все исследуемые штаммы молочнокислых бактерий проявляли высокую чувствительность. Штамм *L. lactis* 4/6 оказался более устойчивым к антибиотикам, особенно к спирамицину, проявляя умеренную чувствительность к офлоксацину, тетрациклину и тилозину (табл. 3).

Таблица 3

Антибиотикочувствительность молочнокислых бактерий

Антибиотики	ДЗЗР, мм		
	<i>L. casei</i> 6	<i>L. plantarum</i> 20	<i>L. lactis</i> 4/6
офлоксацин	16,0 ± 0,8	20,0 ± 1,0	22,0 ± 0,9
тетрациклин	30,0 ± 1,0	36,0 ± 0,9	22,0 ± 1,1
спиромицин	38,0 ± 0,8	50,0 ± 0,9	17,0 ± 1,0
тилозин	40,0 ± 0,8	41,5 ± 1,5	20,0 ± 1,0

Характерной особенностью молочнокислых бактерий является подавление роста условно-патогенных бактерий, плесневых, фитопатогенных и токсинообразующих грибов.

В ходе проведенных экспериментов установлено, что исследованные штаммы молочнокислых бактерий проявляли высокую антагонистическую активность по отношению к санитарно-значимым кишечным микроорганизмам (*Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Salmonella typhimurium*), образуя зоны подавления роста тест-культур диаметром более 20 мм (табл. 4).

У штамма *L. casei* 6 выявлена слабая фунгицидная активность по отношению к таким микромицетам, как *Aspergillus candidus*, *A. fischeri* и *A. alternata*. Эти бактерии не подавляли рост *A. flavus* и *Fusarium moniliforme*, но обладали высокой антагонистической активностью по отношению к *A. pulvinus*, *F. sulphureum* и *Scopulariopsis brevicaulis*.

Штамм *L. plantarum* 20 не подавлял рост всех изученных фитопатогенных грибов, а также плесневых грибов *A. candidus*, *A. flavus*; слабая антагонистическая активность проявилась лишь по отношению к *A. fischeri*. Высокая фунгицидная активность *L. plantarum* 20 выявлена по отношению к *A. pulvinus* и *S. brevicaulis*.

Штамм *L. lactis* 4/6 обладал высокой фунгицидной активностью лишь по отношению к *S. brevicaulis*, рост других фитопатогенных грибов он подавлял слабо.

Таким образом, бактерии исследуемых штаммов обладали определенным уровнем фунгицидной и бактерицидной активности, что свидетельствует об их выраженных антагонистических свойствах по отношению к наиболее распространенным фитопатогенам.

**Таблица 4**  
**Антагонистическая активность молочнокислых бактерий**

Тест - культуры		ДЗЗР, мм		
группа микроорганизмов	виды микроорганизмов	<i>L. casei</i> 6	<i>L. plantarum</i> 20	<i>L. lactis</i> 4/6
штаммы санитарно-значимых кишечных микроорганизмов	<i>S. aureus</i>	24,0 ± 0,4	25,6 ± 0,5	24,0 ± 0,5
	<i>P. vulgaris</i>	20,9 ± 0,5	38,5 ± 0,7	30,6 ± 0,4
	<i>E. coli</i>	28,0 ± 0,7	30,0 ± 0,6	32,0 ± 0,9
	<i>P. aerogenosa</i>	30,0 ± 0,6	28,5 ± 0,5	30,0 ± 0,5
	<i>S. typhimurium</i>	25,0 ± 0,4	25,8 ± 0,5	28,0 ± 0,6
плесневые грибы	<i>A. candidus</i>	15,0 ± 0,5	0	0
	<i>A. flavus</i>	0	0	0
	<i>A. pulvinus</i>	25,0 ± 1,0	23,0 ± 1,0	0
	<i>A. fischeri</i>	15,0 ± 1,0	16,0 ± 1,0	0
фитопатогенные грибы	<i>F. moniliforme</i>	0	0	17,0 ± 1,0
	<i>F. sulphureum</i>	20,0 ± 2,5	0	18,0 ± 1,0
	<i>A. alternata</i>	15,0 ± 2,0	0	16,0 ± 2,0
токсикообразующие грибы	<i>S. brevicaulis</i>	23,0 ± 1,0	22,0 ± 1,0	24,0 ± 1,0

Как правило, проявление протекторных свойств метаболитов бактериальной природы часто коррелирует с их положительным воздействием на ростовые процессы.

Важность этого критерия при выборе микроорганизмов обусловлена тем, что фитостимулирующие микроорганизмы, продуцируя и выделяя экзометаболиты (ферменты, витамины, аминокислоты, витамины и другие важные биологически активные вещества) обеспечивают более высокий процент и более высокую скорость прорастания семян растений [11, 14], от чего во многом зависит направленность дальнейших процессов развития проростков.

В экспериментах по определению влияния микроорганизмов на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов использованы разные разведения каждого исследуемого штамма молочнокислых бактерий, поскольку метаболиты микроорганизмов, в зависимости от их концентрации, могут как ингибировать, так и стимулировать ростовые процессы.

Результаты проведенных экспериментов показали, что исследуемые штаммы микроорганизмов не оказали существенного влияния на прорастание семян огурцов сорта Конкурент (рис. 1).

Так, в контрольном варианте величина энергии прорастания семян огурцов сорта Конкурент практически полностью совпала с показателем всхожести (96 – 100 %), что свидетельствует о высоком ростовом потенциале семян данного сорта (рис. 1). У сорта Феникс в контрольном варианте значения энергии прорастания составили 36–56 %, всхожести – 38–62 % (рис. 2), что свидетельствует о более низком ростовом потенциале семян данного сорта. Штамм *L. casei* б не оказал существенного влияния на энергию прорастания и всхожесть семян данного сорта.

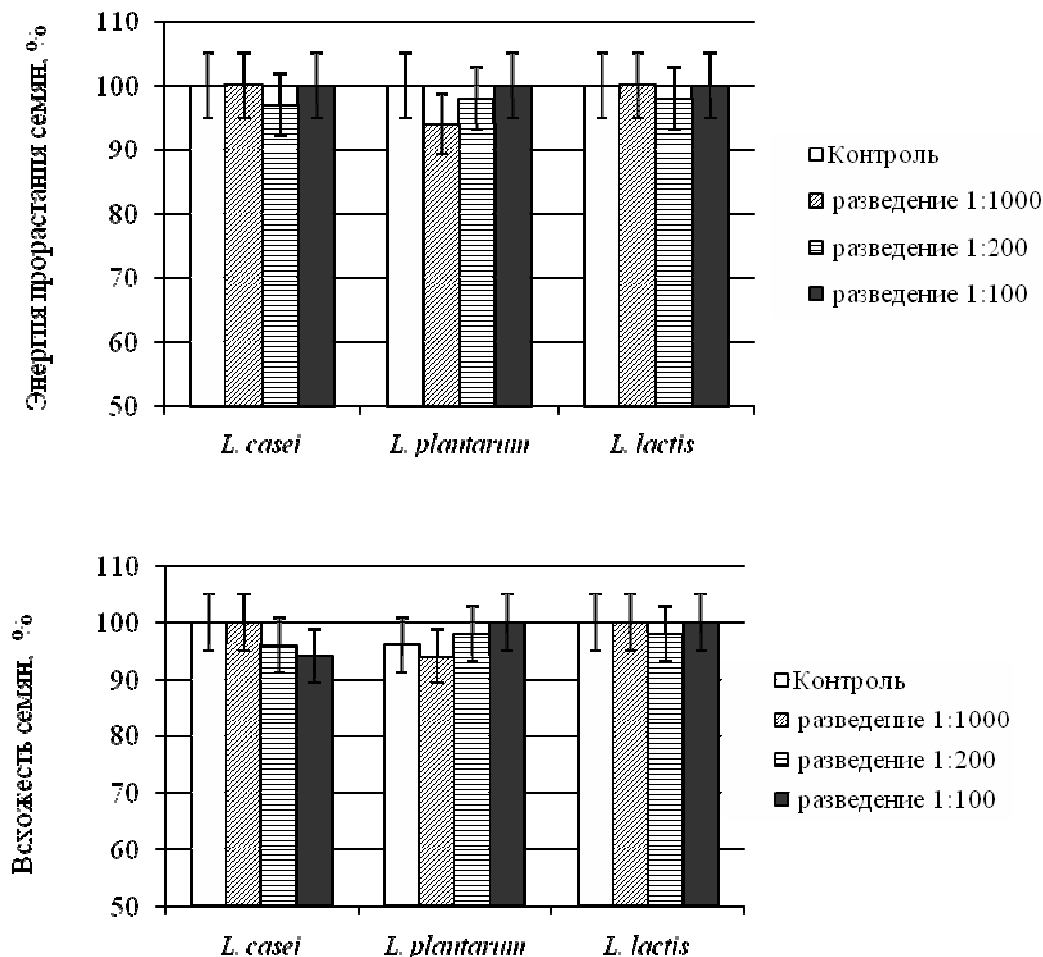


Рис. 1. Влияние штаммов молочнокислых бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов сорта Конкурент

При изучении влияния штамма *L. plantarum* 20 на прорастание семян у сорта Феникс установлено, что в контрольном варианте всхожесть семян составила 54 %,

в присутствии различных разведений культуры данного микроорганизма значения исследуемого показателя возросли до 59 %.

Таким образом, бактерии штамма *L. plantarum* 20 увеличили всхожесть семян сорта Феникс в среднем на 5 % по сравнению с контролем (рис. 2).

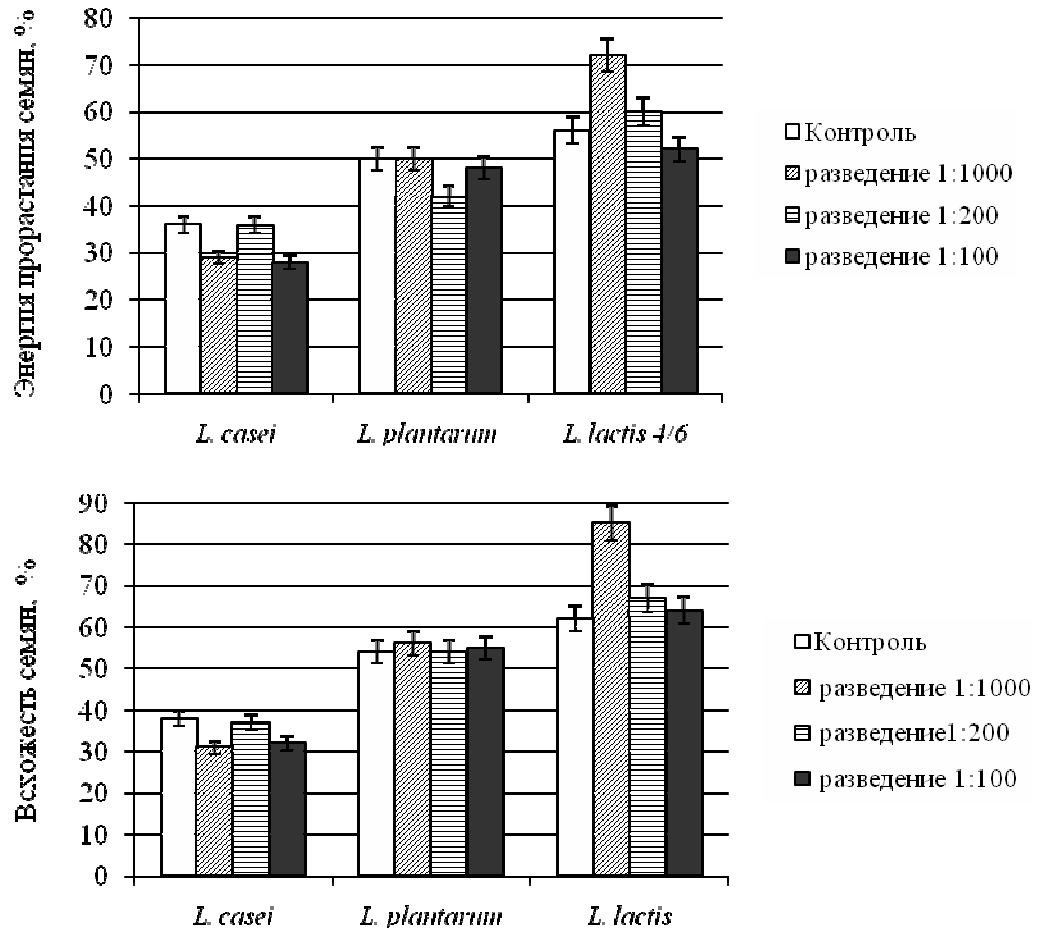


Рис. 2. Влияние штаммов молочнокислых бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов сорта Феникс

При проращивании семян сорта Феникс в различных разведениях штамма *L. lactis 4/6* в контрольном варианте энергия прорастания составила 56 %, всхожесть – 62 %, в разведении 1:1000 – 72 % и 85 % соответственно.

Таким образом, штамм *L. lactis 4/6* увеличил энергию прорастания семян сорта Феникс на 16 %, всхожесть – на 13 % по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

В результате изучения влияния штаммов молочнокислых бактерий на энергию прорастания и всхожесть семян огурцов установлено, что исследованные



микроорганизмы оказывают положительное воздействие в большей степени на всхожесть, чем на энергию прорастания (рис. 2). При сравнении эффективности штаммов молочнокислых бактерий между собой установлено, что наибольшее увеличение энергии прорастания и всхожести как у сорта Феникс, так и у сорта Конкурент вызывал штамм *L. lactis* 4/6. Бактерии *L. plantarum* 20 увеличили всхожесть семян сорта Феникс на 5 % по сравнению с контролем, не изменяя при этом величину энергии прорастания. Штамм *L. casei* 6 не оказал существенного влияния ни на энергию прорастания, ни на всхожесть семян огурцов обоих исследованных сортов.

Изучение морфометрических показателей проростков на ранних этапах онтогенеза при выращивании их в водной культуре с добавлением культур лактобактерий показало, что исследуемые микроорганизмы оказывают положительное влияние на ростовые процессы огурцов сортов Конкурент (рис. 3) и Феникс (рис. 4).

Как следует из данных рис. 3, штамм *L. casei* 6 в разведениях 1:200 и 1:1000 увеличивал длину корневой системы проростков сорта Конкурент на 1,4 % и 8,0 % соответственно по сравнению с контролем. Разведение штамма *L. casei* 6 1:100 не оказывало воздействия на длину корневой системы (рис. 3).

Наибольшее увеличение высоты растений отмечено при разведении штамма *L. casei* 6 1:100 и 1:200 – данный показатель возрос по сравнению с контролем на 19,4 % и 20,0 % соответственно (рис. 3). Разведение штамма *L. casei* 6 1:1000 стимулировало рост побега в меньшей степени: он был лишь на 7,2 % больше контроля. Таким образом, штамм *L. casei* 6 в малых разведениях стимулировал скорость роста сеянцев сорта Конкурент в большей степени, чем корня, в больших разведениях происходило равномерное увеличение как надземных, так и подземных органов растений.

Штамм *L. plantarum* 20 активировал рост корневой системы сеянцев сорта Конкурент (рис. 3) в разведении 1:1000, 1:200 и 1:100: длина корней была больше контрольных значений на 2,8 %, 9,7% и 19,4 % соответственно. В воздействии штамма *L. plantarum* 20 на рост побега наблюдалась противоположная зависимость: разведение 1:1000 вызывало увеличение высоты растений на 37,7 %, а разведение 1:200 – на 16,3 % по сравнению с контролем (рис. 3), разведение 1:100 не оказало стимулирующего эффекта. Таким образом, штамм *L. plantarum* 20 в малых разведениях стимулировал рост корневой системы проростков сорта Конкурент, в больших разведениях – побега.

Разведение штамма *L. lactis* 4/6 1:1000 не оказало воздействия на рост корневой системы (рис. 3) растений огурца сорта Конкурент, а разведение 1:200 увеличило высоту сеянцев на 4,8 % по сравнению с контролем. Разведения 1:1000 и 1:200 стимулировали рост побега (рис. 3): его высота была больше, чем в контрольном варианте на 9,6 % и 21,0 % соответственно. Разведение 1:100 ингибировало ростовые процессы как корневой системы, так и побега, их длина была меньше, чем в контроле, на 6,4 и 1,7 % соответственно. Таким образом, низкие разведения штамма *L. lactis* 4/6 способны задерживать ростовые процессы сеянцев огурца сорта Конкурент.

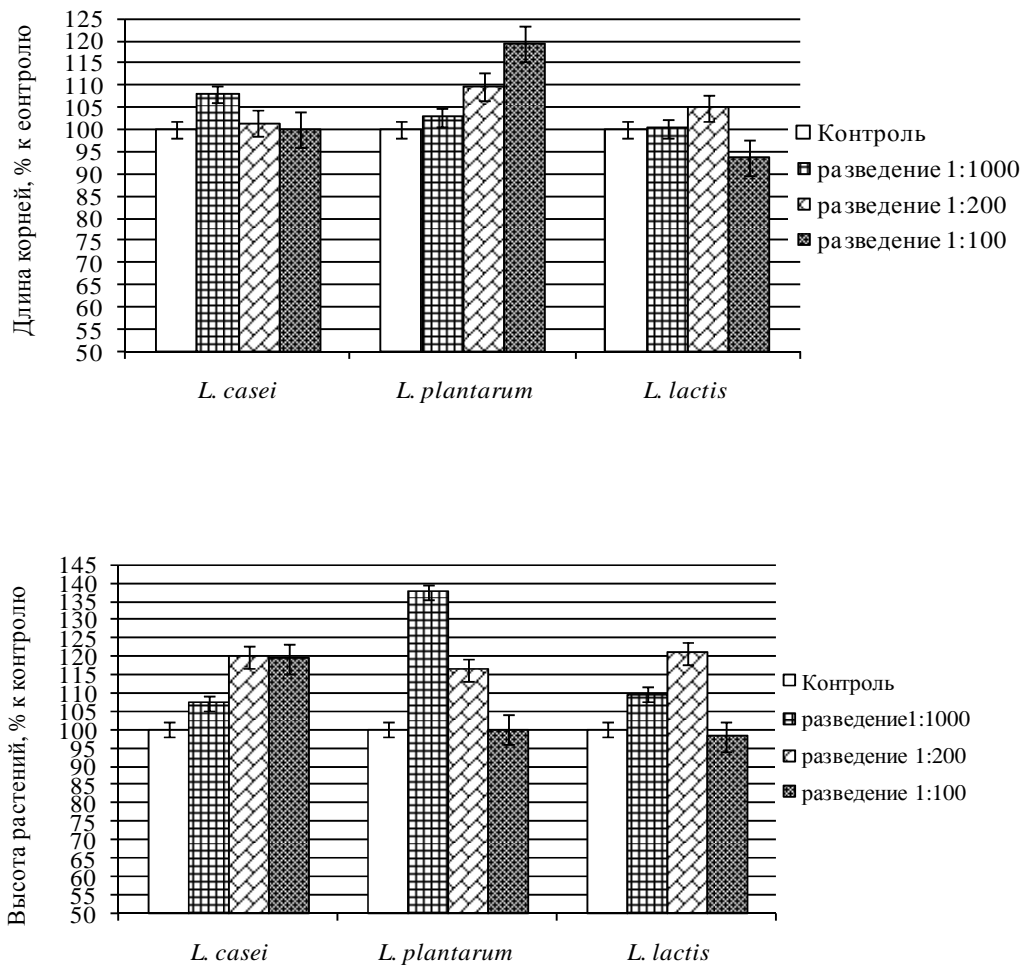


Рис. 3. Влияние молочнокислых бактерий на морфометрические показатели 7-дневных проростков растений огурца сорта Конкурент, выращенных в водной культуре

Как следует из данных рис. 4, штамм *L. casei* б в разведениях 1:1000, 1:200 и 1:100 стимулировал рост корневой системы огурцов сорта Феникс: длина корня была на 8,4, 24,0 и 13,6 % соответственно больше, чем в контроле. Рост побега при использовании разведений штамма *L. casei* б 1:100 и 1:200 также ускорился: высота растений на 22,2 и 53,1 % превышала контрольные значения. Таким образом, штамм *L. casei* б в небольших разведениях стимулировал развитие как корневой системы, так и побега.

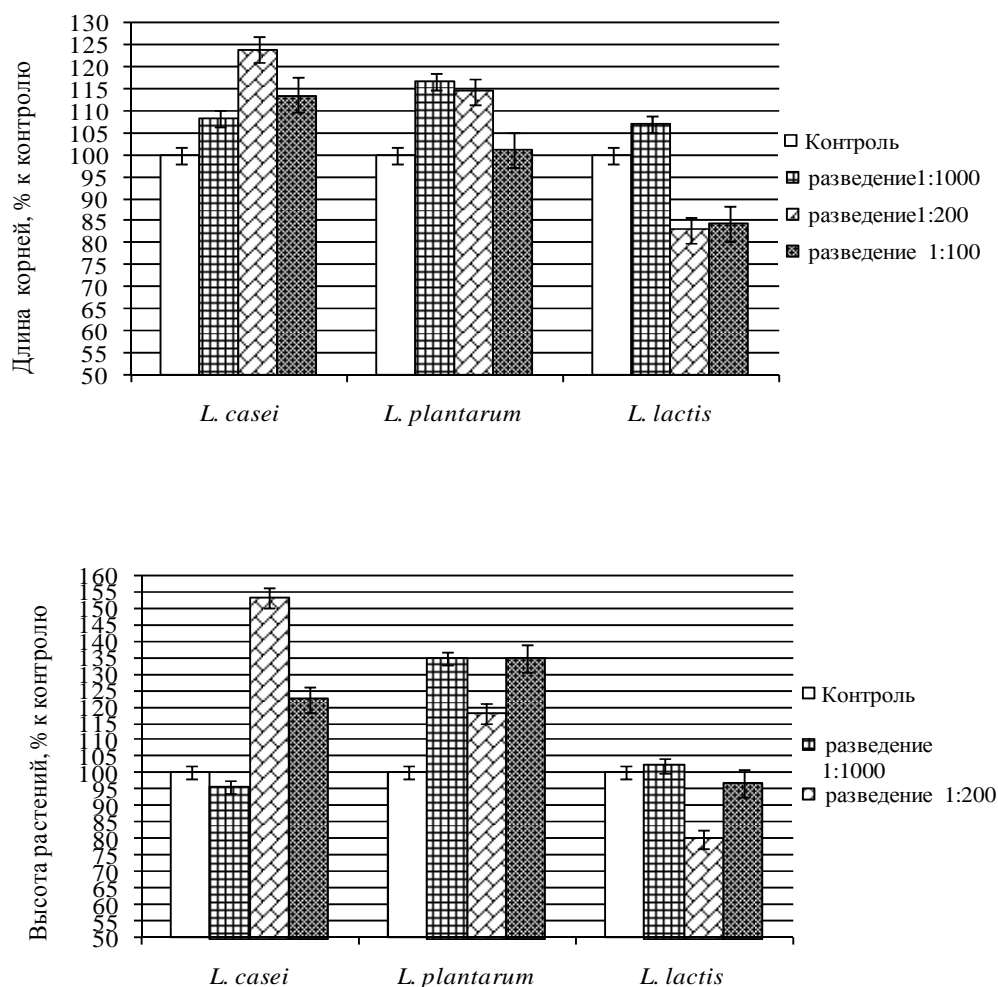


Рис. 4. Влияние молочнокислых бактерий на морфометрические показатели 7-дневных проростков растений огурца сорта Феникс, выращенных в водной культуре

Штамм *L. plantarum* 20 стимулировал рост корней сеянцев огурцов сорта Феникс в разведениях 1:100, 1:200 и 1:1000: длина корней была выше, чем в контроле на 1,2, 14,7 и 16,7 % соответственно. Высота побега под влиянием бактерий штамма *L. plantarum* 20 при разведениях 1:100, 1:200 и 1:1000 была соответственно на 34,8, 18,0 и 34,7 % выше. Таким образом, штамм *L. plantarum* 20 в больших разведениях стимулировал рост и корневой системы, и надземных побегов сеянцев огурцов сорта Феникс.

Разведения штамма *L. lactis* 4/6 1:100 и 1:200 ингибировали рост побегов: растения были ниже, чем в контроле, на 3,1 и 20,2 % соответственно.

Следовательно, морфогенетические ответные реакции растений, особенно на ранних этапах их развития, вызванные присутствием микроорганизмов в среде выращивания, не всегда однозначны: в отдельных случаях наблюдается либо значительная стимуляция, либо угнетение роста надземных побегов по сравнению с контролем, что, вероятно, связано с синтезом эндогенных биологически активных веществ, в том числе и фитогормонов, и нарушением баланса эндо- и экзогенных стимуляторов роста в водной культуре.

Таким образом, анализ результатов экспериментальной работы по изучению влияния штаммов молочнокислых бактерий на прорастание семян и скорость роста сеянцев огурцов сортов Конкурент и Феникс в водной культуре позволил выявить ряд характерных особенностей воздействия микроорганизмов на рост растений, связанных как с индивидуальными биологическими и количественными характеристиками бактериальной культуры. Выделенные штаммы микроорганизмов являются перспективными для создания бактериальных ассоциаций как основы новых микробных препаратов, эффективных для стимуляции роста и, как следствие, повышения биологической продуктивности растений.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Бактерии штаммов молочнокислых лактобацилл *Lactobacillus plantarum* 20 и *Lactobacillus casei* 6, выделенные из силосного зерна и самоквасных домашних кисломолочных продуктов соответственно, а также молочнокислые стрептококки штамма *Lactococcus lactis* 4/6, изолированного из эпифитной сферы растений, обладают типичными для микроорганизмов данных видов морфолого-культуральными признаками.
2. Исследованные штаммы лактобацилл обладали липо- и протеолитической активностью, штамм стрептококка – амило- и липолитической активностью. Бактерии изучаемых штаммов проявили достаточно высокую степень феноло-, желче-, спирто- и солеустойчивости.
3. Лактобактерии были чувствительны к тетрациклину, спирамицину и тилозину, у стрептококка выявлена высокая степень устойчивости к спирамицину, умеренная чувствительность к офлоксацину, тетрациклину и тилозину.
4. Лактобактерии и стрептококк проявили высокую антагонистическую активность по отношению к санитарно-значимым кишечным микроорганизмам. У штамма *L. casei* 6 выявлена фунгицидность по отношению к *A. candidus*, *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *F. sulphureum*, *A. alternata*, *S. brevicaulis*. Штамм *L. plantarum* 20 подавлял рост *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *S. brevicaulis*, а бактерии штамма *L. lactis* 4/6 угнетали рост *S. brevicaulis*, *F. moniliforme*, *F. sulphureum*, *A. alternate*.
5. Экзометаболиты изучаемых молочнокислых бактерий стимулировали прорастание семян огурцов сорта Феникс: их всхожесть под влиянием *L. plantarum* 20 и *L. lactis* 4/6 возросла на 6–12 % и 22 % соответственно по сравнению с контролем. Штамм *L. casei* 6 не оказывал существенного влияния на процессы прорастания семян огурцов исследованных сортов, низкие его

разведения (1:100 и 1:200) угнетали ростовые процессы сеянцев огурцов сортов Конкурент и Феникс.

6. Особенности воздействия микроорганизмов на рост растений определяются как индивидуальными биологическими, так и количественными характеристиками бактериальной культуры: стимуляция роста всех вегетативных органов сеянцев огурцов сорта Конкурент проявилась при использовании штамма *L. casei* 6 в разведении 1:1000, а у сорта Феникс – в разведениях 1:100 и 1:200.
7. Низкие разведения штамма *L. plantarum* 20 вызывали увеличение длины корней, высокие разведения – высоты побегов огурцов сорта Конкурент на 19,4% и 37,7% соответственно по сравнению с контролем. У огурцов сорта Феникс этот штамм в разведении 1:1000 стимулировал рост всех вегетативных органов.

#### Список литературы

1. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения / Н.А. Красильников. – М.: Изд-во АН СССР, 1958. – 463 с.
2. Kloepper J.W. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity / J.W. Kloepper, R. Lifshitz, R.M. Zablotowicz // Trends Biotechnol. – 1989. – № 7. – P. 39 – 43.
3. Rovira A.D. Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production / A.D. Rovira // Reviews of rural science 6: Biotechnology and recombinant DNA technology in the animal production industries. Ens. Leng R.A. et al. University New England Press. – 1985. – P. 185 – 197.
4. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация / М.М. Умаров. – М.: МГУ. – 1986. – 136 с.
5. Bashan Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) / Y.Bashan, G. Holguin, L.E. De Bashan // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50. – P. 521–577.
6. Боронин А.М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений / А.М. Боронин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С.25-31.
7. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А.А. Завалин. – М.: ВНИИА, 2005. – 302 с.
8. Кожемяков А.П. Биопрепараты для земледелия / А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь // В сб.: Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве). – М.: ГНУ ВНИИСХМ, 2005. – С. 18–54.
9. Моргун В.В. Ростостимулирующие ризобактерии и их практическое применение / В.В. Моргун, С.Я. Коць, Е.В. Кириченко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т 41, № 3. – С. 187 – 207.
10. Шапошников А.И. Взаимодействие ризосферных бактерий с растениями: механизмы образования и факторы эффективности ассоциативных симбиозов (обзор) / А.И. Шапошников, А.А. Белимов, Л.В. Кравченко, Д.М. Виванко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 16 – 22.
11. Чудинова Ю.В. Влияние микроорганизмов на всхожесть семян и рост ростков корней редиса / Ю.В. Чудинова, Н.Н. Наплекова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2009. – № 7 (57). – С. 14-18.
12. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е.И. Квасников, О.А.Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 390 с.
13. Патент Российской Федерации на изобретение ММ4А. Консорциум бактерий (*Lactobacillus salvaricus thermophilus*, *Streptococcus bovis*) для активации прорастания семян / Е.В. Чекакина, Кандіба Е.В., Литвинова М.Н., Дмитриева Т.В. Заявл. 31.12.1995; Опубл. 10.03.1999. Бюл. № 7 – 1999. – 3 с.
14. Limanska N. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 12 on initial stages of growth of tomatoes / N.Limanska // Microbial biotechnology: activities and future – Radostim-2012, 19 – 22 November 2012, - Kyiv, Ukrain, 2012. – P. 176 –177.
15. Краткий определитель бактерий Берги / Под редакцией Дж. Хоуга – М.: Мир, 1980. – 496 с.

16. Семёнов А. В. Характеристика антагонистической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях / Автореф. дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук. – Оренбург, 2009. – 20 с.
17. К. Дж. Карапетян. Сравнительная оценка ряда свойств новых штаммов молочнокислых бактерий / Биолог. журн. Армении. – 2009. – Т. 4 (61). – С. 36-42.
18. Эйфельд Д. А. Биологическая характеристика производственных штаммов лактобактерий / Автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук. – Пермь, 2002. – 20 с.
19. Самусенко Н. В. Научное обоснование применения бактерий-антагонистов при длительном холодильном хранении корнеплодов моркови / Автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. техн. наук, Санкт-Петербург, 2001. – 20 с.
20. Ботина С. Г. Молекулярно-биологические подходы к отбору бактериальных культур при создании заквасок для биотехнологии / Автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора биол. наук. – Москва, 2011. – 48 с.
21. Фадеева И. В. Разработка комплексного пробиотического препарата на основе лактобактерий : автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора биол. наук. – Пермь, 2004. – С. 48.
22. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038 [действующий от 01.07.1986]. – М.: Министерство сельского хозяйства СССР, 1984. – 60 с.
23. Четвериков С. П. Идентификация новых экзометаболических штаммов *Pseudomonas spp.* и технология биопрепаратов на их основе / Автореф. дисс. на соискание учен. степени доктора биол. наук. – Уфа, 2012. – 48 с.

**Ржевська В.С. Вивчення біологічних властивостей штамів молочнокислих бактерій / В.С. Ржевська, І.П. Отуріна, Л.М. Теплицька // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 145-160.**

Вивчено морфолого-культуральні і деякі фізіолого-біохімічні властивості виділених з природних джерел штамів молочнокислих бактерій, які мають антагоністичну активність відносно до фітопатогенних мікроорганізмів, високу ферментативну активність, стійкість до агресивних факторів середовища. Досліджено вплив молочнокислих бактерій на проростання насіння і швидкість росту огірків сортів Конкурент і Фенікс при вирощуванні у водної культури. Показано, що ефективність стимуляції ростових процесів під впливом молочнокислих бактерій залежить від їх біологічних особливостей і концентрації бактеріальної культури.

**Ключові слова:** молочнокислі бактерії, огірки, проростання насіння, ростові процеси.

## **STUDY OF THE BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE LACTIC ACID BACTERIA STRAINS**

*Rzhevskaya V.S., Oturina I.P., Teplitskaya L.M.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

*E-mail: viktoriyar45@mail.ru*

The morphological and cultural characteristics of two strains of bacteria of the genus *Lactobacillus* and strain of the genus *Lactococcus* isolated from natural sources were studied. The analysis of the physiological and biochemical properties showed the presence of high enzyme activity: all studied bacteria strains revealed lipolytic activity, moreover, *Lactobacillus* had proteolytic activity and *Streptococcus* – amylolytic activity. All isolated strains showed high resistance to aggressive environmental factors: phenol, bile, ethanol and sodium chloride. Studies of the antibiotic resistance showed that *Lactobacillus* is highly sensitive to tetracycline, spiramycin, tylosin, but *Streptococcus* is resistant to

antibiotics, especially spiramycin, but exhibits moderate sensitivity to ofloxacin, tetracycline and tylosin.

*Lactobacillus* and *Streptococcus* possess high antagonistic activity against intestinal sanitary significant microorganisms. Fungicidal activity of lactic acid bacteria in relation to micromycetes significantly differed. Strain of *L. casei* 6 showed fungicidal action against *A. candidus*, *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *F. sulphureum*, *A. alternata*, *S. brevicaulis*, but it did not suppress the growth of *F. moniliforme* and *A. flavus*. Strain of *L. plantarum* 20 inhibited the growth of *A. pulvinus*, *A. fischeri*, *S. brevicaulis*, but had no effect on the *A. flavus* and *A. candidus*, phytopathogenic fungi *A. alternata*, *F. sulphureum*, *F. moniliforme*. Strain of *L. lactis* 4/6 had antagonistic activity against *S. brevicaulis*, *F. moniliforme*, *F. sulphureum*, *A. alternata*, but it did not suppress the growth of molds genus *Aspergillus*.

Lactic acid bacteria have different effects on the germination of cucumber seeds. Exometabolites of the studied lactic acid bacteria stimulated germination of cucumber sort Phoenix: the germination under the influence of *L. plantarum* 20 and *L. lactis* 4/6 increased by 12,6% and 22,0% respectively compared to the control group. Strain of *L. casei* 6 had no significant effect on the germination of cucumber seeds of studied sorts, its lowest dilution (1:100 and 1:200) inhibited the growth processes of cucumber seedlings of the sorts Competitor and Phoenix.

Lactic acid bacteria have intensified the growth processes of cucumber plants. Strain of *L. casei* 6 at dilutions of 1:100 and 1:200 significantly increased seedling height sort Competitor, dilution of 1:1000 caused accelerated growth both of the aerial and underground plant's organs. In the sort Phoenix this strain at dilutions of 1:100 and 1:200 stimulated the growth of the all vegetative organs. Low dilutions of strain *L. plantarum* 20 increased length of the root, high dilutions – height cucumber seedling sort Competitor by 19.4 % and 37.7 %, respectively, when compared with the control group. In cucumber sort Phoenix this strain in dilution of 1:1000 stimulated the growth of vegetative organs: the length of the root system increased by 16.7 %, and seedlings shoots – by 34,7 % compared to the control group. Low dilutions of strain *L. lactis* 4/6 inhibited the growth processes of 7-day-old seedlings in cucumber sorts Competitor and Phoenix.

Thus, investigated lactic acid bacterial strains *L. casei* 6 and *L. plantarum* 20 can be used as a basis for the creation of bacterial preparations-phytostimulants.

**Key words:** lactic acid bacteria, cucumbers, seed germination, growth processes.

#### References

1. Krasilnikov N.A. Microorganisms of soil and higher plants, 463 p. (AS USSR, 1958).
2. Kloepper J.W. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity, *Trends Biotechnol.*, **7**, 39-43, (1989).
3. Rovira A.D. Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production, Reviews of rural science: Biotechnology and recombinant DNA technology in the animal production industries, *University New England Press.*, 185-197 (1985).
4. Umarov M.M. Associative azotfixing, 136 p. (MSU, 1986).
5. Bashan Y. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003), *Can. J. Microbiol.*, **50**, 521-577 (2004).

6. Boronin A.M. Rhizosphere bacteria of family *Pseudomonas* that promote a height and development of plants, *The Soros educational magazine*, **10**, 25-31 (1998).
7. Zavalin A.A. Bioreparations, fertilizers and harvest, 302 p. (USIA, 2005).
8. Kozhemyakov A.P. Biopreparations for agriculture, *Bioreparations in agriculture*, 18–54 (SNU SSIAM, 2005).
9. Morgun V.V. Stimulant a height rizobacteria and their practical application, *Physiology and biochemistry of the culture plants*, **41**, 3, 187-207 (2009).
10. Shaposhnikov A.I. Cooperating of rhizosphere bacteria with plants: mechanisms of formation and factors of efficiency of associative symbiosis (rev.), *Agricultural biology*, **3**, 16- 22 (2011).
11. Chudinova Yu.V. Influence of microorganisms on the germination of seed and height of sprouts of roots of the garden radish, *Announcer of the Altay State University*, **7 (57)**, 14-18 (2009).
12. Kvasnikov E.I. *Lactobacillus* and ways of their use, 390 p. (Science, 1975).
13. Patent of the Russia Federation on the invention MM4A. Bacteria konsortium (*Lactobacillus salvaricicus thermophilus*, *Streptococcus bovis*) for activation the germination of seed, **7**, 3 p. (1999).
14. Limanska N. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 12 on initial stages of growth of tomatoes, *Microbial biotechnology: activities and future*. – Radostim–2012, 19–22.11.2012, 176 -177 (2012).
15. Short Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Red.: J. Kout, 496 p. (World, 1980).
16. Semenov A.V. Description of antagonistic activity of bacteria at intermicrobial mutual relations, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of candidate of biol. sciences, 20 p. (Orenburg, 2009).
17. Karapetyan K.J. Comparative estimation of row of properties of new strains of *Lactobacillus*, *Armenia Biolog. Journ.*, **4 (61)**, 36-42 (2009).
18. Eysfeld D.A. Biological characteristics of the productive strains of *Lactobacillus*, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of candidate of biol. sciences, 20 p. (Perm, 2002).
19. Samusenko N.V. Scientific ground of application of bacteria antagonists at the protracted refrigeration storage of root crops of carrot, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of candidate of tech sciences, 20 p. (Sankt-Peterburg, 2001).
20. Botina S.G. Molecular biological going near the selection of bacterial cultures at creation of ferments for a biotechnology, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of doctor of biol. sciences, 48 p. (Moscow, 2011).
21. Fadeeva I.V. Development of complex probiotic preparation on basis of *Lactobacillus*, Avtorep. of the diss. on the competition of graduate degree of doctor of biol. sciences, 48 p. (Perm, 2004).
22. Seed of plant-breeding cultures. Methods of determination of germination: SOST 12038, [01.07.1986], 60 p. (Ministry of agriculture of USSR, 1984).
23. Chetverikov S.P. Identification of the new ekzometabolites of some strains *Pseudomonas spp.* and technology of biopreparatosv on their base, Avtorep. diss. on the competition of graduate degree of doctor of biol. sciences, 48 p. (Ufa, 2012).

Поступила в редакцию 05.02.2014 г.



УДК 616.12:616.78

## ВЕГЕТАТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИНУСОВОГО УЗЛА У ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ В УСЛОВИЯХ ВЕСТИБУЛЯРНЫХ РАЗДРАЖЕНИЙ

*Савина К.Д., Сышко Г.Д.*

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: syshko@list.ru*

Изучено влияние вестибулярного раздражения на вегетативную регуляцию и функциональное состояние синусового узла у высококвалифицированных спортсменов. Обследованы 14 высококвалифицированных спортсменов, специализирующихся в беге на 800м, 1500м, 3000с/п и 5000м. На основании анализа вариабельности сердечного ритма выявлены типологические особенности функционального состояния синусового узла, а также факторы, определяющие функциональное состояние регуляторных систем вегетативной регуляции ритма сердца в условиях покоя и вестибулярных раздражений. На основании особенностей ВСР все обследованные спортсменки разделены на две группы. У спортсменок первой отмечается повышенная напряженность регуляторных процессов в организме, с преобладанием симпатических влияний. У спортсменок второй группы наблюдается сбалансированность симпатических и парасимпатических влияний и умеренное напряжение регуляторных систем организма. Проведенный факторный анализ позволил выделить 5 факторов, описывающих 88,2% изменений в распределениях кардиоинтервалов в состоянии относительного покоя и дал возможность определить структуру висцеральной устойчивости при вестибулярных раздражениях у спортсменок. У спортсменок первой группы при вестибулярных раздражениях наблюдаются адекватные изменения в соотношениях факторов, определяющих функциональное состояние регуляторных систем организма, которые свидетельствуют о тенденции к устойчивости вегетативного баланса и менее выраженной напряженности функционирования регуляторных систем организма, однако присутствует фактор неустойчивых состояний. У спортсменок второй группы отсутствует фактор неустойчивых состояний, что является благоприятным симптомом и свидетельствует о повышении устойчивости организма к вестибулярным раздражениям. Однако сохранившиеся при этом веса факторов централизации регуляторных механизмов и активности адаптационных механизмов сердечно-сосудистой системы указывают гиперреактивность срочной адаптации к вестибулярным нагрузкам.

**Ключевые слова:** вегетативная регуляция, кардиоритмография, синусовый узел, спортсменки, вестибулярное раздражение.

### ВВЕДЕНИЕ

Для спорта высших достижений характерны значительные нагрузки. Большая величина и направленность этих нагрузок приводит к специфичным изменениям, как морфологического, так и функционального характера [1]. Известно, что современная спортивная тренировка не обеспечивает одинакового высокого развития всех вегетативных функций у всех спортсменов. Спортсмены высокой квалификации с одной направленностью тренировочного процесса имеют иные уровни висцерального функционирования, чем спортсмены с другой направленностью [2]. Соотношение

различных уровней этих функций и позволяет спортсмену данного конкретного вида спорта показывать высокие спортивные результаты, причём в каждом виде спорта с определенной направленностью тренировочного процесса эти соотношения различны [3]. Поэтому нет и не может быть универсальных критериев оценки соотношений уровней вегетативных функций одинаковых для всех спортсменов, независимо от направленности тренировочного процесса. Энергетический характер нагрузок в беге на средние и длинные дистанции связан с гликолитической ёмкостью и аэробной мощностью. Значительные величины лактата и уровни потребления кислорода достигаются, в том числе, благодаря высокому функционированию вегетативных функций. Поэтому оценка вегетативной регуляции и функционального состояния синусового узла у бегунов на средние и длинные дистанции, является важной для определения функционального состояния организма. Информативность этой оценки увеличивается, если используются не специфичные функциональные пробы, к которым относятся вестибулярное раздражение.

**Цель работы.** Определение особенностей изменений функционального состояния регуляторных систем организма у высококвалифицированных спортсменов в условиях вестибулярных раздражений.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование принимали участие 14 высококвалифицированных спортсменов, специализирующиеся в беге на 800м, 1500м, 3000с/п и 5000м. Средний возраст обследованных спортсменов составлял  $24,1 \pm 2,1$  лет. При помощи прибора Polar RS 800 SD в покое и после вестибулярных раздражений (проба Воячека в кресле Барани) регистрировали показатели вариационной пульсометрии, рассчитываемые автоматически по данным тахограмм, спектрограмм и стандартизированной интервалограммы. В исследованиях продолжительность записи кардиоритмограмм (КРГ) составляла 5 минут (300 с). Рассчитывались статистические характеристики динамического ряда кардиоинтервалов: количество кардиоинтервалов (N); математическое ожидание динамического ряда (RRNN); стандартное отклонение нормальных величин R-R интервалов (SDNN); коэффициент вариации ( $CV=100 \times SDNN/RRNN$ ); доля последовательных R-R интервалов, различие между которыми превышает 50 мс (pNN50, %). Числовыми характеристиками вариационной пульсограммы являются: "Мода" (Mo), "Амплитуда моды" (AMo), "Индекс напряженности" (ИН), "Индекс вегетативной регуляции" (ИВР), "Вегетативный показатель ритма" (ВПР), "Показатель адекватности процессов регуляции" (ПАПР). Спектральный анализ производился по методу быстрого преобразования Фурье. Определялись все спектральные максимумы и мощности спектра в  $мс^2$  в следующих диапазонах: сверхмедленный диапазон (VLF) – от 0,003 Гц до 0,04 Гц; диапазон медленных волн (LF) – от 0,04 до 15 Гц; диапазон высокочастотных (дыхательных) волн (HF) – от 0,15 до 0,40 Гц; диапазон сверхвысокочастотных волн (VHF) – от 0,40 до 1,00 Гц, общая мощность спектра ( $TP_{0-0,40}$ ) в диапазоне от 0,003 Гц до 0,40 Гц. Для анализа и оценки полученных данных применялись методы параметрической и непараметрической статистики и факторного анализа [4].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализ особенностей вариабельности сердечного ритма в состоянии покоя позволил разделить спортсменов на две группы (табл. 1).

В первую группу вошли спортсменки, у которых границы показателей вариабельности сердечного ритма (ВСР) смещены в область высокого напряжения регуляторных систем организма, во вторую – у которых границы показателей ВСР ритма лежат в диапазоне, характерном для состояния нормы [5], покоя. Спортсмены первой группы составляли - 42,9%, второй – 57,1% соответственно.

**Таблица 1**

**Средние значения показателей математического анализа ритма сердца у легкоатлетов в состоянии относительного покоя и после вестибулярных раздражений**

Показатели	1-я группа (n=6) (до вестибулярных раздражений)	2-я группа (n=8) (до вестибулярных раздражений)	1-я группа (n=6) (после вестибулярных раздражений)	2-я группа (n=8) (после вестибулярных раздражений)
RRNN, мс	679±35,3*	885±40,5	824±24,4*	1130±17,5
Mo, мс	641±40,9*	832±44,1	800±39,4*	1100±20,0
SDNN, мс	21,1±9,21	30,8±8,59	26,3±17,50	40,1±5,30
AMo, %	79±5,2*	54±2,2	65±5,2*	43±2,2
ΔR-R, мс	320±105,9	368±92,4	153±39,4	208±56,5
CV, %	2,9±2,62	3,8±1,83	3,2±0,96	3,5±0,47
PNN50, %	3,8±2,92**	9,5±3,21	0,8±2,33**	6,8±1,11
ИИ	281±85,3**	107±20,9	265±85,3**	94±20,9
ИВР	281±73,1**	107±52,0	424±42,2**	206±32,1
ПАПР	90±9,4*	46±7,1	81±4,3*	39±3,4
ВПР	5,5±1,75*	2,8±0,78	8,2±0,96*	4,7±0,52
VLF, мс <sup>2</sup> /Гц	581±172,8*	810±143,4	416±58,6**	807±41,3
LF, мс <sup>2</sup> /Гц	639±161,1	592±84,5	619±64,2*	490±35,6
HF, мс <sup>2</sup> /Гц	408±105,1*	740±73,9	531±88,4**	896±30,5
VHF, мс <sup>2</sup> /Гц	755±124,5**	231±63,2	747±76,6**	224±14,2
TP <sub>0-0,40</sub> , мс <sup>2</sup> /Гц	1625±453,1	2147±213,6	1581±167,2**	2209±61,3
LF/HF	1,58±0,214	0,79±0,102	1,17±0,115**	0,52±0,084
ПАРС	6±0,4*	4±0,2	4±0,4*	1±0,2

*Примечание:* среднее значение ± стандартная ошибка; различие между группами на уровне \* p<0,05; \*\* - p<0,01; достоверность отличий определялась с помощью непараметрического критерия Уилкоксона

Полученные результаты математического анализа ВСР после вестибулярных раздражений свидетельствуют о различных реакциях у спортсменок по двум выделенным группам. В сравнении с состоянием покоя, у спортсменок в условиях вестибулярных раздражений мощности всех периодических компонент ВСР практически не изменились, за исключением достоверного ( $p < 0,05$ ) увеличения мощности спектра в области высокочастотного компонента (HF), что привело к смещению вегетативного баланса в область преобладания парасимпатических влияний у спортсменок второй группы и тенденции к нормализации вегетативного баланса у спортсменок первой.

Об этом свидетельствуют показатели (LF/HF), которые у спортсменок второй группы меньше 1, а у первой снизились от 1,58 до 1,17. На снижение активности регуляторных систем организма у спортсменок в процессе адаптации указывают и изменения показателей адекватности процессов регуляции (ПАПР) и активности регуляторных систем (ПАРС). После вестибулярных раздражений ПАПР в целом по группе снизился с 64 до 54, а ПАРС с 5 до 2. Вследствие этого наметилась тенденция к снижению напряжения функционирования регуляторных систем. Так ИН после вестибулярных раздражений снизился в целом по группе со 179 до 162. Однако у спортсменок первой группы сохранилась относительно высокая напряженность адаптационных процессов. Это подтверждают достоверно ( $p < 0,01$ ) более высокие значения ИН, ПАПР и ПАРС первой группы спортсменок (табл. 1). Более высокие значения, чем у спортсменок второй группы значения АМо, ИВР, ВПР, LF/HF указывают на сохранение преобладания в вегетативном балансе у данных спортсменок симпатических влияний.

В то же время, более низкие ( $p < 0,01$ ), чем в целом по группе, значения VLF и  $TP_{0,40}$  и более высокие ( $p < 0,01$ ) значения VHF свидетельствуют о снижении у данных спортсменок центральных влияний на регуляцию сердечного ритма и активизацию в условиях вестибулярных раздражений автономных звеньев регуляторной системы, более быстрых, но менее устойчивых к влиянию внешних факторов.

Проведенный факторный анализ показателей ВСР у обследованных спортсменок позволил выделить на уровне корреляции  $> 0,70$  пять факторов, описывающих 88,2% изменений в распределениях кардиоинтервалов в состоянии относительного покоя и в условиях вестибулярных раздражений (рис. 1, 2).

В состав имеющего наибольший вес первого фактора - фактора централизации регуляторных механизмов и симпатических влияний - входят VLF, АМо, которые характеризуют активность соответственно центрального контура регуляции, церебральных эрготропных влияний и симпатического отдела вегетативной нервной системы [5, 6].

Второй фактор – фактор вагусных влияний, содержит SDNN и HF, отражающих активность парасимпатического отдела вегетативной нервной системы. Третий фактор - фактор медленных волн или адаптационных механизмов сердечно-сосудистой системы входит LF. В четвертый фактор – фактор активности гуморального канала входят RRNN и Мо, характеризующие уровень функционирования синусового узла. Пятый фактор - фактор очень быстрых волн или фактор неустойчивых состояний содержит VHF, отражающий уровень

активности регуляторных систем организма, включающийся при неспособности других звеньев регуляторной системы удержать организм в устойчивом функциональном состоянии [7].

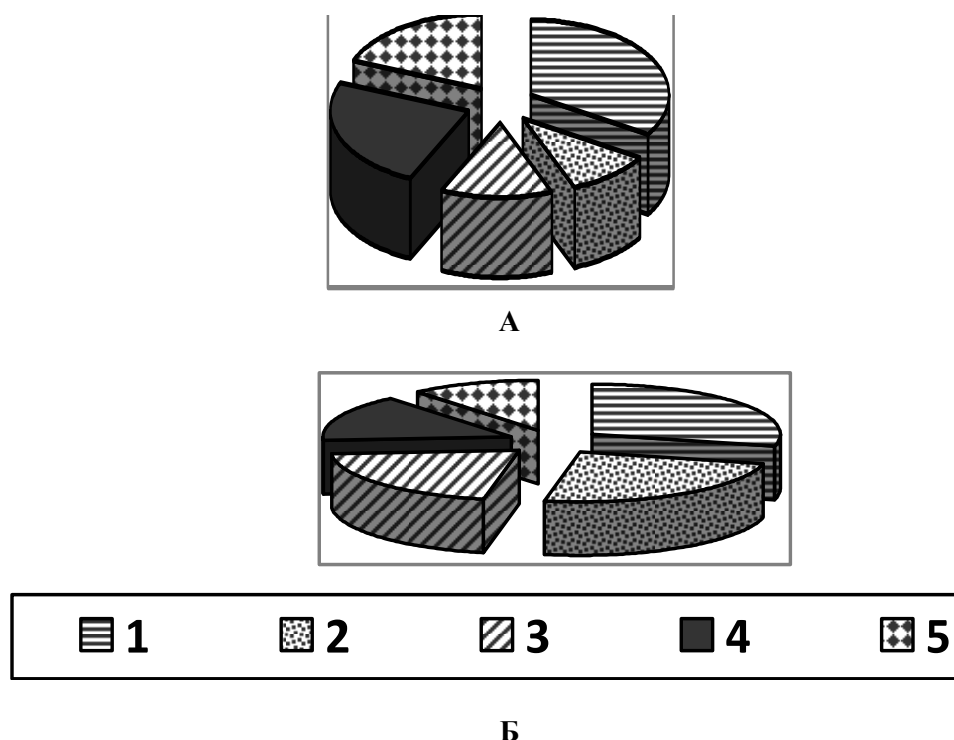


Рис. 1. Удельные веса факторов, определяющих состояние регуляторных систем организма у спортсменок в состоянии относительного покоя: А – первая группа; Б – вторая группа: 1- фактор центральной регуляции; 2- фактор вагусных влияний; 3- фактор активности сердечно-сосудистой системы; 4 - фактор гуморальной активности; 5 – фактор неустойчивых состояний.

В целом по всей группе состав этих факторов не изменился в процессе срочной адаптации к вестибулярным раздражениям, однако изменилось их процентное соотношение (рис. 1 и 2). Увеличился с 22% до 27% вес фактора вагусных влияний и с 12% до 16% фактора активности гуморального канала. Снизился с 19% до 11% вес фактора неустойчивых состояний. В тоже время увеличился с 13% до 20% вес фактора активности адаптационных механизмов, вес фактора централизации регуляторных механизмов практически не изменился. Это может свидетельствовать о незавершенности адаптации спортсменок к вестибулярным раздражениям.

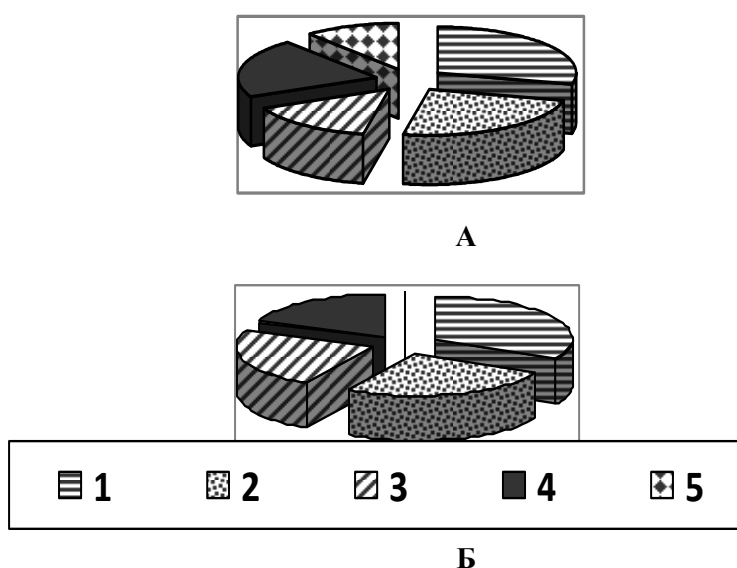


Рис. 2. Удельные веса факторов, определяющих состояние регуляторных систем организма у спортсменок в условиях вестибулярных раздражений: А – первая группа; Б – вторая группа: 1- фактор центральной регуляции; 2- фактор вагусных влияний; 3- фактор активности сердечно-сосудистой системы; 4 - фактор гуморальной активности; 5 – фактор неустойчивых состояний.

Факторный анализ показателей ВСР в условиях вестибулярных раздражений, выявил, что у спортсменок первой группы наблюдаются адаптивные изменения в соотношениях факторов, определяющих функциональное состояние регуляторных систем организма. По сравнению с состоянием покоя (рис. 1) снизился с 34% до 29% вес фактора централизации регуляторных процессов и с 19% до 11% вес фактора неустойчивых состояний, возрос с 10% до 24% вес фактора вагусных влияний (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о наличии у спортсменок данной группы адекватной адаптивности и меньшей цены напряженности функционирования регуляторных систем организма [8].

У спортсменок второй группы факторный анализ выделил самых весомых четыре фактора из пяти, определяющие функциональное состояние регуляторных систем организма спортсменок в условиях вестибулярных раздражений (рис. 2). Для этой группы характерно, что отсутствует фактор неустойчивых состояний, что является благоприятным симптомом [9] и свидетельствует о повышении висцеральной устойчивости в условиях «угрозы» потери равновесия. Однако сохранившиеся при этом высокие веса факторов централизации регуляторных механизмов (33%) и активности адаптационных механизмов сердечно-сосудистой системы (23%) указывают на гиперреактивность срочной адаптации к вестибулярным нагрузкам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основании анализа особенностей ВСР все обследованные спортсменки разделены на две группы. У спортсменок первой отмечается повышенная напряженность регуляторных процессов в организме, с преобладанием симпатических влияний. У спортсменок второй группы наблюдается сбалансированность симпатических и парасимпатических влияний и умеренное напряжение регуляторных систем организма.
2. Проведенный факторный анализ позволил выделить пять факторов, описывающих 88,2% изменений в распределениях кардиоинтервалов в состоянии относительного покоя и дал возможность определить структуру висцеральной устойчивости при вестибулярных раздражениях у спортсменок.
3. У спортсменок первой группы при вестибулярных раздражениях наблюдаются адекватные изменения в соотношениях факторов, определяющих функциональное состояние регуляторных систем организма, которые свидетельствуют о тенденции к устойчивости вегетативного баланса и менее выраженной напряженности функционирования регуляторных систем организма, однако присутствует фактор неустойчивых состояний.
4. У спортсменок второй группы отсутствует фактор неустойчивых состояний, что является благоприятным симптомом и свидетельствует о повышении устойчивости организма к вестибулярным раздражениям. Однако сохранившиеся при этом веса факторов централизации регуляторных механизмов и активности адаптационных механизмов сердечно-сосудистой системы указывают гиперреактивность срочной адаптации в связи с «угрозой» потери равновесия.
5. Полученные данные показывают, что вегетативная «цена» вестибулярной устойчивости спортсменок различна в своих компонентах механизмов регуляции ритма сердца.

## Список литературы

1. Платонов В.Н. Адаптация в спорте / В.Н.Платонов. – К.: Здоров'я, 1988. –216 с.
2. Платонов В.Н. Система подготовки спортсменов в олимпийском спорте. Общая теория и ее практические приложения / В.Н.Платонов – Киев: Олимпийская литература, 2004. – 808 с.
3. Дембо А.Г. Спортивная кардиология: Руководство для врачей / А.Г. Дембо, Э.В. Земцовский. – Л.: Медицина, 1989.-464с.
4. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов. – К., 2006. – 558 с.
5. Черкес Л.И. Факторы, определяющие функциональное состояние регуляторных систем организма у спортсменов на 10-12 сутки пребывания в условиях среднегорья / Л.И.Черкес, В.Н. Ильин и др. // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского. Симферполь.-2012, Т.25(64), №1.- С.244-252
6. Saltin B. Morphology, enzyme activities and buffer capacity in leg muscles of Kenyan and Scandinavian runners / B.Saltin, C.K.Kim, N. Terrados, H. Larsen, J.Svedenhag, C.Rolf // Scand. J. Med. Sci. Sports. – 1995. Vol. 5. – P. 222-230.
7. Wilmore J.H. Physiology of sport and exercise / J.H.Wilmore, D.L.Costill. – Champaign, Illinois: Human Kinetics, 2004. – 726 p.

8. Task Force of the European of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart Rate Variability. Standarts of Measurements, Physiological Interpretation, and Clinical Use // Circulation. –1996. – 93.–Р. 1043-1065.
9. Ильин В.Н. Применение теории ультрастабильных систем для оценки функционального состояния организма человека / В.Н. Ильин // УСиМ. – 2000. – N1. – С.14–19.

**Савіна К.Д. Вегетативна регуляція і функцій ний стан мінусового вузлу у висококваліфікованих спортсменок в умовах вестибулярних подразнень / К.Д. Савіна, Г.Д. Сышко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 161-169.**

Вивчено вплив вестибулярного подразнення на вегетативну регуляцію і функціональний стан синусного вузла у висококваліфікованих спортсменок. Обстежено 14 висококваліфікованих спортсменок, що спеціалізуються в бігу на 800м, 1500м, 3000с/п і 5000м. На підставі статистичного і факторного аналізу варіабельності серцевого ритму виявлені типологічні особливості функціонального стану синусного вузла, а також чинники, що визначають функціональний стан регуляторних систем вегетативної регуляції ритму серця в умовах спокою і вестибулярних подразнень. На підставі аналізу особливостей ВСР всі обстежені спортсменки розділені на дві групи. У спортсменок першою групи спостережали підвищену напруженість регуляторних процесів в організмі, з переважанням симпатичних впливи. У спортсменок другої групи спостерігається збалансованість симпатичних і парасимпатичних впливів і помірна напруга регуляторних систем організму. Проведений аналіз дозволив виділити п'ять чинників, що описують 88,2% змін в розподілах кардіоінтервалів в стані відносного спокою і дав можливість визначити структуру вісцелярної стійкості при вестибулярних подразненнях у спортсменок. У спортсменок першої групи при вестибулярних подразненнях спостерігаються адекватні зміни в співвідношеннях чинників, що визначають функціональний стан регуляторних систем організму, які свідчать про тенденцію до стійкості вегетативного балансу і менш вираженої напруженості функціонування регуляторних систем організму. У спортсменок другої групи відсутній чинник нестійких станів, що є сприятливим симптомом і свідчить про підвищення стійкості організму до вестибулярних роздратувань. Проте вага чинників централізації регуляторних механізмів і активності адаптаційних механізмів серцево-судинної системи, що збереглася при цьому, указує на гіперреактивність термінової адаптації до вестибулярних навантажень.

**Ключові слова:** вегетативна регуляція, кардіоритмографія, синусний вузол, спортсменки, вестибулярне подразнення.

## **VEGETATIVE ADJUSTING AND FUNCTIONAL BEING OF SINE KNOT AT HIGHLY SKILLED SPORTSWOMEN IN THE CONDITIONS OF VESTIBULAR IRRITATIONS**

*Savina K.D., Syshko G.D.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine  
E-mail: syshko@list.ru*

Research influence of vestibular irritation on the vegetative adjusting and functional being of sine knot at highly skilled sportswomen is studied. 14 highly skilled sportswomen specialized in at run on 800m, 1500m are inspected, 3000s/p and 5000m. On basis statistical and factor analysis of variability cardiac rhythm the tipologic features of the functional being of sine knot, and also factors determining the functional being of the regulator systems of the vegetative adjusting of rhythm of heart in the conditions of rest and vestibular irritations, are exposed. On basis analysis of the VSR features all inspected



sportswomen are parted on two groups. At sportswomen the promoted tension of regulator processes in an organism is marked the first, with predominance of simpatico influencing. The sportswomen of the second group have balanced of the simpatico and parasimpatico influencing and moderate tension of the regulator systems of organism. The conducted factor analysis allowed to select 5 factors describing 88,2% changes in distributing of cardio-interval in a state of relative rest and gave possibility to define the structure of visceral stability at the vestibular irritations at sportswomen. At the sportswomen of the first group at the vestibular irritations there are the adequate changes in correlations of factors, determining the functional being of the regulator systems of organism, which testify to the tendency to stability of vegetative balance and less expressed tension of functioning of the regulator systems of organism. At the sportswomen of the second group the factor of the unstable states is absent, that is a favorable symptom and testifies to the increase of stability of organism to the vestibular irritations. However much the weights of factors of centralization of regulator mechanisms and activity of adaptation mechanisms of the cardio-vessels system saved here specify hyper- reactivity of urgent adaptation to the vestibular loadings.

**Key words:** vegetative adjusting, cardio-rhythmo-graphic, sine knot, sportswomen, vestibular irritation.

#### References

1. Platonov V.N. Adaptaziy v sporte [ Adaptation in Sport].-Kiev,1988.-216p.
2. Platonov V.N. Sistema podgotovki sportsmenjv v olimpiyskom sporte [Sistem of training sportsmen in Olympic Sport ] Kiev: Olympic literature, 2004.-808p.
3. Dembo A.G. Zemcovski E.V. Sportivnay kardiologiy [ Sport cardiology ]. – L.: Medicine, 1989,-446p.
4. Antamonov M. U. Matematicheskay obrabotka I analiz medico-biologicheskikh danyh [Mathematical treatment and medico-biologic data analysis]. – K, 2006.-558p.
5. Cherkes L.I. Faktory opredelyushie funkzionalnoe sostoynie regulytornyh system organizma u sportsmenov [Factors determining functional being of the regulator systems of organism at sportsmen]. Scientific messages Taurida National V.I. Vernadsky University. Simferjpol.- 2012, V.25(64),№.1-P.244-252
6. Saltin B. Morphology, enzyme activities and buffer capacity in leg muscles of Kenyan and Scandinavian runners / B.Saltin, C.K.Kim, N. Terrados, H. Larsen, J.Svedenhag, C.Rolf // Scand. J. Med. Sci. Sports. – 1995. Vol. 5. – P. 222-230.
7. Wilmore J.H. Physiology of sport and exercise / J.H.Wilmore, D.L.Costill. – Champaign, Illinois: Human Kinetics, 2004. – 726 p.
8. Task Force of the European of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart Rate Variability. Standarts of Measurements, Physiological Interpretation, and Clinical Use// Circulation. –1996. – 93.–P. 1043-1065.
9. Ilin V.N. Primenenie teorii yltrastabilnyh system dly ozenki funkzionalnogo sostoyniy organizma cheloveka [Application of theory of the ultra-stability systems for determination of the functional being of organism of man]. YSiM.-2000. - №1.- P.14-19

*Поступила в редакцию 27.01.2014 г.*

УДК 582.998.16

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *ARTEMISIA VULGARIS* L.

Симагина Н.О., Изюмская А.А.

Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: nsimagina@list.ru

В статье рассматриваются биологические особенности *Artemisia vulgaris* L. Представлены данные фенологического анализа, морфометрических параметров растения, особенности распространения пыльцы в пределах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L. У генеративных особей выявлено два пика цветения, которые обуславливают обострение аллергических заболеваний. Проанализированы морфометрические параметры пыльцы в различных горизонтах воздуха в пределах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L. Выявлена корреляционная зависимость размеров пыльцевых зерен от высоты распространения их в воздушном пространстве. Установлено, что в пределах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L. с увеличением расстояния от особи уменьшается количество пыльцы на 1 см<sup>2</sup> в воздухе. Выявлена отрицательная коррелятивная связь градиента удаления и количества пыльцы.  
**Ключевые слова:** *Artemisia vulgaris* L., пыльца, фитогенное поле.

### ВВЕДЕНИЕ

Важнейший аллерген растительного происхождения – пыльца ветроопыляемых растений. Аллергические заболевания, вызываемые пыльцой растений, называются поллинозами. Заболевания имеют четко повторяющуюся сезонность, совпадающую с периодом цветения некоторых растений. В разных регионах поллинозами страдают от 0,1 до 5% населения. На сенсбилизацию населения к пыльце в значительной мере влияют региональные особенности. У детей аллергические заболевания представлены шире, чем у взрослых. Самой частой причиной заболеваемости поллинозами являются сорные травы, такие как полынь и амброзия, что связано с наибольшей степенью аллергенности их пыльцы. На втором месте – злаковые травы. Наименьший процент больных поллинозом страдает от пыльцы деревьев. Одним из самых сильных аллергенов является пыльца рода *Artemisia* [1-5].

В Крыму ежегодно 20-30% населения страдает от аллергических реакций на пыльцу, поэтому исследование растений, вызывающих аллергию является актуальным. К настоящему времени хорошо изучены аллергизирующие свойства и компоненты пыльцы *Artemisia vulgaris* L. Из пыльцы полыни выделены аллергенно-активные фракции, изучена морфология пыльцы *Artemisia vulgaris* L. [6-8]. Целью исследования являлось изучение биологических особенностей *Artemisia vulgaris* L. В задачи исследования входило: изучение возрастной структуры популяции *Artemisia vulgaris* L., определение фенологического спектра генеративно-зрелых особей популяции *Artemisia vulgaris* L., установление морфометрических параметров *Artemisia vulgaris* L. в течение вегетационного периода, выявление

особенностей распространения пыльцы в пределах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L., анализ морфометрических параметров пыльцы *Artemisia vulgaris* L.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в окрестностях пос. Вавилова в береговой зоне р. Бельбек в вегетационный период 2012г., 2013г., а также в лабораториях кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Морфометрические параметры особей *Artemisia vulgaris* L. измерялись каждые 20 дней в течение вегетационного периода. Анализировалось высота растений, количество листьев, количество соцветий и количество цветков в них. Полученные результаты обрабатывались стандартными методами описательной математической статистики.

В ценопопуляции согласно качественным морфологическим признакам были отобраны 10 особей в генеративно-зрелом возрастном состоянии. В пределах фитогенного поля каждой особи, в четырех направлениях света (север, юг, запад, восток) устанавливали основы с предметными стеклами для отбора пыльцы, на расстоянии – 50, 100, 150 см., и на высоте – 30, 50, 100 см. Повторность сбора материала в вегетационный сезон двух кратная. В лабораторных условиях учитывали общее количество пыльцевых зерен на 1 см<sup>2</sup>. Размеры пыльцевых зерен определялись с использованием винтового окулярмикрометра. Результаты обрабатывались методами математической статистики [9].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемой ассоциации доминантом являлась *Artemisia vulgaris* (29 особей), содоминантом была *Festuca rupicola* (12 особей), так же в качестве сопутствующих видов были представлены *Poa pratensis* (11 особей), *Elytrigia repens* (7 особей), *Achillea setacea* (5 особей), *Fragaria compestris* (7 особей). Установлено, что ассоциация по доминантному принципу – *Artemisieto-festucosum* (Рис.1).

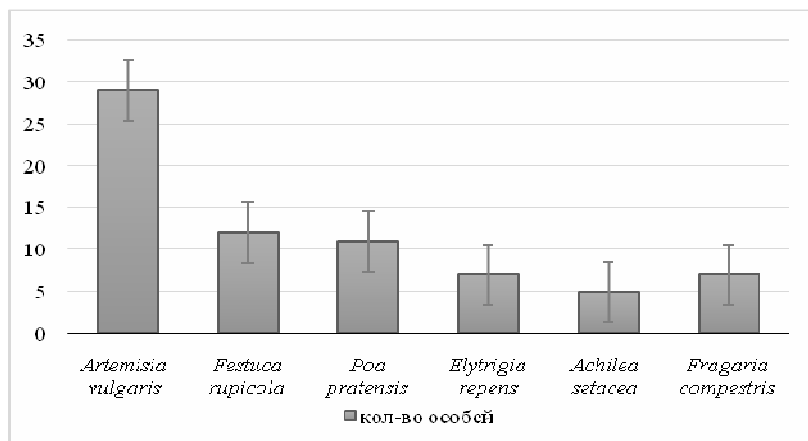


Рис. 1. Флористический спектр ассоциации Artemisieto - festucosum.

В ходе исследований был изучен возрастной спектр ценопопуляции. Всего было выявлено 29 особей *Artemisia vulgaris* L., из которых 12 находилось в вегетативном и 17 в генеративном возрастном состоянии. Особи прегенеративной фазы развития дифференцировали на: проростки (р) и ювенильные особи (j). Для проростков характерно наличие смешанного питания за счет запасных веществ семени и собственной ассимиляции. Для растений этого возрастного состояния характерно наличие зародышевых структур: семядолей, начавшего расти зародышевого корня и, как правило, одноосного побега с небольшими листьями, имеющими часто более простую форму, чем у взрослых растений. Ювенильные растения переходят к самостоятельному питанию. У них отсутствуют семядоли, но организация еще проста, часто сохраняется одноосность и листья иной формы и меньшего размера, чем у взрослых, простые, цельнокрайние. В данной ценопопуляции нам не удалось в годы наблюдений обнаружить особи имматурного и виргинильного возрастных состояний. Особи генеративной фазы подразделялись на молодые (g1) и зрелые (g2). Молодые генеративные особи характеризуются меньшим размером соцветия и цветоноса, заканчивается формирование генеративных структур. Зрелые генеративные особи характеризуются окончательным становлением жизненной формы: максимальным числом генеративных процессов, большим количеством и размером соцветий, чем у молодых генеративных особей. Для определения генеративных фаз использовались следующие диагностические признаки: количество листьев, количество цветков в соцветии, длина соцветия. В данной ценопопуляции особи прегенеративного и генеративного возрастных состояний имеют достаточное развитие, стадии постгенеративного периода (субсенильных и сенильных возрастных состояний) представлены единичными особями (Рис.2).

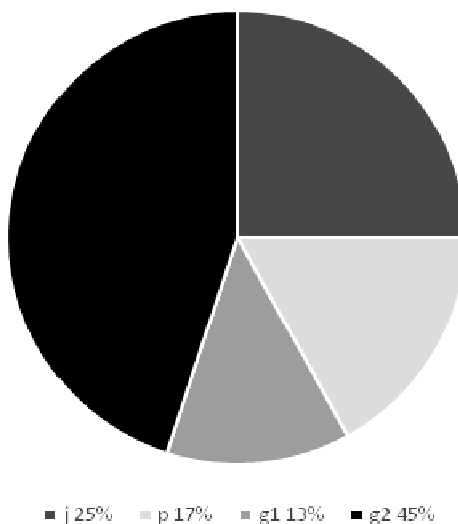
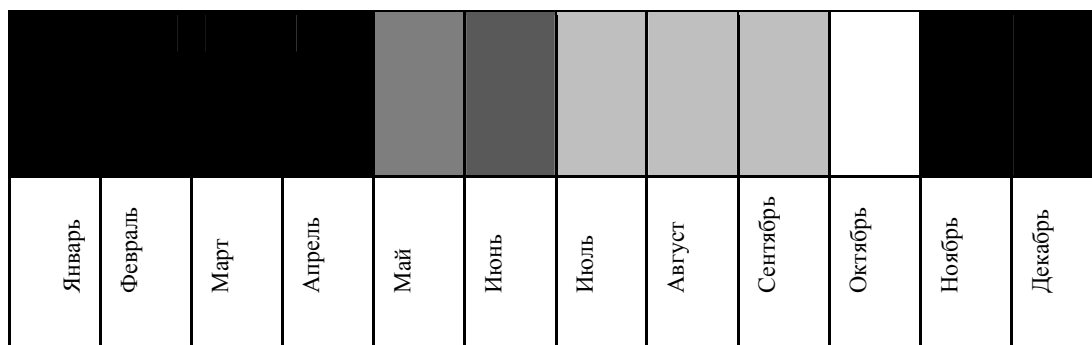


Рис. 2. Онтогенетические состояния *Artemisia vulgaris* L.

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ *ARTEMISIA VULGARIS* L.

Установлено, что основные фенологические фазы *Artemisia vulgaris* L. в окрестностях пос. Вавилова в береговой зоне р. Бельбек проходили в стандартные периоды, указанные и в других регионах.

Период покоя у *Artemisia vulgaris* L. длится с ноября до марта. Vegetация начинается в апреле и продолжается в течение мая. Формирование соцветий *Artemisia vulgaris* L. начинается в конце июня, а период цветения продолжается июль, август, сентябрь. Плодоношение отмечено в сентябре – октябре (Рис.3).



- период покоя;
- период вегетативного роста;
- формирование соцветий;
- цветение растения;
- плодоношение;

Рис.3. Фенологический спектр *Artemisia vulgaris* L.

Морфометрические параметры измеряли в основные фенологические фазы. В исследуемой популяции средняя высота растений варьировала в пределах 0,5 – 2,0 м. Стебли облиствлены по всей высоте, прямостоячие, буроватые с фиолетовым оттенком, в сечении угловато- ребристый.

Количество листьев варьировало у особей различных возрастных состояний от 20 до 60 шт. В максимальном количестве представлены у особей в генеративно-зрелом возрастном состоянии. Листья мягкие дважды или трижды перисто-рассечённые, зелёного цвета, длиной 5—20 см, сверху светло-зелёные, голые или слабо опушённые, снизу густоопушённые. Нижняя часть листьев по окраске резко

отличается от верхней. Конечные сегменты листьев 2,5—9 мм шириной. Хорошо заметны несколько пар прилистников у основания черешка.

Цветки мелкие, многочисленные, их количество варьировало в зависимости от возрастного состояния растения от 74 до 108 штук, желтые или коричневые. Корзинки собраны в рыхлое метелковидное соцветие. Ось корзинок 0,5 – 1 мм длиной. Соцветия, в количестве 18- 36 шт., состоят из трубчатых обоеполых цветков, краевые цветки - однополые пестичные. В течение онтогенеза отмечалось закономерное увеличение морфометрических параметров. При переходе в возрастное состояние генеративного периода онтогенеза количество цветков и соцветий увеличивалось.

Таблица 1.

**Морфометрические параметры вегетативных и генеративных органов *Artemisia vulgaris* L.**

Возрастное состояние	Длина побегов, см $x \pm Sx$	Длина соцветий, см $x \pm Sx$	Кол-во листьев, шт., $x \pm Sx$	Кол-во соцветий, шт., $x \pm Sx$	Кол-во цветков в соцв., шт., $x \pm Sx$
Генеративно-молодое	68,1±1,4	6,1±0,2	31,4±1,5	18,6±1,1	74,3±0,9
Генеративно-зрелое	104,1 ± 1,7	9,4 ± 0,2	43,2 ± 3,4	34,1 ± 1,2	108,1 ± 1,4

Наиболее аллергически опасным периодом является период цветения растения, который повторяется дважды за время вегетации растения. Формирование пыльцы и анемофилия обуславливают риск аллергических заболеваний .

Пыльца сложноцветных весьма разнообразна по размерам и внешнему виду. Пыльца *Artemisia vulgaris* L. резко отличается от остальных, так как растение является ветроопыляемым, поэтому его пыльца лишена крупных шипов. Пыльца трёхбороздная, трёхпоровая с толстой двухслойной экзиной, резко сужающейся в области пор. Размеры пыльцы варьируют от 16 до 50 мкм.

Выявлена отрицательная коррелятивная зависимость размеров пыльцевых зерен от высоты распространения их в воздушном пространстве. Коэффициент корреляции составляет  $-0,78 \pm 0,04$ . Установлено, что на высоте 30 см аккумулируются пыльцевые зерна большего размера, что обусловлено их большей массой. Согласно анализу морфометрических параметров пыльцевых зерен в течение вегетации установлено, что во второй период цветения *Artemisia vulgaris* L. диаметр пыльцевых зерен был на 8 % больше, чем в первый период (Рис.4).

В ходе исследований установлено, что в пределах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L. с увеличением расстояния от особи уменьшается количество пыльцы на  $1 \text{ см}^2$  в воздухе. На градиенте удаления данный показатель снижается в 1,6 раза. Выявлена отрицательная коррелятивная связь градиента удаления и количества пыльцы. Коэффициент корреляции равен  $r = -0,23 \pm 0,02$ . В результате исследований

установлено, что с увеличением высоты основы количество пыльцы уменьшается в 1,7 раза.

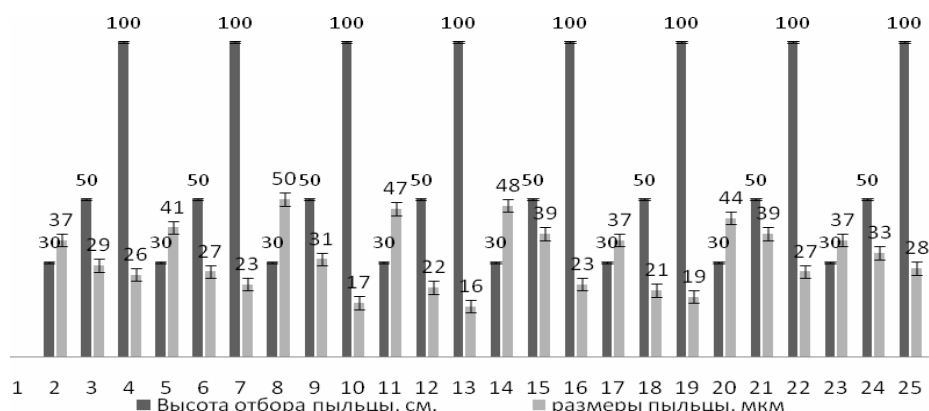


Рис.4. Зависимость размеров пыльцевых зерен от высоты распространения в воздушном пространстве.

Распространение пыльцы в пределах фитогенного поля по сторонам света обусловлено особенностями формирования соцветия и метеорологическими условиями в течение вегетационного периода. Согласно результатам наблюдений в первую фазу цветения наибольшее количество пыльцы на 1 см<sup>2</sup> было зафиксировано в восточном направлении, а во вторую фазу в западном направлении. Данный показатель согласуется со сведениями метеорологических служб.

Выявлено, что во вторую фазу цветения количество пыльцы в воздухе в пределах фитогенного поля в 2,1 раз больше, по сравнению с первым периодом. Это свидетельствует о высокой аллергенной опасности в данный период, что обусловлено формированием дополнительных соцветий.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучена возрастная структура популяции *A. vulgaris* L.
2. Установлено, что *A. vulgaris* L. проходит фенологические фазы развития в окрестностях пос. Вавилова в береговой зоне р. Бельбек в стандартные периоды.
3. Определены морфометрические показатели вегетативных и генеративных структур *A. vulgaris* L.
4. Установлена отрицательная коррелятивная связь аккумуляции пыльцы на 1 см<sup>2</sup> с увеличением расстояния от особей ( $r = -0,23 \pm 0,02$ ).
5. Выявлена зависимость размеров пыльцевых зерен и высоты распространения их в воздушном пространстве. ( $r = -0,78 \pm 0,04$ ).

6. Установлено, что распространение пыльцы в пределах фитогенного поля *A. vulgaris* L. по сторонам света обусловлено метеорологическими условиями в течение вегетационного периода.

#### Список литературы

1. Judžientienė A, Buzelytė J. Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from North Lithuania// СЕМІОА. 2006. Т. 17. № 1. Р. 12–15
2. Растительные ресурсы СССР. Сем. Сложноцветные. – Л.: Наука, 1993.- Растительные ресурсы СССР) Т.7.- 360р.
3. Березовская Т.П., Амелъченко В.П., Красноборов И.М., и др. Полыни Сибири: Систематика, экология, химия, хемосистематика, перспективы использования.- Новосибирск: Наука, 1991.- 540 с.
4. Ханина М.А., Серых Е.А., Березовская Т.П. Кумарины *Artemisia vulgaris* L.// Хим. природ. Соедин. 1986. - № 1. - С. 110.
5. Адекенов С.М., Куприянов А.Н., Кагарлицкий А.Д. Структурные особенности сесквитерпеновых лактонов и систематика рода *Artemisia* L. // Вестн. АН. Каз. ССР. - 1986.- № 10.- С. 49-61.
6. Faegri K., Iversen J. Textbook of Pollen Analysis / K. Faegri, J. Iversen.– The Blackburn Press.-1989. – P. 328.
7. Skvarla, J.J. and Turner, B.L. 1966. Systematic implications from electron microscopic studies of Compositae pollen - a review. *Annals Missouri Botanical Garden* 53: 220-256
8. Stix, E. 1960. Pollenmorphologische untersuchungen an Compositen. *Grana Palynological* 2: 41-104
9. Лакин Т.Ф. Биометрия / Лакин Т.Ф. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.

**Симагина Н.О. Біологічні особливості *Artemisia vulgaris* L. / Н.О. Симагіна, Г.О. Ізюмська // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 170-177.**

У статті розглядаються біологічні особливості *Artemisia vulgaris* L. Представлені дані фенологічного аналізу, морфометричних параметрів рослини, особливості поширення пилку в межах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L. У генеративних особин виявлено два піки цвітіння, які провокують загострення алергічних захворювань. Проаналізовано морфометричні параметри пилку в різних горизонтах повітря в межах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L. Виявлено кореляційна залежність розмірів пилкових зерен від висоти поширення їх у повітряному просторі. Встановлено, що в межах фитогенного поля *Artemisia vulgaris* L., зі збільшенням відстані від особини зменшується кількість пилку на 1 см<sup>2</sup> у повітрі. Виявлен негативний корелятивний зв'язок градієнта видалення та кількості пилку.

**Ключові слова:** *Artemisia vulgaris* L., пилко, фитогенне поле.

#### BIOLOGICAL PECULIARITIES OF ARTEMISIA VULGARIS L.

*Simagin N.O., Izyumskaya A.A.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine  
E-mail: nsimagina@list.ru*

The most important allergen of plant is pollen of wind-pollinated plants. Now it is well researched allergenic properties and components of pollen *Artemisia vulgaris* L. From artemisia pollen the active allergens fractions were allocated, pollen morphology was studied. The studies were conducted in the vicinity of the v. Vavilov in the coastal zone r. Bel'bek during the vegetative season 2012, 2013. and in the laboratories of the Department of Botany and Plant Physiology and Biotechnology of Taurida National V.I. Vernadsky University



It was revealed that in the studied associations *Artemisia vulgaris* is dominant (29 individuals) codominants *Festuca rupicola* ( 12 individuals), as well as associated species were represented: *Poa pratensis* (11 individuals ), *Elytrigia repens* (7 individuals ), *Achillea setacea* (5 individuals), *Fragaria compestris* (7 individuals). It was revealed that association for the dominant principle - *Artemisieta-festucosum*. The population age structure was studied. 29 individuals *Artemisia vulgaris* L. were identified: 12 were in the vegetative and 17 in generative age state.

It was established that *A. vulgaris* L. passes phenological phases of development in the vicinity of the v. Vavilov in the coastal zone r.Bel'bek in standard periods. Period of rest at *Artemisia vulgaris* L. lasts from November to March. Its vegetation begins in April- May. The formation of inflorescences *Artemisia vulgaris* L. begins in late June, and the flowering period lasts July, August , September. Fruiting - September - October Morphometric indices of vegetative and generative structures *A. vulgaris* L. were determined. In generative individuals two peaks of flowering were revealed, in these periods the allergic diseases are provoked by *A. vulgaris* L . Morphometric parameters of pollen in different levels of air within phytogenic field *Artemisia vulgaris* L. were analyzed. The dependence of the pollen grains size from the height distribution of their airspace were revealed. The correlation of the pollen grains size of and height distribution of their airspace ( $R = -0,78 \pm 0,04$ ) were determined. It was established that within the phytogenic field of *Artemisia vulgaris* L. with increasing distance from the individual the amount of pollen in the air  $1\text{cm}^2$  is reduced. The negative correlation of accumulation of pollen per  $1\text{cm}^2$  with increasing distance from the individuals ( $r = - 0,23 \pm 0,02$ ) was established. It was revealed that the spread of pollen within phytogenic field *Artemisia vulgaris* L. to the cardinal is caused by weather conditions during the growing season.

**Key words:** *Artemisia vulgaris* L., pollen, phytogenic field.

#### References

1. Judžentienė A, Buzelytė J. Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from North Lithuania // CHEMIJA. 2006 . Т. 17. Nr. 1. P. 12-15
2. Plant Resources of the USSR. Sem. Asteraceae . - Leningrad: Nauka , 1993 . - Plant Resources of the USSR ) V.7 . - 360p.
3. Berezovskaja TP, Amel'chenko VP Krasnoborov IM , etc. Wormwood Siberia : Systematics , ecology, chemistry , chemosystematics , prospects. - Novosibirsk : Nauka, 1991 . - 540 .
4. Khanin MA, EA Grey , Berezovskaja TP Coumarins *Artemisia vulgaris* L. // Chem. natures . Connected . 1986 . - № 1. - S. 110.
5. Adekenov SM, Kupriyanov A.N., Kagarlitskiy A.D. Structural features of sesquiterpene lactones and systematics of the genus *Artemisia* L. / Vestn. Academy of Sciences . Kaz . SSR. - 1986 . - № 10 . - S. 49-61 .
6. Faegri K., Iversen J. Textbook of Pollen Analysis - The Blackburn Press.- 1989 . - P. 328.
7. Skvarla, J.J. and Turner, B.L. 1966 . Systematic implications from electron microscopic studies of Compositae pollen - a review. Annals Missouri Botanical Garden 53 : 220-256
8. Stix, E. 1960 . Pollenmorphologische untersuchungen an Compositen. Grana Palynological 2 : 41-104
9. Lakin TF Biometrics - Moscow: Higher School , 1980 . - 293 .

Поступила в редакцию 17.01.2014 г.

**УДК 627:574(262.5)**

## **НАКОПИЧЕННЯ НАФТОВИХ ВУГЛЕВОДНІВ МАСОВИМИ ВИДАМИ ЧОРНОМОРЬСЬКИХ МОЛЮСКІВ В УМОВАХ ПОРТОВИХ АКВАТОРІЙ**

*Соловійова О.В., Тихонова О.А.*

*Інститут біології південних морів НАН України, Севастополь, Україна  
E-mail: kozl\_ya\_oly@mail.ru*

Проведено порівняльний аналіз процесів накопичення нафтових вуглеводнів масовими видами моллюсків прибережної зони моря та їхньої участі в процесах самоочищення портів акваторій. Отриманий склад вуглеводнів свідчить про присутність у моллюсках як автохтонних так і алохтонних вуглеводнів. Досліджені моллюски приймають активну участь в їх трансформації і мають різну здібність к їх накопиченню, про що свідчить отриманий діапазон n-алканів – найширший у абри (до C<sub>36</sub>) і майже однаковий у насаріусів і мідій (до C<sub>23</sub> і C<sub>24</sub> відповідно). Моллюски, що мешкають на досліджених гідротехнічних спорудах, витягують із морської води значну кількість (3,1 т/р) нафтових вуглеводнів.

**Ключові слова:** портові акваторії, гідротехнічні споруди, прибережна зона, нафтові вуглеводні, самоочищення, макрзообентос.

### **ВСТУП**

У відповідності зі стратегічним планом дій по охороні Чорного моря (1996) серед основних видів антропогенного впливу виділені: забруднення моря біогенними речовинами, бактеріальне й нафтове забруднення.

Нафта та нафтопродукти, що потрапили в поверхневі води вступають у загальний ланцюг складних і мало досліджених по тривалості процесів (у тому числі і переробка фільтраторами), у результаті яких вони втрачають плавучість, осаджуються на дно і накопичуються у донних осадах, де відбувається їх подальше перетворення вже за участю донної біоти. Частіше ці компоненти концентруються поблизу гідротехнічних споруд різного функціонального призначення. Берегозахисні гідротехнічні конструкції, у випадку забезпечення їхньої біопозитивності, можуть виступати повними аналогами штучних рифів і здатні суттєво поліпшувати якість водного середовища за рахунок інтенсифікації процесів природного самоочищення [1–4]. Найбільший вклад в ці процеси вносить мікробіальне угруповання, а також масові види моллюсків [5, 6]. Якщо ролі мідій, які в умовах севастопольських бухт створюють щільні поселення на цих спорудах, у процесі трансформації нафтових вуглеводнів приділено певну увагу, то інформації про перетворення цих речовин такими масовими і достатньо стійкими до нафтового забруднення мешканцями морських ґрунтів як *A. segmentum* та *N. reticulatus* або відсутня або її замало.

Тому, метою роботи є оцінка ролі масових видів молюсків штучних субстратів різного типу і рихлих ґрунтів в процесах самоочищення в прибережній зоні моря.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом дослідження були проби обростання (із них відбирались мідії – *Mytillus galloprovincialis* Lam. та мітілястери – *Mytelaster lineatus* Gmel.), зібрані з поверхні гідротехнічних споруд севастопольського узбережжя, у період з 2004 по 2010 рр., а також проби макрозообентосу, зокрема моллюсків абра – *Abra segmentum* (Récluz, 1843), насаріус – *Nassarius reticulatus* (L., 1758), і донних осадів, відібраних у севастопольських бухтах у період з 2006 по 2008 рр. Було досліджено мітілідне обростання південного молу Севастопольської бухти; східного молу, що обмежує Камишову бухту зі сторони мису Східний; підводної частини набережної Севастопольської бухти на відріжку між мисами Миколаївським та Кришталевим.

Проби бентосних молюсків і донних осадів відбирали на 12 станціях б. Севастопольської з глибин від 7 до 17 м у рамках багаторічного моніторингу відділу морської санітарної гідробіології у 2006 р., в б. Стрілецькій - щомісяця протягом 2008 р. Проби відбирали в трьох повторностях дночерпаком Петерсена з площею захвату 0,038 м<sup>2</sup>. Молюски цілком готувалися попередньо для хімічного аналізу по [7]. Для отримання усереднених результатів в аналізі використовували всіх відібраних молюсків представлених розмірних груп (для абри від 8 до 20 мм, для насаріуса від 18 до 25 мм, для мітілід відповідні дані брали з літературних джерел [8, 9, 10]). Кількість нафтових вуглеводнів (НВ) визначалась методом інфрачервоної спектроскопії (ІЧ) по [11], нормальних алканів – газової хроматографії [12].

Оцінка участі мідій і мітілястерів у трансформації потоків НВ проводилася аналогічно до зроблених раніше розрахунків [8], коли приймалося, що моллюски затримують біля половини нафти що знаходиться у воді [10]. Передбачалося, що мітілястери взаємодіють з НВ подібно мідіям. Сумарний потік НВ на молах розраховувався за середньою чисельністю й розмірним складом молюсків на цих спорудах, які дозволили розрахувати по [13, 14] об'єми води, що фільтрують мітіліди. Користуючись інформацією про концентрацію НВ в воді на різних горизонтах глибин в районі вказаних гідротехнічних споруд [15], а для районів, для яких така інформація відсутня - приймали концентрацію НВ рівною ПДК=0.05 мг/л [16], було зроблено оцінку кількості нафти, що затримують мідії та мітілястери.

Для статистичної обробки матеріалу використовувався однофакторний дисперсійний аналіз (перевірка вірогідності розходження двох вибірок проводилася за критерієм Фішера при  $\alpha=0,05$ ), кореляційний аналіз.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Численні лабораторні дослідження показали, що водні організми можуть накопичувати нафтові вуглеводні (НВ) із морської води, з донних відкладень, а також із харчових об'єктів. За результатами наших досліджень визначено також, що розподіл НВ в донних осадах [7] відповідає розподілу НВ у бентосних організмах Севастопольської бухти: мінімальні величини – в її вершині (середня концентрація

становить  $9,8 \text{ мг} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$  пов.-сух. реч-ни), максимальні – в центральній частині (середня концентрація –  $50,4 \text{ мг} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$  пов.-сух. реч-ни). При цьому на виході з бухти їх вміст близький до значень центральної частини (в середньому –  $43,6 \text{ мг} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$  пов.-сух. реч-ни).

При цьому частина з них потрапляє в мантийну рідину молюска, а решта розподіляється по тканинах і органах. Тому нами було проведено дослідження метано-нафтової фракції НВ в мантийній рідині абри, а також проаналізовано аналогічні данні про мідії.

У літературі було відзначено, що у мідій, зібраних як в забрудненій акваторії, так і в чистій акваторії, нормальні алкани не виявлені [9], тоді як за нашими даними, в мантийній рідині абри зафіксовані н-алкани в діапазоні  $C_{10}$ - $C_{18}$  в 100 % проб. Аналогічні дані були отримані нами і для асцидій, відібраних одноразово з системи гідробіологічного очищення вод в акваторії Нафтогавані (Севастопольська бухта). Виявлений діапазон  $C_{11}$ - $C_{18}$  відповідає діапазону нафтопродуктів, що потрапляють в акваторію що досліджена [17].

Відсутність же нормальних алканів в мантийній рідині мідій може бути пов'язано або з їх малими кількостями, які не були зафіксовані приладом, що використовували для аналізу, або з летючістю легкої фракції вуглеводнів. Так, в експериментальних умовах при додаванні дизельного палива в морську воду в акваріум з мідіями, у молюсків, відібраних як в чистій, так і в забрудненій акваторії були зафіксовані вуглеводні з низькою температурою кипіння ( $C_{10}$ - $C_{12}$ ). При цьому концентрація н-алканів даного діапазону в мантийній рідині мідій з чистої акваторії після їх витримування в дизельному паливі на протязі доби була вище, ніж в мантийній рідині мідій із забрудненої акваторії. В мантийній рідині абри, як було вже вказано раніше, вуглеводні  $C_{10}$ ,  $C_{11}$ ,  $C_{12}$  відмічені у 100 % проб, тоді як  $C_9$  – у 60 %, а октан  $C_8$  – отримано на одній хроматограмі, при цьому його кількість була максимальною серед усіх визначених вуглеводнів. Їхня присутність в пробах морських гідробіонтів може свідчити про недавнє потраплення свіжої нафти, оскільки вона, зазнавши впливу зовнішніх факторів, протягом одного – двох днів втрачає легколетучі компоненти ( $C_8$ - $C_{10}$ ) [17].

Розраховані нами характеристики розподілу н-алканів в мантийній рідині *A. segmentum* показують, що відношення концентрацій н-алканів з непарним і парним числом атомів С у мантийній рідині *A. segmentum* не перевищує 1,5, а в 46% випадків – менше 1. Оскільки відомо, що для незабруднених проб цей показник перевищує 2,0, то отриманий нами свідчить про забрудненість проби нафтопродуктами [17].

Найбільш широкий діапазон нормальних алканів відзначено в абрах (зафіксовані н-алкани до  $C_{36}$ ), тоді як у насаріуса найменший діапазон – до  $C_{23}$ . Що стосується мідій, то раніше в літературних джерелах [9] вказувалося, що найширший діапазон н-алканів від  $C_{12}$  до  $C_{24}$ , відзначений у даного виду молюсків із забрудненої акваторії, практично відповідає виявленому діапазону н-алканів у насаріуса.

У деяких пробах були відсутні н-алкани з  $C_{13}$  і  $C_{17}$ , а також прописувався ізомер  $C_{14}$ . Забруднені проби НВ абри і насаріуса характеризувалися також домінуванням

вуглеводнів з парним числом атомів вуглецю  $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$ . Однією з ознак нафтового забруднення досліджених проб є наявність на хроматограмах нерозкладного фону і низький коефіцієнт СРІ [10], який складає в середньому для абри, насаріуса, мантийної рідини абри 0,48, 0,85, 0,82 відповідно.

Що стосується передачі нафтових вуглеводнів по харчовому ланцюгу (ще одного способу переробки і відповідно трансформації нафтових вуглеводнів), то в лабораторних умовах встановлено [18], що суттєвої різниці у вмісті нафтопродуктів до і після годування абрами в організмах насаріусів-хижаків не виявлено. Однак, спостерігалось збільшення концентрації легких вуглеводнів  $C_9$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$  (концентрація  $C_{11}$  не змінилася) і зниження вмісту більш важких вуглеводнів  $C_{14}$ - $C_{16}$ .

Маючи дані про якісну трансформацію НВ моллюсками, можна переходити до потоків НВ. Оцінка кількості бентосних моллюсків, завдяки їх плямистому розподілу є непростю задачею, тому в цієї роботі обмежимося розрахунками, пов'язаними з мітілідними моллюсками гідротехнічних споруд, поселення яких досліджено нами більш детально.

Кількісний аспект потоків НВ можна простежити, використовуючи отримані раніше дані про характер мітілідного обростання великих гідротехнічних споруд Севастопольської акваторії [14]. Для більшої ясності наведемо деякі цифри. Інтенсивність потоків НВ на бетонних конструкціях у середньому вища, ніж на кам'яному накиді, і становить на бетонних тетраподах, накиді бетонних масивів і їхній кладці 228, 50 і 469 мг·доб<sup>-1</sup>·м<sup>-2</sup> відповідно, а на кам'яному накиді – 22 мг·доб<sup>-1</sup>·м<sup>-2</sup>. Завдяки цьому, сумарний потік НВ через поселення мітілід на південному молі становить 1,5 т·рік<sup>-1</sup> (з них 1,2 на тетраподах і 0,3 т·рік<sup>-1</sup> – на каменях), на східному молі – 0,4, на підводній частині набережної – 1,2 т·рік<sup>-1</sup>.

Таким чином, сумарна кількість НВ, яка седиментована мітілідами досліджених споруд складає близько 3.1 т/р, при щорічному надходженні в акваторію – порядку 200 т/р [19], що становить близько 1,5 %.

Крім механічного видалення нафтопродуктів, при проходженні через організм мідій також відбувається якісна зміна вуглеводневого складу нафти. Але, оскільки мідії не мають ферментів що розкладають вуглеводні, це явище пов'язують с діяльністю внутрішньої мікрофлори моллюсків [8], тобто ці процеси протікають більшою часткою в мантийній рідині двостулкового моллюска. Як вже вказувалося, н-алкани, що зафіксовані в організмі мідій, належать до діапазону  $C_{12}$ - $C_{24}$ , тобто саме ці речовини підвергаються трансформації при проходженні через організми моллюсків. У забруднених мідій у порівнянні з контрольними зникають легкі вуглеводні  $C_{11}$ - $C_{15}$ , дещо зменшується кількість  $C_{16}$ - $C_{17}$ , а вміст алканів з більш високою молекулярною масою  $C_{18}$ - $C_{13}$  збільшується. Тобто в мідіях накопичуються більш важкі фракції парафінової групи нафтопродуктів [5, 9].

## ВИСНОВКИ

Отримані дані за якісним і кількісним складом нафтових вуглеводнів (а саме наявність легколетких фракцій н-алканів в мантийній рідині абри) в моллюсках показують, що видах моллюсків, що досліджені, присутні вуглеводні як алохтонного так і автохтонного походження, але дані види мають різну здібність к їх

накопиченню, про що свідчить отриманий діапазон н-алканів – найширший у абри (до C<sub>36</sub>) і майже однаковий у нассаріусів і мідій (до C<sub>23</sub> і C<sub>24</sub> відповідно).

Показано, що найбільш інтенсивно процес трансформації НВ проходить у мантийній рідині молюсків, де цьому, скоріш за все, сприяють нафтоокислюючи мікроорганізми.

Кількісно показано, що молюски, що мешкають на гідротехнічних спорудах сприяють поліпшенню екологічного стану акваторії. Завдяки їхньої життєдіяльності із морської води витягується значна кількість (3,1 т/р) нафтових вуглеводнів, у тому ж числі н-алканів у діапазоні C<sub>12</sub>-C<sub>24</sub>.

### Список літератури

1. Lok A. Turkey: a new region for artificial habitats / A. Lok, A. Tokac; Ed. by A. C. Jensen, K. J. Collins, and A. P. M. Lockwood // *Artificial Reefs in European Seas*, – Kluwer, 2000. – P. 21 – 30.
2. Spanier E. Artificial reefs off the Mediterranean coast of Israel / E. Spanier; Ed. by A. C. Jensen, K.J. Collins, and A. P.M. Lockwood // *Artificial Reefs in European Seas*. – Kluwer, 2000 – P. 1 – 19.
3. Александров Б.Г. Теоретические основы управления качеством водной среды с помощью твёрдых субстратов / Б.Г. Александров // *Доп. НАН Украины*. – 2001. – № 5. – С. 181 – 184.
4. Алёмов С. В. О создании искусственных поселений мидий в целях гидробиологической очистки морских нефтесодержащих вод / *Искусственные рифы для рыбного хозяйства* : Всес. конф., Москва, 2 – 4 декабря 1987 г. : тез. докл., – М., 1987. – С. 69 – 71.
5. Мировов О. Г. Проблемы химического загрязнения вод Мирового океана. 4: Влияние нефти и нефтепродуктов на морские организмы и их сообщества / О. Г. Мировов. – Л. : Гидрометиздат, 1985. – 136 с.
6. Мировов О. Г. Санитарно-биологические аспекты экологии севастопольских бухт в XX веке / Мировов О. Г., Кирухина Л. Н., Алёмов С. В. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003, – 185 с. – (НАН Украины, Институт биологии южных морей).
7. Тихонова Е. А. Определение нефтяных углеводородов в макрозообентосе Севастопольской бухты (Чёрное море) / Е. А. Тихонова // *Экология моря*. – 2008. – вып. 76. – С. 96 – 99.
8. Мировов О. Г. Потоки нефтяных углеводородов через морские организмы / О. Г. Мировов // *Морск. экол. журн.* – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 5 – 14.
9. Мировов О. Г. Преобразование парафиновых углеводородов в желудке и мантийной жидкости мидий / О. Г. Мировов, Т. Л. Щекатурина // *Биологические науки*. – 1989. – № 1. – С. 71 – 75.
10. Щекатурина Т. Л. Углеводородный состав, его динамика и метаболизм у морских организмов / Т.Л. Щекатурина // *Биологические аспекты нефтяного загрязнения морской среды*. – К. : Наук. думка, 1988. – С. 186 – 234.
11. Методические указания «Определение загрязняющих веществ в пробах морских донных отложений и взвеси». – М. : Федеральная служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды. – 1996. – С. 18 – 26.
12. Шляхов А. Ф. Газовая хроматография в органической геохимии. – М. : Недра, 1984. – 222 с.
13. Мировов Г. Н. Фильтрационная работа и питание мидий Чёрного моря / Г. Н. Мировов // *Тр. Севастоп. биол. станции*. – 1948. – Т. 6. – С. 338 – 352.
14. Соловьёва О. В. Роль митилид (Mollusca: Mutilidae) в процессах самоочистки морской воды от нефтяных углеводородов / О. В. Соловьёва // *Экология моря*. – 2007. – вып. 73. – С. 91 – 100.
15. Губанов В. И., Клименко Н. П., Моница Т. Л. и др. Гидрометеорология и гидрохимия морей. 4: Чёрное море, вып. 3: Современное состояние загрязнения вод Чёрного моря. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 1996. – 230 с.
16. Обобщенный перечень предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов / [Анисова С.Н., Лесников Л.А., Минаева Т.В., Ляшенко С.Ф.]. – М. : ВНИРО, 1990. – 46 с.
17. Тихонова Е.А. Передача нормальных алканов по цепи: донные осадки - *Abra segmentum* – *Nassarius reticulatus* / Е.А. Тихонова // *Экология моря*. – 2009. – вып. 78. – С. 91 – 93.

18. Тихонова Е.А. Исследование накопления и выведения нефтяных углеводородов моллюсками *Abra segmentum* в экспериментальных условиях / Е.А. Тихонова // Наук. записки Терноп. нац. пед. університету ім. В. Гнатюка. Серія: біологія. – 2010. – №3 (44). – С. 280 – 282.
19. Гордина А.Д., Ткач А.В., Севрикова С.Д. Реакция ихтиопланктона портовых зон Черного моря на антропогенное воздействие (на примере севастопольских бухт) // Гидробиологический журнал. – 1999. – 35. – №. 4. – С. 88 – 95.

**Соловьёва О.В. Накопление нефтяных углеводородов массовыми видами черноморских моллюсков в условиях портовых акваторий / Соловьёва О.В., Тихонова Е.А. // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С.178-185.**

Проведён комплексный анализ процессов накопления нефтяных углеводородов массовыми видами моллюсков прибрежной зоны моря и их участия в процессах самоочищения портовых акваторий. Полученный состав углеводородов свидетельствует о присутствии в моллюсках как автохтонных, так и аллохтонных углеводородов. Исследованные моллюски принимают активное участие в их трансформации и имеют разную способность к их накоплению, о чём свидетельствует полученный диапазон n-алканов – самый широкий в абре (до C<sub>36</sub>) и почти одинаковый в нассариусах и мидиях (до C<sub>23</sub> и C<sub>24</sub> соответственно). Моллюски, обитающие на исследованных гидротехнических сооружениях, извлекают из морской воды значительное количество (3,1 т/г.) нефтяных углеводородов, в том же числе n-алканов в диапазоне C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub>.

**Ключевые слова:** портовые акватории, гидротехнические сооружения, прибрежная зона, нефтяные углеводороды, самоочищение, макрозообентос.

## OIL HYDROCARBONS ACCUMULATION BY THE DOMINANT BLACK SEA MOLLUSCS SPECIES IN CONDITION OF THE PORT WATER AREAS

*Soloviova O.V., Tikhonova E.A.*

*The A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern seas National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, Ukraine  
E-mail: kozl\_ya\_oly@mail.ru*

In accordance to the Black Sea Protection Strategic Action Plan (1996) among the major human impact types were defined: marine nutrient pollution, bacterial and oil pollution. Oil and oil products that get into the water surface enter the general chain of complex and slightly studied processes (including processing by filter-feeders); as a result they lose their floatability, deposit on the bottom and accumulate in sediments, where they undergo further transformation by benthic biota. These components are often concentrated near the hydraulic structures of different functionalities. The largest contribution to these processes is carried by microbial communities and dominant mollusks species. The role in transformation of petroleum hydrocarbons by the mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.), which create dense settlements in the Sevastopol bays, has been studied before, while the information on oil transformation by such widespread and fairly resistant to oil pollution marine bottom inhabitants as *A. segmentum* and *N. reticulatus* is either absent or insufficient.

Thus, the purpose of the research was to assess the role of the dominant mollusks species of artificial substrates of different types and sediments in the process of self-purification in the coastal zone of the sea.

A comprehensive analysis of the oil hydrocarbons accumulation processes by the dominant mollusks species of the coastal zone and their participation in the self-purification processes in harbors was conducted. A new data that make significant contribution into the knowledge about self-purification of the marine environment from oil was obtained. It was ascertained that hydraulic structures that form additional substrates for mytilidae settlement, improve self-purification capacity of the sea coastal zone.

The data on the qualitative and quantitative composition of oil hydrocarbons (such as the presence of light volatile fractions of n-alkanes in the mantle fluid of *A. segmentum*) demonstrates that in the studied mollusks contain hydrocarbons of allochthonous and autochthonous origin. Studied mollusks have different accumulation capability, as it was shown the resulting range of n-alkanes was the widest in *A. segmentum* (to C<sub>36</sub>) and almost the same – in *N. reticulatus* and mussels (C<sub>24</sub> to C<sub>23</sub> and respectively). It is shown that the most intensive oil hydrocarbons transformation process takes place in the mollusks' mantle fluid, due to the most significant presence of oil-oxidizing microorganisms. A significant amount of oil hydrocarbons (3.1 tone / year) including n-alkanes in the range C<sub>12</sub> – C<sub>24</sub> is extracted from the seawater as a result of the activity of these organisms.

**Keywords:** port water areas, hydrotechnical structures, coastal zone, oil hydrocarbons, self-purification, macrozoobenthos.

#### References

1. Lok A., Tokac A., Turkey: a new region for artificial habitats, *Artificial Reefs in European Seas* (Kluwer, 2000), p. 21.
2. Spanier E., Artificial reefs off the Mediterranean coast of Israel, *Artificial Reefs in European Seas* (Kluwer, 2000), p. 1.
3. Alexandrov B., Theoretical basis of water environment quality management using solid substrates, *Reports of National Academy of Sciences of Ukraine*, **5**, 181 (2001).
4. Alemov S., Creation of artificial mussels' settlement for marine hydrobiological cleaning oil-containing water Artificial reefs for fisheries, *All-Union. Conf. (Moscow, 1987)*, p. 69.
5. Mironov O.G., *Problems of the oceans chemical pollution. 4: Influence of oil and oil products on marine organisms and their communities*, 136 p. (Gidrometizdat, L., 1985).
6. Mironov O., Kiryukhina L., Alemov S., *Sanitary and biological aspects of Sevastopol bays ecology in the XX century*. 185 p. (Sevastopol, ECOSY-Hydrophysics, 2003).
7. Tikhonova E. A., Oil hydrocarbons determination in macrozoobenthos of Sevastopol bay (Black Sea), *Ecology of the Sea*, **76**, 96 (2008).
8. Mironov O., Oil hydrocarbon fluxes through marine organisms, *Marine. Ecol. Journal*, **5**, 5 (2006).
9. Mironov O.G., Schekaturina T.L., Conversion of paraffinic hydrocarbons in the stomach and hemolymph of mussels, *Biological sciences*, **1**, 71 (1989).
10. Schekaturina T., *Hydrocarbon composition, its dynamics and metabolism in marine organisms: Biological aspects of oil pollution of the marine environment*, 250 p. (K., Naukova Dumka, 1988).
11. Guidelines «Determination of pollutants in the marine bottom sediments and suspension», *Federal hydrometeorology and environmental monitoring service of Russia*. p. 18. (1996).
12. Shljahov A.F., *Gas chromatography in organic chemistry*, 222 p. (M., Nedra, 1984).



13. Mironov G., Filtration capacity and nutrition of the Black Sea mussels, *Proc. Sevastop. biol. station*, **6**, 338 (1948).
14. Soloviova O., The role of mussels (Mollusca: Mytilidae) in the processes of self-purification of the water from oil hydrocarbons, *Ecology of the sea*, **73**, 91 (2007).
15. Gubanov V.I., Klimenko N. P., Monina T. L. and oth., *Hydrometeorology and hydrochemistry of the sea. 4: Black Sea, iss. 3: Contemporary Black Sea pollution status.*, 230 p. (Sevastopol, ECOSY-Hydrophysics, 1996).
16. Anisova S., Lesnikov L., Minaeva T. and oth., *Generalized list of maximal permitted concentrations (MPC) and tentatively safe level of influence (TSLI) of harmful substances in the fish industry waters.* 46 p. (M., VNIRO, 1990).
17. Tikhonova E.A., Study of *Abra segmentum* oil hydrocarbons accumulation and excretion in experimental conditions, *Scientific Notes of Ternopol. nat. ped. university V. Hnatiuk. Series: Biology*, **3 (44)**, 280 (2010).
18. Tikhonova E.A., Normal alkanes transfer through the chain: bottom sediments – *Abra segmentum* - *Nassarius reticulatus*, *Ecology of the Sea*, **78**, 91 (2009).
19. Gordina A.D., Tkach A.V., Sevrikova S.D., Reaction of the Black Sea port water areas ichthyoplankton to the anthropogenic impacts (for example, the Sevastopol bays), *Hydrobiological journal*, **4**, 88 (1999).

Поступила в редакцію 16.01.2014 г.

УДК 591.185:615.849.11

## РОЛЬ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МЕХАНИЗМАХ ИЗМЕНЕНИЯ НОЦИЦЕПЦИИ ПРИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМ ЭКРАНИРОВАНИИ

Темурьянц Н.А., Костюк А.С., Туманянц К.Н., Ярмолюк Н.С.

Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: alexkostyuk@mail.ru

Обнаружено, что многодневное электромагнитное экранирование вызывает трехфазные изменения ноцицепции моллюсков: начальная фаза гипералгезии сменяется антиноцицептивным эффектом с дальнейшей нормализацией параметров ноцицепции. Установлена роль дофаминовых рецепторов в механизмах изменения термонотицептивной чувствительности моллюсков *Helix albescens* в условиях электромагнитного экранирования. Ежедневное введение моллюскам блокатора D2-дофаминовых рецепторов галоперидола в дозе 1,25 мг/кг приводит к более раннему развитию гипералгетического эффекта электромагнитного экранирования, усилению антиноцицептивного действия фактора. Делается вывод о том, что дофаминовые рецепторы участвуют в механизмах действия электромагнитного экранирования.

**Ключевые слова:** дофаминовые рецепторы, галоперидол, электромагнитное экранирование, ноцицепция, моллюски.

### ВВЕДЕНИЕ

Исследование феноменологии и механизмов действия низкоинтенсивных электромагнитных факторов является актуальной задачей биофизики. Особое внимание привлекает изучение биологических эффектов электромагнитного экранирования (ЭМЭ), которое широко распространено [1, 2], но плохо изучено.

Ранее нами были описаны фазные перестройки ноцицепции моллюсков *Helix albescens* в этих условиях [3], а также показана важная роль опиоидной системы [4] и мелатонина (МТ) [5] в механизмах ее изменений. Известно, что важную роль в изменении ноцицепции при различных воздействиях играют и другие антиноцицептивные системы, и, в частности, дофаминергическая [6, 7]. Однако ее роль в механизмах биологического действия ЭМЭ не исследована. В связи с изложенным целью настоящего исследования явилось изучение роли дофаминовых рецепторов в механизмах изменения ноцицепции при ЭМЭ.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для достижения цели исследования проведены эксперименты на наземных моллюсках *Helix albescens*. Все процедуры на животных проводили в соответствии с Европейской Конвенцией (1986) под контролем комиссии по биоэтике Таврического национального университета имени В.И. Вернадского.

В эксперименте использовались половозрелые животные, одинаковые по массе и размерам. Животных содержали в светонепроницаемых стеклянных террариумах при постоянной температуре ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), высокой влажности и избытке пищи.

Ослабление фонового электромагнитных полей (ЭМП) достигалось применением экранирующей камеры, которая представляет собой комнату размером  $2 \times 3 \times 2$  м, изготовленную из железа «Динамо». Коэффициент экранирования  $V_{\text{ДС}}$ , измеренный с помощью феррозондового магнитометра, составляет для вертикальной составляющей 4,4, для горизонтальной – около 20. Измерялась также спектральная плотность магнитного шума как в области ультранизких (от  $2 \times 10^{-4}$  Гц до 0,2 Гц), так и в области частот от 15 Гц до 100 кГц. В области сверхнизких частот измерения производились с помощью феррозондового магнитометра в паре со спектроанализатором, в области радиочастот – индукционным методом. Внутри камеры для частот выше 170 Гц и в области частот от  $2 \times 10^{-3}$  до 0,2 Гц уровень спектральной плотности магнитного шума ниже  $10 \text{ нТл/Гц}^{0.5}$ . Коэффициент экранирования камеры на частотах 50 и 150 Гц порядка трех. На частотах больше 1 МГц имеет место практически полное экранирование. Кроме того, в помещении лаборатории и в экранирующей камере измерялся естественный радиационный фон с помощью радиометра  $\beta$ - $\gamma$ -излучения РКС-20.03 «Припять». Величина фона составила 10–15 мкР/ч, что соответствует норме. Различий естественного радиационного фона в лаборатории и в экранирующей камере не выявлено [8].

Таким образом, в нашем исследовании имело место ослабление как постоянной, так и переменной компонент магнитного поля Земли, в отличие от значительных (100 и более раз) уменьшения таковых, применяемого в подавляющем большинстве исследований [2, 9, 10].

В камере соблюдались затемненные условия. Температура в ней во время экспозиции колебалась в пределах  $22$ – $23^{\circ}\text{C}$ .

О состоянии термонотицептивной чувствительности животных судили по порогу и латентному периоду (ЛП) реакции избегания (РИ) в тесте «горячая пластинка» [11].

Для выяснения роли дофаминергической системы в механизмах изменения ноцицепции моллюсков *Helix albescens* использовали способ ее выключения с помощью блокатора дофаминовых D2-рецепторов, для чего применяли галоперидол (4-[4-(4-Хлорфенил)-4-гидрокси-1-пиперидинил]-1-(4-фторфенил)-1-бутанон). Этот препарат блокирует постсинаптические дофаминовые D2-рецепторы. Дофаминовые рецепторы обнаружены у моллюсков в периферических тканях, где они контролируют различные физиологические процессы [12-14]. Интенсивно распределяется в ткани, т.к. легко проходит гистогематические барьеры, в том числе гематоэнцефалический. Биодоступность данного препарата составляет 60-70 %. Галоперидол на 90% связывается с белками плазмы, 10% представляют собой свободную фракцию.

Было проведено три серии повторных экспериментов. В каждой серии животных делили на две равноценные группы. Животные первой (контрольной)

группы находились в стандартных лабораторных условиях. Особей второй группы содержали в условиях ЭМЭ по 21 часу в сутки.

В каждой из описанных групп животные были разделены на три подгруппы: животные первой подгруппы оставались интактными (контроль), животным второй подгруппы вводили галоперидол в дозе 1,25 мг/кг, а животным третьей подгруппы – эквивалентный объем физиологического раствора (0,6% раствора NaCl). Каждая подгруппа состояла из 20 моллюсков. Галоперидол вводили животным в переднюю долю нижней поверхности подошвы за час до экспериментального воздействия.

Животных второй группы извлекали из камеры на три часа с 11<sup>00</sup> до 14<sup>00</sup> ч для измерения параметров ноцицепции, которые проводили у каждого животного ежедневно в течение 18 дней на свету (до нормализации параметров ноцицепции), и уборки террариумов. У животных первой группы измерения проведены с 8<sup>00</sup> до 11<sup>00</sup> ч. Таким образом, животные находились в условиях свет : темнота 3 : 21 ч.

Действие ЭМЭ на параметры термоноцицепции оценивалось по коэффициенту его эффективности (КЭ). Этот коэффициент, учитывающий изменения измеряемого параметра по отношению к данным контрольной группы, дает более полное представление о происходящих перестройках, он широко используется в магнитобиологических исследованиях [15-17]. Отрицательные значения этого коэффициента свидетельствуют о развитии состояния относительной гипералгезии (ЛП меньше, чем в группе контроля), а положительные – о состоянии гипоалгезии.

Эффект влияния блокатора на параметры ноцицепции оценивался также по его коэффициенту эффективности, отрицательные значения которого расценивались как усиление состояния гипералгезии.

Статистическую обработку и анализ материала проводили с помощью параметрических статистических методов, возможность применения которых была показана проверкой полученных данных на закон нормального распределения. Для оценки достоверности наблюдаемых изменений использовали *t*-критерий Стьюдента. Оценивалась достоверность различий показателей термоноцицептивной чувствительности между группами ( $p_1$ ), а также между исходными значениями и данными, полученными в каждом дне эксперимента в пределах групп ( $p_2$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследования эффекта ЭМЭ на ноцицепцию моллюсков *Helix albescens* показал, что они полностью совпадают с полученными нами ранее исследованиями [3], а именно: при многодневном ЭМЭ развиваются трехфазные изменения поведенческих показателей РИ термического стимула – начальная фаза гипералгезии сменяется антиноцицептивным эффектом с дальнейшей нормализацией параметров ноцицепции. Эти данные еще раз свидетельствуют о том, что изменения ноцицепции при ЭМЭ являются хорошо воспроизводимым феноменом.

Введение физиологического раствора интактным моллюскам не изменяло параметров ноцицепции, тогда как при введении галоперидола отмечалась тенденция к снижению ЛП РИ термического стимула.

Введение физиологического раствора моллюскам, находившимся в условиях ЭМЭ, не изменяло параметров ноцицепции, а именно: начальная гипералгетическая фаза сменялась гипоалгетическим эффектом с последующей нормализацией параметров ноцицепции (рис. 1). Статистически достоверных различий в динамике и выраженности изменений по сравнению с данными, полученными при экранировании интактных животных, не наблюдалось.

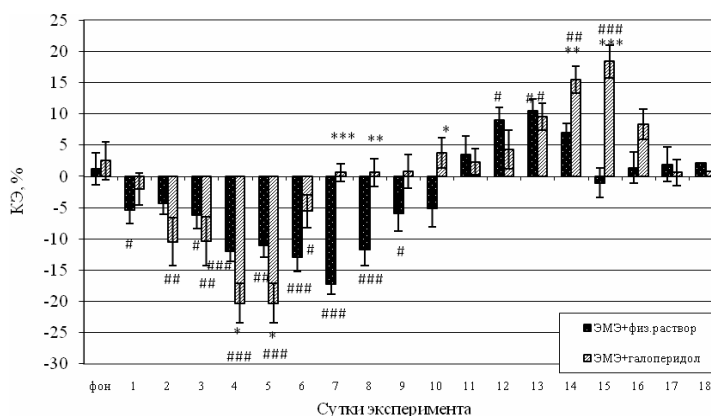


Рис. 1. Динамика ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ) коэффициентов эффективности (%) электромагнитного экранирования у моллюсков при ежедневном введении галоперидола (КЭЭмэ+галоперидол) и физиологического раствора (КЭЭмэ+фр).  
 Примечание: \* – различия достоверны между группами: \* –  $p_1 < 0,05$ ; \*\* –  $p_1 < 0,01$ ; \*\*\* –  $p_1 < 0,001$ . # – различия достоверны между исходными значениями и данными, полученными в каждом дне эксперимента в пределах групп: # –  $p_2 < 0,05$ ; ## –  $p_2 < 0,01$ ; ### –  $p_2 < 0,001$ .

Ежедневные инъекции животным блокатора дофаминовых D2-рецепторов перед их помещением в экранирующую камеру также приводили к трехфазным изменениям ноцицепции, однако продолжительность фаз, и выраженность изменений ноцицепции существенно отмечались от таковых, регистрируемых у контрольных животных. Так, гипералгетический эффект ЭМЭ развивался несколько раньше, чем у животных контрольной группы, он был менее продолжительным (двое суток), по сравнению с данными контрольной группы (пять-шесть суток), но значения максимальных отклонений КЭЭмэ+галоперидол не отличались от КЭЭмэ+физ.раствор (рис. 2).

Восстановление значений КЭ комбинированного действия экранирования и галоперидола регистрировалось уже на седьмые сутки, т.е. раньше на четверо суток, чем у животных, находившихся в условиях ЭМЭ без введения блокатора дофаминовых D2-рецепторов.

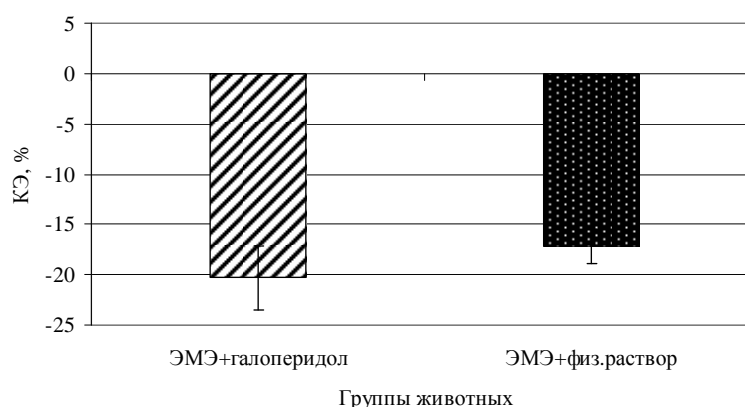


Рис. 2. Минимальные значения ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ) коэффициентов эффективности (%) электромагнитного экранирования у моллюсков при ежедневном введении галоперидола (ЭМЭ+галоперидол) и физиологического раствора (ЭМЭ+физ.раствор) в стадию гипералгезии.

Таким образом, галоперидол значительно уменьшал продолжительность фазы гипералгезии, вызванной экранированием.

КЭ галоперидола в этот период колебался от -22% до -17%, что свидетельствует о снижении активности дофаминергической системы (рис. 3), что и обуславливает увеличение чувствительности моллюсков к термическому стимулу.

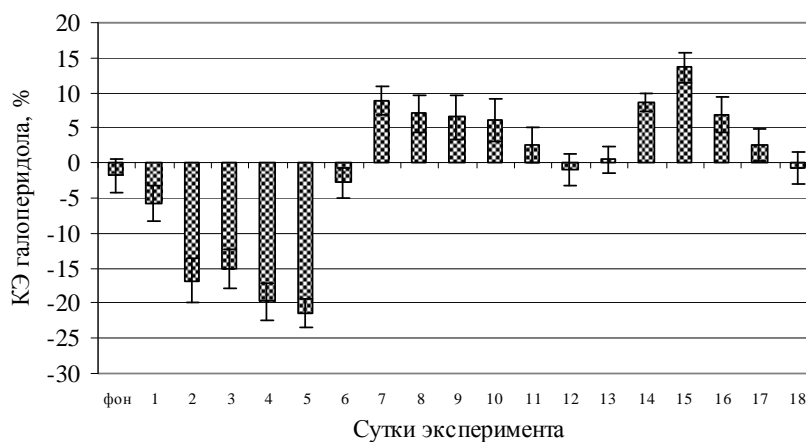


Рис. 3. Динамика ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ) коэффициента эффективности (%) галоперидола (КЭ галоперидола) у моллюсков при их электромагнитном экранировании.

Следствием укорочения фазы гипералгезии явилось более раннее начало фазы антиноцицепции, в начале которой в течение трех суток регистрировались близкие к нулю значения КЭЭмэ+галоперидол. Таким образом, в этот период галоперидол

полностью ликвидирует изменения ноцицепции под влиянием ЭМЭ, т.е. они могут быть полностью дофаминобусловленными. В дальнейшие сроки наблюдения под влиянием галоперидола антиноцицептивный эффект возрастает и на 14-15 сутки превышает таковой, зарегистрированный у животных, находящихся в ЭМЭ без введения блокатора, в 2-8 раз ( $p_1 < 0,01$ ). Различий в динамике и скорости восстановления параметров ноцицепции после экспериментальных воздействий у животных двух групп не обнаружено.

Таким образом, галоперидол вызывает более раннее развитие гипералгетического эффекта, продолжительность которого уменьшается, а также усиление антиноцицептивного эффекта.

Следовательно, дофаминовые рецепторы участвуют в изменении ноцицепции при ЭМЭ.

Полученные результаты могут быть объяснены с позиции мелатониновой теории действия электромагнитных факторов, разработанной в экспериментах на позвоночных и наблюдениях на человеке. Однако, учитывая высокий уровень мелатонина у моллюсков [18, 19], а также обнаруженные нами однотипные изменения ноцицепции у позвоночных и беспозвоночных [5] при ЭМЭ, правомерно распространить ее и на беспозвоночных.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что ЭМП различных параметров при непродолжительных, однократных воздействиях вызывают принципиально одинаковые изменения – нивелирование ночного накопления мелатонина (МТ) в эпифизе – основном месте его синтеза [20, 21], а также уменьшение концентрации в сыворотке крови [22, 23] и экскреции с мочой и со слюной метаболитов МТ [24-26].

Уменьшение его содержания ведет к снижению экспрессии МТ1 и МТ2 рецепторов, которые локализованы на мембранах клеток практически всех тканей [20], вследствие чего наблюдаются многочисленные физиологические эффекты электромагнитных факторов. В частности, увеличивается чувствительность к термическому стимулу, что проявляется в развитии гипералгезии. Этот эффект реализуется не только благодаря снижению экспрессии мелатониновых рецепторов МТ1 и МТ2 на спинальном и супраспинальном уровнях [27], но и опосредованно через снижение взаимодействия с другими рецепторами (опиоидными, бензодиазепиновыми,  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -адренергическими, дофаминергическими, серотонинергическими и др.) [27, 28]. Таким образом, при начальном угнетении секреции МТ электромагнитными факторами снижается активность опиоидной, адренергической и др. антиноцицептивных систем, с рецепторами которых взаимодействует МТ.

При продолжающемся действии электромагнитного фактора продукция МТ постепенно возрастает. Действительно, Е.Н. Чуян (2004) обнаружено увеличение содержания МТ в крови интактных животных на 36%, а у крыс с ограниченной подвижностью – на 145% на девятые сутки воздействия электромагнитными факторами [29]. Это приводит к активации МТ1 и МТ2 рецепторов на спинальном и супраспинальном уровнях [27], а также опиоидных, адренергических и других рецепторов и как следствие к развитию антиноцицептивного эффекта.

Ранее нами было обнаружено, что экзогенный МТ нивелирует экранообусловленную гипералгезию у моллюсков, вызывает более ранний и более выраженный антиноцицептивный эффект [5]. Также было показано, что с фазными изменениями секреции МТ взаимосвязаны фазные изменения и опиоидной системы при таких воздействиях: I фаза заключается в торможении ее активности, в силу чего прогрессирует гипералгезия, далее ее активность возрастает (II фаза), результатом чего является полное нивелирование антиноцицептивного эффекта ЭМЭ налоксоном. Прогрессирующее уменьшение активности опиоидной системы, регистрируемое на последующих этапах, связано с развитием ее толерантности, в силу чего она редуцирует антиноцицептивный эффект.

Динамике МТ частично соответствует и активность дофаминергической системы: снижение его уровня ведет не к снижению активности дофаминергической системы, а к ее более раннему развитию. Увеличение же секреции МТ, благодаря увеличению экспрессии мелатониновых рецепторов, усиливает его взаимодействие с D2-дофаминовыми рецепторами, возрастает роль дофаминергических механизмов и развитию антиноцицептивного эффекта. Участие дофаминовых рецепторов в антиноцицептивном действии МТ было показано в ряде исследований [30-32]. Причем такой эффект обнаружен как в экспериментах на животных, так и в клинических наблюдениях на различных моделях боли (формалиновый тест, боль при воспалении, нейропатическая боль и т.д.).

Следовательно, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что влияние ЭМЭ на изменения ноцицепции может осуществляться через D2-дофаминовые рецепторы.

Таким образом, изменение ноцицепции на разных этапах воздействия ЭМЭ обеспечивается различными антиноцицептивными системами. Фаза гипералгезии связана, в основном, с торможением активности опиоидной системы, антиноцицептивный эффект на первых этапах его развития обусловлен как опиоидной, так и дофаминергической системами. В последующие сроки антиноцицепции, в связи с развитием толерантности опиоидной системы, основное значение приобретает дофаминергическая и, возможно, другие системы. Роль других антиноцицептивных систем в этом процессе должны быть изучены в последующих исследованиях.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. В механизмах изменения ноцицепции моллюсков при ЭМЭ важную роль играют дофаминовые рецепторы.
2. Изменения ноцицепции на разных этапах воздействия ЭМЭ обеспечивается различными антиноцицептивными системами: фаза гипералгезии связана, в основном, с торможением активности опиоидной системы, антиноцицептивный эффект на первых этапах его развития обусловлен как опиоидной, так и дофаминергической системами. В последующие сроки антиноцицепции, в связи с развитием толерантности опиоидной системы, основное значение приобретает дофаминергическая и, возможно, другие системы.



Список литературы

1. Григорьев Ю.Г. Реакции организма в ослабленном геомагнитном поле / Ю.Г. Григорьев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1995. – Т. 35 (1). – С. 3–18.
2. Mo W.-C. A biological perspective of the hypomagnetic field: from definition towards mechanism / W.-C. Mo, Y. Liu, R.-Q. He // Progress in biochemistry and biophysics. – 2012. – Vol. 39, Is. 9. – P. 835–842.
3. Костюк А.С. Ноцицепция моллюсков *Helix albescens* в экране (электромагнитное экранирование) / А.С.Костюк, Н.А.Темурьянц. – Saarbrucken (Germany) : LAP Lambert Academic Publishing, 2012. – 181 с.
4. Темурьянц Н.А. Роль опиоидной системы в модуляции термоноцицептивной чувствительности моллюсков при действии слабых электромагнитных факторов / Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк // Нейрофизиология. – 2011. – Т.43, № 5. – С. 432–441.
5. Темурьянц Н.А. Участие мелатонина в изменении ноцицепции моллюсков и мышей при длительном электромагнитном экранировании / Н.А. Темурьянц, А.С. Костюк, К.Н. Туманянц // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2013. – Т.99, №11. – С. 1333–1341.
6. The role of dopamine receptors in ventrolateral orbital cortex-evoked anti-nociception in a rat model of neuropathic pain / Y.H. Dang, Y. Zhao, B. Xing [et al.] // Neuroscience. – 2010. – Vol. 169 (4). – P. 1872–1880.
7. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat / U. Coffeen, A. López-Avila, J.M. Ortega-Legaspi [et al.] // Eur J Pain. – 2008. – Vol. 12 (5). – P. 535–543.
8. Метод получения крайне слабых постоянного магнитного и электрического полей и хорошо воспроизводимого комбинированного магнитного поля для биологических исследований / Н.И. Богатина, Н.В. Шейкина, В.С. Мартынюк [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология. Химия». – 2010. – Т. 23 (64), №2. – С. 54–65.
9. Дубров А.П. Геомагнитное поле и жизнь / Дубров А.П. – Л.: Гидрометеиздат, 1974. – 175 с.
10. Asashima M. Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster* / M. Asashima, K. Shimada, C.J. Pfeiffer // Bioelectromagnetics. – 1991. – Vol. 12, Is. 4. – P. 215–224.
11. Патент 48094 Україна, МПК51 А 01 К 61/00. Пристрій реєстрації параметрів больової чутливості наземних моллюсків / Темур'янц Н.А., Вишневський В.Г., Костюк О.С., Макеєв В.Б.; заявник та патентовласник Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського. – № U 200908538; заявл. 13.08.2009; опубл. 10.03.2010, Бюл. №5.
12. Gies A. Serotonin and dopamine as regulators of adenylate cyclase and relaxation in a smooth muscle of the mussel *Mytilus edulis*. / A. Gies // Comp. Biochem. Physiol.. – 1986. – Vol. 84. – P. 61–66.
13. The organization of serotonin-, dopamine-, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia* / L. Hernadi, L. Erdelyi, L. Hiripi, K. Elekes // J. Neurocytol.. – 1998. – Vol. 27. – P. 761–775.
14. Dopamine and serotonin receptors mediating contractions of the snail, *helix pomatia*, salivary duct / T. Kissa, L. Hiripia, N. Pappa, K. Elekes // Neuroscience. – 2003. – Vol. 116, Is. 3. – P. 775–790.
15. Биоэффекты слабых переменных магнитных полей и биологически предвестники землетрясений / В.В. Леднев, Н.А. Белова, З.Е. Рождественская, Х.Г. Тирас // Геофизические процессы и биосфера. – 2003. – Т. 2 (1). – С. 3–11.
16. Влияние крайне слабых переменных магнитных полей на регенерацию планарий и гравитационную реакцию растений / Н.А. Белова, А.М. Ермаков, А.В. Знобищева [и др.] // Биофизика. – 2010. – Т. 55, вып. 4. – С. 704–709.
17. Prato F.S. Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgesia in the land snail depending on field and light conditions / F.S. Prato, M. Kavaliers, A.W. Thomas // Bioelectromagnetics. – 2000. – Vol. 2. – P. 287–301.
18. Abran D. Melatonin Activity Rhythms in Eyes and Cerebral Ganglia of *Aplysia Californica* / D. Abran, M. Antil, A. Ali // Gen. & Comp. Endocrinol. – 1994. – Vol. 96 (2). – P. 215–222.
19. Melatonin and 5-methoxytryptophol (5-ML) in nervous and/or neurosensory structures of a gastropod mollusc (*Helix aspersa maxima*): synthesis and diurnal rhythms / A. Blanc, B. Vivien-Roels, P. Pévet [et al.] // Gen Comp Endocrinol. – 2003. – Vol. 131 (2). – P. 168–175.

20. Reiter R.J. Melatonin: clinical relevance / R.J. Reiter // Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. – 2003. – Vol. 17. – P. 276–285.
21. Rosen L.A. A 0,5 G, 60 Hz magnetic field suppresses melatonin production in pinealocytes / L.A. Rosen, I. Barber, B. Lyle Daniel // Bioelectromagnetics. – 1998. – Vol. 19 (2). – P. 123–127.
22. Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats / M. Kato, K. Honma, T. Shigemitsu, Y. Shiga // Bioelectromagnetics. – 1993. – Vol. 4 (2). – P. 97–106.
23. Changes in human plasma melatonin profiles in response to 50 Hz magnetic field exposure / A.W. Wood, S.M. Armstrong, M.L. Sait [et al.] // J. Pineal Res. – 1998. – Vol. 25 (2). – P. 116–127.
24. Cellular telephone use and excretion of a urinary melatonin metabolite / J.B. Burch, J.S. Reif, C.A. Pitrat [et al.] // Research in Biological effects of electric and magnetic fields from the generation, delivery and use of electricity: Abstract book. – San Diego, CA. – 1997. – P. 52.
25. Nocturnal 6-hydroxymelatonin sulfate excretion in female workers exposed to magnetic fields / J. Juutilainen, R.G. Stevens, L.E. Anderson [et al.] // J. Pineal Res. – 2000. – Vol. 28 (2). – P. 97–104.
26. Pflugger D.H. Effects of exposure to 16.7 Hz magnetic fields on urinary 6-hydroxymelatonin sulfate excretion of Swiss railway workers / D.H. Pflugger, C.E. Minder // J. Pineal Res. – 1996. – Vol. 21. – P. 91–100.
27. Melatonin in antinociception: its therapeutic applications / V. Srinivasan, E.C. Lauterbach, K.Y. Ho [et al.] // Curr Neuropharmacol. – 2012. – Vol. 10 (2). – P. 167–178.
28. Melatonin: a hormone that modulates pain / M. Ambriz-Tututi, H. Rocha-Gonzalez, S.L. Cruz, V. Granados-Soto // Life Sci. – 2009. – Vol. 84 (15–16). – P. 489–498.
29. Чуян Е.Н. Изменение содержания мелатонина в крови крыс под влиянием низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты / Е.Н. Чуян // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология. Химия». – 2004. – Т. 17 (56), №1. – С. 99–107.
30. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice / M. Mantovani, M.P. Kaster, R. Pertile [et al.] // J Pineal Res. – 2006. – Vol. 41 (4). – P. 382–389.
31. Evaluation of the role of melatonin in formalin-induced pain response in mice / M. Ray, P.K. Mediratta, P. Mahajan, K.K. Sharma // Indian J Med Sci. – 2004. – Vol. 58 (3). – P. 122–130.
32. Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action / V. Srinivasan, S.R. Pandi-Perumal, D.W. Spence [et al.] // Brain Res Bull. – 2010. – Vol. 16, 81(4-5). – P. 362–371.

**Темур'яниц Н.А. Роль дофамінових рецепторів у механізмах зміни ноціцепції при електромагнітному екрануванні / Н.А. Темур'яниц, О.С. Костюк, К.М. Туманянц, Н.С. Ярмолюк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Биология, химия”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 186–196.**

Виявлено, що багатоденне електромагнітне екранування викликає трьохфазні зміни ноціцепції моллюсків: початкова фаза гіпералгезії змінюється антиноціцептивним ефектом з подальшою нормалізацією параметрів ноціцепції. Встановлено роль дофамінових рецепторів у механізмах зміни термоноціцептивної чутливості моллюсків *Helix albescens* в умовах електромагнітного екранування. Щоденне введення моллюскам блокатора D2-дофамінових рецепторів галоперидолу в дозі 1,25 мг/кг призводить до більш раннього розвитку гіпералгетического ефекту електромагнітного екранування, посиленню антиноціцептивної дії фактора. Робиться висновок про те, що дофамінові рецептори беруть участь у механізмах дії електромагнітного екранування.

**Ключові слова:** дофамінові рецептори, галоперидол, електромагнітне екранування, ноціцепція, моллюски.

ROLE OF DOPAMINE RECEPTORS IN MECHANISMS OF CHANGES OF NOCICEPTION UNDER THE ELECTROMAGNETIC SHIELDING

*Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Tumanyants K.N., Yarmolyuk N.S.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

*E-mail: alexkostyuk@mail.ru*

Results of the conducted research were showed that multi-day electromagnetic shielding causes three-phase changes in nociception of snails: an initial phase of the antinociceptive effect of hyperalgesia is replaced with a further normalization of the parameters of nociception.

For clarify of the role of dopaminergic system in the mechanisms of nociception changes in snails under the influence of electromagnetic shielding method was used a way of its switching off by means of a blocker dopamine D2-receptors to what applied a haloperidol. This preparation entered an animal into a forward share of the bottom surface of a sole for an hour before experimental influence.

Daily injections of blocker dopamine D2-receptors in animal before inserting them into the shielding chamber led to three-phase changes of nociception, however the hyperalgetic effect of electromagnetic shielding developed slightly earlier, than at animals of control group, and it was less long (two days). In addition, strengthening of antinociceptive action of an electromagnetic factor at introduction of haloperidol (by 2-8 times) is noted. Thus, it is concluded that dopamine receptors participate in mechanisms of action of electromagnetic shielding.

**Key words:** dopamine receptors, haloperidol, electromagnetic shielding, nociception, snails.

References

1. Grigoriev Yu.G., Reactions of the organism in a weakened geomagnetic field, *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, **35** (1), 3 (1995).
2. Mo W.C., Liu Y., He R.Q., A biological perspective of the hypomagnetic field: From definition towards mechanism, *Prog Biochem Biophys.*, **39**, 835 (2012).
3. Kostyuk A.S., Temuryants N.A., Nociception in snails *Helix albescens* in the shield (electromagnetic shielding) (Saarbrücken (Germany), LAP Lambert Academic Publishing, 2012).
4. Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Role of opioid system in the modulation thermonociceptive sensitivity in snails under the action of weak electromagnetic factors, *Neurophysiology*, **43** (5), 432 (2011).
5. Temuryants N.A., Kostyuk A.S., Tumanyants K.N., Involvement of melatonin in changing nociception in snails and mice with prolonged electromagnetic shielding, *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova RAN*, **99** (11), 1333 (2013).
6. Dang Y.H., Zhao Y., Xing B., Zhao X.J., Huo F.Q., Tang J.S., Qu C.L., Chen T., The role of dopamine receptors in ventrolateral orbital cortex-evoked anti-nociception in a rat model of neuropathic pain, *Neuroscience*, **169** (4), 1872 (2010).
7. Coffeen U., López-Avila A., Ortega-Legaspi J.M., del Angel R., López-Muñoz F.J., Pellicer F., Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat, *Eur J Pain*, **12** (5), 535 (2008).
8. Bogatina N.I., Sheykina N.V., Martynuk V.S., Temuryants N.A., Pavlyukov D.V., Method of obtaining extremely weak static magnetic and electric fields and well reproducible combined magnetic field for biological research, *Uchenyye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya «Biologiya. Khimiya»*, **23** (2), 54 (2010).
9. Dubrov A.P., Geomagnetic Field and Life: A short essay on geomagnitobiology (L., Gidrometeoizdat, 1974).
10. Asashima M., Shimada K., Pfeiffer C.J., Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster*, *Bioelectromagnetics*, **12** (4), 215 (1991).
11. Patent 48094 Ukraine, MPK51 A 01 K 61/00. The device to registration parameters of pain sensitivity in land snails / Temuryants N.A., Vishnevsky V.G., Kostyuk A.S., Makeev V.B.; заявник that

- patentovlasnik Tavriysky natsionalny universitet IM. BI: Vernadskogo. - № U 200908538; appl. 13.08.2009, publ. 10.03.2010, Bull. Number 5.
12. Gies A., Serotonin and dopamine as regulators of adenylate cyclase and relaxation in a smooth muscle of the mussel *Mytilus edulis.*, *Comp. Biochem. Physiol.*, **84**, 61 (1986).
  13. Hernadi L., Erdelyi L., Hiripi L., Elekes K., The organization of serotonin-, dopamine-, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia*, *J. Neurocytol.*, **27**, 761 (1998).
  14. Kissa T., Hiripia L., Pappa N., Elekes K., Dopamine and serotonin receptors mediating contractions of the snail, *helix pomatia*, salivary duct, *Neuroscience*, **116** (3), 775 (2003).
  15. Lednyov V.V., Belov H.A., Christmas Z.E., Tiras H.G., Bioeffects of weak alternating magnetic fields and biological precursors of earthquakes, *Geofizicheskiye protsessy i biosfera*, **2** (1), 3 (2003).
  16. Belova N.A., Ermakov A.M., Znobischeva A.V., Srebnitsky L.K., Lednyov V.V., Influence of extremely weak variables magnetic fields on regeneration in planaria and gravity reaction in plants, *Biofizika*, **55** (4), 704 (2010).
  17. Prato F.S., Kavaliers M., Thomas A.W., Extremely low frequency magnetic fields can either increase or decrease analgesia in the land snail depending on field and light conditions, *Bioelectromagnetics*, **2**, 287 (2000).
  18. Abran D., Anctil M., Ali A., Melatonin Activity Rhythms in Eyes and Cerebral Ganglia of *Aplysia Californica*, *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **96** (2), 215 (1994).
  19. Blanc A., Vivien-Roels B., Pévet P., Attia J., Buisson B., Melatonin and 5-methoxytryptophol (5-ML) in nervous and/or neurosensory structures of a gastropod mollusc (*Helix aspersa maxima*): synthesis and diurnal rhythms, *Gen Comp Endocrinol.*, **131** (2), 168 (2003).
  20. Reiter R.J., Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, **17**, 276 (2003).
  21. Rosen L.A., Barber I., Lyle Daniel B., A 0,5 G, 60 Hz magnetic field suppresses melatonin production in pinealocytes, *Bioelectromagnetics*, **19** (2), 123 (1998).
  22. Kato M., Honma K., Shigemitsu T., Shiga Y., Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on plasma and pineal melatonin levels in rats, *Bioelectromagnetics*, **4** (2), 97 (1993).
  23. Wood A.W., Armstrong S.M., Sait M.L., Devine L., Martin M.J., Changes in human plasma melatonin profiles in response to 50 Hz magnetic field exposure, *J. Pineal Res.*, **25** (2), 116 (1998).
  24. Burch J.B., Reif J.S., Pitrat C.A., Keefe, T.J., Yost, M.G., Cellular telephone use and excretion of a urinary melatonin metabolite, Research in Biological effects of electric and magnetic fields from the generation, delivery and use of electricity: Abstract book, 52 (1997).
  25. Juutilainen J., Stevens R.G., Anderson L.E., Hansen N.H., Kilpeläinen M., Kumlin T., Laitinen J.T., Sobel E., Wilson B.W., Nocturnal 6-hydroxymelatonin sulfate excretion in female workers exposed to magnetic fields., *J. Pineal Res.*, **28** (2), 97 (2000).
  26. Pfluger D.H., Minder C.E., Effects of exposure to 16.7 Hz magnetic fields on urinary 6-hydroxymelatonin sulfate excretion of Swiss railway workers, *J. Pineal Res.*, **21**, 91 (1996).
  27. Srinivasan V., Lauterbach E.C., Ho K.Y., Acuña-Castroviejo D., Zakaria R, Brzezinski A., Melatonin in antinociception: its therapeutic applications, *Curr Neuropharmacol.*, **10** (2), 167 (2012).
  28. Ambriz-Tututi M., Rocha-Gonzalez Hi, Cruz S.L., Granados-Soto V., Melatonin: a hormone that modulates pain, *Life Sci.*, **84** (15-16), 489 (2009).
  29. Chuyan E.N., Change of melatonin in the blood of rats under the influence of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency, *Uchenyye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. Seriya «Biologiya. Khimiya»* **17** (56), 1, 99 (2004).
  30. Mantovani M., Kaster M.P., Pertile R., Calixto J.B., Rodrigues A.L., Santos A.R., Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice, *J Pineal Res.*, **41** (4), 382 (2006).
  31. Ray M., Mediratta P.K., Mahajan P., Sharma K.K., Evaluation of the role of melatonin in formalin-induced pain response in mice, *Indian J Med Sci.*, **58** (3), 122 (2004).
  32. Srinivasan V., Pandi-Perumal S.R., Spence D.W., Moscovitch A., Trakht I, Brown G.M., Cardinali D.P., Potential use of melatonergic drugs in analgesia: mechanisms of action, *Brain Res Bull.*, **16**, 81(4-5), 362 (2010).

Поступила в редакцию 25.01.2014 г.

**УДК 612.821**

## **МИОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА КОЖИ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ**

*Трибрат Н.С., Чуюн Е.Н.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: tribratnatalia@rambler.ru*

В работе исследована миогенная активность микрососудистого русла кожи здорового человека при действии низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты. Методом лазерной доплеровской флоуметрии показано, что низкоинтенсивное излучение вызывает изменения миогенного компонента регуляции микроциркуляторного русла, что выражается в дилатации гладкомышечных прекапиллярных сфинктеров в покое, а также увеличении их чувствительности и сократительной активности при экспериментально модулируемом увеличении потока крови, следствием чего является увеличение нутритивного кровотока в покое и активная констрикторная реакция, направленная на ограничение периваскулярного отека.

**Ключевые слова:** электромагнитное излучение крайне высокой частоты, микроциркуляция крови, миогенный компонент регуляции.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Основной задачей системы микроциркуляции является поддержание оптимального тканевого гомеостаза, для осуществления которого необходимо оптимальное перераспределение потоков крови в тканях. Это возможно осуществить посредством активных ритмических сокращений стенки микрососудов – вазомоций. Природа вазомоций обусловлена, с одной стороны, нисходящей импульсацией по симпатическим адренегрическим волокнам - нейрогенным контролем тканевого кровотока, а, с другой, – собственно миогенной активностью [1, 2]. Исследование изолированного миогенного компонента на практике весьма затруднено, что обусловлено методическими подходами к исследованию тканевого кровотока. Указанные трудности можно нивелировать, используя неинвазивный метод исследования микроциркуляции крови – лазерную доплеровскую флоуметрию (ЛДФ). Флоуметрия, дополненная функциональными пробами, позволяет детально проследить механизмы адаптационных, регуляторных перестроек микроциркуляторного русла. Для детального выявления миогенной активности микрососудов целесообразно применять функциональные пробы, в числе которых окклюзионная и постуральная [3].

В наших и других исследованиях показано, что низкоинтенсивное электромагнитное излучение крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ) (рабочая длина волны - 7,1 мм; плотность потока мощности – 0,1 мВт/см<sup>2</sup>) оказывает воздействие

на систему микроциркуляции крови, в связи с чем применяется для коррекции различных заболеваний в патогенезе которых отмечаются микроциркуляторные расстройства [4]. Данный эффект может быть обусловлен, в том числе, и действием этого фактора на гладкомышечные прекапилляры, где ведущим механизмом регуляции микрокровотока является миогенный. Однако действие низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на миогенный компонент микроциркуляторного русла не исследовано. Поэтому, целью настоящей работы явилось выявление изменения миогенного компонента регуляции микроциркуляции крови при действии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на базе Центра коррекции функционального состояния человека при Таврическом национальном университете имени В.И. Вернадского. В исследовании принимали участие 30 студентов-волонтеров женского пола в возрасте 18-23 лет.

Экспериментальное воздействие ЭМИ КВЧ осуществляли с помощью одноканального терапевтического генератора «КВЧ. РАМЕД. ЭКСПЕРТ-01» (регистрационное свидетельство № 783/99 от 14.07.99, выданное КНМТ МОЗ Украины о праве на применение в медицинской практике в Украине) (рабочая длина волны - 7,1 мм; плотность потока мощности – 0,1 мВт/см<sup>2</sup> на область биологически активной точки (БАТ) GI-4 правой руки ежедневно, в утреннее время суток с экспозицией 30 минут в течение 10 дней.

Изменения показателей микроциркуляции оценивали с помощью метода ЛДФ с использованием лазерного анализатора микроциркуляции «ЛАКК-02» (НПП «Лазма», Россия).

При регистрации ЛДФ-метрии оценивали показатель микроциркуляции (ПМ), характеризующий общую (капиллярную и внекапиллярную) усредненную стационарную перфузию микрососудов за время исследования.

В результате спектрального разложения ЛДФ-граммы на гармонические составляющие, выполняемого с помощью вейвлет-преобразования, оценивали усредненную максимальную амплитуду миогенных осцилляций, природа которых обусловлена внутренней активностью прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол [5]. Ввиду разброса результатов измерений амплитуд колебаний, определяли вклад амплитуды миогенных колебаний относительно средней модуляции кровотока по формуле:

$$A = A_m / 3\sigma, \quad (1)$$

где  $A_m$  – амплитуда колебаний в миогенном диапазоне от 0,07-0,15 Гц,  $\sigma$  – среднее квадратичное отклонение.

ЛДФ-метрию проводили до воздействия ЭМИ КВЧ (контроль) в течение 10-ти минут, а также после первого и десятого сеансов КВЧ-воздействия также в течение 10-ти минут.

Для детальной оценки вовлеченности миогенного механизма в реализацию биологического действия ЭМИ КВЧ проводили постуральную и окклюзионную

функциональные пробы, в ходе проведения которых оценивали динамику изменения ПМ.

Окклюзионная проба позволяет исследовать реактивность микрососудов прекапиллярного звена [1]. При проведении пробы ЛДФ-волновод фиксировали на области БАТ GI-4 правой руки. Проба проводилась по следующей схеме: в течение одной минуты осуществлялась регистрация исходного уровня ПМ, затем создавалась окклюзия путем быстрого нагнетания давления в манжете до уровня 250 мм рт. ст. и дальнейшая регистрация ПМ в течение трех минут периода окклюзии. По истечении трехминутной окклюзии воздух из манжеты быстро выпускался, и в течение последующих шести минут регистрировалась реакция перфузии в ходе восстановления кровотока – постокклюзионная реактивная гиперемия.

При интерпретации результатов окклюзионной пробы оценивали показатель  $T_{1/2}$  (с), определяемый как интервал времени от момента достижения максимального значения показателя микроциркуляции до момента его полувосстановления, который определяется по следующей формуле:

$$T_{1/2} = ПМ_{\max} - ПМ_{\text{исх}}, \quad (2)$$

где  $ПМ_{\text{исх}}$  – исходный уровень показателя микроциркуляции,  $ПМ_{\max}$  – максимальное значение показателя микроциркуляции в реактивной постокклюзионной гиперемии.

Показатель  $T_{1/2}$  характеризует реактивность микрососудов прекапиллярного звена, где ведущим регулирующим механизмом является непосредственно миогенный [1].

Функциональной пробой, оценивающей активность миогенных механизмов, может служить и постуральная проба [1].

При проведении постуральной пробы ЛДФ-зонд фиксировали в области БАТ GI-4 правой руки. При проведении постуральной пробы конечность испытуемого первоначально находилась в горизонтальном положении, после чего в процессе проведения пробы конечность испытуемого опускалась ниже уровня сердца и в свешенном состоянии находилась в течение одной минуты, после чего испытуемого просили вернуть руку в исходное положение. Регистрация уровня ПМ осуществлялась в течение всего периода проведения пробы вплоть до полного восстановления тканевого кровотока.

В постуральной пробе оценивали  $\Delta ПМп$  – показатель микроциркуляции, характеризующий снижение уровня перфузии, отмечаемый в период, когда рука находилась в свешенном состоянии относительно исходных значений ПМ.

$$\Delta ПМп = (ПМ_{\text{исх}} - ПМп) / ПМ_{\text{исх}} * 100\%, \quad (3)$$

где  $ПМп$  – уровень перфузии, зарегистрированный во время опускания конечности ниже уровня сердца;  $ПМ_{\text{исх}}$  – исходная величина ПМ.

Изменение уровня  $\Delta ПМп$ , наблюдаемое в постуральной пробе, позволяет оценить веноуло-артериолярную реакцию в микроциркуляторном русле, осуществляемую за счет гемодинамического механизма, обусловленного собственной чувствительностью прекапиллярных сфинктеров [3].

Окклюзионную и постуральную пробы проводили до воздействия низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ (контроль), а также после 1 и 10 сеансов.

Статистическая обработка экспериментальных данных производилась с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и Statistica 8.0. При статистической обработке данных использовали описательную статистику и непараметрические методы статистического анализа (критерий Вилкоксона).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значение амплитуды миогенных ритмов (Ам) до воздействия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ составило 16,92 перф. ед. Однако уже после первого сеанса КВЧ-воздействия показатель Ам увеличился на 31,05% ( $p \leq 0,05$ ) относительно контрольных значений. 10-тикратное КВЧ-воздействие характеризовалось увеличением показателя Ам на 30,55% ( $p \leq 0,05$ ) в сравнении с контрольными значениями показателя (рис. 1).

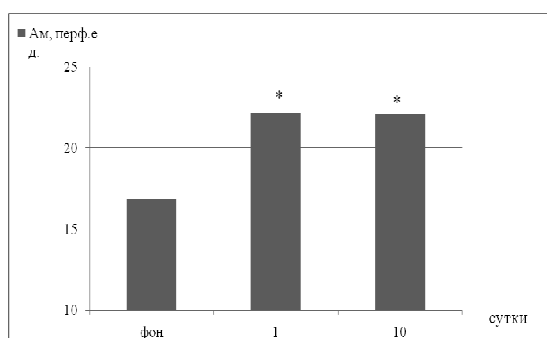


Рис. 1. Динамика показателя амплитуды миогенных ритмов (Ам), зарегистрированная до, а также после первого и десятого сеансов воздействия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ.

*Примечание:* достоверность различий \* - ( $p \leq 0,05$ ) относительно исходных значений данного показателя по критерию Вилкоксона.

Согласно литературным данным, осцилляции миогенного диапазона отображают активность миоцитов прекапиллярных сфинктеров и являются ведущим механизмом регуляции числа функционирующих кожных капилляров [3]. Кроме того, выявлена положительная корреляция между числом функционирующих капилляров, по данным капилляроскопического исследования, и амплитудой миогенных колебаний по данным ЛДФ-метрии [6].

Таким образом, увеличение Ам при КВЧ-воздействии свидетельствует о вазодилатации прекапилляров, увеличении количества функционирующих капилляров, и, как следствие, усилении нутритивного кровотока.

Для более полной оценки вовлеченности миогенного механизма в реализацию биологического действия ЭМИ КВЧ оценивали результаты проведения функциональных проб.



Как показали результаты настоящего исследования, при проведении постуральной пробы исходный уровень  $\Delta$ ПМп у испытуемых составил 32,23%, что не противоречит литературным данным, согласно которым снижение уровня ПМ у здоровых лиц в ходе проведения постуральной пробы достигает 30-45% [1]. Воздействие низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ способствовало изменению параметров, характеризующих миогенную реактивность в постуральной пробе. Так, после однократного воздействия низкоинтенсивного излучения параметр  $\Delta$ ПМп увеличился на 83,22% ( $p \leq 0,05$ ), а после 10-тикратного воздействия ЭМИ КВЧ отмечался рост  $\Delta$ ПМп на 71,64% ( $p \leq 0,05$ ) относительно фоновых значений (табл. 1).

**Таблица 1.**  
**Показатели тканевого кровотока, зарегистрированные в период проведения окклюзионной и постуральной функциональных проб до (контроль), а также после первого и десятого воздействий низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ**

Показатели	Контроль	После однократного воздействия ЭМИ КВЧ	После десятикратного воздействия ЭМИ КВЧ
$\Delta$ ПМп, (%)	32,23±4,87	59,06±5,61 ( $p \leq 0,05$ )	55,33±4,79 ( $p \leq 0,05$ )
T1/2, (с)	32,75±3,45	23,39±2,69 ( $p \leq 0,05$ )	19,76±2,11 ( $p \leq 0,05$ )

*Примечание:* достоверность различий ( $p \leq 0,05$ ) относительно исходных значений данного показателя по критерию Вилкоксона.

Изменение уровня  $\Delta$ ПМп характеризует изменение реактивности прекапилляров гладкомышечных клеток [3]. Прекапилляры, осуществляя текущую локальную регуляцию тканевого кровотока, отличаются наибольшей чувствительностью к локальным экстра- и интравазальным факторам, в том числе и к интенсивности потока крови.

Увеличение показателя  $\Delta$ ПМп, отмечаемое после однократного и курсового КВЧ-воздействий, свидетельствует об увеличении чувствительности гладкомышечных клеток к изменению потока крови и усилении их сократительной активности, что позволяет в большей степени ограничить уровень перфузионного давления на внутреннюю поверхность нутритивных микрососудов и в дальнейшем позволит избежать трофических нарушений. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об улучшении функционирования ауторегуляторных механизмов, за счет увеличения чувствительности гладкомышечных клеток и усиления их сократительной активности при увеличении потока крови, создаваемого нагрузочной пробой.

Как показали результаты окклюзионной пробы, параметр T1/2 в контроле составил 32,75 с, что согласуется с литературными данными, согласно которым данный параметр у здоровых испытуемых составляет 25-40 с [3].

При действии ЭМИ КВЧ отмечалось сокращение времени полувосстановления тканевого кровотока в реакции постокклюзионной реактивной гиперемии после

однократного воздействия низкоинтенсивного фактора на 28,57% ( $p \leq 0,05$ ), а после 10-тикратного на 39,65% ( $p \leq 0,05$ ) относительно исходных значений.

Поскольку временной показатель  $T_{1/2}$  характеризует миогенную реактивность микрососудов прекапиллярного звена [1], то его сокращение указывает на увеличение реактивности гладкомышечных клеток.

Следовательно, результаты ЛДФ-метрии, окклюзионной и постуральной функциональных проб свидетельствуют о вовлеченности миогенного компонента в реализацию биологического эффекта ЭМИ КВЧ в системе микроциркуляции крови посредством увеличения чувствительности гладкомышечных клеток к увеличению потока крови, а также их реактивности.

Проблема первичной рецепции ЭМИ КВЧ на уровне целого организма до сих пор остается нерешенной. Практически все ЭМИ КВЧ поглощается в кожных покровах на глубине до 1 мм, а максимум удельной поглощаемости в коже локализован на глубине 0,7 мм. Под действие излучения попадают кровеносные и лимфатические сосуды, клетки иммунной системы, диффузной нейроэндокринной системы, разнообразные нервные окончания, а также БАТ [7].

Микроциркуляторная система кожи, которая располагается на глубине около 150 мкм, может непосредственно осуществлять рецепцию ЭМИ КВЧ. Изменения в системе микроциркуляции под влиянием КВЧ-воздействия могут быть во многом детерминированы факторами, осуществляющими регуляцию микрососудистого тонуса, среди которых в физиологических условиях наиболее важную роль играют локальные миогенные факторы. Так, предполагают, что одним из ведущих механизмов, обеспечивающих миогенные реакции является устойчивое повышение внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Результаты многочисленных экспериментов свидетельствуют о том, что действие ЭМИ можно рассматривать на уровне систем внутриклеточной регуляции, что напрямую связано с изменением кальций-регулируемых процессов в клетке. Действительно, пути трансдукции внутриклеточных сигналов в живых системах, могут оказаться чувствительными к воздействию слабых ЭМИ, которые могут влиять на процессы транспорта  $Ca^{2+}$  через плазматическую мембрану модифицировать активность  $Ca^{2+}$ -зависимых мембраносвязанных белков, индуцировать кальциевую мобилизацию, изменять внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция, что, в свою очередь, может приводить к существенным изменениям на уровне основных функций клеток различного типа, в числе которых гладкомышечные клетки сосудов [8-10].

Результаты экспериментальных работ продемонстрировали, что механизм миогенной ауторегуляции запускается активацией чувствительных к растяжению сосудистой стенки ионных каналов, в результате чего наблюдается увеличение поступления ионов кальция внутрь клетки, что приводит к активации протеинкиназы C и фосфолипазы  $A_2$ , стимулирующих высвобождение арахидоновой кислоты из клеточной мембраны. Арахидоновая кислота, превращаясь в вазоконстрикторный метаболит, деполяризует клеточную мембрану за счет блокады кальций-зависимых калиевых каналов и открытия потенциал-зависимых кальциевых каналов.

В современной литературе ведущая роль в механизмах увеличения чувствительности сократительного аппарата гладкомышечных клеток к ионам кальция отводится преимущественно протеинкиназе С [11]. Показано, что опосредованные протеинкиназой С пути сенситизации сократительных белков участвуют в ответных реакциях гладкомышечных клеток на увеличение внутрисосудистого давления в микроциркуляторном русле [12]. По-видимому, увеличение реактивности гладкомышечных клеток, отмечаемое в окклюзионной и постуральной функциональных пробах, модулирующих увеличение внутрисосудистого давления, после КВЧ-воздействия может быть связано с влиянием КВЧ-излучения, в том числе, на протеинкиназу С. Действительно, в ряде работ было показано, что действие ЭМИ КВЧ изменяет активность протеинкиназы С при наличии тока ионов кальция через мембрану клеток [9].

Кроме того, экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что фосфолипаза  $A_2$  является одной из мишеней рецепции ЭМИ КВЧ в клетках [9], что также может оказывать влияние на реализацию миогенных реакций при действии низкоинтенсивного физического фактора, стимулируя высвобождение арахидоновой кислоты, метаболиты, которой в дальнейшем способствуют деполяризации клеточной мембраны и сокращению гладкомышечных клеток. Ранее было показано, что метаболиты арахидоновой кислоты, обладающие вазоконстрикторной активностью, принимают участие в реализации противовоспалительного действия низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц) [13].

Таким образом, результаты различных исследований свидетельствуют о том, что низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ может оказывать влияние на различные сенсоры, участвующие в реализации миогенных реакций, а суммарный эффект может проявляться в увеличении функциональной активности гладкомышечных клеток микрососудов кожи.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о вовлеченности миогенного компонента в реализацию биологического эффекта низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ в системе микроциркуляции крови.
2. Воздействие ЭМИ КВЧ приводит к увеличению амплитуд миогенных ритмов после первого и десятого сеансов на 31,05% ( $p \leq 0,05$ ) и 30,55% ( $p \leq 0,05$ ) соответственно.
3. Низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ приводит к увеличению показателя, характеризующего реактивность гладкомышечных прекапилляров, при проведении постуральной пробы после однократного воздействия на 83,33% ( $p \leq 0,05$ ) и после 10-тикратного на 71,64% ( $p \leq 0,05$ ).
4. КВЧ-воздействие приводит к сокращению периода полувосстановления уровня перфузии в окклюзионной пробе на 28,57% ( $p \leq 0,05$ ) после однократного и 39,45% ( $p \leq 0,05$ ) после 10-тикратного сеанса, что свидетельствует об увеличении активной миогенной реакции гладкомышечных клеток при модулируемом увеличении потока крови.

Список литературы

1. Крупаткин, А. И. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови / А.И. Крупаткин, В.В. Сидоров. – М. : Медицина, 2005. – 254 с.
2. Impaired 0.1 – Hz vasomotion assessed by laser Doppler anemometry as an early index of peripheral sympathetic neuropathy in diabetes / M.F. Mayer, C.J. Rose, J.-O. Hulsmann [et.al.] // *Microvascular Research*, 2003. – Vol. 65. – P. 88-95.
3. Маколкин, В.И. Микроциркуляция в кардиологии / В.И. Маколкин. – М. : Визарт, 2004. – 135 С.
4. Субботина, Т.И. Экспериментально-теоретическое исследование КВЧ-облучения открытой печени прооперированных крыс и поиск новых возможностей высокочастотной терапии / Т.И. Субботина, А.А. Яшин // *Вестник новых медицинских технологий*. – 1998. – Т. 5, № 1. – С. 122–126.
5. Stefanovska A. Physics of the human cardiovascular system. / A. Stefanovska, M. Bracic // *Contemporary Physics*. – 1999. – Vol. 40, № 1. – P. 31–35.
6. Крупаткин, А.И. Влияние симпатической иннервации на тонус микрососудов и колебания кровотока кожи / А.И. Крупаткин // *Физиология человека*. – 2006. – Т. 32, № 5. – С. 95.
7. Воронов, В.Н. Морфологические изменения в коже при действии КВЧ ЭМИ / В.Н. Воронов, Е.П. Хижняк // *Миллиметровые волны нетепловой интенсивности в медицине: межд. симпоз.: сб. докл.* – М.: ИРЭ АН СССР, 1991. – С. 635–638.
8. Гапеев, А.Б. Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных: Ч. 3. "Биологические эффекты непрерывного ЭМИ КВЧ" / А Ю. Гапеев, Н.К. Чермерис // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2000. – Т. 7, № 1. – С. 20–25.
9. Биологический эффект ЭМИ КВЧ определяется функциональным статусом клеток / А.А. Аловская, А.Г. Габдулхакова, А.Б. Гапеев [и др.] // *Вестник новых медицинских технологий*. – 1998. – Т. 5, № 2. – С. 11–14.
10. Adey, W. R. Physiological signaling across cell membranes and cooperative influences of extremely low frequency electromagnetic fields / W.R. Adey // In: Frohlich H. (ed.) *Biological coherence and response to external stimuli*. – Berlin Heidelberg, New York: Springer, 1988. – P. 148–170.
11. Кізуб, І.В. Сучасні уявлення про роль протеїнкінази С у регуляції тонусу гладеньких м'язів стінки кровеносних судин / І.В. Кізуб, О.О. Павлова, А.І. Соловйова // *Фізіологічний журнал*. – 2007. – Т. 53, № 2. – С. 78–89.
12. Albert A. P. Properties of a constitutively active Ca<sup>2+</sup> permeable non-selective cation channel in rabbit ear artery myocytes / A. P. Albert, A. S. Paper, W. A. Large // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 549. – P. 143–156.
13. Gapeyev, A. B. Mechanisms of Anti-Inflammatory Effects of Low-Intensity Extremely High-Frequency Electromagnetic Radiation / A. B. Gapeyev, E. N. Mikhailik, N. K. Chemeris // *Microwave & Telecommunication Technology : 17th International Crimean Conference*, 10–14 Sept. 2007. – CriMiCo, 2007. – P. 30–32.

**Трибрат Н.С. Міогенні реакції мікроциркуляторного русла шкіри при дії низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання надто високої частоти / Н.С. Трибрат, О.М.Чуян // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 197-206.**

У роботі досліджена міогенна активність мікросудинного русла шкіри здорової людини при дії низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання надто високої частоти. Методом лазерної доплерівської флоуметрії показано, що низькоінтенсивне випромінювання викликає зміни міогенного компонента регуляції мікроциркуляторного русла, що виражається в дилатації гладком'язових прекапілярних сфінктерів в спокої, а також збільшенні їх чутливості і скорочувальної активності при експериментально модульованому збільшенні потоку крові, наслідком чого є збільшення нутрітивного кровотоку в спокої і активна констрикторна реакція, спрямована на обмеження периваскулярного набряку.

**Ключові слова:** електромагнітне випромінювання надто високої частоти, мікроциркуляція крові, міогенний компонент регуляції.

**MYOGENIC REACTIONS OF MICROVASCULATURE SKIN UNDER THE INFLUENCE OF LOW INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION EXTREMELY HIGH FREQUENCY**

*Tribrat N.S., Chuyan E.N.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

*E-mail: tribratnatalia@rambler.ru*

We have studied the activity of myogenic microvascular healthy person's skin by the action of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency. The study was conducted by laser Doppler flowmetry using occlusal and postural function tests. There is demonstrated that a single and course action of low intensity radiation causes changes in the amplitude of myogenic rhythms, resulting to dilation of the smooth muscle precapillary sphincters. The results of the postural and occlusal tests shows, that increase in sensitivity and contractile activity of smooth muscle cells in experimental modulated increase blood flow, resulting in an increase in active constrictor response aimed at limiting perivascular edema. The results of the present study suggest the involvement of myogenic component in the implementation of the biological effects of low-intensity EHF EMR system in the microcirculation. Impact EHF EMR increases the amplitude of the myogenic rhythm after the first and tenth sessions at 31,05 % ( $p \leq 0,05$ ) and 30,55 % ( $p \leq 0,05$ ), respectively. Low-intensity EHF EMR increases the index, characterizing the reactivity of smooth muscle precapillaries, during postural tests after a single exposure to 83,33 % ( $p \leq 0,05$ ) and after 10 times with at 71,64 % ( $p \leq 0,05$ ). EHF- influence leads to a reduction in the period of semi-occlusive perfusion level in the sample at 28,57 % ( $p \leq 0,05$ ) after single and 39,45% ( $p \leq 0,05$ ) after 10 times with the session , indicating an increase in active myogenic response of smooth muscle cells in modulating the increase of blood flow.

**Keywords:** electromagnetic radiation of extremely high frequency, blood microcirculation, myogenic component regulation.

**References**

1. Krupatkin A.I., Sidorov V.V., Laser Doppler flowmetry of microcirculation, *Medical*, 254 (2005).
2. Mayer M. F., Rose C. J., Hulsmann J.-O. Impaired 0.1 – Hz vasomotion assessed by laser Doppler anemometry as an early index of peripheral sympathetic neuropathy in diabetes. *Microvascular Research*, 65, 88 (2003).
3. Makolkin V.I., Microcirculation in cardiology, *WizArt*, 135 (2004).
4. Subbotina T.I., Yashin A., Experimental and theoretical study of EHF-irradiation of open liver operated rats and search for new possibilities of high-frequency therapy, *Herald of new medical technologies*, 5, 1, 122 (1998).
5. Stefanovska A., Bracic M. Physics of the human cardiovascular system. *Contemporary Physics*. 40, 1, 31 (1999).
6. Krupatkin A.I., Influence of sympathetic innervation in the microvascular tone and skin blood flow oscillations, *Human Physiology*, 32, 5, 95 (2006).
7. Voronov V.N., Khizhnyak E.P., Morphological changes in the skin by the action of EHF EMR Millimeter waves in medicine nonthermal intensity : *Intl. symposium: Sat of reports* (1991), p. 635.
8. Gapeev A.B., Chemeris N.K., Action continuous and modulated EHF EMR on animal cells. Biological effects of continuous EHF EMR, *Herald of new medical technologies*, 7, 1, 20 (2000).
9. Alovskaya A.A., Gabdulhakova A.G., Gapeev A.B., The biological effect of EHF EMR determined by the functional status of cells, *Herald of new medical technologies*, 5, 2, 11 (1998).

10. Adey, W. R., *Frohlich H* Physiological signaling across cell membranes and cooperative influences of extremely low frequency electromagnetic. Biological coherence and response to external stimuli. *New York: Springer*, 148 (Berlin Heidelberg, 1988).
11. Kizub I.V., Pavlova O.O., Solovjova A.I., Modern understanding of the role of protein kinase C in the regulation of smooth muscle tone of the walls of blood vessels, *Physiological journal*, 53, 2, 78 (2007).
12. Albert A. P., Paper A. S., Large W. A., Properties of a constitutively active Ca<sup>2+</sup> permeable non-selective channel in rabbit ear artery myocytes. *J. Physiol.*, 549, 143 (2003).
13. Gapeyev A. B. , Mikhailik E. N., Chemeris N. K. Mechanisms of Anti-Inflammatory Effects of Low-Intensity Extremely High-Frequency *Electromagnetic Radiation Microwave & Telecommunication Technology : 17th International Crimean Conference (CriMiCo, 2007)*, p. 30.

Поступила в редакцию 27.01.2014 г.

**УДК 612.35+616.36+591.132.5**

## **УЧАСТЬ ПРОСТАГЛАНДИНІВ У РЕАЛІЗАЦІЇ ВПЛИВУ БОМБЕЗИНУ НА МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ ГЕПАТОЦИТІВ**

*Цапенко П.К., Оглобля О.В., Лященко Т.П.*

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
E-mail: tsapenko Petr@yahoo.com*

Показано, що простагландин  $F_{2\alpha}$ , котрий є посередником між різними субпопуляціями клітин печінки, спричиняє гіперполяризацію мембран гепатоцитів, тобто чинить збуджуючий вплив на ці клітини. При цьому простагландини опосередковують та посилюють дію норадреналіну на паренхімні клітини печінки, що позначається на величині змін мембранного потенціалу. Блокада синтезу екзогенних простагландинів за допомогою ацетилсаліцилової кислоти не позначається на ефектах бомбезину. Отримані дані свідчать, що вплив бомбезину на мембранний потенціал гепатоцитів щурів не опосередкований дією простагландинів.

**Ключові слова:** бомбезин, мембранний потенціал, гепатоцит, простагландини.

### **ВСТУП**

Бомбезин та споріднені з ним пептиди поширені у багатьох системах органів вищих тварин та здійснюють вплив на велику кількість фізіологічних процесів, у тому числі гепатобіліарної системи. Зокрема, показано, що бомбезин та гастрин-релізінг пептид відіграють важливу роль у каналцевої секреції жовчі, а також забезпечують скорочення жовчного міхура та вихід жовчі у дванадцятипалу кишку [1]. Дослідження жовчосекреторної функції печінки щурів *in vivo* показали стимулювальний вплив бомбезину на процес жовчоутворення [2]. Існують дані про те, що бомбезин посилює протипухлинні ефекти субстанції Р [3], про вплив бомбезину на проліферацію гепатоцитів [4] та пригнічуючий вплив його антагоністів на ріст пухлинних клітин [5]. Проте, не зважаючи на численні відомості щодо впливу бомбезину на функціонування печінки, механізми цього впливу лишаються дотепер нез'ясованими.

Відомо, що внутрішньоклітинні посередники дії бомбезинових пептидів представлені інозитолтрифосфатом та діацилгліцеролом [6]. Наші попередні дослідження показали деполяризуючу дію бомбезину на мембранний потенціал гепатоцитів, при цьому зміни цього показника пов'язані виключно з хемокерованими каналами [7-9]. Разом з тим вазопресин, дія якого на гепатоцити так само пов'язана з системою інозитолтрифосфату та діацилгліцеролу, викликав гіперполяризаційні зміни мембранного потенціалу гепатоцитів [9], що змушує припустити непряму дію бомбезину на клітини паренхіми печінки. Так, показано, що катехоламіни справляють свій вплив на функції гепатоцитів не лише прямим шляхом, але й опосередковано через дію на непаренхімні клітини печінки та виділювані цими клітинами простагландини [10, 11]. Дослідження питання участі ендогенних простагландинів в ефектах бомбезину

і стало метою даної роботи. У якості показника функціонального стану клітин ми використовували мембранний потенціал, оскільки він відображає процеси синтезу та мембранного транспорту у секреторних клітинах, зокрема, гепатоцитах [7, 12].

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на самцях лабораторних білих щурів масою 200-250 г, які утримувались в стандартних умовах віварію. Дослідження на тваринах проведені з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

Дію бомбезину на мембранний потенціал гепатоцитів досліджували за допомогою мікроелектродної техніки за методом печінкових слайсів [13]. Для цього у наркотизованих щурів проводили відмивання печінки від крові за методикою Сеглена [14]. Препарат печінки перфузували у експериментальній камері стандартним позаклітинним сольовим розчином, температура розчину становила 37°C; склад розчину був таким (у ммоль/л): 140 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 глюкоза, 1 KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>, 10 НЕРЕС (рН 7,4, NaOH) [7].

Мікроелектроди виготовляли з боросилікатних заготовок зовнішнього діаметру 1,45 мм на півавтоматі для виготовлення скляних мікроелектродів МЭ-4. Мікроелектроди заповнювали 2,5 М розчином KCl у термостаті за температури 50°C протягом 10 годин. Опір готових мікроелектродів становив 100-120 МОм. Потенціал реєстрували за допомогою диференційного підсилювача, що був виготовлений дослідно-конструкторським виробництвом Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України на основі мікросхеми К140УД8Б. Сигнал від підсилювача спрямовувався через аналогово-цифровий перетворювач до комп'ютера, на якому реєструвався за допомогою спеціальної програми. Після реєстрації дані зберігалися у вигляді таблиць в файлах формату Excel, після чого проводилася їх статистична обробка.

Експеримент складався з таких серій:

1. З метою визначення, як позначається на мембранному потенціалі опосередкованню дії норадреналіну простагландинами, ми досліджували вплив норадреналіну на тлі дії ацетилсаліцилової кислоти та порівнювали з дією самого катехоламіну та самої ацетилсаліцилової кислоти.
2. Визначаючи характер дії простагландинів, вивчали вплив на мембранний потенціал гепатоцитів простагландину F<sub>2α</sub> (єдиного простагландину, до якого на гепатоцитах містяться рецептори [10]).
3. З'ясовували роль ендогенних простагландинів у реалізації ефектів бомбезину, застосовуючи пептид на тлі дії ацетилсаліцилової кислоти.

Ми перфузували препарат розчином досліджуваних речовин в максимально ефективній концентрації: норадреналін («Здоров'я», Харків) - 1 мкмоль/л [15], бомбезин («Sigma», США) – 50 нмоль/л [16], простагландин F<sub>2α</sub> - 5 мкмоль/л [17], ацетилсаліцилова кислота - 500 мкмоль/л [18].

Фактичний матеріал було оброблено методами варіаційної статистики. Проводився тест на нормальність розподілу Шапіро-Уїлка, нормально розподілені дані обчислювалися за критерієм Стюдента для залежних вибірок з урахуванням тесту Левена на гомогенність вибірки. Статистично значущими вважалися зміни при p<0,05.



### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Результати наших досліджень свідчать, що за умов блокади циклооксигенази норадреналін викликає гіперполяризацію мембран гепатоцитів, але меншої величини, ніж за умов застосування самого норадреналіну (Рис. 1). При цьому сама ацетилсаліцилова кислота не спричиняла змін мембранного потенціалу гепатоцитів, а отже будь-яка модуляція даного показника була пов'язана саме з дією гормону.

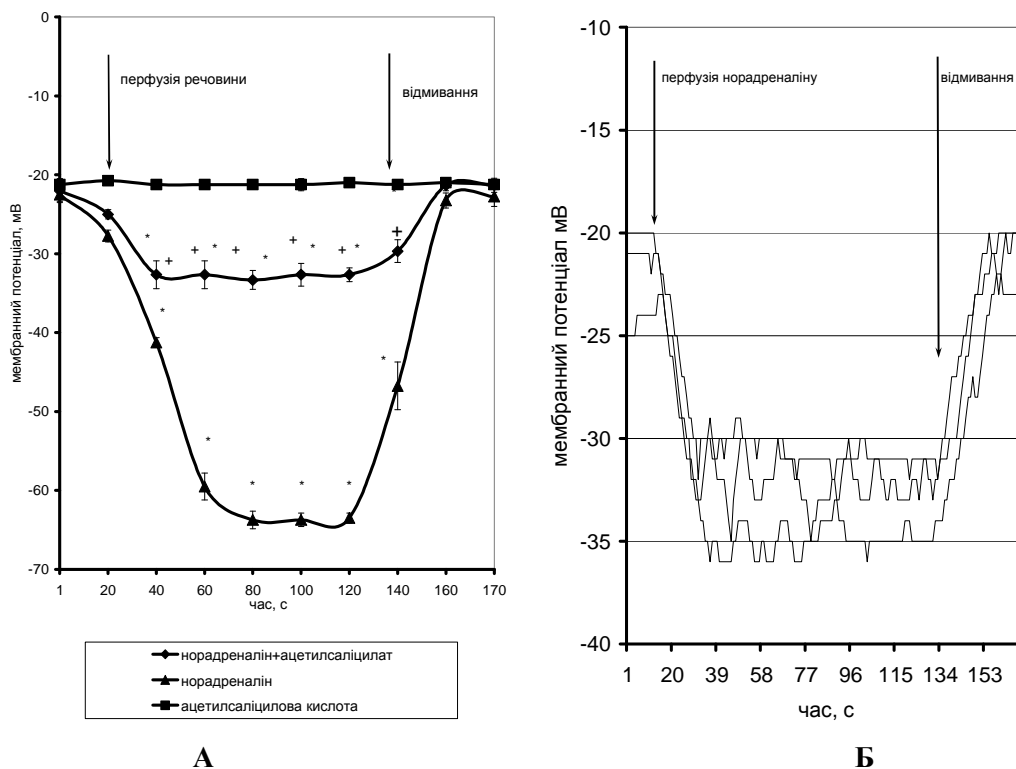


Рис. 1. А.- Вплив норадреналіну, ацетилсаліцилової кислоти та норадреналіну на тлі дії ацетилсаліцилової кислоти на мембранний потенціал гепатоцитів. \* -  $p < 0,05$  щодо вихідного рівня; + -  $p < 0,05$  щодо перфузії самого норадреналіну. Б - Вплив норадреналіну на тлі дії ацетилсаліцилової кислоти на мембранний потенціал гепатоцитів (оригінальні записи).

Також слід зазначити, що при дії норадреналіну на тлі дії ацетилсаліцилової кислоти спостерігалися секреторні потенціали, а отже стимуловальний вплив норадреналіну не повністю опосередковується дією через непаренхімні клітини печінки, проявляється й пряма дія гормону (рис.1).

Отже, наші дані підтверджують відомості про опосередкування ефектів норадреналіну простагландінами і одночасно свідчать про те, що блокада циклооксигенази проявляється на величині змін мембранного потенціалу гепатоцитів під впливом регулятора, дія якого опосередкована ейкозаноїдами.

З метою перевірки гіпотези про опосередкування дії бомбезину простагландинами, ми на першому етапі перфузували препарат розчином ейкозаноїду (рис.2). Наші результати свідчать, що простагландин  $F_{2\alpha}$  спричиняє гіперполяризацію мембран гепатоцитів, при цьому клітини в значній мірі проявляють індивідуальні особливості (рис.2), що може бути пов'язане з різним ступенем їх функціональної активності. Адже в умовах нашого експерименту ми не можемо контролювати від клітини якої зони печінкового ацинусу (зони 1-3 або перипортальної чи перивенозної зони за різними класифікаціями) ми проводимо відведення потенціалу.

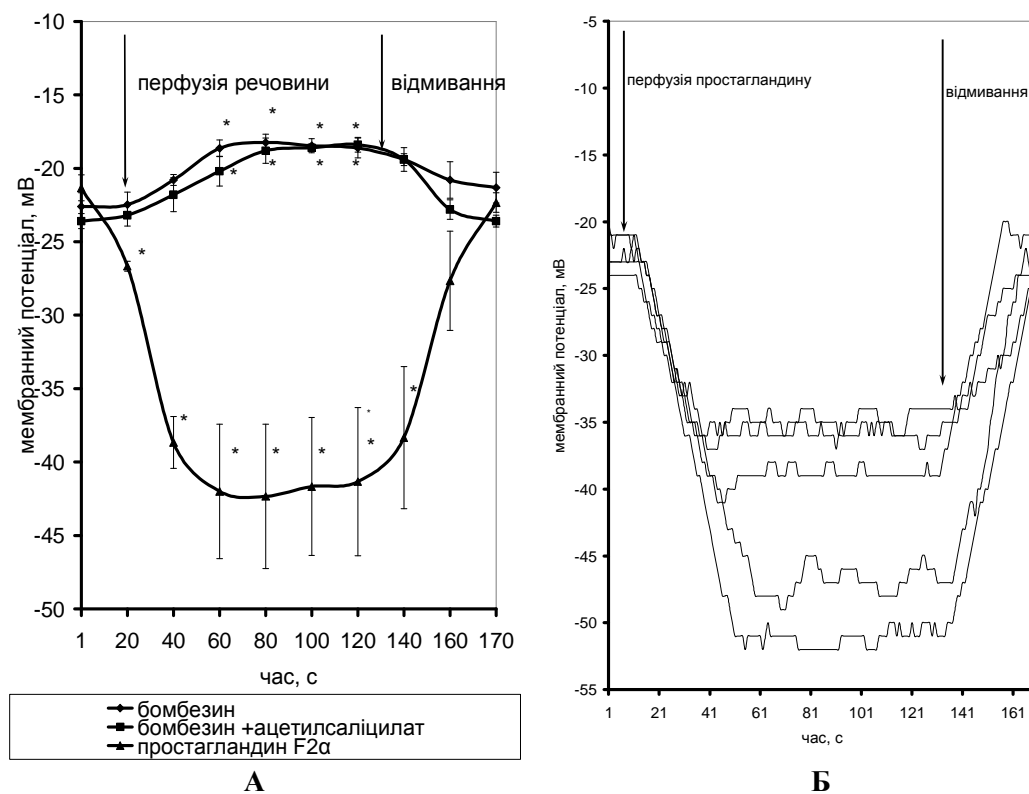


Рис. 2. А - Зміни мембранного потенціалу гепатоцитів щурів під впливом простагландину  $F_{2\alpha}$ , та бомбезину на тлі дії ацетилсаліцилової кислоти. \* -  $p < 0,05$  щодо контролю. Б - Вплив простагландину  $F_{2\alpha}$  на мембранний потенціал гепатоцитів (оригінальні записи).

Статистична обробка показала, що застосування простагландину  $F_{2\alpha}$  призводило до зростання мембранного потенціалу в середньому на 82%. Це зростання було значущим: t-критерій Стьюдента дорівнював 65,54, а рівень статистичної значущості був меншим за 0,001. Звертає увагу факт, що простагландин  $F_{2\alpha}$  викликає появу секреторних потенціалів порівняно високої амплітуди (рис. 2), тобто значно стимулює процеси трансмембранного транспорту

клітин паренхіми печінки, що може бути свідченням посилення виділення компонентів жовчі через апікальну мембрану гепатоцитів або посилення захоплення жовчних кислот через базолатеральну мембрану клітин.

Застосування бомбезину на тлі попереднього застосування блокатору циклооксигенази ацетилсаліцилової кислоти викликало деполяризаційні зміни мембранного потенціалу гепатоцитів, які не відрізнялися від таких за умов застосування самого пептиду (рис.3). Це свідчить про незалучення метаболітів арахідонової кислоти в реалізації впливу бомбезину на електричні процеси на мембранах гепатоцитів щурів. Отже, бомбезин справляє свій вплив на гепатоцити через інший посередник, найвірогідніше, внутрішньоклітинний, оскільки за даними літератури інші відомі міжклітинні посередники в печінці або ж не справляють свого впливу на процеси жовчоутворення, або ж виступають у ролі інгібіторів цих процесів [11, 19]. Це дозволяє припустити, що деполяризуюча дія бомбезину пов'язана із дією самого пептиду та його власними специфічними внутрішньоклітинними механізмами сигналізації. Оскільки ж показано, що зв'язування бомбезинових рецепторів із своїм агоністом спричиняє активацію фосфоліпази C та її каскадних механізмів, яка зумовлює гіперполяризацію мембран гепатоцитів через відкривання кальцій-залежних калієвих каналів, то деполяризація мембран клітин паренхіми печінки під впливом бомбезину може бути пов'язана з наявністю інших внутрішньоклітинних сигнальних шляхів пептиду. Питання встановлення цих шляхів бомбезину та переключення між ними лишається відкритим та потребує подальших досліджень.

#### ВИСНОВКИ

1. Бомбезин деполяризує мембрани гепатоцитів, що може вказувати на зміни метаболічної активності гепатоцитів та свідчить про активацію трансмембранного транспорту клітин.
2. Простагландини викликають гіперполяризацію мембран гепатоцитів, що є свідченням зростання їх метаболічної активності, та опосередковують і посилюють дію норадреналіну на ці клітини.
3. Оскільки пригнічення активності циклооксигенази не змінює характер дії бомбезину на мембранний потенціал гепатоцитів, то це вказує на те, що дія бомбезину на гепатоцити не залучає простагландини.

#### Список літератури

1. Cho W.K. Intracellular pH regulation in bombesin-stimulated secretion in isolated bile duct units from rat liver / Cho W.K., Mennone A., Boyer J.L. // *AJP - Gastrointest. Liver Physiol.* – 1998.- vol. 275, issue 5. – P. 1028-1036.
2. Мороз О.Ф. Участь бомбезину у регуляції жовчосекреторної функції печінки щурів / Мороз О.Ф.: Автореферат... к. біолог. наук, спец.: 03.00.13 - фізіологія людини і тварин. — К. : Київський нац. ун-т ім. Т. Шевченка, 2009. — 19 с.
3. MacKinnon A.C. Expression of V1A and GRP receptors leads to cellular transformation and increased sensitivity to substance-P analogue-induced growth inhibition / MacKinnon A.C., Tufail-Hanif U., Lucas C.D. et al. // *Br. J. Cancer.*- 2005.- Vol.92(3).- P. 522-531.

4. Assimakopoulos S.F. Stimulation of oval cell and hepatocyte proliferation by exogenous bombesin and neurotensin in partially hepatectomized rats / Assimakopoulos S.F., Tsamandas A.C., Alexandris I.H., Georgiou C., Vagianos C.E., Scopa C.D. // World J. Gastrointest. Pathophysiol.- 2011.- Vol.2(6).- P.146-154.
5. Bajo A.M. Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers / Bajo A.M., Schally A.V., Groot K., Szepeshazi K. // Br. J. Cancer.- 2004.- Vol.90, N1.- P. 245-252.
6. Santiskulvong C. EGF receptor function is required in late G1 for cell cycle progression induced by bombesin and bradykinin / Santiskulvong C., Sinnet-Smith J., Rozengurt E. // Am J Physiol Cell Physiol.- 2001.- vol. 281, issue 3. – P. 886-898.
7. Aromataris E.D. Glucagon activates Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in rat hepatocytes / Aromataris E.D., Roberts M.L., Barritt G.J. et al. // J. Physiol. – 2006. – 573. – Issue 3. – P.611-625.
8. Цапенко П.К. Вплив бомбезину на електричну активність гепатоцитів щурів / Цапенко П.К., Оглобля О.В., Лященко Т.П. // Фізика живого. – 2009. - №2. – С.68-73.
9. Цапенко П.К. Зміни мембранного потенціалу гепатоцитів щурів під впливом вазопресину / Цапенко П.К., Лященко Т.П. // Фізіологічний журнал. – 2011. - №4. – С.77-82.
10. Kmiec Z. Cooperation of liver cells in health and disease / Kmiec Z. // Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. – 2001. – Vol.161. – P.149-151.
11. Oben J.A. Sympathetic nervous system regulation of liver repair / Oben J.A., Diehl A.M. // Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.- 2004.- Vol. 280(1).- P. 874-883.
12. Фролькис В.В. Влияние активации биосинтеза белка на уровень мембранного потенциала клеток / Фролькис В.В. // Биофизика. – 1974. – 19. – №3. – С.470-473.
13. Lyall V. Measurement of intracellular chloride activity in mouse liver slices with microelectrodes / Lyall V., Croxton T.L., Armstrong W.M. // Biochim. Biophys. Acta. – 1987. – N.903(1). – P.56-67.
14. Li A.P. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development / Li A.P. // Chemico-biological interactions. – 2007. – V.168(1). – 16-29.
15. Sanchez-Gutierrez J.C. Modulation of gluconeogenesis by epinephrine in hepatocytes isolated from genetically obese (fa/fa) Zucker rats / Sanchez-Gutierrez J.C. // Arch. Biochem. Biophys.- 2000.- Vol.373(1).- P. 249-254.
16. Mitchell F.M. Differential modulation of bombesin-stimulated phospholipase C and mitogen-activated protein kinase activity d-Arg, d-Phe, D-Trp, Leu Substance P / Mitchell F.M., Heasley L.E., Qian N.-X. et al. // American society for Biochemistry and molecular biology, inc.- 1995.- Vol.210, No 15.- issue 14.- P. 8623-8628.
17. Koukoui O. Effects of the prostaglandins PGF<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> on calcium signaling in rat hepatocyte doublets / Koukoui O., Boucherie S., Sezan A. et al. // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.- 2006.- Vol. 290.- P. G66-G73.
18. Sils D. Inhibition of platelet aggregation and thromboxane production by low concentrations of aspirin in vitro / Sils D., Rodgers S.E., Lloyd J.V. et al. // Clin. Sci.- 1988.- Vol. 74(5).- P. 491-497.
19. Boyer J.L. Bile formation / Boyer J.L., Nathanson M.H. // Shiff's diseases of the liver.- Philadelphia.- 1999.- P. 119-142.

**Цапенко П.К. Участие простагландинов в реализации влияния бомбезина на мембранный потенциал гепатоцитов / П.К. Цапенко, О.В. Оглобля, Т.П. Лященко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 207-214.**

Показано, что простагландин F<sub>2α</sub>, который является посредником между разными субпопуляциями клеток печени, вызывает гиперполяризацию мембран гепатоцитов, то есть оказывает возбуждающее воздействие на эти клетки. При этом простагландины опосредуют и усиливают действие норадреналина на паренхимные клетки печени, что сказывается на величине изменений их мембранного потенциала. Блокада синтеза экзогенных простагландинов при помощи ацетилсалициловой кислоты не изменяет эффекты бомбезина. Полученные данные свидетельствуют, что влияние бомбезина на мембранный потенциал гепатоцитов крыс не опосредован воздействием простагландинов.

**Ключевые слова:** бомбезин, мембранный потенциал, гепатоцит, простагландины.

**THE ROLE OF PROSTAGLANDINS IN REALIZATION OF BOMBESIN  
INFLUENCE ON HEPATOCYTES MEMBRANE POTENTIAL**

*Tsapenko P.K., Ogloblya O.V., Liashchenko T.P.*

*Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine  
E-mail: tsapenkopetr@yahoo.com*

Stimulating effects of bombesin on cholangyocyte secretion activity, gall bladder contraction and bile formation was shown by various authors. Influence of bombesin on hepatocyte proliferation activity is known also. But mechanism of bombesin effects on hepatocyte function is unclear. Our previous investigation suggests that bombesin evokes depolarization of rat liver cells by chemosensitive ionic channels activation. By contrast vasopressin, which has the same second messengers as bombesin, provokes hepatocyte hyperpolarization. It suggests that bombesin effect on hepatocyte membrane potential may involve releasing of prostaglandins by non-parenchymal liver cells, similar to norepinephrine liver cells regulation.

Bombesin effect on hepatocyte membrane potential was investigated by microelectrode technique on liver slices. For the preparation of liver slices, male rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of sodium thiopental (50 mg kg<sup>-1</sup> body mass). After laparotomy liver was perfused by standard medium (in mM: 140 NaCl, 4 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucose, 1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 HEPES, adjusted to pH 7.2-7.4 with NaOH) then it was isolated and sliced. Slices were placed in perfused silgard-covered bath at 37°C. Silver chloride indifferent electrode was attached with medium by salt bridge. Microelectrodes were made from borosilicate glass (interior diameter 1.45 mm, resistance below 110 MΩ) and filled by 2.5 M KCl. Hepatocyte membrane potential was measured in the presence of: 1) norepinephrine and norepinephrine at cyclooxygenase inhibition by acetylsalicylic acid, 2) acetylsalicylic acid alone, 3) prostaglandin F<sub>2α</sub> (only one prostaglandin which has receptors on hepatocytes), 4) bombesin with acetylsalicylic acid.

Norepinephrine evokes hepatocyte hyperpolarization from -25 to -65 mV. By contrast, at cyclooxygenase inhibition norepinephrine provokes hepatocyte hyperpolarization to -35 mV. Acetylsalicylic acid has no effect on rat liver hepatocyte electrical potential, so prostaglandins mediate catecholamine influence on these cells. It should also be stated that norepinephrine in the presence of acetylsalicylic acid induces membrane potential oscillations (secretory potentials). This fact suggests that membrane potential changes are induced by catecholamine and prostaglandin together.

Prostaglandin F<sub>2α</sub> evokes hepatocyte hyperpolarization; in this case there is an inherent characteristic of hepatocyte membrane potential changes, that may depends on hepatocyte functional activity. It should be noted that prostaglandin F<sub>2α</sub> provokes high amplitude secretory potentials of rat liver cells, what indicates that prostaglandin activates hepatocyte transmembrane transport system and induces increasing of bile flow trough apical membrane or increasing of bile acid uptake on basolateral cell membrane.

Bombesin at cyclooxygenase inhibition by acetylsalicylic acid causes cell depolarization which was not differ from bombesin-induced depolarization. So, prostaglandins are not mediate bombesin influence on rat hepatocyte membrane potential. It suggests that there is another (maybe intracellular) bombesin messenger. We can assume that bombesin-induced rat liver cells depolarization is not mediated by protein kinase C intracellular cascade. Therefore intracellular signal pathways of bombesin are still unclear and should be investigated.

Conclusion: prostaglandin F<sub>2α</sub>, which is a messenger between liver cells subpopulations, evokes hepatocyte membrane hyperpolarization and has a stimulating action on these cells. Prostaglandins mediate and potentiate norepinephrine action on rat liver cells membrane potential difference. Inhibition of endogenous prostaglandins synthesis by acetylsalicylic acid does not change a bombesin effects on hepatocytes electrical membrane potential. This fact suggests that influence of bombesin on rat liver hepatocytes membrane potential does not mediated by prostaglandins.

**Keywords:** bombesin, membrane potential, hepatocyte, prostaglandins.

### References

1. Cho W.K., Mennone A., Boyer J.L., Intracellular pH regulation in bombesin-stimulated secretion in isolated bile duct units from rat liver, *AJP - Gastrointest. Liver Physiol.*, **275**, 1028 (1998).
2. Moroz O.F., Effect of bombesin on bile formation in the rat liver, *Dissertacion for the candidate biological science degree in speciality 03.00.13 – human and animal physiology* (Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, 2009), 19 p.
3. MacKinnon A.C., Tufail-Hanif U., Lucas C.D. Expression of V1A and GRP receptors leads to cellular transformation and increased sensitivity to substance-P analogue-induced growth inhibition, *Br. J. Cancer.*, **92**, 522 (2005).
4. Assimakopoulos S.F., Tsamandas A.C., Alexandris I.H., Georgiou C., Vagianos C.E., Scopa C.D., Stimulation of oval cell and hepatocyte proliferation by exogenous bombesin and neurotensin in partially hepatectomized rats, *World J. Gastrointest. Pathophysiol.*, **2**, 146 (2011).
5. Bajo A.M., Schally A.V., Groot K., Szepeshazi K., Bombesin antagonists inhibit proangiogenic factors in human experimental breast cancers, *Br. J. Cancer.*, **90**, 245 (2004).
6. Santiskulvong C., Sinnet-Smith J., Rozengurt E., EGF receptor function is required in late G<sub>1</sub> for cell cycle progression induced by bombesin and bradykinin, *Am J Physiol Cell Physiol.*, **281**, 886 (2001).
7. Aromataris E.D., Roberts M.L., Barritt G.J., Glucagon activates Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in rat hepatocytes, *J. Physiol.*, **573**, 611 (2006).
8. Tsapenko P.K., Ogloblia O.V., Lyashchenko T.P., Influence of bombesin on electrical activity of rat hepatocytes, *Physics of the alive*, **2**, 68 (2009).
9. Tsapenko P.K., Liashchenko T.P., Effect of vasopressin on the membrane potential of rat hepatocytes, *Fiziologichnyi zhurnal*, **4**, 77 (2011).
10. Kmiec Z., Cooperation of liver cells in health and disease, *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, **161**, 149 (2001).
11. Oben J.A., Diehl A.M., Sympathetic nervous system regulation of liver repair, *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, **280**, 874 (2004).
12. Frol'kis V.V., Effect of activation of protein biosynthesis on the magnitude of cell membrane potential, *Biofizika*, **19**, 470 (1974).
13. Lyall V., Croxton T.L., Armstrong W.M., Measurement of intracellular chloride activity in mouse liver slices with microelectrodes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **903**, 56 (1987).
14. Li A.P., Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development, *Chemico-biological interactions.*, **168**, 16 (2007).
15. Sanchez-Gutierrez J.C., Modulation of gluconeogenesis by epinephrine in hepatocytes isolated from genetically obese (fa/fa) Zucker rats, *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 249 (2000).
16. Mitchell F.M., Heasley L.E., Qian N.-X., Differential modulation of bombesin-stimulated phospholipase C and mitogen-activated protein kinase activity d-Arg, d-Phe, D-Trp, Leu Substance P, *American society for Biochemistry and molecular biology, inc.*, **210**, 8623 (1995).
17. Koukoui O., Boucherie S., Sezan A., Effects of the prostaglandins PGF<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> on calcium signaling in rat hepatocyte doublets, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **290**, G66 (2006).
18. Sils D., Rodgers S.E., Lloyd J.V., Inhibition of platelet aggregation and thromboxane production by low concentrations of aspirin in vitro, *Clin. Sci.*, **74**, 491 (1988).
19. Boyer J.L., Nathanson M.H., Bile formation, *Shiff's diseases of the liver*, edited by Schiff E.R., Sorrell M.F., Maddrey W.C. (Lippincott-Raven, Philadelphia PA, 1999), 119.

Поступила в редакцию 25.01.2014 г.

УДК 594.124:577.1(262,5)

## ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ МЕДИ В МЯГКИХ ТКАНЯХ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА И СТАДИИ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД

Челядина Н.С.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Национальной академии наук  
Украины, Севастополь, Украина  
E-mail: chelydina2007@mail.ru

Показано, что содержание Cu в мягких тканях *M. galloprovincialis* зависит от линейных параметров, сезона, пола и стадии зрелости гонад моллюска. В мидиях с длиной раковины 30 и 50 мм в летний сезон, при интенсивном соматическом росте, содержание меди в мягких тканях выше (до 156 мкг/г), чем осенью (до 63,8 мкг/г). Коэффициенты вариации (CV %) концентрирования меди в мягких тканях самцов выше, чем у самок.

**Ключевые слова:** *Mytilus galloprovincialis*, концентрация меди, индивидуальная изменчивость, Чёрное море.

### ВВЕДЕНИЕ

Мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam., культивируемая в Чёрном море, является перспективным сырьём для пищевой, фармакологической и сельскохозяйственной промышленности. Мидии содержат микроэлементы, витамины, иммуномодуляторы, радиопротекторы и т.д. Однако, пригодность моллюсков для потребления регламентируется уровнем их загрязнения, одним из основных показателей которого является концентрация тяжёлых металлов в их тканях. Медь занимает особое место среди тяжелых металлов, являясь опасным токсикантом. Известно, что ионы Cu могут блокировать фосфатные и аминные группы в молекуле ДНК, изменять её структуру и быть потенциальным мутагеном. В то же время медь выступает как кофактор некоторых ферментативных систем, обеспечивая их функционирование [1].

Имеется обширная литература по изучению содержания меди в тканях моллюсков в зависимости от различных факторов окружающей среды и физиологического состояния моллюска [2–6]. Однако в этих работах анализировались обобщённые пробы мягких тканей, взятых от нескольких особей, при этом индивидуальная особенность отдельных организмов концентрировать микроэлементы не учитывалась. Исследования индивидуального содержания меди в мягких тканях моллюска могут быть полезны для оценки полиморфизма мидий, качества продукции фермы и возможности унификации продукции. Наличие в популяции изменчивости подтверждается фенотипическим разнообразием

признаков, связанных с генетической детерминацией [7, 8], поэтому окраску раковины моллюска необходимо учитывать при изучении биохимических характеристик *M. galloprovincialis*, в частности, при накоплении моллюсками тяжёлых металлов. Цель работы: изучение содержания меди в мягких тканях культивируемого *M. galloprovincialis* с длиной раковины 30 мм и 50 мм в зависимости от окраски раковины, пола и стадии зрелости гонад в летний и осенний периоды года.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальную часть работы проводили в летний и осенний периоды 2007 и 2010 гг. Мидии собирали с длиной раковины  $30,20 \pm 0,02$  мм и  $50,30 \pm 0,04$  мм с верёвочных коллекторов (глубина 3–4 м) экспериментальной мидийной фермы, расположенной в бухте Мартынова (г. Севастополь). Данный выбор позволил ограничить вариабельность моллюсков по длине раковины. Всего проанализировано 654 экземпляров.

В изучаемых размерных группах моллюсков определяли окраску раковины, пол, стадию зрелости гонад, вес мягких тканей, содержание Cu в мягких тканях. Окраску раковины моллюска определяли по методике, предложенной Драголи [9]. Для определения пола и стадии зрелости гонад использовали методику визуального изучения мазков гонад при помощи микроскопа МБИ-6. [10]. После определения пола и стадий зрелости гонад мидий, мягкие ткани отделяли от створки при помощи пластмассового ножа, удаляя мантийную жидкость. Мягкие ткани предварительно обсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали на аналитических весах ВЛР–200. Индивидуальное содержание меди в мягких тканях определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии после кислотной минерализации, выражали в мкг/г сух. ткани [11]. Полученные результаты обрабатывали статистически [12].

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были проведены исследования индивидуального содержания меди в мягких тканях разноразмерных *M. galloprovincialis* в зависимости от пола моллюска и сезона года [13]. В настоящей работе проведён более глубокий анализ отмеченных закономерностей, а также показано влияние стадий зрелости гонад и окраски раковины на концентрирование меди мягкими тканями моллюсков.

С целью оценки индивидуальной изменчивости изучено содержание Cu в мягких тканях мидий двух размерных групп (рис. 1).

Моллюски более интенсивно накапливали Cu в мягких тканях в летний период, после весеннего нереста, в процессе соматического роста, что ранее отмечалось нами и другими авторами [11, 3, 14, 15]. Отмеченная закономерность, по-видимому, связана с гидролого-гидрохимическими особенностями акватории расположения фермы. В летний период года на взморье г. Севастополя часто отмечаются сгонные явления, после чего наблюдаются «вспышки» развития фитопланктона, который является аккумулятором соединений меди и других тяжёлых металлов, благодаря высокой площади поверхности организмов [16]. Сгонные явления способствуют



переходу меди из донных отложений в водную толщу [17, 14], а при разложении высокой биомассы фитопланктона в воду так же выделяются растворённые ионы меди. В летний сезон антропогенная нагрузка на акватории взморья г. Севастополя возрастает, это касается и токсичных металлов. Возможно, что и этот фактор внёс определённую роль в более высокое содержание меди в тканях мидий.

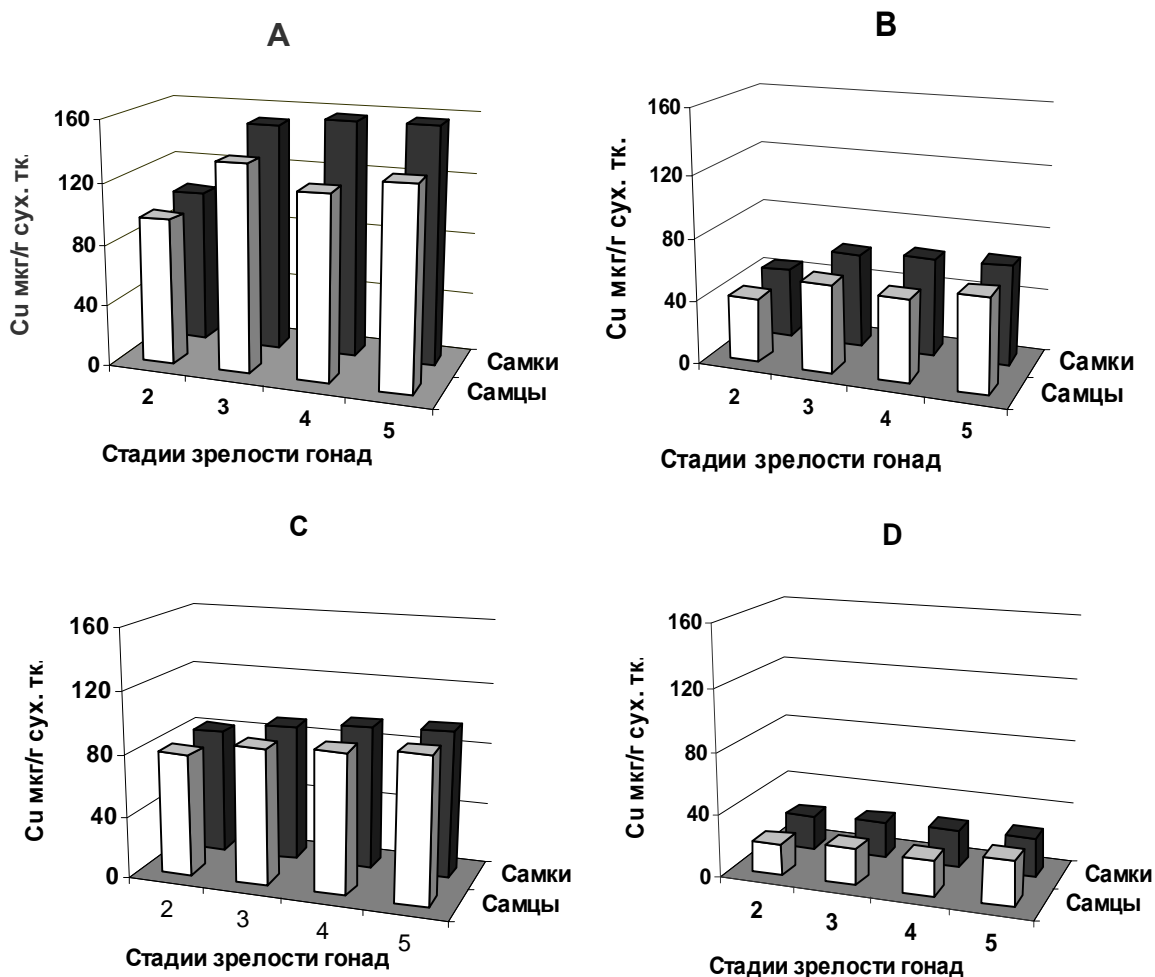


Рис.1. Концентрация Cu в мягких тканях самцов и самок *M. galloprovincialis* в зависимости от стадии зрелости гонад в разные сезона года (А – лето, 30 мм; В – осень, 30 мм; С – лето, 50 мм; D – осень, 50 мм).

При сравнении содержания Cu в мягких тканях молодежи и взрослых особей наблюдалась более высокая способность мелких моллюсков накапливать Cu, что уже обсуждалось нами ранее [14]. У мидий с размером раковин 30 мм

энергетические процессы и фильтрационная активность протекают быстрее, чем у моллюсков товарного размера (50 мм). Этим, по-видимому, объясняется более высокое содержание меди в мягких тканях мидий мелкого размера. У самок обеих размерных групп, по сравнению с самцами, прослеживается тенденция к более высокому содержанию Cu, как в летний, так и осенний периоды года. Концентрация Cu в мягких тканях самцов и самок изменялась в зависимости от стадии гаметогенеза моллюсков, увеличиваясь на 3 и 4 стадиях зрелости гонад. К 5-ой, нерестовой, стадии, наблюдалась тенденция к небольшому увеличению или сохранению содержания Cu на одном уровне у самок и незначительному уменьшению его у самцов. Стабильное увеличение содержания меди у самок при переходе от 2-ой к 4-ой стадии репродуктивного цикла связано с ростом ооцитов в гонадах, при котором возрастает содержание липидов, низкомолекулярных белков и углеводов, с которыми медь образует прочные связи [18]. Стабилизация содержания меди в мягких тканях мидий или её уменьшение к 5-ой стадии (нересту), связана с выходом тяжёлых металлов, в частности меди, в морскую среду с половыми продуктами [19]. Противоположная картина по содержанию тяжёлых металлов в мягких тканях моллюсков в зависимости от сезона года получена для *Mytilus edulis* [20]. Авторы отмечали минимальное содержание меди в мягких тканях летом и возрастание её содержания к зиме. Такие различия в концентрировании меди моллюсками рода *Mytilus* связаны, по-видимому, с различиями в сезонности размножения изучаемых объектов. Известно, что *Mytilus edulis* нерестится летом и основной пик нереста приходится на начало июля [21], когда авторы и отмечали минимальное содержание микроэлемента в теле моллюска.

Рассчитаны коэффициенты вариации (CV) содержания Cu в мягких тканях мидий различного размера, пола и фена (табл. 1).

Таблица 1.

**Индивидуальная вариабельность содержания Cu  
в мягких тканях мидий разного размера, пола и окраски раковины**

Cu мкг*г <sup>-1</sup> сух массы ткани, CV±Δ CV, %				
Окраска раковины	30 мм		50 мм	
	♂	♀	♂	♀
Коричневая	70,8 ± 16,4	76,1 ± 14,0	51,0 ± 13,1	55,2 ± 10,2
	CV=52,9±19,1	CV=23,9±10,4	CV=58,5±21,7	CV=36,7±12,0
Чёрная	81,9 ± 21,8	86,1 ± 16,6	56,1 ± 13,5	63,3 ± 9,9
	CV=52,3±18,7	CV=25,5± 7,8	CV=54,9±19,7	CV=35,5±15,2

Показано, что коэффициенты вариации содержания меди в мягких тканях самцов и самок мидий обеих размерных групп высокие. Содержание Cu в мягких тканях самцов более вариабельно (табл. 1). При сравнении коэффициента CV можно отметить, что содержание Cu у особей товарного размера более вариабельно, чем у

мидий 30 мм размера. Отличий в вариабельности содержания меди в мягких тканях мидий в зависимости от окраски раковины не выявлены.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Индивидуальное содержание Cu в мягких тканях *M. galloprovincialis* зависит от размера, сезона, пола и стадии зрелости гонад моллюска.
2. В мидиях с длиной раковины 30 и 50 мм в летний сезон, при интенсивном соматическом росте, содержание меди в мягких тканях выше (до 156 мкг/г), чем осенью (до 63,8 мкг/г).
3. Содержание Cu в мягких тканях самцов варьирует больше (CV=57 %), чем у самок (CV=36 %).
4. Влияния окраски раковины на вариабельность содержания меди в мягких тканях мидий не выявлено.

#### Список литературы

1. Яцимирский К.Б. Изучение комплекса ионов меди с дизоксирибонуклеиновой кислотой / К.Б. Яцимирский, Е.Е. Крисс, Т. И. Ахrameева // Доклады академии наук СССР, 1966. – Т. 168, №4. – С 840–843.
2. Карасёва Е. М. Накопление тяжелых металлов в половых железах и соматических органах двустворчатых моллюсков / Е. М. Карасёва // Биология моря. – 1993. – № 2. – С. 66–67.
3. Саенко Г. Н. Металлы и галогены в морских организмах / Г. Н. Саенко – М.: Наука, 1993. – 252 с.
4. Akdogan S. Variations in trace metal content of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamark with season and size / S. Akdogan, M. Unsal // Tr. J. of Zoology. – 1993. – Vol. 17. – P. 117–125.
5. Nicholson S. Accumulation of metals in the soft tissues, byssus and shell of the mytilid *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters / S. Nicholson, P. Szefer // Mar. Pollut. Bull – 2003. – Vol. 46. P. 1039-1043.
6. Viarengo A., Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam./ A. Viarengo, L. Canesi, M. Pertica [et. al.] // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1990. – Vol. 97. – P. 37–42.
7. Хорольская Е.Н. Изучение индивидуальной изменчивости *Pyrhocoris apterus* в природных популяциях г. Сумы и г. Белгорода / Е.Н. Хорольская, И.В. Батлуцкая // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2008. – 3, вып. 6. – С. 12–17.
8. Sukhotin A. Shell colors polymorphism and growth variability in *Mytilus* population / A. Sukhotin // Abstracts of 31 European marine Biology Symposium. – St. – Petersburg, Sept. 1996. – 1996. – p. 24.
9. Драголи Л.В. К вопросу о взаимосвязи между вариациями Черноморской мидии (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) / Л.В. Драголи // Распределение бентоса и биология донных животных в южных морях. – К.: Наук. думка, 1966. – С. 3–15.
10. Пиркова А. В. Размножение мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. и элементы биотехнологии её культивирования : автореф. дисс. на соискание учёной степени канд. биол. наук : спец. 03.00.18 «Гидробиология» / А. В. Пиркова. – Севастополь, 1994. – 25 с.
11. Поспелова Н. В. Элементы баланса каротиноидов,  $\alpha$ -токоферола и некоторых металлов в системе «взвешенное вещество – мидии – биоотложения: автореф дисс. на соискание учёной степени канд. биол. наук : спец. 03.00.17. «Гидробиология» / Н. В. Поспелова – Севастополь, 2008. – 25 с.
12. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных / А. А. Халафян – М.: ООО «Бином- пресс», 2007 г. – 512 с.
13. Челядина Н.С. Сезонные изменения содержания меди в створках и мягких тканях *Mytilus galloprovincialis* Lam. / Н.С. Челядина, Л.Л. Смирнова // Еколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження моллюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища: Збірник наукових праць. – Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І. Франка. – 2-й вип. – 2005. – 384 с.

14. Христофорова Н. К. Тяжёлые металлы в промысловых и культивируемых моллюсках залива Петра Великого. Владивосток / Н. К. Христофорова, В. М. Шулькин, В. Я. Кавун: Даль-наука. – 1994. 296 с.
15. Unsal M. A preliminary study on the metal content of mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lam. in eastern Black Sea / M. Unsal., S. Besiktepe // Tr. J. Zoology. – 1994. – 18. – P. 265 – 271.
16. Скрипник И.А. Реакция фитопланктонных сообществ на локальное загрязнение медью. Эколого-функциональні та фауністичні аспекти дослідження моллюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища / И.А. Скрипник, Л.Ю. Секундяк., Е.В. Кирсанова // Зб. наук. пр. – Житомир, 2005. – Вип. 2. – С. 225–227.
17. Митропольський О.Ю. Екогеохімія Чорного моря / О.Ю. Митропольський, Е.І. Наседкіна, Н.П. Осокіна – К. : Академперіодика, 2006. – 278 с.
18. Мотавкин П.А. Регуляция размножения и биотехнология получения половых продуктов у двустворчатых моллюсков / П.А. Мотавкин, Ю.С. Хотимченко, И.И. Дередович – М.: Наука, 1990. – 215 с.
19. Караванцева Н. В., Поспелова Н.В., Бобко Н. И., Нехорошев М. В. Методика отбора половых продуктов мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam./ Система контроля окружающей среды. Вып. 17. Сборник науч. трудов. Севастополь 2012. с. 184 – 187.
20. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis* / J. Amiard, C. Amiard-Triquet, B. Berthet, C. Métaeyer // Mar. Biol. – 1986. – Vol. 90, №3. – P. 425–431.
21. Гудимов А. В. Поведенческие реакции мидий в условиях колебаний факторов среды прибрежья Восточного Мурмана : автореф. дисс. на соискание научной степени канд. биол. наук : спец. 25. 00. 28 / А. В. Гудимов – Мурманск, 2004. – 25 с.

**Челядіна. Н.С.** Індивідуальна мінливість змісту міді у м'яких тканинах *Mytilus galloprovincialis* Lam. в залежності від фену, статі та стадії зрілості гонад / Н.С. Челядіна // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 215-222.

Показано, що індивідуальний зміст Cu в м'яких тканинах *M. galloprovincialis* залежить від розміру, сезону, статі та стадії зрілості гонад моллюска. У мідях з довжиною раковини 30 і 50 мм в літній сезон, при інтенсивному соматичному рості, вміст міді в м'яких тканинах вище (max = 156 мкг / г), ніж восени (max = 63,8 мкг / г). Зміст Cu в м'яких тканинах самців варіює більше (CV = 57%), ніж у самок (CV = 36%). Впливи забарвлення раковини на варіабельність вмісту міді в м'яких тканинах мідій не виявлено.

**Ключові слова:** індивідуальна мінливість, мідь, *Mytilus galloprovincialis*, Чорне море.

## INDIVIDUAL VARIABILITY OF THE COPPER CONTENT IN THE SOFT TISSUES OF *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAM. DEPENDING ON PHENE, SEX AND STAGE OF GONADS MATURITY

*Chelyadina N.S.*

*Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, Crimea, Ukraine*  
*E-mail: chelyadina2007@mail.ru*

The individual copper content in the soft tissues of *M. galloprovincialis* depending on the season, phene, sex and stage of gonads maturity are studied. Mussels with a shell length  $30,20 \pm 0,02$  and  $50,30 \pm 0,04$  mm was taken from collectors of farm situated in Martynova bay (Sevastopol) during 2007 and 2010 in the summer and autumn seasons. It is shown individual Cu content in the soft tissues *M. galloprovincialis* depends on size, sex and stage of gonad maturity of mollusks and also on a season. Mussels accumulated

Cu in soft tissues more intensively in the summer season after the spring spawning during of somatic growth. The copper content in soft tissues of mussels was higher in the summer season during somatic growth (up to 156 mg/g) than in the autumn (up to 63.8 mg/g). This regularity, apparently was associated with the hydrological and hydrochemical features of the farm waters. Upwellings off the coast of Sevastopol are often registered in the summer season and then phytoplankton "bloom" follows. Phytoplankton is an accumulator of copper and other heavy metals due to high surface area of the body. Upwellings promote the transition copper from sediment into the water column. Anthropogenic impact on the waters of the Sevastopol are increases in the summer season, this also concerns to toxic metals. Possibly this factor is introduced a role in higher copper content in soft tissues of mussels.

The small mussels have higher ability to accumulate Cu in a soft tissues then mussels of market size (50 mm). Energetic processes and filtration activity proceed faster in mussels with shell 30 mm than in ones with shells 50 mm. This can explain the higher copper content in the soft tissues of small-sized mussels. The tendency towards higher content of Cu in the summer and autumn seasons for females of both size groups compared with males is observed.

The Cu concentration in the soft tissues of males and females varied depending on the stage of gametogenesis of mussels increasing by 3 and 4 stages of gonad maturity. By the 5 stage of gonad maturity there was a tendency to a slight increase or stabilization in Cu content on the same level in females and to a slight decrease in one in males.

The females have a stable increase in the copper content from the 2 to 4 stage of the reproductive cycle. It is connected with oocyte growth in gonads while there are increased content of lipid, low molecular weight proteins and carbohydrates which the copper has a strong connection with.

Stabilization of copper content in the soft tissues of mussels or its reduction to the 5 stage (spawning) is associated with the release of heavy metals particularly copper in the marine environment with reproductive products.

The index of variation (CV, %) of the Cu content in the soft tissues of mussels of different sizes, sex and phene are calculated. It is shown the index of variation of copper content in the soft tissues of males and females of both size groups of mussels are high. The Cu content in the soft tissues of males is more variable. The Cu content in the soft tissues of mussels of commercial sized are more variable than in 30 mm sized mussels. There are no differences in a variability of the copper content in the soft tissues of mussels depending on the phene.

**Keywords:** individual variability, copper, *Mytilus galloprovincialis*, Black Sea

#### References

1. Yatsimirskii K.B., Criss E.E., Ahrameeva T.I. Study of the complex is copper ions with deoxyribonucleic acid. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1996, 168, No. 4, 840–843 (in Russ.).
2. Karaseva E.M. Accumulation of heavy metals in the gonads and somatic organs of bivalves, Mar. Biol., 2, 66 (1993).
3. Saenko G.N. Metals and halogens in marine organisms, p. 252.(Moscow, 1993).
4. Akdogan S. Unsal M. Variations in trace metal content of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamark with season and size, Tr. J. of Zoology, 17, 117 (1993).

5. Nicholson S., Szefer P. Accumulation of metals in the soft tissues, byssus and shell of the mytilid *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) from polluted and uncontaminated locations in Hong Kong coastal waters, *Mar. Pollut. Bull.*, 46, 1039 (2003).
6. Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli, G., Moore, MN., Orunesu M. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Comparative Biochemistry and Physiology*, 97, 37 (1990).
7. Khorolskay E.N, Batlutskaya I.V. The study of individual variability *Ryrrhocoris apterus* in natural populations of city Sumy and Belgorod, *Scientific statements BelG.: Natural Sciences*, 3, No. 6, 12 (2008).
8. Sukhotin A. Chell colors polymorphism and growth variability in *Mytilus* population. pp. 24, Abstracts of 31 European marine Biology Symposium (St. Petersburg, 1996).
9. Dragole L. V. On the relationship between variations in the Black Sea mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.), Distribution of benthos and benthic biology in the southern seas, *Kive*, 3 (1966).
10. Pirkova A.V. Reproduction mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. and elements of its biotechnology cultivation, pp. 25, Abstract diss. for the degree of PhD, *biol. Sciences* (, Sevastopol, 1994).
11. Pospelov N.V. Elements balance of carotenoids,  $\alpha$ -tocopherol and some metal in the "suspended material - mussels – excrement, Abstract diss. for the degree of PhD, *biol. Sciences: special*, pp. 25 (Sevastopol, 2008).
12. Khalafyan A. A STATISTICA 6. Statistical analysis, pp. 512 (Moscow, 2007).
13. Chelyadina N.S., Smirnova L.L Seasonal changes of copper content in a soft tissue and shell of *Mytilus galloprovincialis* Lam., Ecology-functional and faunal aspects of the study of mollusks and their role in the environment bioindication, 2, 256 (Zhitomir, 2005).
14. Hristoforova N.K. Shulkin V.M. Hristoforova N.K. Kavun V.Y Heavy metals in commercial and cultured mussels of bay the Great Peter, 296 p. (Vladivostok, 1994).
15. Unsal M., Besiktepe S. A preliminary study on the metal content of mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lam. in eastern Black Sea, *Tr. J. Zoology* 18, 265 ( 1994).
16. Skripnik I.A., Sekundyak L.Yu. Kirsanova E.V. Reaction of phytoplankton communities on local pollution-copper, Ecology-functional and faunal aspects of the study of molluscs and their role in the environment bioindication, 2, 225 (Zhitomir, 2005).
17. Mitropol'skii O. Yu., Nasedkina E.I., Osokina N.P. Ekogeohimiya Black Sea, 278 p. (Kiev, 2006).
18. Motavkin P.A., Khotimchenko Yu.S., Deredovich E. E. Regulation of reproduction and biotechnology obtain reproductive products in bivalves, 215 p. (Moscow, 1990).
19. Karavantseva N. V., Pospelova N.V., Bobko N. I., Nehoroshev M. V Methodical gathering reproductive products of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. / *Control systems of environment*, 17, 184 (Sevastopol, 2012).
20. Amiard J., Amiard-Triquet C., Berthet B., Métayer C. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*, *Mar. Biol.*, Vol. 90, No 3, 425 (1986).
21. Hudymov A.V. Behavioral reaction of mussel in Conditions of oscillations environment factors of seaside of East Murmansk: Abstract diss. for the degree of PhD, *biol. Sciences, Murmansk*, 1, pp. 25 (2004).

Поступила в редакцию 29.01.2014 г.

**УДК 581.1:631.811**

## **ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЦИРКОН НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ**

*Чмелева С.И., Кучер Е.Н., Дашкевич Ю.О., Ситник М.И.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: chmeleva@ukr.net*

Приведены результаты исследования влияния различных концентраций препарата Циркон на посевные качества семян и показатели роста на начальных этапах развития кукурузы сорта Моника 350 МВ в условиях почвенной засухи. Установлено, что предпосевная обработка препаратом повышает засухоустойчивость кукурузы, при этом возрастает всхожесть семян и увеличиваются значения морфометрических параметров проростков. Данный эффект зависит от концентрации действующего вещества и сохраняется на протяжении всего эксперимента. Наилучшие результаты были получены при обработке семян раствором исследуемого препарата в концентрации 2,5%. Показано стимулирующее влияние регулятора роста в указанной концентрации на лабораторную всхожесть семян, а также на показатели роста растений кукурузы (высоту надземной части, длину корневой системы, площадь листовой поверхности, массу сухого вещества надземной части и корней).

**Ключевые слова:** регуляторы роста, Циркон, ростовые процессы, засуха, кукуруза.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время в связи с изменением климатических условий, а также с возрастающим антропогенным воздействием, актуальной является проблема устойчивости культурных растений [1].

Засуха относится к наиболее распространенным неблагоприятным абиотическим факторам среды, с которыми растения сталкиваются на протяжении онтогенеза. Территории с засушливым климатом по разным оценкам занимают от 35 до 45% суши [2, 3]. Засуха - критический фактор, лимитирующий процессы роста и развития растений [2]. В условиях пониженной почвенной влажности быстро тормозится клеточное деление и растяжение, что приводит к формированию мелких клеток. Вследствие этого задерживается рост самого растения, в первую очередь листьев и стеблей. Таким образом, недостаток влаги вызывает значительные и постепенно усиливающиеся изменения большинства физиологических процессов в организме растений [4].

Кукуруза – одна из ведущих кормовых и зернофуражных культур. Широкий диапазон ее использования обусловлен высокой продуктивностью, определяющейся С<sub>4</sub>-типом фотосинтеза и интенсивными ростовыми процессами. Кукуруза относится к культурам, требовательным к водному режиму. Это связано с образованием большого

объема вегетативной массы и потреблением значительного количества питательных элементов в относительно короткий период интенсивного роста растений [5].

В последние годы в сельскохозяйственной практике широко применяются многочисленные регуляторы роста растений, использование которых направлено как на увеличение урожая, так и на повышение устойчивости растений к экстремальным условиям окружающей среды [6]. Современные полифункциональные регуляторы роста способны одновременно стимулировать рост, развитие и физиологические процессы растений, повышать их способность адаптироваться к неблагоприятным факторам [6, 7]. Одним из таких препаратов является препарат нового поколения Циркон. Его действующим веществом является смесь гидроксикоричных кислот (ГКК), получаемых из растительного сырья эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L.) [8]. Циркон в растениях выполняет функции регулятора роста, иммуномодулятора и антистрессового адаптогена. ГКК осуществляют важнейшую для клетки антиоксидантную функцию посредством активирования соответствующих ферментных систем, и компенсируют дефицит природных регуляторов роста [9-11].

Ранее нами было проведено изучение влияния препарата Циркон на рост и развитие кукурузы сорта Моника 350 МВ [12]. В данной работе приводятся результаты исследования особенностей воздействия предпосевной обработки препаратом Циркон на рост и развитие растений этого сорта в условиях почвенной засухи.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовались семена и растения кукурузы (*Zea mays* L. CV 'Моника 350 МВ'). Отобранные по средним размерам и протравленные в слабом растворе перманганата калия, семена замачивали в водных растворах препарата Циркон (0,25%, 0,5%, 1,0%, 2,5% и 5,0%) в течение 24 часов, а затем высаживали в почву. Для сравнения использовались семена, замоченные в водопроводной воде. В качестве морфометрических показателей исследовались: высота растений, длина корней, площадь листовой пластинки, масса сухого вещества у 7-, 14- и 21-дневных растений, выращенных в вегетационных сосудах емкостью 2 кг, при естественном освещении. Растения выращивали в лабораторных условиях при температуре от +22 до +24°C в течение 3 недель при двух уровнях влажности почвы: оптимального – 65-70% от полной влагоемкости (ПВ) и засушливого – 30%. Соответственно использовано два контрольных варианта: контроль 1 – семена замачивали в отстоянной водопроводной воде и высевали в субстрат с оптимальным увлажнением; контроль 2 – семена замачивали в отстоянной водопроводной воде и высевали в субстрат с низким уровнем влажности. Влажность почвы периодически определяли гравиметрическим методом и поддерживали на заданном уровне до конца эксперимента [13]. Полученные экспериментальные данные обработаны с помощью методов математической статистики [14].



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные нами исследования выявили резкое снижение всхожести семян, прироста массы как надземной части исследуемых растений, так и корневой системы у растений кукурузы сорта Моника 350 МВ при недостатке почвенной влаги (контроль 2) по сравнению с растениями, выращиваемыми в условиях оптимального водообеспечения (контроль 1) (рис.1, табл.1-3).

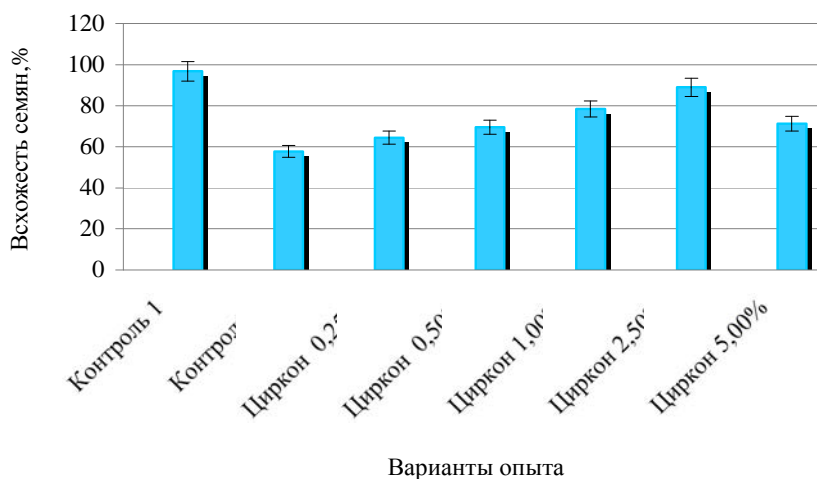


Рис. 1. Влияние препарата Циркон на всхожесть семян кукурузы в условиях почвенной засухи.

Изучение влияния препарата Циркон на величину всхожести семян у кукурузы в условиях почвенной засухи показало, что использование регулятора роста при предпосевной обработке приводит к повышению данного параметра по сравнению с испытываемыми дефицитом влаги контрольными растениями (рис. 1). Наиболее эффективное воздействие оказывает 2,5%-ная концентрация раствора препарата, повышая всхожесть семян на 11,1%.

Результаты изучения влияния препарата Циркон на высоту надземной части проростков и длину их корневой системы в условиях недостаточной влажности почвы представлены в таблицах 1 и 2.

Установлено, что проращивание семян кукурузы с использованием исследуемых концентраций препарата стимулирует рост как надземных, так и подземных органов растений, испытывающих недостаток почвенной влаги. Самые высокие значения морфометрических параметров имеют проростки, подвергшиеся обработке раствором 2,5%-ной концентрации. Высота надземной части и длина корневой системы таких растений близки по величине показателей к таковым у контрольных, выращенных при оптимальном увлажнении.

Таблица 1

**Влияние предпосевной обработки кукурузы препаратом Циркон на высоту растений в условиях почвенной засухи**

Варианты опыта	Высота надземной части, см ( $\bar{x} \pm S_x$ )		
	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Контроль 1	4,9±0,02	23,5±0,43	35,3±0,51
Контроль 2	2,3±0,02	13,8±0,32	19,4±0,44
Циркон 0,25%	2,7±0,04	18,8±0,35	28,2±0,57
Циркон 0,50%	3,5±0,02	20,2±0,29	28,9±0,42
Циркон 1,00%	3,9±0,03	21,4±0,33	30,0±0,36
Циркон 2,50%	4,0±0,12	21,8±0,58	31,0±0,49
Циркон 5,00%	2,5±0,20	18,5±0,50	20,6±0,62

*Примечание:* разница средних значений контроля и опыта достоверна при  $P \leq 0,01$  для всех вариантов.

Таблица 2

**Влияние предпосевной обработки кукурузы препаратом Циркон на длину корневой системы в условиях почвенной засухи**

Варианты опыта	Длина корневой системы, см ( $\bar{x} \pm S_x$ )		
	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Контроль 1	11,3±0,21	16,8±0,51	24,8±0,92
Контроль 2	5,4±0,06	7,8±0,11	13,5±0,54
Циркон 0,25%	6,4±0,04	9,3±0,21	16,9±0,64
Циркон 0,50%	7,2±0,07	11,7±0,32	17,4±0,82
Циркон 1,00%	7,9±0,10	13,3±0,40	18,6±0,72
Циркон 2,50%	10,4±0,21	15,9±0,23	23,0±0,80
Циркон 5,00%	6,0±0,35	8,3±0,14	14,2±0,58

*Примечание:* разница средних значений контроля и опыта достоверна при  $P \leq 0,01$  для всех вариантов.

Воздействие неблагоприятных факторов среды на метаболические процессы в растительном организме отражаются также на ростовых функциях листа и накоплении массы растением [15]. В таблице 3 приведены результаты исследования влияния предпосевной обработки регулятором роста на развитие листовой пластинки и накопление массы сухого вещества растений кукурузы в условиях почвенной засухи. Сравнение значений параметров контрольных и опытных растений в таблице представлено на 14-й день учета.

Таблица 3

**Влияние препарата Циркон на морфометрические показатели 14-дневных растений кукурузы в условиях почвенной засухи**

Вариант опыта	Площадь листовой поверхности, % от контроля 1 $x \pm S_x$	Масса сухого вещества, % от контроля 1 $x \pm S_x$	
		надземной части	корней
Контроль 2	56,4±0,89	50,2±0,53	57,4±0,40
Циркон 0,25%	57,5±0,43	64,8±0,54	61,8±0,90
Циркон 0,50%	70,5±0,70	67,8±0,71	65,3±0,52
Циркон 1,00%	72,8±0,65	68,3±0,87	76,9±0,70
Циркон 2,50%	81,8±0,90	75,3±0,98	89,7±0,53
Циркон 5,00%	60,3±1,20	47,3±0,32	54,5±0,40

*Примечание:* разница средних значений контроля и опыта достоверна при  $P \leq 0,01$  для всех вариантов.

Выявлено положительное влияние препарата на исследуемые параметры у растений, выращиваемых в условиях почвенной засухи. Наибольший стимулирующий эффект дало использование 2,5%-ной концентрации раствора препарата. Полученные данные свидетельствуют, что наиболее выраженный стимулирующий эффект на величины площади листовой поверхности и массы сухого вещества оказывает предпосевная обработка препаратом в концентрации 2,5% (значения показателей более чем на 25% превышают контроль 2).

Таким образом, в условиях почвенной засухи установлено значительное улучшение посевных качеств семян и морфометрических характеристик растений при проведении предварительного замачивания семян в растворе регулятора роста, что свидетельствует о повышении засухоустойчивости кукурузы сорта Моника 350 МВ под влиянием препарата Циркон.

Полученные нами данные подтвердили перспективность использования препарата Циркон для предпосевной обработки семян различных сельскохозяйственных культур в условиях почвенной засухи [16-18].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведенные исследования показали, что в условиях почвенной засухи предпосевная обработка препаратом Циркон стимулирует прорастание и ростовые процессы кукурузы сорта Моника 350 МВ на ранних этапах онтогенеза.
2. Наиболее эффективной по действию на изучаемые показатели является предпосевная обработка раствором препарата 0,25%-ной концентрации. Показано стимулирующее влияние регулятора роста в данной концентрации на лабораторную всхожесть семян, а также на показатели роста растений кукурузы (высоту надземной части, длину корневой системы, площадь листовой поверхности, массу сухого вещества надземной части и корней).

3. Полученные результаты подтвердили перспективность использования препарата Циркон для предпосевной обработки семян кукурузы в условиях недостаточной почвенной влажности.

#### Список литературы

1. Бугара А. М. Влияние препарата «Geoplus» на устойчивость к засолению и засухе растений кукурузы на ранних этапах онтогенеза / А. М. Бугара, С. Н. Кабузенко, А. В. Омельченко // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия: Биология, химия. – 2006. – Т. 19 (58), № 1. – С. 3-7.
2. Жук О. І. Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води / О. І. Жук // Физиология и биохимия культурных растений. – 2001. – Т. 43, № 1. – С. 26-37.
3. Пьянков В. И. Основные тенденции изменения растительности Земли в связи с глобальным потеплением климата / В. И. Пьянков, А. Т. Мокроносков // Физиология растений. – 1993. – Т. 40, № 4. – С. 515-531.
4. Генкель П. А. Физиология устойчивости растительных организмов / П. А. Генкель // Физиология сельхоз растений. – М.: Наука, 1967. – С. 87-265.
5. Семина С. А. Водопотребление кукурузы в зависимости от приемов возделывания / С. А. Семина, А. Г. Иняхин // Всероссийская научно-практическая конференция «Инновационные технологии в АПК: теория и практика». – Пенза, 2013. – С. 98-100.
6. Шевелуха В. С. Регуляторы роста растений в сельском хозяйстве / В. С. Шевелуха, В. М. Ковалев, Л. Г. Груздев // Вестник с.-х. науки. – 1985. – № 9. – С. 57-65.
7. Прусакова Л. Д. Регуляторы роста растений с антистрессовыми и иммунопротекторными свойствами / Л. Д. Прусакова, Н. Н. Малеванная, С. Л. Белопухов, В. В. Вакуленко // Агрохимия. – 2005. – № 11. – С. 76-86.
8. Малеванная Н. Н. Ростостимулирующая и иммуномодулирующая активности природного комплекса гидроксикоричных кислот (препарат Циркон) / Н.Н. Малеванная // IV Международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». – Минск, 2005. – С. 141.
9. Малеванная Н. Н. Препарат циркон – иммуномодулятор нового типа / Н. Н. Малеванная // Научно-практическая конференция «Применение препарата циркон в производстве сельскохозяйственной продукции». – М., 2004. – С. 17-20.
10. Малеванная Н. Н. Циркон - новый стимулятор роста и развития растений / Н.Н. Малеванная // VI Международная конференция "Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях". – М., 2001. – С. 163-171.
11. Ткачук О. А. Эффективность применения регуляторов роста при возделывании яровой пшеницы в условиях лесостепной зоны Среднего Поволжья / О. А. Ткачук, Е. В. Павликова, А. Н. Орлов // Молодой ученый. – 2013. – № 4. – С. 677-679.
12. Чмелева С. И. Влияние препарата Циркон на рост и развитие растений кукурузы на начальных этапах онтогенеза / С. И. Чмелева, Е. Н. Кучер, Ю. О. Дашкевич, М. И. Ситник // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия: Биология, химия. – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 188-195.
13. Александрова Л. Н. Лабораторно-практические занятия по почвоведению / Л. Н. Александрова, О.А. Найденова. – Л.: Колос, 1976. – 280 с.
14. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
15. Карпова Г. А. Оптимизация продукционного процесса агрофитоценозов проса, яровой пшеницы и ячменя при использовании регуляторов роста и бактериальных препаратов в лесостепи Среднего Поволжья: автореферат на соискание научн. степени доктора с-х. наук / Г.А. Карпова; ФГОУ ВПО «Пензенская ГСХА». – Пенза, 2009. – 52 с.
16. Чурикова В.В. К вопросу о механизме защитного действия циркона / В.В. Чурикова, Н.Н. Малеванная // Научно-практическая конференция «Применение препарата циркон в производстве сельскохозяйственной продукции». – М., 2004. – С. 3-4.

17. Сучкова Е. В. Продуктивность и адаптационная способность к засухе разных сортов пшеницы при обработке цирконом: на соискание учен. степени кандидата биологических наук / Е.В. Сучкова. – М., 2005. – 24 с.
18. Серегина И. И. Действие обработки семян цирконом на продуктивность яровой пшеницы в различных условиях азотного питания и водообеспечения / И.И. Серегина, Е.В. Сучкова // Бюлл. ВИУА. – 2003. – № 118. – С. 79-81.

**Чмельова С.І. Вплив препарату Циркон на ріст і розвиток рослин кукурудзи на початкових етапах онтогенезу в умовах ґрунтової посухи / С.І. Чмельова, С.М. Кучер, Ю.О. Дашкевич, М.І. Сітнік // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 223-231.**

Наведено результати дослідження впливу різних концентрацій препарату Циркон на посівні якості насіння і показники зростання на початкових етапах розвитку кукурудзи сорту Моніка 350 МВ в умовах ґрунтової посухи. Встановлено, що передпосівна обробка препаратом підвищує посухостійкість кукурудзи, при цьому зростає схожість насіння і збільшуються значення морфометричних параметрів проростків. Даний ефект залежить від концентрації діючої речовини та зберігається протягом усього експерименту. Найкращі результати були отримані при обробці насіння розчином досліджуваного препарату в концентрації 2,5%. Показано стимулюючий вплив регулятора росту у зазначеній концентрації на лабораторну схожість насіння, а також на показники росту рослин кукурудзи (висоту надземної частини, довжину кореневої системи, площу листової поверхні, масу сухої речовини надземної частини і коренів).

**Ключові слова:** регулятори росту, Циркон, ростові процеси, посуха, кукурудза.

## THE INFLUENCE OF DRUG ZIRCON ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF CORN PLANTS AT THE EARLY STAGES OF ONTOGENY IN CONDITIONS OF DROUGHT

*Chmeleva S.I., Kucher E.N., Dashkevich Y.O., Sitnik M.I.*

*National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine*

*E-mail: chmeleva@ukr.net*

Currently, due to changes in climatic conditions, as well as increasing anthropogenic influence the actual problem is the stability of cultivated plants. Drought is the most common adverse environmental factor to which plants face during ontogeny. Modern multifunctional growth regulators that simultaneously stimulate growth, development and physiological processes of plants, capable to enhance the ability of the plant organism to adapt to the effects of inadequate water supply. One of these growth regulators is the preparation of new generation Zircon. Its active substance is a mixture of hydroxycinnamic acids (HCA) derived from plant material of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). HCA cells carry out important antioxidant function by activating the relevant enzyme systems, and compensate for lack of natural growth regulators.

The aim of our work was to study the effect of pre-seeded treatment with drug Zircon on the growth and development of corn plants in conditions of drought in the early stages of ontogeny. Corn seeds and corn plants (*Zea mays* L. CV 'Monica 350 MV') were used as objects of study. Seeds were soaked in aqueous solutions of the tested drug (0,25%, 0,5%, 1,0%, 2,5% and 5,0%) for 24 hours and then were planted in the soil. Seeds soaked in tap water were used for comparison. As morphometric parameters were studied: plant height,

root length, leaf blade area, dry weight in 7-, 14- and 21-day-old plants grown in pots of 2 kg, in natural light. Plants were grown in the laboratory at temperatures from +22 to +24° C for 3 weeks at two levels of soil moisture: optimal – 65-70% of the total moisture capacity (TMC) and dry – 30%. Accordingly two control options were used: control 1 – seeds were soaked in settled tap water and were seeded in substrate with optimum moisture, control 2 – seeds were soaked in settled tap water and were seeded in substrate with low moisture. Soil moisture was regularly determined gravimetrically and was maintained at a predetermined level until the end of the experiment.

Studies revealed that pre-seeded treatment with preparation improves drought tolerance of corn. Using of growth regulator leads to an increase in seed germination compared to experiencing moisture deficit by control plants. The most effective action has 2,5% concentration solution of the drug, increasing seed germination by 11,1%. It is found that seed germination of corn using the tested drug concentrations stimulates the growth of both aerial and underground organs of plants that lack of soil moisture. The highest value of morphometric parameters have seedlings subjected to treatment with a solution of 2,5% concentration. The height and length of the aerial part of the root system of these plants are close in magnitude to those indicators in the control grown at optimum moisture. There is a positive effect of the drug on the growth of the leaf blade and the weight of dry matter accumulation in conditions of drought. The greatest stimulatory effect was also given by using a 2,5% concentration solution of the drug. Our data confirmed the promise of using the drug Zircon for treatment of seeds of different crops in conditions of drought.

**Keywords:** growth regulators, Zircon, growth processes, drought, corn.

#### References

1. Buhara A. M., Kabuzenko S.N., Omelchenko A.V., Effect of drug «Geoplus» on Stability to salification and drought of corn in the early stages of ontogeny, *Scientific Notes of Taurida National V. I. Vernadsky University. – Series : Biology, Chemistry*, **19 (58)**, 3 (2006).
2. Zhuk O.I., Forming adaptive response of plants to water deficit, *Physiology and biochemistry cultivated plants*, **43**, 26 (2001).
3. P'yankov V.I., Mokronosov A.T., Main trends in the vegetation of the earth due to global warming, *Plant Physiology*, **40**, 515 (1993).
4. Henkel P.A. *Physiology resilience plant organisms*, 265 p. (Science, Moscow, 1967).
5. Semina S.A., Inyahin A.G., Water consumption of corn depending on methods of cultivation, *Abstracts of All-Russian Scientific and Practical Conference "Innovative technologies in agribusiness: Theory and Practice"*, (Penza, 2013), p. 98.
6. Shevelukha V.S., Kovalev V.M., Gruzdev L.G., Plant growth regulators in agriculture, *Herald of agricultural science*, **9**, 57 (1985).
7. Prusakova L.D., Malevannaya N.N., Belopukhov S.L., Vakulenko V.V., Plant growth regulators with anti-stress and immuno-protective properties, *Agrochemicals*, **11**, 76 (2005).
8. Malevannaya N.N., Growth stimulating and immunomodulatory activity of natural complex hydroxycinnamic acids (drug Zircon), *Abstracts of IV International Scientific Conference "Regulation of growth, development and productivity of plants"*, (Minsk, 2005), p. 141.
9. Malevannaya N.N., Drug zircon - a new type of immunomodulator, *Abstracts of Scientific and Practical Conference "Use of the drug zircon in agricultural production"*, (Moscow, 2004), p. 17.
10. Malevannaya N.N. Zircon - new stimulator of growth and development plant, *Abstracts of VI International Conference "Growth regulators and plant development in biotechnology"*, (Moscow, 2001), p. 163.

11. Tkachuk O.A., Pavlikova E.V., Orlov A.N., Efficiency of growth regulators in the cultivation of spring wheat in the forest-steppe zone of the Middle Volga, *Young scientist*, **4**, (2013).
12. Chmeleva S.I., Kucher E.N., Dashkevich Y.O., Sitnik N.I., The influence of drug Zircon on the growth and development of corn plants at the early stages of ontogenesis, *Scientific Notes of Taurida National V. I. Vernadsky University. – Series : Biology, Chemistry*, **26 (65)**, 4 (2013).
13. Aleksandrova L.N., Naydenova O.A. *Laboratory practical classes on soil science*, 280 p. (Kolos, Leningrad, 1976).
14. Lakin G.F. *Biometrics*, 352 p. (Higher School, Moscow, 1990).
15. Karpova G.A. Optimization of the production process agrophytocenosis millet, spring wheat and barley using growth regulators and bacterial preparations in the Middle Volga steppe, 52 p. (Penza, 2009).
16. Churikova V.V., Malevannaya N.N., On the mechanism of the protective effect of zircon, Abstracts of Scientific and Practical Conference "Use of the drug zircon in agricultural production", (Moscow, 2004), p. 3.
17. Suchkova E.V. Efficiency and adaptability to drought of different varieties of wheat during processing zircon, 24 p. (Moscow, 2005).
18. Seregina I.I., Suchkova E.V., Action zircon seed treatment on the productivity of spring wheat under different conditions of nitrogen nutrition and water supply, *Bull. VIUA*, **118**, 79 (2003).

*Поступила в редакцию 02.02.2014 г.*

**УДК 57.042/615.212:615.214**

## **ИЗМЕНЕНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА АСПИРИНА НА ФОНЕ ИНТОКСИКАЦИИ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ПРИ БЛОКИРОВАНИИ D<sub>2</sub>-РЕЦЕПТОРОВ**

*Шилина В.В., Хусаинов Д.Р., Чертаев И.В., Коренюк И.И.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: langrevik@gmail.com*

В работе был изучен анальгетический эффект аспирина на фоне интоксикации сульфатом ртути и хлоридом кадмия, до и после блокирования D<sub>2</sub>-рецепторов. Выявлено, что на фоне интоксикации сульфатом ртути и хлоридом кадмия противоболевой эффект аспирина существенно изменяется в тестах «электростимуляция» (ЭС) и «горячая пластина» (ГП). Блокирование D<sub>2</sub>-рецепторов у нативных крыс вызывает заметное усиление анальгетического эффекта аспирина в обоих тестах, в условиях интоксикации сульфатом ртути также наблюдается его достоверное усиление, а у интоксигированных хлоридом кадмия животных анальгетический эффект увеличивается только на уровне тенденции в тесте ГП.

**Ключевые слова:** аспирин, анальгетический эффект, сульфат ртути, хлорид кадмия, D<sub>2</sub>-рецепторы.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Тяжелые металлы обладают широким спектром токсического действия на живые организмы [1, 2]. Так в некоторых исследованиях была обнаружена способность металлов этой группы влиять на поведение, когнитивные функции, болевые ощущения [3–5], причиной которого являются множественные повреждения на клеточном уровне [2]. Поэтому не исключено, что при попадании тяжелых металлов в организм, могут изменяться эффекты различных препаратов, в том числе и анальгетических средств [3, 5]. Согласно последним рекомендациям ВОЗ, часто используемыми средствами для купирования острого болевого синдрома являются нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) [6–8]. НПВП применяют при болях слабой и средней интенсивности, которые локализуются в мышцах, суставах, сухожилиях, нервных стволах, а также при головной или зубной боли [9]. Нередко их используют в качестве упреждающей анестезии, т.е. до нанесения травмы с целью предупреждения формирования болевого синдрома и дальнейшего введения в послеоперационном периоде [7]. Важно, что НПВП обладают способностью блокировать очаг возникновения боли, а по последним данным также влиять на ее проведение и восприятие [9–12]. В связи с этим актуальным является исследование механизмов действия НПВП на уровне центральной нервной системы (ЦНС) при различных состояниях организма [13].

Целью настоящей работы было выяснить особенности изменения эффекта аспирина после интоксикации сульфатом ртути и хлоридом кадмия, а также



влияния блокирования D<sub>2</sub>-рецепторов на действие препарата в условиях интоксикации.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на белых беспородных крысах самцах массой 230-250 грамм. Животные были разделены на группы по 10 особей в каждой, условные обозначения которых отражены в таблице. Крысам контрольной группы вводили физиологический раствор. Хроническую интоксикацию крыс формировали путем введения растворов HgSO<sub>4</sub> или CdCl<sub>2</sub> в течение семи дней. Далее неинтоксцированным и интоксцированным крысам вводили в течение трех дней блокатор D<sub>2</sub>-рецепторов галоперидол. Аспирин вводили через два часа после последней инъекции блокатора и за 30 минут до тестирования. Все растворы вводили один раз в день внутривентриально в объеме 0,2 мл [14, 15].

Анальгетический эффект аспирина оценивали с помощью стандартных тестов на десятый день от начала введения веществ. В тесте «горячая пластина» (ГП) животное помещали на металлическую площадку, поверхность которой с помощью нагревательного элемента была равномерно нагрета до 45°C, одновременно включали секундомер. В данном тесте фиксировали время до появления реакции облизывания лап - латентный период болевой реакции (ЛПБР) [14, 15].

Таблица.

Условные обозначения групп животных

Введенные вещества, их доза и период проведения инъекций				Группы крыс
1-й - 7-й день	8-й	9-й	10-й	
Физраствор				<b>Контроль</b>
Физраствор			Аспирин 40 мг/кг	<b>ASP</b>
HgSO <sub>4</sub> 20 мг/кг	Физраствор			<b>Hg</b>
CdCl <sub>2</sub> 1 мг/кг				<b>Cd</b>
HgSO <sub>4</sub> 20 мг/кг	Физраствор	Аспирин 40 мг/кг		<b>Hg/ASP</b>
CdCl <sub>2</sub> 1 мг/кг				<b>Cd/ASP</b>
Физраствор	Галоперидол 2,5 мг/кг	Галоперидол 2,5 мг/кг, аспирин 40 мг/кг		<b>D<sub>2</sub>/ASP</b>
HgSO <sub>4</sub> 20 мг/кг				<b>Hg/D<sub>2</sub>/ASP</b>
CdCl <sub>2</sub> 1 мг/кг				<b>Cd/D<sub>2</sub>/ASP</b>

В тесте «электростимуляция» (ЭС) крысу помещали в камеру 20x30x20 см с медным решетчатым полом, через который пропускали электрический ток от электростимулятора, генерирующего импульсы длительностью 10 мс и частотой 40 Гц. Измеряемым показателем служило напряжение, которое плавно увеличивали до вздрагивания или подпрыгивания животного – болевой порог (БП) [14, 15].

Для сравнения данных использовали критерий Mann-Whitney, уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным или меньшим чем 0,05. В связи с небольшим количеством особей в группе использовали

медиану, а также верхний и нижний квартили, которые рассчитаны в процентах относительно контроля, принятого за 100%.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выраженный противоболевой эффект аспирина наблюдался в тесте ГП у крыс без интоксикации, где введение препарата вызвало повышение показателя ЛПБР до 188,7 % ( $p < 0,05$ ). На фоне же интоксикации у животных группы «Hg/ASP» достоверных отличий от «контроля» не наблюдалось, а по сравнению с группой «Hg» наблюдалось достоверное снижение. У крыс группы «Cd/ASP» уровень ЛПБР не отличался от «контроля» и группы «Cd». И так, после накопления сульфата ртути [5], которое приводило к значительному снижению болевой чувствительности, введение аспирина не вызвало видимого анальгетического эффекта. В условиях интоксикации хлоридом кадмия болевая чувствительность не изменялась, а также аспирин не проявлял противоболевого эффекта

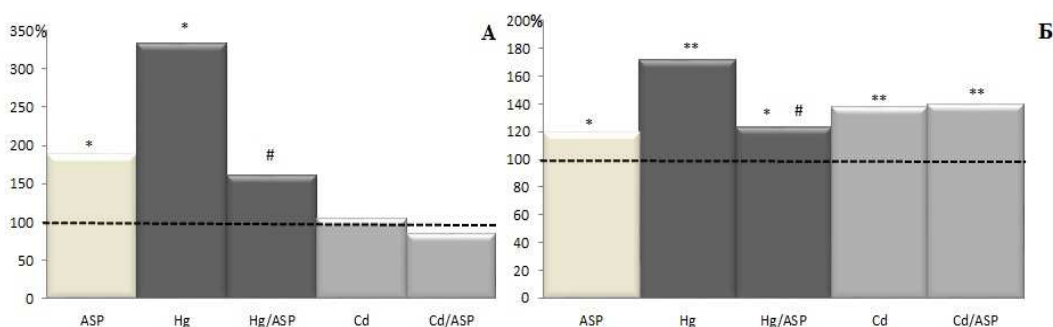


Рис. 1. Анальгетический эффект аспирина в тестах горячая пластина и электростимуляция у неинтоксцированных и интоксцированных крыс.

*Примечание:* А. латентный период болевой реакции в тесте «горячая пластина», Б. болевой порог в тесте «электростимуляция». Данные выражены в процентах, за 100 % принят контроль. «\*» ( $p < 0,05$ ), «\*\*» ( $p < 0,01$ ) – достоверность отличий по сравнению с контролем; «#» ( $p < 0,05$ ), «##» ( $p < 0,01$ ) – достоверность относительно группы после введения только соли металла.

В тесте электростимуляция у крыс без интоксикации введение аспирина вызвало повышение показателя БП до 120 % ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о проявлении противоболевого эффекта препарата. На фоне же интоксикации сульфатом ртути у животных группы «Hg/ASP» показатель БП достиг уровня 123,4 % ( $p < 0,05$ ), что ниже группы «Hg» (172,3 %), но все же достоверно превышает контроль. Введение аспирина крысам интоксцированным хлоридом кадмия не вызвало изменение показателя БП, и его уровень составил 140 % ( $p < 0,01$ ) относительно контроля.

Подводя итог, необходимо отметить, что в тесте ГП на фоне интоксикации крыс хлоридом кадмия анальгетический эффект аспирина не проявляется. Во всех остальных случаях в обоих тестах анальгезия животных очевидна, однако ее

механизмы могут иметь сложную природу. Одной из возможных причин снижения болевой чувствительности крыс является известный факт противоболевого эффекта тяжелых металлов, который был отмечен и в нашем исследовании у группы «Hg» и в меньшей степени - «Cd». Поэтому, логично предположить эффект суммации противоболевой активности аспирина и металлов или «маскировки» эффекта препарата влиянием металлов. Явление «маскировки», вероятнее всего, наблюдалось у группы «Cd/ASP» в тесте ЭС. Но для крыс интоксигированных ртутью такого прогнозируемого результата получено не было. Так, при введении аспирина на фоне интоксикации сульфатом ртути наблюдались яркие особенности: у группы «Hg/ASP» происходило снижение абсолютных значений показателей относительно группы «Hg» в обоих тестах, т. е. противоболевой эффект металлов уменьшался. Это может быть связано с антиоксидантными свойствами аспирина, которые описаны в литературе [15]. Возможно, аспирин снижает количество свободных радикалов, образующихся при накоплении катионов тяжелых металлов в организме [2–4, 15], тем самым уменьшая повреждающее влияние ртути, в том числе и на процессы восприятия боли.

При рассмотрении центральных механизмов необходимо заметить, что при способности препаратов проходить ГЭБ тест ГП позволяет судить о характере влияния веществ на супраспинальном уровне (Спр), а тест ЭС - также и на спинальном (Сп) [16]. После введения аспирина интоксигированным крысам в обоих тестах происходило заметное изменение его эффектов поэтому можно заключить, что нарушение действия препарата связано с процессами на Сп и на Спр уровнях. По литературным данным известно, что противоболевой эффект НПВП связан с ингибированием синтеза простагландинов на периферии, а последние данные свидетельствуют также о их способности действовать в центральной нервной системе посредством процессов косвенно связанных с опиоидной системой, НМДА-рецепторами, ГАМК, оксидом азота. В реализации антиноцицептивного эффекта немаловажную роль играет также дофаминергическая система [17–19], поэтому следующим этапом нашего исследования было изучить эффект анальгетика при блокировании D<sub>2</sub>-рецепторов.

Итак, после блокирования D<sub>2</sub>-рецепторов противоболевой эффект аспирина усиливался у крыс без интоксикации, что отражалось в повышении ЛПБР в группе «D<sub>2</sub>/ASP» до 249,2 % (p < 0,05), однако относительно группы «ASP» повышение показателя было только на уровне тенденции. На фоне интоксикации в группе «Hg/D<sub>2</sub>/ASP» ЛПБР увеличивался до 385,5 % (p < 0,05), что также достоверно превышает уровень «Hg/ASP». У животных группы «Cd/D<sub>2</sub>/ASP» повышение достигало 205,7 % (p < 0,01) относительно контроля, что на уровне тенденции превышает показатель группы «Cd/ASP». Полученные данные свидетельствуют, что блокирование D<sub>2</sub>-рецепторов в условиях интоксикации сульфатом ртути вызывает достоверное повышение противоболевого эффекта, а у интоксигированных хлоридом кадмия животных усиливает анальгетический эффект только на уровне тенденции. Не исключено, что подобный факт связан с резким снижением сродства D<sub>2</sub>-рецепторов к блокатору галоперидолу в условиях интоксикации хлоридом кадмия.

При электрораздражении анальгетический эффект аспирина усиливался у неинтоксцированных крыс после блокирования D<sub>2</sub>-рецепторов, так БП достигал уровня 215,2 % (p < 0,01), что превышает уровень «ASP». Аналогичное усиление действия анальгетика наблюдалось и у крыс группы «Hg/D<sub>2</sub>/ASP», где БП увеличивался до 217,4 % (p < 0,01), превосходя уровень «Hg/ASP». После накопления хлорида кадмия у крыс группы «Cd/D<sub>2</sub>/ASP» наблюдалось повышение БП до 140 % относительно контроля, однако по сравнению со значениями группы «Cd/ASP» отличий не было. Данные указывают, что в тесте ЭС в условиях блокирования D<sub>2</sub>-рецепторов у крыс без интоксикации и интоксцированных сульфатом ртути анальгетический эффект аспирина усиливается, а на фоне интоксикации хлоридом кадмия не изменяется.

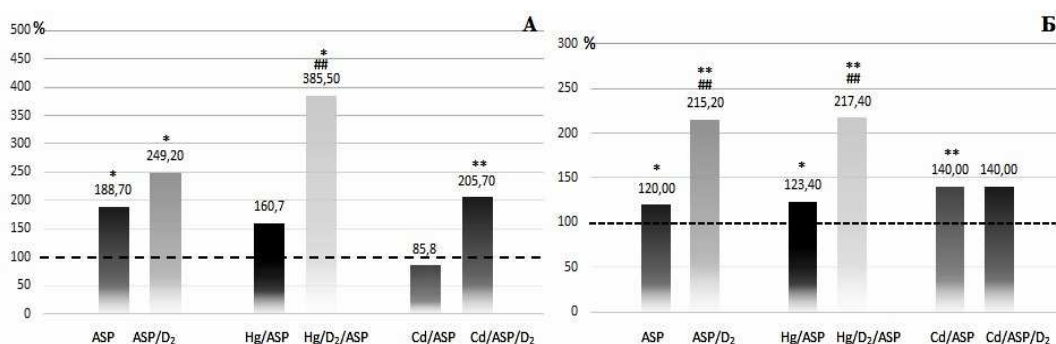


Рис. 2. Изменение анальгетического эффекта аспирина в тестах горячая пластина и электростимуляция у неинтоксцированных и интоксцированных крыс до и после введения блокатора D<sub>2</sub>-рецепторов.

*Примечание:* А. латентный период болевой реакции в тесте «горячая пластина», Б. болевой порог в тесте «электростимуляция», данные выражены в процентах, за 100 % принят контроль. «\*» (p<0,05), «\*\*» (p<0,01) – достоверность отличий по сравнению с контролем; «#» (p<0,05), «##» (p<0,01) – достоверность относительно группы без блокирования D<sub>2</sub>-рецепторов.

Учитывая изменения показателей в обоих тестах, очевидно, что у неинтоксцированных крыс формирование анальгетического эффекта аспирина связано с функциональной активностью D<sub>2</sub>-рецепторов, либо наблюдается эффект суммации параллельных противоболевых воздействий. В условиях интоксикации сульфатом ртути противоболевой эффект также зависит от D<sub>2</sub>-рецепторов и реализуется как на Сп, так и Спр уровнях. Однако, на фоне накопления хлорида кадмия анальгетический эффект аспирина связан с D<sub>2</sub>-рецепторами, вероятно, только на Спр уровне.

Подводя итог необходимо отметить, что на фоне интоксикации сульфатом ртути и хлоридом кадмия участие D<sub>2</sub>-рецепторов в реализации анальгетического эффекта аспирина изменяется, что может быть связано с их функциональными нарушениями под воздействием ионов тяжелых металлов [2, 3, 20].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Аспирин у нативных крыс (контроль) вызывает снижение болевой чувствительности и его влияние реализуется как на Сп, так и Спр уровнях, которое зависит от функциональной активности D<sub>2</sub>-рецепторов.
2. В условиях интоксикации животных сульфатом ртути введение аспирина подавляет анальгетический эффект ионов ртути и значения показателей группы «Hg/ASP» было практически на уровне «ASP».
3. При интоксикации крыс хлоридом кадмия аспирин не проявляет своих анальгетических свойств в тесте ГП, а в тесте ЭС этот эффект, вероятно, «маскируется» влиянием металла.
4. В условиях интоксикации крыс сульфатом ртути формирование противоболевого эффекта аспирина связано с D<sub>2</sub>-рецепторами на Сп и Спр уровнях, а при интоксикации хлоридом кадмия в малой степени на Спр уровне.

**Список литературы**

1. Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы во внешней среде / И.М. Трахтенберг, В.П. Луковенко. - Минск.: Наука и техника, 1994. - 285 с.
2. Duruibe J.O. Heavy metal pollution and human biotoxic effects / J.O. Duruibe, M.O. Ogwuegbu, J.N. Egwurugwu // Int. jour of phys sci. – 2007. – Vol. 2, №5. – P. 112-118.
3. Clarkson Th.W. The Toxicology of Mercury, Current Exposures and Clinical Manifestations / Th.W. Clarkson, L. Magos, G.J. Myers, // N engl j med. – 2003. – Vol. 349. - P. 1731-1737.
4. Антоняк Г. Л. Кадмій в організмі людини і тварин. II. Вплив на функціональну активність органів і систем / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, Л. П. Білецька [та ін.] // Біологічні студії. – 2010. - Т. 4, № 3. – С. 125–136.
5. Коренюк И. И. Нейрохимические механизмы изменения показателей болевой чувствительности крыс на фоне интоксикации сульфатом ртути / И. И. Коренюк, В. В. Шилина, Д. Р. Хусаинов // Успехи современного естествознания. - 2013. — №12. — С. 28–31.
6. Насонов Е. Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации / Насонов Е. Л., Каратеев А. Е. // Русский медицинский журнал. – 2006. – Т. 14, № 25. – С. 1769-17.
7. Борисов Д. Б. Сбалансированное послеоперационное обезболивание в абдоминальной хирургии: эффективность сочетанного применения эпидуральной блокады и неопиоидных анальгетиков / Д.Б. Борисов, А. В. Левин, Д. Н. Уваров и др. // Анестезиол. и реаниматол. — 2009. — № 2. — С. 35–37.
8. Tonner P. H. Balanced anaesthesia today / Tonner P. H. // Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol. — 2005. — Vol. 19, № 3. — P. 475–484.
9. Vane J. R. The mechanism of action of aspirin. / J. R. Vane, R.M. Botting // Thrombosis research. – 2003. – Т. 110. – P. 255-258.
10. Melis M, Diana M, Gessa GL. Cyclo-oxygenase-inhibitors increase morphine effects on mesolimbic dopamine neurons. Eur J Pharmacol. 2000 Jan 3;387(1):R1-3.
11. Ortí E. Site-specific effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug lysine clonixinate on rat brain opioid receptors / E. Ortí, H. Coirini, J.C. Pico // Pharmacology. — 1999. – Vol.58 (4). – P. 190-199.
12. Valeri P. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on withdrawal responses in guinea pig ileum after a brief exposure to morphine / P. Valeri, L.A. Morrone, L. Romanelli, M.C. Amico // J Pharmacol Exp Ther. — 1993. – Vol. 264(3). – P. 1028-1032.
13. Балашов А.М. Центральные механизмы анальгетического действия нестероидных противовоспалительных препаратов / А.М. Балашов, И.Е. Шахбазян // Научно-практическая ревматология. – 2005. - №2. – P. 47-52.

14. Катюшина О.В. Механизмы физиологической дії надмалых доз аспирину та його похідних, Автореф. дис. ... канд. біол. наук, Сімферополь (2013).
15. Shi X. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF- $\kappa$ B activation, and TNF- $\alpha$  production / X.Shi, M. Ding, Z. Dong [et. al] // *Molecular and Cellular Biochem.* – 1999. – Vol. 199 (1-2). – P. 93-102
16. Бутылин А.Г. Влияние гепарина на антиноцицептивные свойства пчелиного яда / А.Г. Бутылин, М.Б. Звонкова, А.Е. Хомутов и др. // *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского.* – 2010. – Т. 2 (2). - С. 607–610.
17. Брагин Е.Р. Нейрохимические механизмы регуляции болевой чувствительности. / Е.Р. Брагин. - УДН, Москва, 1991. - 248 с.
18. Brown D.A. Some new insights into the molecular mechanisms of pain perception / D.A. Brown, G.M. Passmore // *J Clin Invest.* - 2010. – Vol. 120, №5. – P. 1380–1383.
19. McMahon S. Wall & Melzack's Textbook of Pain / S. McMahon, M. Koltzenburg - Churchill Livingstone, UK, 2005. - 1280 p.
20. Bridges C.C. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metal / C.C. Bridges, R.K. Zalups // *Toxicol Appl Pharmacol.* — 2005. — Vol. 204. — P. 274–308.

**Шилина В.В. Зміна анагетичного ефекту аспирину на тлі інтоксикації солями важких металів та при блокуванні D<sub>2</sub>-рецепторів / В.В. Шилина, Д.Р. Хусаинов, І. В. Черетаєв, І.І. Коренюк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 232-240.**

У роботі було досліджено анагетичний ефект аспирину на тлі інтоксикації сульфатом ртуті та хлоридом кадмію, а також вплив блокування D<sub>2</sub>-рецепторів на його формування. Виявлено, що на тлі інтоксикації сульфатом ртуті та хлоридом кадмію анагетичні властивості аспірину в тестах «електростимуляція» (ЕС) і «гаряча пластина» (ГП) суттєво змінюються. Блокування D<sub>2</sub>-рецепторів у інтактних тварин викликає збільшення анагетичного ефекту аспирину в обох тестах, при інтоксикації сульфатом ртуті також спостерігається його посилення, а у при інтоксикації хлоридом кадмію відмічено лише тенденцію посилення ефекту у тесті ГП.

**Ключові слова:** аспірин, анагетичний ефект, сульфат ртуті, хлорид кадмію, D<sub>2</sub>-рецептори.

## **ANALGESIC EFFECT OF ASPIRIN AGAINST A BACKGROUND OF HEAVY METAL SALTS INTOXICATION AND AFTER BLOCKING D<sub>2</sub>-RECEPTORS**

*Shylina V.V., Khusainov D.R., Cheretaev I.V., Koreniuk I.I.*

*Taurida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine  
E-mail: langrevik@mail.ru*

Heavy metals released into the environment by anthropogenic causes. This group of metals is well known by its biotoxic effects on the human body. Among many pathology by heavy metals, it is important to point out the change of the pain sensitivity that can lead to modification of analgesic effects of some drugs.

In the work it was investigated the analgesic effect of aspirin by testing the reaction of the rats on a «hot plate» (latent period of pain reaction -LPPR was explored) and an «electrostimulation» (threshold of pain – TP – was studied). The investigations were carried out on white outbred male rats weighing between 230-250 grams. The rats were divided into 9 groups, 10 rats in each group. Each group of rats received a symbol,

depending on the type of injected solution of several substances: «control» - saline solution, «ASP» - aspirin, «Hg» - HgSO<sub>4</sub>, «Cd» - CdCl<sub>2</sub>, «Hg/ASP» - HgSO<sub>4</sub> then aspirin, «Cd/ASP» - CdCl<sub>2</sub> then aspirin «D<sub>2</sub>/ASP» - haloperidol, antagonist D<sub>2</sub>-receptors, then aspirin, «Hg/D<sub>2</sub>/ASP» - HgSO<sub>4</sub>, then haloperidol, then aspirin, «Cd/D<sub>2</sub>/ASP» - CdCl<sub>2</sub>, then haloperidol, then aspirin. All data were calculated as a percentage, 100% are the control values.

The purpose was to explore the analgesic effect of aspirin against the background of mercury sulfate and cadmium chloride intoxication. The other part of the experiment was dedicated to studying the role of D<sub>2</sub>-receptors in the formation of analgesic effect of aspirin in unpoisoned and poisoned rats.

The injection of aspirin led to increasing of LPPR up to 188,7 % (p < 0,05) and TP up to 120 % (p < 0,05) relative to control. Against a background of sulfate mercury and cadmium chloride intoxication the injection of aspirin did not cause any significant changes of the indexes. The data indicated that intoxication of mercury sulfate and cadmium chloride reduced the analgesic effect of aspirin in both tests. Such differences between effects in unpoisoned and poisoned rats may be caused by their specific accumulation both in the skin and in the nervous tissues.

It was found that in the group «D<sub>2</sub>/ASP» LPPR increased up to 249,2 % (p < 0,05), but compared to «ASP» there were no significant changes. The rats of group «Hg/D<sub>2</sub>/ASP» had an increase of LPBR to 385,5 % (p < 0,05) that is also higher compared to «Hg/ASP». Rats of group «Cd/D<sub>2</sub>/ASP» had an increase of LPBR to 205,7 % (p < 0,01) but compared to «Cd/ASP» there were no significant changes. So in the test «hot plate» blocking of D<sub>2</sub>-receptors causes significant increases of the analgesic effect in rats with mercury sulfate intoxication.

An increase of level TP up to 215,2 % (p < 0,01) was observed in group «D<sub>2</sub>/ASP» that is also higher compared to «ASP». Rats of group «Hg/D<sub>2</sub>/ASP» had an increase of TP to 217,4 % (p < 0,01) that is also higher compared to «Hg/ASP». Meanwhile, in the group «Cd/D<sub>2</sub>/ASP» any significant changes were not observed compared to control and «Cd/ASP». The data indicates that in the test «electrostimulation» blocking of D<sub>2</sub>-receptors leads to enhancing of the analgesic effect of aspirin in unpoisoned and mercury sulfate poisoned rats.

Based on the obtained results we suppose that the analgesic effect of aspirin is associated with the dopaminergic system in unpoisoned and mercury-poisoned rats. However, the analgesic effect of aspirin slightly depends on the dopaminergic system in the rats with cadmium chloride intoxication.

**Keywords:** aspirin, analgesic effect, mercury sulfate, cadmium chloride, D<sub>2</sub>-receptor..

#### References

24. Trachtenberg I.M., Kolesnikov V.S., Lukovenko V.P., *Heavy metals in the environment: Modern hygienic and toxicological aspects*, - 286 p. (Science and technology, Minsk, 1994).
25. J.O. Duruibe, M.O. Ogwuegbu, J.N. Egwurugwu, "Heavy metal pollution and human biotoxic effects", *Int. jour of phys sci.* **2**, №5, 112 (2007).
26. Carlsson K.H., Monzel W., Jurna I. Depression by morphine and the non-opioid analgesic agents, metamizol (dipyrone), lysine acetylsalicylate, and paracetamol, of activity in rat thalamus neurones evoked by electrical stimulation of nociceptive afferents. *Pain*, **32(3)**, 313 (1988).

27. Antonyak H. L., Babych N. O., Biletska L. P., Panas N. E., Zhylishchych Y. V., Cadmium in human and animal organism. II. Effect on functional activity of organs and systems, *Studia Biologica*, **4**, 125 (2010)
28. Korenyuk I. I., Shylina V. V., Khusainov D. R., Neurochemical mechanisms of changes of pain sensitivity against the background of mercury sulfate intoxication in rats, *Successes contemporary science*. **12**, 28 (2013).
29. Nasonov E. L., Karateev A. E. The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Clinical recommendations, *Russian Medical Journal*, **14**, 1769 (2006).
30. Borisov D. B., Levin A. V., Uvarov D. N. Balanced postoperative analgesia in abdominal surgery: efficacy of combined use of epidural blockade and non-opioid analgesics, *Anesth. and reanimatol.*, **2**, 35 (2009).
31. Tonner P. H. Balanced anaesthesia today, *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol*, **19**, 475 (2005).
32. Vane J. R., Botting R.M. The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis research*, **110**, 255 (2003).
33. Melis M, Diana M, Gessa GL. Cyclo-oxygenase-inhibitors increase morphine effects on mesolimbic dopamine neurons. *Eur J Pharmacol*, **387(1)**, R1 (2000).
34. Ortí E, Coirini H, Pico JC. Site-specific effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug lysine clonixinate on rat brain opioid receptors. *Pharmacology*, **58(4)**, 190 (1999).
35. Valeri P, Morrone LA, Romanelli L, Amico MC. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on withdrawal responses in guinea pig ileum after a brief exposure to morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, **264(3)**, 1028 (1993).
36. Balashov A.M., Shahbazyan I.E. Central mechanisms of analgesic action of non-steroidal anti-inflammatory drug. *Sci and Pract Rheumat*, **2**, 47 (2005).
37. Butylin A.G., Zvonkova M.B., Homutov A.E., Pursanov K.A., Slobodyaniuk V.S. Effect of heparin on the antinociceptive properties of bee venom. *Bulletin of Univer of Nizhny Novgorod N.I. Lobachevskogo*, **2**, 607 (2010).
38. Shi X., Ding M., Dong Z. [et. al] Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF- $\kappa$ B activation, and TNF- $\alpha$  production // *Molecular and Cellular Biochem*. **199**, (1-2), 93 (1999).
39. Bragin E.R., *Neurochemical mechanisms of pain sensitivity regulation*. - 248 p. (UDN, Moscow, 1991).
40. Brown D. A., Gayle M. Passmore Some new insights into the molecular mechanisms of pain perception *J Clin Invest*, **120(5)**, 1380 (2010).
41. McMahon S., Koltzenburg M. *Wall & Melzack's Textbook of Pain* - 1280 p. (Churchill Livingstone, UK, 2005).
42. C.C. Bridges, R.K. Zalups, Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metal, *Toxicol Appl Pharmacol*. **204**, 274 (2005).

*Поступила в редакцию 22.01.2014 г.*



**УДК 595.142.3**

## **ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДА БИ-58 НА ЛЮМБРИЦИД В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ**

*Эмирова Д.Э.*

*Республиканское высшее учебное заведение «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь, Украина  
E-mail: emirovadilyara@mail.ru*

Проведен анализ острой токсичности пестицида БИ-58 на дождевых червей. Установлено, что препарат в исследованном диапазоне концентраций (0,05–0,4 мл/л) оказывал негативное влияние на дождевых червей, проявляющееся в выраженном угнетении двигательной активности животных (50–85%). Дозы препарата 0,1–0,4 мл/л приводили к смертности животных в пределах 5–15%.

**Ключевые слова:** токсичность, дождевые черви, пестициды, БИ-58.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время одним из направлений сельскохозяйственного производства является использование средств химической защиты растений, которые зачастую становятся опасным токсическим оружием под прицелом которого оказываются не вредители, а сельскохозяйственные культуры и представители мезофауны. В связи с этим возникает необходимость оценки токсического действия используемых препаратов. Для достижения этой цели можно использовать метод биотестирования, то есть использование в контролируемых условиях биологических объектов (тест-объектов) для выявления и оценки действия факторов окружающей среды на организм, его отдельную функцию или систему органов [1]. Наиболее распространенными в биотестировании являются такие интегральные параметры, как показатели выживаемости, роста, плодовитости тест-организмов [2]. Биотестирование пестицидов – это оценка степени их токсического действия по ответным реакциям организмов, использующихся в качестве тест-объектов. Для экспресс-анализа токсического действия пестицидов удобным тест-объектом являются люмбрициды [3], так как ксенобиотики вызывают быструю ответную реакцию животных, которая зависит не только от длительности загрязнения [4], но и от дозы загрязнителя [5]. Целью настоящего исследования явилась оценка острого токсического действия пестицида БИ-58 на люмбрицид в условиях искусственного загрязнения почв.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В экспериментах мы использован тест на острую токсичность [6] (acute toxicity), основанный на определении выживаемости и поведенческих реакциях дождевых червей при воздействии тестируемого пестицида, вносимого в почву. Показатель выживаемости определяется по среднему количеству тест-объектов,

выживших в тестируемой почве или в контроле за время экспозиции. Критерием токсичности является гибель 50% и более дождевых червей за двое суток. Показатель поведенческих реакций животных – скорость их зарывания в грунт. Критерием токсичности является отсутствие зарывания тест-объектов в почву, активное ползание по ее поверхности и попытки покинуть посуду (avoidance test).

В экспериментах использовались половозрелые особи дождевых червей из маточной популяции. Перед проведением эксперимента червей на сутки размещали в субстрат, увлажненный дистиллированной водой, излишек влаги адсорбировали фильтровальной бумагой и переносили по 10 червей на поверхность почвы в стеклянные банки. Посуду закрывали полиэтиленовыми крышками с отверстиями для аэрации и содержали при постоянной температуре ( $t=20 - 24^{\circ}\text{C}$ ) и естественном освещении [6]. Животных во время проведения эксперимента не кормили.

В исследованиях использовался препарат БИ-58 (0,0-диметил-S-(N-метил-карбамоилметил) дитиофосфат), для определения острой токсичности которого червей содержали на протяжении двух суток в почве, обработанной различными концентрациями БИ-58 (0,05; 0,1 (рекомендуемая к применению доза); 0,2 и 0,4 мл/л). Растворы препарата готовили непосредственно перед экспериментом на основе дистиллированной воды. Контрольный вариант – почва, увлажненная дистиллированной водой. На протяжении эксперимента следили за общим состоянием животных, их активностью, реакцией на прикосновения. Животных считали мертвыми, если они не реагировали на раздражение фронтального отдела тела [6, 7]. Наблюдения проводили в четырехкратной повторности.

Для определения острой токсичности указанных концентраций БИ-58 в почве использовали формулу расчета [5]:

$$A=(X_k-X_t): X_k \cdot 100,$$

где  $A$  – показатель острой токсичности, %;

$X_k$  – среднее количество выживших дождевых червей в контроле;

$X_t$  – среднее количество выживших червей в опытных вариантах.

При  $A \leq 10\%$  – тестируемый препарат не оказывает острого токсического действия.

При  $A \geq 50\%$  – тестируемый препарат оказывает острое токсическое действие.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ “Microsoft Excel 2000”. Достоверность различий между полученными данными определяли по t-критерию Стьюдента [8].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования токсического влияния БИ-58 на люмбрицид показали, что данный препарат оказывал определенное влияние на испытуемых животных. Токсическое действие БИ-58 в большей степени проявлялось в поведенческих реакциях дождевых червей. При внесении животных в токсическую среду на протяжении первых часов экспозиции они предпринимали активные попытки покинуть посуду, что являлось критерием токсичности [6]. Черви поднимались до границы просачивания препарата, после чего движение осуществлялось вдоль нее, так как люмбрициды искали незагрязненные участки почвы. Подобные поведенческие реакции классифицируются как «пограничный таксис» [9], наряду с

которым наблюдался «вертикальный таксис», при котором животные пытались пройти загрязненный препаратом слой субстрата перпендикулярно границе просачивания, после чего выходили на его поверхность [9]. Спустя несколько часов активность червей заметно снижалась.

По истечении двух суток после экспозиции, был осуществлен учет двигательной активности животных в опытных вариантах в сравнении с контролем. Концентрации БИ-58 0,05 и 0,1 мл/л оказывали практически одинаковое влияние на люмбрицид, инициируя снижение двигательной активности у 52,5 и 50% особей соответственно по каждому варианту ( $p < 0,001$ ) (рис. 1).

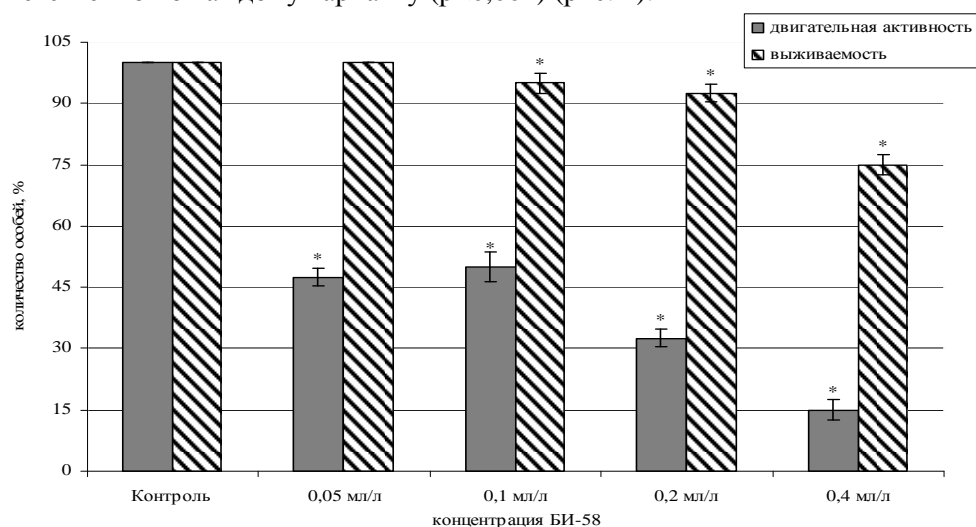


Рис. 1. Сравнительные показатели поведенческих реакций (двигательной активности) и выживаемости люмбрицид при действии БИ-58 в диапазоне концентраций 0,05–0,4 мл/л (\* –  $p < 0,001$ )

Увеличение концентрации БИ-58 приводило к более выраженному влиянию на поведенческие реакции люмбрицид: при концентрации 0,2 мл/л было отмечено снижение двигательной активности у 67,5% ( $p < 0,001$ ) червей, при 0,4 мл/л – у 85% ( $p < 0,001$ ). При этом наблюдалась дозозависимая реакция, в частности, при концентрации 0,2 мл/л наиболее выраженными были реакции пограничного таксиса, при увеличении концентрации препарата до 0,4 мл/л – реакции вертикального таксиса. У животных отмечалось активное сокращение кожно-мышечного мешка, сопровождающееся захватывающими движениями ротового отверстия.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно прийти к заключению о том, что БИ-58 в исследованных дозах оказывал негативное влияние на дождевых червей, проявляющееся в значительном угнетении двигательной активности животных.

Параллельно с анализом поведенческих реакций дождевых червей при действии различных концентраций БИ-58 проводился учет смертности животных. Тестируемый препарат в концентрации 0,05 мл/л не оказал влияния на смертность дождевых червей:

количество особей оказалось постоянным на протяжении двух суток эксперимента и составило по 10 экз. на каждую банку (см. рис. 1). При увеличении дозы препарата в два раза (0,1 мл/л) смертность зарегистрирована у 5% животных ( $p < 0,001$ ). Указанная концентрация БИ-58 является нормой, рекомендуемой к применению, однако, несмотря на то, что она вызывала гибель животных, острой токсичностью не обладала. Дальнейшее увеличение концентрации БИ-58 приводило к росту показателя смертности червей. В частности, при концентрации 0,2 мл/л показатель смертности достиг 7,5% ( $p < 0,001$ ), при 0,4 мл/л – 15% ( $p < 0,001$ ) соответственно. Смертность червей напрямую связана не только с концентрацией препарата, но и с поведенческими реакциями. В частности, при реакциях пограничного таксиса животные осуществляют попытки избегания контакта с токсическим веществом, в результате чего степень негативного воздействия препарата снижалась. При прохождении червями субстрата перпендикулярно границе просачивания токсиканта (вертикальный таксис) вероятность непосредственного контакта с ним неизбежна, что увеличивает негативное влияние препарата на животных. Как указывалось выше, наиболее выраженными реакциями животных на внесение в почву препарата в дозе 0,2 мл/л были реакции пограничного таксиса, при которых черви активно передвигались в поисках незагрязненных участков, по-видимому, это способствовало более высокому проценту выживаемости в сравнении с дозой 0,4 мл/л, при которой черви непосредственно контактировали с токсикантом, так как продвигались перпендикулярно границе просачивания. Полученные результаты согласуются с литературными данными. Так, В.В. Воронцов установил, что оптимальной формой двигательной активности для выживаемости червей является реакция горизонтальной миграции из зоны загрязнения в чистую почву (реакция «пограничного таксиса»). Гибель червей, проходящих слой почвы, загрязненной пестицидами, перпендикулярно границе просачивания и выходящих на поверхность, увеличивается и может достигать 100% [9].

Полученные данные свидетельствуют, что исследованные дозы БИ-58 не обладали острым токсическим воздействием на тест-животных, так как показатель смертности не достигал уровня 50% [5]. Вместе с тем наличие погибших особей (5–15%) и снижение двигательной активности живых (50–85%) свидетельствует о том, что препарат в исследованных концентрациях оказывал негативное влияние на дождевых червей.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Пестицид БИ-58 в исследованном диапазоне концентраций (0,05–0,4 мл/л) оказывал негативное влияние на дождевых червей, проявляющееся в выраженном угнетении двигательной активности животных (50–85%). Концентрации 0,2 и 0,4 мл/л вызывали проявление у животных реакций пограничного и вертикального таксиса.
2. Дозы препарата 0,1–0,4 мл/л приводили к смертности животных в пределах 5–15%, однако острой токсичностью не обладали, так как показатель смертности не достигал уровня 50%.
3. Рекомендуемая к применению в практике доза БИ-58 (0,1 мл/л) острого токсического действия на дождевых червей не оказывала, так как смертность животных не достигала границ 50%, однако характеризовалась выраженным

токсическим действием, проявляющемся в угнетении двигательной активности и поведенческих реакций 50% животных.

### Список литературы

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др., под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 288 с.
2. Yakovlev A.S. Estimate of Ecological Soil Toxicity Using Biotestmethods (on the solid Waste Ranges in Moscow Region) / A.S. Yakovlev, I.V. Tumencev, S.A. Yakovlev, A.A. Rachleeva, V.A. Terekhova // The 2-nd Int. Congress Waste. – Tech. 2001, Moscow, 5-6 June, 2001. – P. 620.
3. Терещенко П.В. Действие гербицидов на дождевых червей / П.В. Терещенко // Известия ТСХА. – 1997. – № 3. – С. 99–107.
4. Воронцов В.В. Действие некоторых пестицидов на дождевых червей (*Lumbricus terrestris* L.): Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.08– Экология (биология). – М., 2013. – 20 с.
5. Эмирова Д.Э. Биотестирование острой токсичности препарата ДНОК с использованием дождевых червей / Д.Э. Эмирова, Д.В. Баличиева // Ученые записки Таврического нац-го ун-та им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63). – № 1. – С. 159–163.
6. Жарикова Г.А. Оценка интегральной токсичности почв биотестированием на дождевых червях // <http://www.green-pik.ru/sections/98.html&article=19>.
7. Залоїло О.В. Екоотоксикологічна оцінка пестицидів за впливом на індикаторні групи ґрунтових організмів: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.16 – «Екологія». – К., 2006. – 18 с.
8. Плохинский Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский – М.: МГУ, 1970. – 367 с.
9. Воронцов В.В. Исследование влияния модельного загрязнения почвы пестицидами на дождевых червей в лабораторных условиях // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 9 (Ч. 1). – С. 26–32

Емірова Д.Е. Оцінка гострої токсичності пестициду БІ-58 на люмбрицид в умовах штучного забруднення ґрунтів / Д.Е. Емірова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 241-246.

Проведено аналіз гострої токсичності пестициду БІ-58 на дощових черв'яках. Встановлено, що препарат в дослідженому діапазоні концентрацій (0,05-0,4 мл/л) негативно впливав на дощових черв'яків, що проявлялося у вираженому пригнібленні рухової активності тварин (50-85%). Дози препарату 0,1-0,4 мл/л призводили до загибелі тварин в межах 5-15%.

**Ключові слова:** токсичність, дощові черв'яки, пестициди, БІ- 58.

### ESTIMATION OF SHARP TOXICNESS OF PESTICIDE OF BI-58 ON LUMBRICIDE IN THE CONDITIONS OF ARTIFICIAL CONTAMINATION OF SOILS

*Emirova D.E.*

*Republican higher educational establishment is the “Crimean engineer-pedagogical university”,  
Simferopol, Ukraine  
E-mail: emirovadilyara@mail.ru*

The analysis of sharp toxicness of pesticide of BI-58 is conducted on earthworms in the range of concentrations 0,05-0,4 ml/l. The research results show that this preparation rendered certain influence on examinee animals. The toxic action of BI-58 in a greater degree revealed in the behavior reactions of earthworms.

Testable preparation in the investigational range of concentrations (0,05-0,4 ml/l) rendered negative influence on earthworms, with the expressed oppressing of their motive activity

(50-85%). Concentrations of 0,2 and 0,4 ml/l caused reactions of frontier and vertical taxis of the animals.

The preparation doses over 0,1–0,4 ml/l cause to the death rate of animals within the limits of 5-15%, however the sharp toxicness was not possessed, because the index of death rate did not level reach 50%.

Recommendable to application in practice dose of BI-58 (0,1 ml/l) did not render the sharp toxic operating on earthworms, because the death rate of animals did not reach the borders of 50%, however it was characterized by expressed toxic action, expressed in oppressing of motive activity and behavior reactions of 50% animals.

The obtained data testify that the investigational doses of BI-58 did not possess the sharp toxic affect of test animals, because the index of death rate did not reach 50% level. At the same time the presence of the lost individuals (5-15%) and decline of motive activity of living examinees (50-85%) testifies that the preparation in its investigational concentrations rendered negative influence on earthworms.

**Keywords:** toxicness, earthworms, pesticides, BI-58.

### References

1. Melehova O.P., Egorov of E.И., Evseeva T.I. and other. Is Biological control of environment: bioindication and biotesting. – Moscow: the Publishing center “Academy”, 2007. – 288 p.
2. Yakovlev A.S., Tumencev I.V., Yakovlev S.A., Rachleeva A.A., Terekhova V.A. Estimate of Ecological Soil Toxicity Using Biotestmethods (on the solid Waste Ranges in Moscow Region) / The 2-nd Int. Congress Waste. – Tech. 2001, Moscow, 5-6 June, 2001. – P. 620.
3. Tereshenko P.V. Operating of herbicides on the earthworms // Information of agricultural academy. – 1997. – № 3. – P. 99–107.
4. Voroncow V.V. Operating of some pesticides on earthworms (*Lumbricus terrestris* L.): Abstract of thesis of dissertation of candidate of biological sciences: 03.02.08 is Ecology (biology). – M., 2013. – 20 p.
5. Emirova D.E., Balichiyeva D.V. Biotesting acute toxicity of DNOK on earthworms // Scientific Notes of Taurida V.I. Vernadsky National University. – Series: Biology, Chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63). – № 1. – P. 159–163.
6. Zaricova G.A. Estimation of integral toxicness of soils by a biotesting on earthworms // <http://www.green-pik.ru/sections/98.html&article=19>.
7. Zaloyilo O.V. Ecotoxicological estimation of pesticides is after influence on the indicatory groups of the ground organisms: Abstract of thesis of dissertation of candidate of biological sciences: 03.00.16 – «Ecology». – K., 2006. – 18 p.
8. Plochinckiy N.A. Biometrics. – M.: MSU, 1970. – 367 c.
9. Voroncow V.V. Research of influence of model contamination of soil pesticides on earthworms in laboratory terms // Fundamental researches. – 2012. – № 9 (Vol. 1). – P. 26–32.

Поступила в редакцию 26.01.2014 г.

Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського  
Серія «Біологія, хімія». Том 27 (66). 2014. № 1. С. 247-255.

**УДК 57.022**

## **СУЧАСНИЙ СТАН ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКЦІЇ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ТА РОЗРАХУНОК ЕМІСІЇ ХІМІЧНО АКТИВНОГО АЗОТУ У ГАЛУЗІ ТВАРИННИЦТВА АВТОНОМНОЇ РЕСПУБЛІКИ КРИМ**

*Бригас О.П., Масберг І.В., Кейван М.П.*

*Інститут агроекології і природокористування НААН, Київ, Україна  
E-mail: kot\_56@list.ru*

У процесі виробництва продукції тваринництва викиди сполук азоту залежать від виду, поголів'я тварин, їх раціону, способу утримання і утилізації їх відходів. За зберігання гною у відкритих ємностях відбувається випаровування і потрапляння в атмосферу аміаку, молекулярного азоту та інших його сполук. В даній роботі наведена оцінка стану виробництва продукції сільського господарства Автономної республіки Крим та проведено розрахунок емісії хімічно активного азоту у галузі тваринництва.

**Ключевые слова:** ефективність використання азоту, сільське господарство, тваринництво, відходи тваринного походження, емісія сполук азоту.

### **ВСТУП**

Регулювання відносин у галузі охорони, використання і відтворення природних ресурсів, забезпечення екологічної безпеки, запобігання і ліквідація негативного впливу господарської діяльності на навколишнє природне середовище, збереження природних ресурсів, генетичного фонду живої природи, ландшафтів та інших природних комплексів покладено в основу законів України «Про охорону навколишнього природного середовища», «Про охорону атмосферного повітря» та «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» [1–3].

### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Дослідження галузі тваринництва у контексті ефективності використання азоту проводили з використанням матеріалів Державного племінного реєстру України та Головного управління статистики у Автономній Республіці Крим. Статистична обробка даних за використання комп'ютерної програми MSExcel 2013.

### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

На початок жовтня 2013 р. господарствами населення утримувалось 86,6% від загальної чисельності великої рогатої худоби (у 2012 р. – 82,8%), у т.ч. корів – 92,2%

(91,2%); свиней – 48,9% (46,2%), овець та кіз – 94,3% (91,0%), птиці всіх видів – 57,5% (47,1%) (табл. 1).

**Таблиця 1**  
**Поголів'я основних видів худоби та птиці станом на 1 жовтня 2013 року**

Вид тварин	Усі категорії господарств		У тому числі			
	тис. голів	у % до 1 жовтня 2012р.	сільськогосподарські підприємства		господарства населення	
			тис. голів	у % до 1 жовтня 2012р.	тис. голів	у % до 1 жовтня 2012р.
ВРХ	168,3	115,1	22,5	89,6	145,8	120,4
у т.ч. корови	70,3	103,5	5,5	91,7	64,8	104,7
Свині	172,8	101,7	88,3	96,6	84,5	107,6
Вівці та кози	310,9	113,8	17,7	71,7	293,2	117,9
Птиця	10570,1	80,3	4492,9	64,6	6077,2	97,9

За січень–вересень 2013 р. загальний обсяг виробництва продукції тваринництва порівняно з відповідним періодом 2012р. скоротився на 7,7%, у т.ч. в аграрних підприємствах – на 22,7%, в господарствах населення – збільшився на 2,4%. (табл. 2). У структурі реалізації худоби та птиці на забій (у живій вазі) сільськогосподарськими підприємствами частка птиці всіх видів становила 82,0% (у січні–вересні 2012р. – 84,0%), у т.ч. бройлерів – 99,1% (99,1%); великої рогатої худоби – 5,3% (4,8%), свиней – 12,5% (10,8%).

**Таблиця 2**  
**Виробництво основних видів продукції тваринництва у січні–вересні 2013року**

Продукція	Усі категорії господарств		У тому числі			
	січень–вересень 2013р.	у % до січня–вересня 2012р.	Сільськогосподарські підприємства		Господарства населення	
			січень–вересень 2013р.	у % до січня–вересня 2012р.	січень–вересень 2013р.	у % до січня–вересня 2012р.
М'ясо <sup>1</sup> , тис. т	142,4	94,4	73,5	84,3	68,9	108,3
Молоко, тис. т	226,4	93,2	18,7	77,0	207,7	95
Яйця, млншт.	403,0	69,7	107,4	37,5	295,6	101,3

<sup>1</sup>Реалізація худоби та птиці на забій (у живій вазі)



**СУЧАСНИЙ СТАН ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКЦІЇ СІЛЬСЬКОГО ...**

Аграрними підприємствами у січні–вересні 2013 р. порівняно з січнем– вереснем 2012р. загальний обсяг вирощування худоби та птиці зменшився на 15,6% за рахунок скорочення вирощування птиці на 35,4%, великої рогатої худоби – на 10,4% та свиней – на 3,4%. Середньодобові прирости великої рогатої худоби на вирощуванні, відгодівлі та нагулі зросли на 6,1%, свиней – зменшилися на 0,2%. Відношення загального обсягу вирощування худоби та птиці до їх реалізації на забій становило 101,8% (2012 р.– 101,5%).

Загальний обсяг реалізованої продукції сільгосппідприємствами за січень– вересень 2013р. порівняно з відповідним періодом 2012 р. зменшився на 25,7%, у тому числі продукції рослинництва – на 20,0%, продукції тваринництва – на 30,5% (табл. 3).

**Таблиця 3**

**Реалізація основних видів продукції аграрними підприємствами  
січні–вересні 2013 р.**

Продукція	Обсяг реалізованої продукції		Середня ціна реалізації	
	т	у % до січня– вересня 2012р.	грн. за т (тис.шт.)	у % до січня– вересня 2012р.
Зернові та зернобобові культури – всього	228634	55,7	1617,8	102,8
у тому числі				
пшениця	121976	47,6	1446,7	98,3
ячмінь	65274	65,8	1474,7	97,8
жито	846	X	1483,8	100,8
кукурудза	5648	73,9	1462,4	110,4
Насіння соняшнику	32686	88,7	2752,3	82,8
Соя	8072	44,0	3882,8	122,4
Ріпак	12458	202,0	3077,0	84,8
Худоба та птиця (у живій вазі)	74199	84,4	12297,4	87,3
у тому числі:				
велика рогата худоба	4118	90,1	16027,1	102,4
свині	9547	96,2	18296,7	100,8
птиця	60222	82,4	11098,0	82,5
Молоко	14768	72,2	3488,2	114,2
Яйця, тис. шт.	94838	34,2	516,2	91,5

На сільськогосподарських підприємствах концентрація поголів'я і використання традиційних технологій утримання і доїння корів супроводжуються забрудненням навколишнього природного середовища тваринницькими відходами.

Вирішення проблеми відходів вбачається в освоєнні інноваційних технологій зберігання і внесення гною, впровадження яких за відповідності сільськогосподарського виробництва міжнародним природоохоронним вимогам забезпечить отримання додаткової конкурентної переваги, зокрема у зниженні витрат на мінеральні добрива. Удосконалення технологій утилізації гною в напрямку повного використання фізичної маси і поживних елементів гною і посліду дозволить знизити забруднення водних джерел, а також знизити виділення в навколишнє середовище аміаку шляхом зниження викиду шкідливих речовин вентиляційними системами тваринницьких приміщень та зведення до мінімуму періоду між розкиданням і зорбкою гною.

Згідно динаміки поголів'я сільськогосподарських тварин останніми роками у АРК змінилася й кількість відходів у галузі тваринництва. За нашими розрахунками кількість відходів від ВРХ становить 435,4 тис т/рік, свинарство додає 189,2, ДРХ – 226,9 і птиця – 385,8 тис. т/рік. Загальна кількість відходів від тваринництва становить 1237,4 тис. т/рік (табл. 4).

**Таблиця 4**

**Розрахункова кількість відходів та викидів аміаку від тваринницьких господарств усіх форм власності АРК (2013 р.)**

Вид тварин	Поголів'я тварин, тис. гол.	Тверді відходи т/рік	Аміак т/рік	Кількість відходів за рік, кг/га с.-г. угідь
ВРХ	238,6	435445	6847,82	23,4
Свині	172,8	189216	2730,24	10,2
Вівці та кози	310,9	226957	143,014	12,2
Птиця	10570,1	385808	3382,432	20,8
<b>Усього</b>	–	<b>1237426,7</b>	<b>13103,51</b>	<b>66,6</b>

Обсяги забруднюючих речовин, які надійшли у повітряний басейн Автономної Республіки Крим (без урахування викидів діоксиду вуглецю) від стаціонарних джерел забруднення становлять 32,7 тис.т, що на 0,1 тис.т (0,4%) менше, ніж у попередньому році. Із загальної кількості викиди метану та оксиду азоту, які належать до парникових газів, становили відповідно 2,8 та 0,8 тис.т. Крім того, обсяг викидів діоксиду вуглецю склав 1,5 млн. т (рис. 1).

Отже, АРК як регіон України з розвинутою галуззю тваринництва має високий рівень навантаження навколишнього природного середовища в основному від забруднення відходами виробництва тваринного походження. Це у свою чергу призводить до забруднення повітря сполуками азоту та парниковими газами, води нітратами та токсичними поллютантами, ґрунту важкими металами, до погіршення епізоотологічного стану, зменшення біорізноманітності та інших наслідків.

Ефективність використання азоту (ЕВА) у сільському господарстві залежить від комплексу показників – спеціалізації сільськогосподарського підприємства, видів сільськогосподарських культур і категорій тварин [4]. Так, у галузі рослинництва, зернові мають високу ЕВА, а коренеплоди, як і листові овочі – низьку.

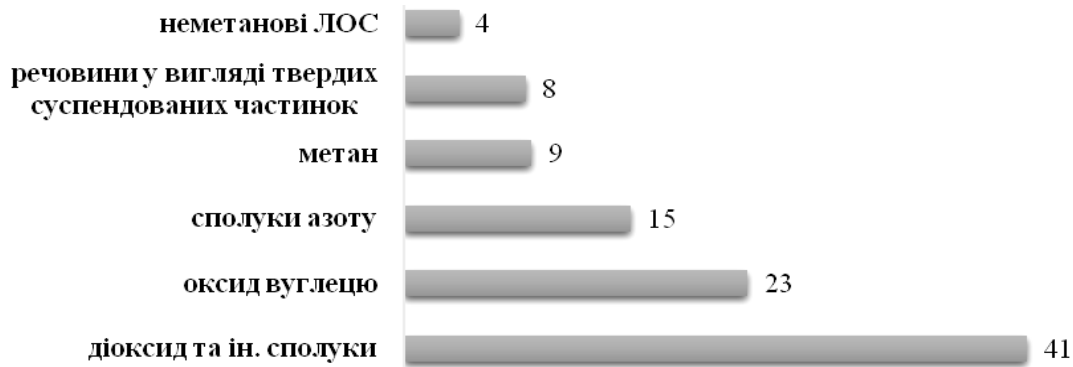


Рис. 1. Структура викидів забруднювальних речовин в атмосферу з усіх джерел, %

У галузі тваринництва, надлишок і ефективність використання азоту залежать від технології вирощування тварин. За системи пасовищного та комбінованого утримання молочної ВРХ з високими надоями молока, низькою щільністю утримання тварин, низького значення  $N_{\text{надл.}}$  та годівлі тварин бобовими культурами, коефіцієнт ЕВА зростає до 0,6. За системи пасовищного утримання м'ясної ВРХ – ЕВА=0,5.

За безземельної системи – вихід азоту з молоком, м'ясом і гноєм дорівнює його надходженню. Надлишок азоту ( $N_{\text{надл.}}$ ) – це газоподібні втрати азоту з приміщень і гноєсховища. Оскільки ці сільськогосподарські підприємства майже не мають землі, усі продукти тваринництва включно з відходами вивозяться. Значення  $N_{\text{надл.}}$  може знаходитися у межах 0–1000 кг/рік залежно від розміру підприємства і газоподібних втрат азоту.

Станом на 1.01.2013 р. за основними видами сільськогосподарських тварин в Україні зареєстровано 749 суб'єктів племінної справи тваринництва. Найчисельнішою в Україні за використанням земельних ресурсів (60,6%) і кормів (195494,9 т корм. од./рік) є галузь молочної і комбінованого скотарства. Далі, галузі свинарства відповідно 19,3 і 46529,8, м'ясного скотарства – 19,0% і 22169,5 т корм. од./рік і птахівництва (1,1% від загальної земельної площі). Молочна продуктивність ВРХ у середньому по Україні становить 5584 кг молока/рік при затратах корму 55,4 ц корм. од., несучість курки – 217 яєць/рік

Серед регіонів АПК займає значну частку у галузі тваринництва України (табл. 5). За кількістю племінних господарств (2,1%), площею с.-г. угідь (2,4) та витратою кормів (1,2%). Молочна продуктивність ВРХ у середньому по АПК становить 5239 кг молока/рік при затратах корму 50,7 ц корм. од., несучість курки – 309 яєць/рік. Найчисельнішою за використанням земельних ресурсів (43,5%) і кормів (2530,0 корм. од./рік) є галузь молочної і комбінованого скотарства. Далі, галузі свинарства відповідно 35,5% і 696,3, т корм. од./рік і птахівництва (21,1% від загальної земельної площі).

**Таблиця 5**  
**Структура галузі тваринництва суб'єктів племінної справи. АРК станом на 1.01.2013 р.**

Галузь тваринництва	Кількість суб'єктів	Загальна земельна площа с.-г. угідь, га	Відносна земельна площа, %	Витрати кормів за рік, т корм. од.
Молочне і молочно-м'ясне скотарство	7	29355,62	43,5	2530,0
Свинарство	5	23901,39	35,5	696,3
Кури	4	14150	21,0	
Усього	16	67407,01	100	3226,3

В галузі молочного і молочно-м'ясного скотарства АРК технологія вирощування тварин передбачає використання систем як пасовищного так і комбінованого утримання молочної та молочно-м'ясної худоби. Керуючись загальним підходом оцінки складових ЕВА цієї галузі, виявлено їх значні коливання у АРК (табл. 6).

**Таблиця 6**  
**Статистичний аналіз складових ЕВА галузі молочного і молочно-м'ясного скотарства АРК станом на 1.01.2013 р.**

Показник ЕВА	Статистичні показники АРК						$r_{xy}$	
	$M \pm m$	min	max	$Cv_6$	Медіана			
Надій 1 корови, кг/рік	5239±447,3	4071	6844	22,6	4901	0,676		
Витрати кормів на 1 тварину, ц корм. од./рік	50,7±8,7	32,6	91,0	42,2	48,6			
Викиди аміаку, т/рік	23,4±3,5	12,3	37,1	39,4	21,8			
Поголів'я відносно площі, гол./100 га	24,7±9,1	2,9	52,9	82,6	21,3			0,826

Наприклад, безрозмірний коефіцієнт варіації ( $Cv_6$ ) надою від 1 корови становить 22,6, за викидів аміаку – 39,4, витрат кормів – 42,2 та поголів'я відносно площі – 82,6. Позитивну кореляцію ( $r_{xy}$ ) виявлено між надоєм та витратами кормів (0,676), викидами аміаку та поголів'я відносно площі (0,826), негативну кореляцію (-0,442) – між витратою кормів на викидами аміаку.

Такі ж дослідження провели у галузі свинарства (табл. 7) та птахівництва (табл. 8).

**Таблиця 7**  
**Статистичний аналіз складових ЕВА галузі свинарства АРК станом на 1.01.2013 р.**

Показник ЕВА	Статистичні показники АРК					
	M±m	min	max	Cv <sub>6</sub>	Медіана	r <sub>xy</sub>
Витрати кормів на 1 тварину, ц корм. од./рік	6,3±0,2	6,1	6,5	4,5	6,3	-0,827
Поголів'я відносно площі, гол./100 га	187,4±98,9	13,8	531,0	118,0	62,2	
Викиди аміаку, т/рік	34,9±15,9	11,2	97,3	102,0	19,3	-

**Таблиця 8**  
**Статистичний аналіз складових ЕВА галузі птахівництва АРК станом на 1.01.2013 р.**

Показник ЕВА	Статистичні показники АРК					
	M±m	min	max	Cv <sub>6</sub>	Медіана	r <sub>xy</sub>
Несучість 1 курки, шт./рік	309±6,9	295,0	321,7	4,5	309,6	0,810
Поголів'я відносно площі, гол./га	1049±128,2	795,5	1403,7	24,5	997,7	
Викиди аміаку, т/рік	11,9±1,5	8,9	15,9	24,9	11,3	-

#### ВИСНОВКИ

1. Для зменшення забруднення повітря потрібно вживати заходи, спрямовані на значне скорочення виділення у навколишнє середовище аміаку шляхом вдосконалення методики проектування систем мікроклімату; розробки та прийняття нормативів викидів шкідливих речовин з приміщень, перехід до використання замкнутих систем мікроклімату за рахунок використання біологічного тепла тварин, із застосуванням елементів осушування, очищення та дезодорації повітря; розроблення високоефективних технічних засобів мікроклімату тваринницьких приміщень модульного типу з керуванням на базі мікропроцесорної техніки.
2. Реалізація екологічних вимог до тваринництва повинна базуватися на результатах системного моніторингу територій тваринницьких підприємств, виявленні індикаторів антропогенних забруднень.

### Список літератури

1. Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення: [Закон України] // Відомості Верховної Ради України. – 1994. – № 27. – 219 с.
2. Про охорону навколишнього природного середовища: [Закон України] // Відомості Верховної Ради (ВВР). – 1991. – № 41. – 546 с.
3. Про охорону атмосферного повітря: [Закон України] // Відомості Верховної Ради (ВВР). – 1992. – № 50. – 678 с.
4. Проект рішення о прийнятті Руководящего документа о предотвращении и сокращении выбросов аммиака из сельскохозяйственных источников // Материалы 31 сессии Европейской экономической комиссии. – Женева, 11–13 декабря 2012 г. – 122 с.

**Бригас О.П. Современное состояние производства продукции сельского хозяйства и расчет эмиссии химически активного азота в области животноводства Автономной республики Крым / О.П. Бригас, И.В. Масберг, М.П. Кейван // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С.247-255.**

В процессе производства продукции животноводства выбросы соединений азота зависят от вида, поголовья животных, их рациона, способа содержания и утилизации их отходов. При хранении навоза в открытых емкостях происходит испарение и попадания в атмосферу аммиака, молекулярного азота и других его соединений. В данной работе приведена оценка состояния производства продукции сельского хозяйства Автономной республики Крым и проведен расчет эмиссии химически активного азота в области животноводства.

**Ключевые слова:** эффективность использования азота, сельское хозяйство, животноводство, отходы животного происхождения, эмиссия соединений азота.

### **CURRENT STATUS OF AGRICULTURE PRODUCTION AND CALCULATION OF REACTIVE NITROGEN IN THE AREA OF ANIMAL BREEDING IN CRIMEA**

*Brygas O.P., Masberg I.V., Keivan M.P.*

*Institute of Agroecology and Environmental, Kyiv, Ukraine  
E-mail: kot\_56@list.ru*

Regulation of relations in the spheres of protection, utilization and reproduction of natural resources, environmental safety, prevention and elimination of the negative impact of economic activity on the environment, preserving of natural resources, genetic stock of wildlife, landscapes and other natural systems are cornerstone of such Ukrainian laws as "On Protection environment", "On air Protection" and "On ensuring sanitary and epidemiological welfare of population". In the process of animal breeding emission of nitrogen compounds depends on the species, livestock number, their diet, and way of maintenance and disposal of waste. For storage of manure in open containers results in ammonia and molecular nitrogen and its other compounds evaporation into the atmosphere. In this work the author features the estimation of the agricultural production of Crimea and the calculation of reactive nitrogen emissions in the livestock industry.

**Keywords:** efficiency of nitrogen use, agriculture, animal husbandry, animal waste, emissions of nitrogen compounds.

**References**

1. Law of Ukraine On Ensuring Sanitary and Epidemic Safety of the Population, Verkhovna Rada of Ukraine, 1994, No 27, article 218.
2. Law of Ukraine On Environmental Protection, Verkhovna Rada of Ukraine, 1991, No 41, article 546.
3. Law of Ukraine On Air Protection, Verkhovna Rada of Ukraine, 1992, No 50, article 678.
4. Draft decision on adoption of guidance document on preventing and abating Ammonia emissions from agricultural sources, Economic Commission for Europe, Thirty-first session Geneva, 11–13 December 2012.

*Поступила в редакцію 18.01.2014 г.*

УДК 539.194

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ  
ФАКТОРОВ НА ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ПОГРЕШНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
КОНСТАНТЫ РАВНОВЕСИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ С  
ВОДОРОДНОЙ СВЯЗЬЮ В СЛУЧАЕ САМОАССОЦИИ ДОНОРА  
ПРОТОНА**

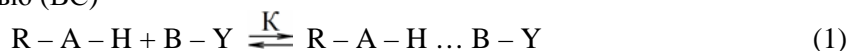
*Валиев Э.В., Шейх-Заде М.И.*

*РВУЗ «Крымский инженерно-педагогический университет», Симферополь, Украина  
E-mail: envervaliyev@ukr.net*

Получены математические модели влияния величин  $\gamma$ ,  $K$ ,  $C_0^a$ ,  $K_d$  на относительную погрешность  $\epsilon_K$  константы равновесия  $K$  процесса образования комплексов с водородной связью в случае самоассоциации донора протона. На основе анализа этих моделей выявлены факторы, влияние которых на  $\epsilon_K$  наиболее значимы. Определены области значений  $\gamma$ , минимизирующие величину  $\epsilon_K$ .  
**Ключевые слова:** водородная связь, константа равновесия, относительная погрешность, донор протона, самоассоциация, математическая модель.

**ВВЕДЕНИЕ**

Изменение энтальпии и энтропии реакции образования комплексов с водородной связью (BC)



можно определить по температурной зависимости константы равновесия  $K$  этого процесса при условии, что этот процесс является единственным. Однако, на практике есть случаи, когда в системе донор-акцептор протона наряду с процессом (1) имеет место конкурирующий процесс самоассоциации донора протона, от которого в большинстве случаев невозможно избавиться разбавлением раствора и повышением температуры раствора до разумных пределов. Разбавление раствора ограничено прозрачностью растворителя и необходимостью получения оптимальной оптической плотности в максимуме аналитической полосы, а увеличение температуры раствора ограничено температурой кипения растворителя. Поэтому самоассоциацию донора протона нужно учитывать при определении константы равновесия процесса (1). Типичным примером таких доноров протона являются карбоновые кислоты.

На рис. 1 показан спектр разбавленного раствора фенилантраниловой кислоты (ФАК) в  $C_2Cl_4$  в области  $\nu_{C=O}$  и  $\nu_{OH}$ .



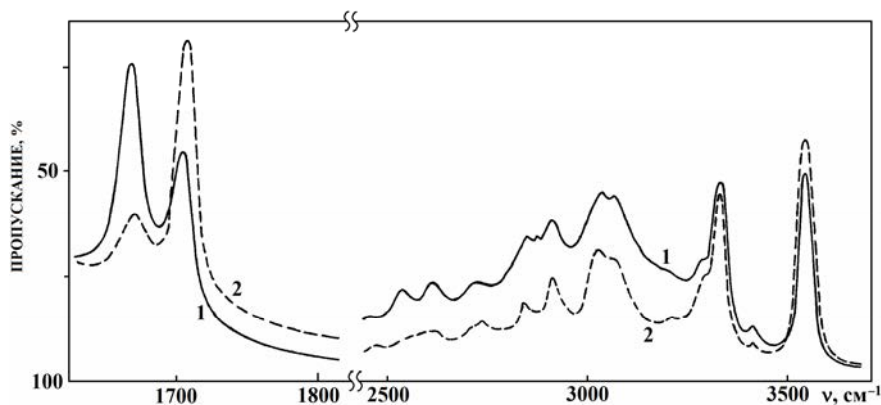


Рис. 1. Спектр раствора ФАК в  $C_2Cl_4$ . 1 –  $25^\circ C$ ; 2 –  $110^\circ C$ .

Полосы с частотами  $1702$  и  $3541\text{ см}^{-1}$  относятся соответственно к  $\nu C=O$  и  $\nu OH$  мономеров ФАК. Полоса с частотой  $1663\text{ см}^{-1}$  и широкая полоса с центром  $\sim 2950\text{ см}^{-1}$  относятся соответственно к  $\nu C=O$  и  $\nu OH$  димеров ФАК [1].

В работе [2] на примере систем карбоновая кислота – акцепторы протона рассмотрено влияние на относительную погрешность  $\epsilon_K$  константы равновесия  $K$  процесса (1) факторов  $\gamma = C_0^B/C_0^A$ ,  $C_0^A$ ,  $K$ ,  $K_d$ , где  $C_0^A$ ,  $C_0^B$  – исходные концентрации донора и акцептора протона соответственно,  $K_d$  – константа димеризации донора протона.

Задачей данной работы являлось разработка математических моделей влияния  $\gamma$ ,  $C_0^A$ ,  $K$ ,  $K_d$  на значение  $\epsilon_K$  с целью выяснения, какие из этих факторов и взаимодействие каких факторов оказывает преимущественное влияние на значение  $\epsilon_K$ .

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ИК спектры растворов ФАК в  $C_2Cl_4$  регистрировались на приборе Spесord 75 IR. Условия регистрации выбирались такими, чтобы свести к минимуму искажающее влияние прибора на спектры. При регистрации спектров использовались термостатируемые кюветы с окнами из  $CaF_2$ . Температура измерялась медь-константановой термопарой с точностью  $0,5^\circ C$ . Измерения проводились в интервале концентраций ФАК  $4,6 \cdot 10^{-4} - 1,2 \cdot 10^{-2}$  моль/л и температур  $25^\circ C - 100^\circ C$ . Толщина слоя раствора выбиралась такой, чтобы свести к минимуму погрешность в определении оптической плотности в максимуме аналитической полосы. Растворитель  $C_2Cl_4$  осушался с помощью  $CaCl_2$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленной задачи был использован метод планирования эксперимента (факторного эксперимента) [3]. В соответствии с [3] величины  $\gamma$ ,  $K$ ,  $C_0^A$ ,  $K_d$  будем называть факторами, а  $\epsilon_K$  – критерием оптимизации. Был проведен полный факторный эксперимент (ПФЭ) типа  $2^4$  с варьированием факторов на двух

уровнях. При построении матрицы планирования ввели обозначение  $\varepsilon_K = y$ , а вместо именованных факторов  $\gamma$ ,  $K$ ,  $C_0^a$ ,  $K_d$  ввели кодированные безразмерные факторы  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_4$  соответственно. Матрицу планирования ПФЭ мы здесь не приводим, так как она заняла бы много места. Заметим только, что такая матрица планирования позволяет определить значения коэффициентов уравнения регрессии

$$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_4 \cdot x_4 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{14} \cdot x_1 \cdot x_4 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{24} \cdot x_2 \cdot x_4 + b_{34} \cdot x_3 \cdot x_4 + b_{123} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{124} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_4 + b_{234} \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4 + b_{1234} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4, \quad (2)$$

которая и представляет собой искомую математическую модель.

В работе [2] показано, что при  $\gamma > 1$  в факторном пространстве можно условно выделить две области:

область I ( $K < 100$  л/моль,  $K_d > K$ ,  $C_0^a < 2 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $\varepsilon_K$  неприемлемо велики);

область II ( $K > 100$  л/моль,  $K_d < K$ ,  $C_0^a > 2 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $\varepsilon_K$  приемлемо малы).

В области I для факторов  $\gamma$ ,  $K$ ,  $C_0^a$ ,  $K_d$  нулевой уровень был выбран равным 2, 100 л/моль,  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $2 \cdot 10^3$  л/моль соответственно.

В области II для этих же факторов нулевой уровень был выбран равным 5, 500 л/моль,  $2 \cdot 10^{-2}$  моль/л, 200 л/моль соответственно. Интервал варьирования каждого фактора выбран равным  $\pm 25\%$  от его значения на нулевом уровне.

С использованием этих данных, матрицы планирования и формулы (4) из [2] были получены уравнения регрессии:

для области I:

$$\hat{y}_I = (6983,75 - 1638,75 \cdot x_1 - 1478,75 \cdot x_2 - 890,00 \cdot x_3 + 607,50 \cdot x_4 + 368,75 \cdot x_1 \cdot x_2 + 220,00 \cdot x_1 \cdot x_3 - 152,50 \cdot x_1 \cdot x_4 + 220,00 \cdot x_2 \cdot x_3 - 152,50 \cdot x_2 \cdot x_4 - 73,75 \cdot x_3 \cdot x_4 - 55,00 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 + 37,50 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_4 + 18,75 \cdot x_1 \cdot x_3 \cdot x_4 + 18,75 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4 - 3,75 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4) \cdot 10^{-4} \quad (3)$$

для области II:

$$\hat{y}_{II} = (12521,00 - 27,56 \cdot x_1 - 7,81 \cdot x_2 - 6,56 \cdot x_3 + 1,31 \cdot x_4 + 3,06 \cdot x_1 \cdot x_2 + 2,31 \cdot x_1 \cdot x_3 - 0,81 \cdot x_1 \cdot x_4 + 1,81 \cdot x_2 \cdot x_3 - 0,56 \cdot x_2 \cdot x_4 - 0,31 \cdot x_3 \cdot x_4 - 0,81 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 + 0,31 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_4 + 0,06 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4 - 0,06 \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4) \cdot 10^{-4} \quad (4)$$

Для оценки значимости коэффициентов в уравнениях (3) и (4) нужно знать величину дисперсии воспроизводимости  $S^2\{y\}$  [3]. Так как в данной работе использован вычислительный эксперимент [4], то значение  $S^2\{y\}$  оказывается равным нулю. По этой причине нет возможности строгой оценки значимости коэффициентов в уравнениях (3) и (4) и строгой проверки адекватности полученных моделей с помощью критерия Фишера [3]. Оценку адекватности полученных моделей можно провести косвенным образом путем сравнения значений  $y_u$ , полученных по формуле (4) из [2] и значений  $\hat{y}_u$ , вычисленных по уравнениям (3) и (4) данной работы. Расчеты показали, что эти значения совпадают.

Уравнения (3) и (4) можно упростить без существенной потери точности результатов. Расчеты показали следующее.

1. В уравнениях (3) и (4) можно отбросить все слагаемые, которые соответствуют тройным и четверному взаимодействию факторов. Это приводит к погрешности в 3,3 % и 0,01 % соответственно.
2. Из двойных взаимодействий наиболее существенную роль в уравнении (3) играет взаимодействие  $x_1 \cdot x_2$ , а в уравнении (4) – взаимодействия  $x_1 \cdot x_2$ ,  $x_1 \cdot x_3$ ,  $x_2 \cdot x_3$ .

Остальными двойными взаимодействиями можно пренебречь без заметной потери точности.

3. В уравнениях (3) и (4) доминирующую роль играет фактор  $x_l$  ( $\gamma$ ), изменением которого можно эффективно влиять на значение  $\epsilon_K$ .

Из результатов, полученных в [2] и данной работе, следует, что для достижения значений  $\epsilon_K$  примерно 8 – 10 % нужно использовать значения  $\gamma > 5$  в области II и  $\gamma > (20 - 30)$  в области I.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены математические модели влияния  $\gamma$ ,  $K$ ,  $C_0^a$ ,  $K_d$  на значение  $\epsilon_K$ .
2. Выявлены наиболее значимые факторы и взаимодействия факторов, влияющие на значение  $\epsilon_K$ .
3. Определены области значений  $\gamma$ , при использовании которых значения  $\epsilon_K$  могут быть меньше заранее заданной величины  $\epsilon$ .

### Список литературы

1. Шейх-Заде М.И. Спектроскопическое исследование молекулярных форм фенилантраниловой кислоты / М.И. Шейх-Заде // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия» – 2006. – Т. 19(58). – № 4. – С. 241–244.
2. Валиев Э.В. Об относительной погрешности определения по ИК-спектрам константы равновесия образования комплексов с водородной связью в случае самоассоциации донора протона / Э.В. Валиев, М.И. Шейх-Заде // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия» – 2013. – Т. 26(65). – № 2. – С. 211–215.
3. Тихомиров В.Б. Планирование и анализ эксперимента / В.Б. Тихомиров. – М.: Легкая индустрия, 1974. – 263 с.
4. Основы научных исследований / Под ред. В.И. Крутова и В.В. Попова. – М.: Высшая школа, 1989. – 400 с.

**Валієв Е.В. Математичне моделювання впливу різних чинників на відносну похибку визначення константи рівноваги утворення комплексів з водневим зв'язком у випадку самоасоціації донора протона / Е.В. Валієв, М.І. Шейх-Заде // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 256-260.**

Отримано математичні моделі впливу величин  $\gamma$ ,  $K$ ,  $C_0^a$ ,  $K_d$  на відносну похибку  $\epsilon_K$  константи рівноваги до процесу утворення комплексів з водневим зв'язком у випадку самоасоціації донора протона. На основі аналізу цих моделей виявлено фактори, вплив яких на  $\epsilon_K$  найбільш значущий. Визначено області значень  $\gamma$ , які мінімізують величину  $\epsilon_K$ .

**Ключові слова:** водневий зв'язок, константа рівноваги, відносна похибка, донор протона, самоасоціація, математична модель.

**MATHEMATICAL MODELING OF THE VARIOUS FACTORS INFLUENCE ON THE RELATIVE ERROR IN DETERMINING THE EQUILIBRIUM CONSTANT OF FORMATION OF COMPLEXES WITH HYDROGEN BOND IN THE CASE OF PROTON DONOR SELF-ASSOCIATION**

*Valiev E.V., M.I. Sheikh-Zade*

*Republican Higher Education Institution "Crimean Engineering and Pedagogical University"*  
*E-mail: envervaliev@ukr.net*

Energy of the process of formation of complexes with intermolecular hydrogen bonds (IHB) between donor and acceptor of the proton can be identified by IR absorption spectra using the temperature dependence of the equilibrium constant  $K$  of this process, provided that the process is unique. However, in practice there are cases when the system of the proton donor-acceptor along with this process takes place a competing process of self-association of a proton donor, from which it is impossible to get rid of. A typical example of such proton donors are carboxylic acids. This requires taking into account the self-association of proton donors in determining  $K$ , which introduces additional uncertainty in the value of  $K$ .

In this paper we analyzed the impact on the equilibrium constant  $K$  relative error  $\varepsilon_K$  next factors:  $\gamma = C_0^b/C_0^a$ ,  $C_0^a$ ,  $K$ ,  $K_d$ , where  $C_0^a$ ,  $C_0^b$  – initial concentration of the proton donor and acceptor respectively,  $K_d$  – proton donor dimerization constant. Using the methods of experiment planning and computational experiment derived mathematical models of the impact of these factors on  $\varepsilon_K$  for the formation of complexes with IHB carboxylic acid-proton acceptor. Based on the analysis of these models identified factors whose influence on  $\varepsilon_K$  most significant. Defined range of values of  $\gamma$  minimizing the value of  $\varepsilon_K$ .

**Keywords:** hydrogen bond, equilibrium constant, relative error, proton donor, self-association, mathematical model.

**References**

1. Sheih-Zade M.I., Spectroscopic study of molecular forms of phenylantranilic acid, *Sci. Not. Taurida V.I. Vernadsky Nat. Univ, Ser. Biology, chemistry*, **19** (4), 241 (2006).
2. Valiev E.V., Sheih-Zade M.I., The relative error in the IR spectra determination of the equilibrium constant of complexes formation with a hydrogen bond in the case of proton donor self-association, *Sci. Not. Taurida V.I. Vernadsky Nat. Univ, Ser. Biology, chemistry*, **26** (2), 211 (2013).
3. Tihomirov V.B., Planing and analysis of experiment, 263 p. (Legkaya industria, Moscow, 1974). (in Russ.).
4. Basics of scientific research, edited by Krutov V.I. and Popov V.B., 400 p. (Vyshaya shkola, Moscow, 1989). (in Russ.).

*Поступила в редакцию 19.01.2014 г*

**УДК 577.152.193**

## **МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ**

***Вяткина О.В.***

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: oksana\_yyatkina@list.ru*

Установлены оптимальные условия экстракции пероксидазы из корнеплода редьки черной: время, температура, массовое соотношение растительное сырьё/экстрагент. Проведён сравнительный анализ влияния очистки фермента фракционированием, криоконсервации и иммобилизации на водонерастворимых подложках на скорость инактивации фермента при хранении. Показано, что средняя скорость инактивации замороженного при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  фосфатно-буферного раствора фермента соизмерима со скоростью инактивации иммобилизованных на силикагеле и бентоните пероксидаз. Учитывая простоту реализации, метод криоконсервации может быть рекомендован нами как эффективный метод стабилизации активности пероксидазы редьки черной.

**Ключевые слова:** пероксидаза, криоконсервация, иммобилизация, фракционная очистка, инактивация.

### **ВВЕДЕНИЕ**

В промышленных биокаталитических процессах широко используются различные ферменты, но особый интерес представляют собой оксидоредуктазы, в частности растительные пероксидазы. Однако перспективы использования растительных пероксидаз в промышленности, водоочистке, химическом анализе зачастую ограничены низкой стабильностью и активностью нативного фермента. Значительное повышение активности и устойчивости фермента происходит при его очистке и выделении в кристаллическом виде. Однако, схема очистки достаточно сложна, требует больших временных и финансовых затрат [1]. Другим способом повышения устойчивости активности растительных пероксидаз является их иммобилизация на водонерастворимых подложках [2]. Но одним из наиболее простых методов сохранения активности нативных ферментных препаратов является их хранение при низких температурах, в частности, в замороженном состоянии.

Так как ранее мы проводили исследования стабилизации ферментов путём иммобилизации на водонерастворимых подложках, то в данной работе представлены данные по изучению влияния криоконсервации и очистки фракционированием на активность пероксидазы редьки черной.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Объектом исследования являлись фосфатно-буферные (pH=6,8) и ацетатно-буферные (pH=5,75) экстракты пероксидазы корнеплодов редьки черной.

Экстракцию фермента из очищенного и измельченного растительного сырья проводили в течение 15 мин по стандартной методике, описанной Селибером [3].

Полученные экстракты пероксидазы редьки черной замораживали при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и выдерживали от 5 до 40 суток. После чего в размороженных растворах определяли пероксидазную активность по начальной скорости реакции пероксидазного окисления гидрохинона ( $t=10$  мин,  $t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в системах I, II, III, где концентрация гидрохинона равна  $0,00002$  моль/л, концентрация пероксида водорода –  $0,01$  моль/л, объем ферментного препарата варьировал соответственно от 1 до 3 мл, общий объем системы 50 мл. Изменение концентрации гидрохинона в исследуемых системах контролировали фотоколориметрическим методом по реакции с *o*-фенантролином в присутствии ионов  $\text{Fe}^{3+}$  [4]. За единицу активности принимали количество окисленного субстрата (мкмоль), катализированного 1 мл ферментного препарата в течение 1 мин.

Удельную ферментативную активность рассчитывали по формуле:

$$\bar{A} = \frac{\Delta C \cdot V}{V_{\text{п}} \cdot t}; \quad (1)$$

Где:  $\Delta C = C_{\text{н}} - C_{\text{к}}$  – концентрация прореагировавшего гидрохинона, мкм/л;

$V$  – объем окислительной системы, л;

$t$  – время реакции, мин;

$V_{\text{п}}$  – объем используемого экстракта пероксидазы, мл.

Другим критерием, характеризующим активность ферментного препарата, считали степень конверсии гидрохинона в исследуемых системах ( $\alpha$ , %)

$$\alpha = \frac{C_{\text{н}} - C_{\text{к}}}{C_{\text{н}}} \cdot 100\% \quad (2)$$

Где:

$C_{\text{н}}$  – начальная концентрация  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$  в системе;

$C_{\text{к}}$  – конечная концентрация  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$  в системе.

Кроме того, были определены рН, Eh и содержание белка в свежеполученных растворах и после 40 суток замораживания. Контроль рН и Eh проводили методом прямой потенциометрии. Измерения проводили на иономере универсальном ЭВ-74: электрод сравнения – хлорсеребряный; индикаторные электроды – рН (стеклянный), Eh (платиновый). Содержание белка устанавливали фотоколориметрическим методом по биуретовому способу [5].

Для определения оптимальных условий экстракции пероксидазы из корнеплодов редьки черной фосфатным и ацетатным буферными растворами варьировали следующие параметры:

- 1) температуру процесса от  $15$  до  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;
- 2) время экстракции от  $0,5$  ч до  $24$  ч;
- 3) массовое соотношение фаз (растительное сырьё/экстрагент)  $1:1$  и  $1:10$ .

Затем полученные в оптимальных условиях экстракты пероксидазы подвергли очистке методом высаливания сульфатом аммония. В ходе исследований концентрация соли была  $3,2$  моль/л; температура  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Время осаждения –  $24$  часа.

Фермент также очищали путем осаждения в системе ацетон– $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , где концентрация  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  равна 0,2 моль/л. Соотношение объемов экстракта пероксидазы, раствора сульфата аммония и использование ацетона составляло  $V_{\text{II}}:V_{\text{C}}:V_{\text{A}}=1:1:1$ . Осаждение проводили при температуре 4 °С, в течение 24 часов.

Полученные осадки отделяли центрифугированием при 8000 об. в течение 10 мин. После центрифугирования осадок высушивали при комнатной температуре, затем растворяли в 10 мл дистиллированной воды. После чего определяли содержание белка и пероксидазную активность полученного препарата по гидрохинону. Аналогичные измерения повторяли через 5 суток.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе исследования были установлены исходные характеристики полученных ферментных препаратов, представленные в таблице 1.

Таблица 1

#### Содержание белка, Eh и pH в экстрактах пероксидазы редьки черной до и после замораживания

Время опыта	Ацетатный буфер				Фосфатный буфер			
	pH	Eh (mV)	Белка, г/л	A, е.а.	pH	Eh (mV)	Белка, г/л	A, е.а.
30 мин	5,3	-70	15±0,6	0,055	6,9	-105	17±0,3	0,100
40 суток	5,6	180	17±0,4	0,011	6,55	187	19±0,4	0,026

Было установлено, что активность относительно гидрохинона исходного ацетатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной практически в 2 раза ниже активности фосфатно-буферного экстракта фермента, что связано с более низким содержанием белка, более высокой кислотностью среды и подтверждается более высоким значением Eh-потенциала системы. Данные, полученные в ходе изучения динамики изменения активности исследуемых ферментных препаратов, представлены на рис. 1, 2.

Как видно из рис. 1, при замораживании фосфатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной в течении 19 суток в системах I и II степень конверсии гидрохинона достигает 100%. Незначительное уменьшение степени конверсии субстрата наблюдается во всех исследованных системах, начиная с 28 суток. В системах с ацетатно-буферным экстрактом пероксидазы редьки чёрной (рис. 2) установили, что степень конверсии гидрохинона остаётся относительно стабильной при использовании экстракта пероксидазы, замороженного в течении 7 суток. Более длительные времена замораживания фермента приводят к снижению его активности на 80%, что подтверждается зависимостями, представленными на рис. 3, 4.

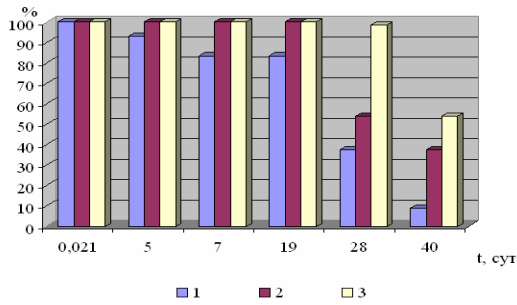


Рис. 1. Изменение степени ферментативной конверсии гидрохинона после хранения фосфатно-буферного экстракта пероксидазы в замороженном виде. 1 – система (III); 2 – система (II); 3 – система (I).

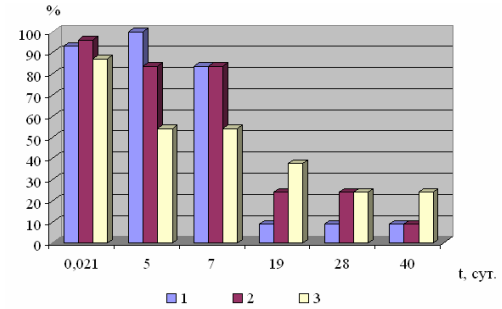


Рис. 2. Изменение степени ферментативной конверсии гидрохинона после хранения ацетатно-буферного экстракта пероксидазы в замороженном виде. 1 – система (III); 2 – система (II); 3 – система (I).

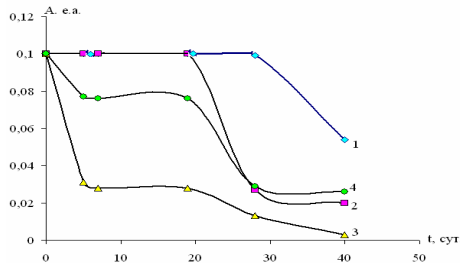


Рис. 3. Динамика снижения активности фосфатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной после хранения в замороженном виде. 1 – система (I); 2 – система (II); 3 – система (III); 4 – средняя активность в системах (I, II, III).

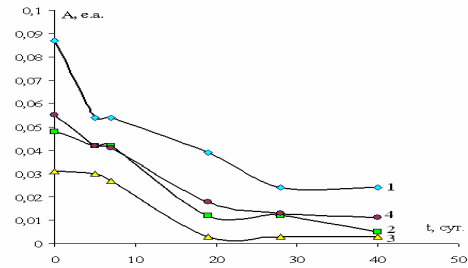


Рис. 4. Динамика снижения активности ацетатно-буферного экстракта пероксидазы редьки черной после хранения в замороженном виде. 1 – система (I); 2 – система (II); 3 – система (III); 4 – средняя активность в системах (I, II, III).

Уменьшение активности пероксидазы при длительном замораживании очевидно обусловлено тем, что во время замораживания водных растворов, вода из раствора трансформируется в кристаллы льда, оставляя безводные компоненты сконцентрированными в сильно уменьшенном количестве жидкой воды. При этом в растворе существенно изменяются рН, ионная сила, вязкость, поверхностные и межфазные натяжения и окислительно-восстановительный потенциал, что может приводить к изменению степени диссоциации функциональных групп макромолекул фермента, степени их сольватации, а, следовательно, к агрегации либо к распаду субъединиц, то есть к изменению конформации молекул фермента на уровне четвертичной и даже третичной структуры белка.



Изменения значений рН и Eh в исследуемых системах нами были подтверждены экспериментально (табл. 1). Таким образом было установлено, что эффективной криоконсервация при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  для фосфатно-буферных экстрактов пероксидазы редьки черной является в течении 19 суток, а для ацетатно-буферного экстракта не более 7 суток.

Начальной стадией выделения пероксидазы из растительного сырья является экстракция фермента различными водными растворами. На рисунках 5–8 представлены диаграммы отражающие влияние температуры, времени экстракции, массовых соотношений растительное сырьё/экстрагент, рН системы на активность выделенного фермента.

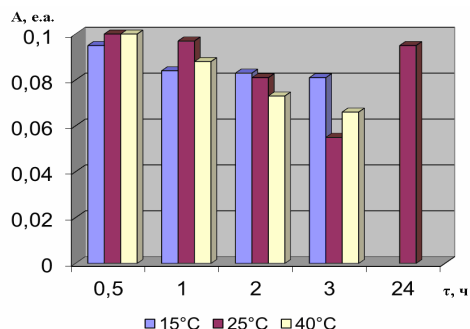


Рис. 5. Влияние температуры и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной Экстрагент – фосфатный буфер (рН=6,8)

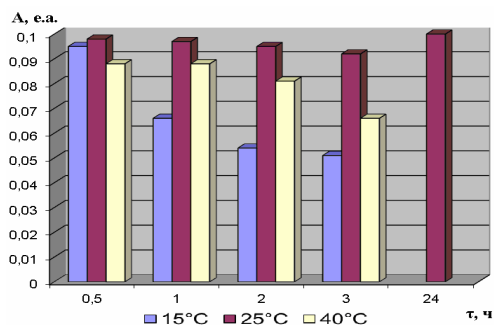


Рис. 6. Влияние температуры и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной Экстрагент – ацетатный буфер (рН=5,75)

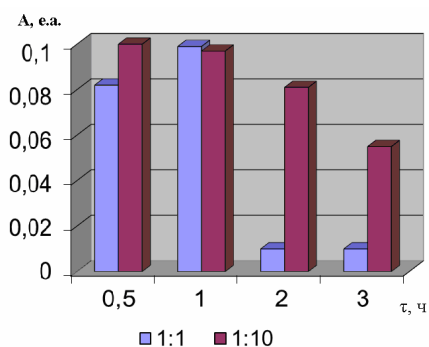


Рис. 7. Влияние массового соотношения фаз (растительное сырьё/экстрагент) и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной. Экстрагент – фосфатный буфер (рН=6,8)

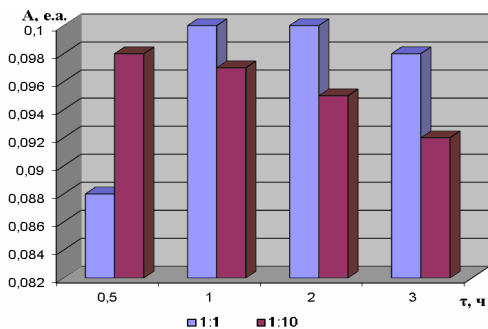


Рис. 8. Влияние массового соотношения фаз (растительное сырьё/экстрагент) и времени экстракции на активность препарата пероксидазы корнеплодов редьки черной. Экстрагент – ацетатный буфер (рН=5,75)

В ходе эксперимента было установлено, что оптимальными условиями экстракции пероксидазы из корнеплода редьки черной является время 30 мин., температура 25 °С и массовое соотношение растительное сырьё/экстрагент 1:10 как в случае использования фосфатного так и ацетатного буфера. Результаты определения активности препаратов пероксидазы, экстрагированных буферными растворами в оптимальных условиях и очищенных методом высаливания и осаждением в системе с ацетоном и сульфатом аммония, представлены в табл. 2.

**Таблица 2**

**Активность и содержание белка в препарате пероксидазы редьки черной, очищенной фракционированием**

Реагент-осадитель	Фосфатный буфер (рН=6,8)		Ацетатный буфер (рН=5,75)	
	А, е.а	С <sub>белок</sub> , г/л	А, е.а	С <sub>белок</sub> , г/л
24 ч				
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,3±0,2	138 ±2	7,0±0,4	145 ±2
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9,0±0,2	192±3	7,3±0,2	149 ±3
120 ч				
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,3±0,2	137 ±2	7,0±0,4	145 ±2
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9,0±0,2	194±3	7,3±0,2	148 ±2

Из таблицы видно, что очистка пероксидазы высаливанием из фосфатно-буферного экстракта повышает активность ферментного препарата в 53 раза, осаждением в системе с ацетоном – в 90 раз. Для пероксидазы, полученной из ацетатно-буферного экстракта в обоих случаях после очистки активность увеличилась приблизительно в 70 раз. При хранении в течение 120 часов полученного препарата при температуре 4°С изменения активности пероксидазы не наблюдалось. Полученные данные по ферментативной активности коррелируют с количеством белка в системах.

Обобщенные данные по динамике инактивации нативной пероксидазы редьки черной и стабилизированной путём криоконсервации, фракционной очистки и иммобилизации на водонерастворимых подложках приведены в таблице 3. Ранее было установлено, что нативный фермент теряет свою активность уже в течение первых двух часов – она уменьшается на 50% [6]. Иммобилизация же фермента увеличивает срок его хранения. Так, в течение 14 суток средняя пероксидазная активность в системе с гидрохиноном уменьшилась менее чем на 10%, а в случае фермента, иммобилизованного на силикагеле, в течение 30 суток средняя молярная пероксидазная активность в системе с гидрохиноном уменьшилась на 7% [7]. Также было установлено, что средняя скорость инактивации замороженного при –20 °С

фосфатно-буферного раствора фермента соизмерима со скоростью инактивации иммобилизованных на силикагеле и бентоните пероксидаз.

**Таблица 3**  
**Динамика инактивации нативной пероксидазы редьки черной и после различных видов обработки**

пероксидаза	pH	$\Delta A$ , %	$\Delta t$	$w = \Delta A / \Delta t$ , %/сут.
нативная	6,8	50	0,08 сут. (2 ч)	625
	5,75	32	0,08 сут. (2 ч)	400
замороженная	6,8	10	19	0,53
		74	40	1,85
	5,75	24	7	3,4
		80	40	2
осаждённая (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,8	0	5	0
	5,75			
осажденная (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO-(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,8	0	5	0
	5,75			
иммобилизованная на бентоните	–	10	14 сут.	0,7
иммобилизованная на силикагеле	–	7	30 сут.	0,2

Учитывая простоту реализации, данный метод может быть рекомендован нами как метод стабилизации активности пероксидазы редьки черной. Полученные нами путём фракционной очистки ферментные препараты отличались стабильностью активности при хранении, однако в данном случае необходимо изучение активности данных препаратов при более длительном хранении.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что оптимальными условиями экстракции пероксидазы из корнеплодов редьки черной является время 30 мин., температура 25 °С и массовое соотношение растительное сырьё/экстрагент 1:10 как в случае использования в качестве экстрагента фосфатного, так и ацетатного буфера.
2. Очистка пероксидазы высаливанием из фосфатно-буферного экстракта повышает активность ферментного препарата в 53 раза, осаждением в системе с ацетоном – в 90 раз. Для пероксидазы, полученной из ацетатно-буферного экстракта в обоих случаях после очистки активность увеличивается 70 раз. Активность препаратов стабильна при хранении в течение 120 часов.
3. Установлено, что оптимальная длительность криоконсервации при –20 °С для фосфатно-буферных экстрактов пероксидазы редьки черной составляет 19 суток, а для ацетатно-буферного экстракта – не более 7 суток. Показано, что средняя скорость инактивации замороженного при –20 °С фосфатно-буферного

раствора фермента соизмерима со скоростью инактивации иммобилизованных на силикагеле и бентоните пероксидаз. Учитывая простоту реализации, данный метод может быть рекомендован нами как метод стабилизации активности пероксидазы редьки черной.

#### Список литературы

1. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985. – 425 с.
2. Березин И.В. Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов. – М.: Высш. шк., 1987. – 159 с.
3. Селибер Г.Л. Большой практикум по микробиологии / Г.Л. Селибер. – М.: Мир, 1962. – 492 с.
4. Лурье Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбников. – М.: Химия, 1974. – 395 с.
5. Бейли Д. Определение белка. Методы химии белков / Д. Бейли. □ М.: Химия, 1965. – 266 с.
6. Вяткина О.В. Каталитична активність пероксидази редьки чорної щодо субстратів відновників різної природи. / О.В. Вяткіна, І.В. Лаврентьєва, М.О. Єрмакова // Вісник Львівського університету. – 2012. – В. 53. – С. 357–362.
7. Ermakova M.O. Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase radish black substrate specificity / M.O. Ermakova, O.V. Vyatkina // Peer-reviewed articles 8th International Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers. – 2012. – Vol. 8, № 116. – P. 1–8.

**Вяткіна О.В. Методи підвищення та стабілізації активності пероксидази редьки чорної / О.В. Вяткіна** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 261-269.

Встановлені оптимальні умови екстракції з коренеплоду редьки чорної пероксидази: час, температура, масове співвідношення рослинна сировина/екстрагент. Проведений порівняльний аналіз впливу очищення ферменту фракціонуванням, кріоконсервування та іммобілізації на водо нерозчинних підкладках на швидкість інактивациі ферменту при зберіганні. Показано, що середня швидкість інактивациі замороженого при –20 °С фосфатно-буферного розчину ферменту порівняна з швидкістю інактивациі пероксидаз, що іммобілізовані на силикагелі та бентоніті. Беручі до уваги легкість реалізації, даний метод може бути рекомендований нами як метод стабілізації активності пероксидази редьки чорної.

**Ключові слова:** пероксидаза, кріоконсервування, іммобілізація, фракційне очищення, інактивациія.

#### **METHODS OF IMPROVEMENT AND STABILIZATION OF ACTIVITY BLACK RADISH PEROXIDASE**

*Vyatkina O.*

*Taurida V.I. Vernadskiy National University, Simferopol, Ukraine  
E-mail: oksana\_vyatkina@list.ru*

A great number of enzymes are used in the industrial biocatalytic processes, the oxidoreductases, and vegetation peroxidases in particular, contributing the biggest interest among them. However, the prospects of the vegetation peroxidases usage in manufacturing industry, water purification, and chemical analysis are often limited by low native enzyme permanency and activity. The considerable increase of the enzyme activity and constancy happens during its purification and crystallize separation. However, the purification pattern is quite complicated, requiring large time and financial spending. The

other way of the increase of the vegetation peroxidases enzyme activity is their immobilization on the water - insoluble surface. But one of the easiest ways of the activity preservation for the native enzyme compounds is their low – temperature storage, in particular in frozen condition. Thus, the purpose of this work was studying the efficiency of the vegetation peroxidases stabilization methods mentioned.

The study was made of black radish peroxidase. The inactivation dynamics of native, frozen under the temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ , immobilized and purified by the enzyme fractionating during its storage was identified by the peroxidase oxidation speed of the hydroquinone. The obtained data of inactivation dynamics of black radish peroxidase ( $w=\Delta A/\Delta\tau$ , % per day:  $\Delta A$ , % – change of molar peroxidase activity,  $\Delta\tau$ , per day) are represented:

native peroxidase –  $\text{pH}=6,8$ ,  $\Delta\tau=0,08$ ,  $w=625\%$  per day,  $\text{pH}=5,75$   $\Delta\tau=0,08$ ,  $w=400\%$  per day;

frozen peroxidase –  $\text{pH}=6,8$ ,  $\Delta\tau=19$ ,  $w=0,53\%$  per day,  $\Delta\tau=40$ ,  $w=1,85\%$  per day;

frozen peroxidase –  $\text{pH}=5,75$ ,  $\Delta\tau=7$ ,  $w=3,4\%$  per day,  $\Delta\tau=40$ ,  $w=2,0\%$  per day;

peroxidase precipitated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  –  $\text{pH}=6,8$ ,  $\Delta\tau=5$ ,  $w=0\%$  per day,  $\text{pH}=5,75$   $\Delta\tau=5$ ,  $w=0\%$  per day;

peroxidase precipitated  $(\text{CH}_3)_2\text{CO}-(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  –  $\text{pH}=6,8$ ,  $\Delta\tau=5$ ,  $w=0\%$  per day,  $\text{pH}=5,75$   $\Delta\tau=5$ ,  $w=0\%$  per day;

immobilized on bentonite peroxidase -  $\Delta\tau=14$ ,  $w=0,7\%$  per day;

immobilized on silica –  $\Delta\tau=30$ ,  $w=0,2\%$  per day.

In the course of research it was fixed that the medium inactivation speed of the frozen under  $-20^{\circ}\text{C}$  phosphatic – buffering enzyme solution is proportional to the inactivation speed of the bentonite and silica immobilized peroxidase. Taking into account the easiness of realization, this method can be recommended by us as an activity stabilization method of black radish peroxidase. The enzyme compounds obtained by us during the fractionating purification also were especially stable while being stored, however in this case the study of the mentioned compounds activity during longer storage time is required.

**Keywords:** peroxidase, frozen, immobilization, fractionating purification, inactivation.

### References

- 1 Scopes R., Methods of protein purification, 425 p. (Mir, Moscow, 1985). (in Russ.).
- 2 Berezin I.V., Klyachko D., Levashov A.V., Immobilized enzymes, 159 p. (Vysshaya Shkola, Moscow, 1987). (in Russ.).
- 3 Seliber G.L., A large workshop in microbiology, 492 p. (Mir, Moscow, 1962). (in Russ)
- 4 Lurie Y.Y., Rybnikov A.I., Chemical analysis of industrial waste water, 395 p. (Khimiya, Moscow, 1974). (in Russ.).
- 5 Bailey D., Determination of protein. Methods chemistry of proteins, 266 p. (Khimiya, Moscow, 1965). (in Russ.).
- 6 Vyatkina O.V., Lavrent'eva I.V., Ermakova MO, Catalytic activity of peroxidase black radish relatively substrates reducing agents of different nature, *Visnyk of Lviv University*, **53**, 357 (2012).
- 7 Ermakova M.O., Vyatkina O.V., Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase radish black substrate specificity, *Peer-reviewed articles 8th International Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers*, **8**(116), 1 (2012).

Поступила в редакцию 29.01.2014 г

УДК 663.253.2:547,477

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ВИНА И ВИНОМАТЕРИАЛОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

*Жулякова Т.А.<sup>1</sup>, Аристова Н.И.<sup>1</sup>, Панов Д.А.<sup>2</sup>, Зайцев Г.П.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Национальный институт винограда и вина «Магарач» НААН Украины, Ялта, Украина;*

<sup>2</sup>*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина*

*E-mail: golden.heart@mail.ru*

Разработаны и апробированы методики определения концентрации катионов и анионов в винах и виноматериалах Крымского и Одесского регионов методом капиллярного электрофореза на приборе фирмы «Agilent Technologies» (Германия).

**Ключевые слова:** виноматериалы, вина, капиллярный электрофорез, атомно-адсорбционная спектроскопия.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на рынок виноматериалов поступает некачественная, а иногда и фальсифицированная продукция. Положительные изменения в аспекте оценки качества винодельческой продукции являются результатом оснащения производственных и научных лабораторий современным аналитическим оборудованием и приборами, которые позволяют на основе международных стандартов определять практически все компоненты винопродукции и напитков, гарантировать их качество и безопасность. Введение стандартов защищает внутренний рынок от фальсифицированных продуктов и предоставляет возможность Украине стать полноправным торговым партнером в мире.

Неорганические анионы и катионы являются важной характеристикой состава, а, следовательно, натуральности и подлинности вин, так как они переходят в вино из винограда и отображают катионно-анионный состав воды и грунта местности произрастания виноградной лозы. Мякоть винограда содержит в среднем (в мг на 1 г зольного остатка) 180 мг калия, 24 мг натрия, 52 мг кальция, 34 мг магния [1]. В вине соотношения между кальцием и магнием может быть обратным в результате выпадения в осадок виннокислого кальция. Концентрация сульфат-иона меняется в сторону увеличения вследствие окисления сернистой кислоты и обработки вина гипсом. Высокое содержание анионов хлора и катионов калия, наблюдается в сусле и вине из винограда, выращенного в приморских районах с засоленным грунтом [2]. В винограде и вине катионы аммония и нитрат-анионы представляют собой различные формы азота. Часть аммонийных солей в результате автолиза дрожжей переходит в вино, и количество их может возрастать, если первая переливка

задерживается. Массовая концентрация минеральных веществ увеличивается при обработке сусел и вин бентонитом, при гипсовании, меловании и сульфитации [3].

В табл. 1 приведен диапазон концентраций катионов и анионов в сусле и винах согласно литературным данным [2, 3]. Из табл. 1 видно, что из катионов в сусле и винах преобладает калий, а из анионов – сульфат.

**Таблица 1**  
**Концентрации катионов и анионов в сусле и винах (мг/дм<sup>3</sup>)**

Ион	Сусло	Вино
Сульфат (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	40–500	50–1000
Хлорид (Cl <sup>-</sup> )	3–300	20–200
Нитрат (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	5–20	5–20
Калий (K <sup>+</sup> )	300–2000	100–2500
Натрий (Na <sup>+</sup> )	10–300	10–200
Кальций (Ca <sup>2+</sup> )	20–250	30–200
Магний (Mg <sup>2+</sup> )	40–250	30–240
Аммоний (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	10–150	0–150

Поскольку определение минерального состава в вине и виноматериалах может служить указанием на натуральность и подлинность, то актуальным является решение вопросов по разработке методов контроля [4]. Существующие химические и физико-химические методы анализа катионно-анионного состава винодельческой продукции требуют предварительной подготовки пробы, то есть затраты времени и увеличение стоимости анализа. В последнее время в литературе стали появляться сообщения об использовании капиллярного электрофореза (КЭ) – эффективного метода качественного и количественного анализа ионов и молекул, основанного на их разделении в кварцевом капилляре диаметром менее 1 мм и длиной до 80 см при наложении электрического поля [5]. Этот метод КЭ позволяет определять массовые концентрации компонентов от 1 до 100 мг/дм<sup>3</sup>, отличается быстротой анализа (продолжительность около 8 мин), упрощенной пробоподготовкой, малым расходом реактивов и практически неограниченным сроком службы капилляра. Это позволяет достичь минимальной себестоимости анализа.

Ведущие фирмы мира («Beckman Coulter», «Agilent Technologies», «Prince Technologies», «Люмэкс») поставляют на рынок приборы капиллярного электрофореза разной степени универсальности. В сборнике методов Международной организации винограда и вина (МОВВ) капиллярный электрофорез применен для анализа сорбиновой (OIV-MA-AS313-18) и органических кислот (OIV-MA-AS313-19) [6]. Так как минеральный состав является значимым показателем качества винопродукции. Однако отсутствие в сборнике МОВВ методов анализа минерального состава винопродукции методом КЭ вызывает необходимость разработки и адаптации методик, предлагаемых производителями приборов КЭ.

В настоящее время определение подлинности винопродукции с использованием метода КЭ проводились на юге России учеными Гугучкиной Т.И.,

Агеевой Н.М. и другими [7, 8]. К сожалению, в Украине до сих пор этот метод не нашел нужного применения.

Целью наших исследований стали адаптация и оптимизация параметров методик определения катионов и анионов в винах и виноматериалах, произведенных на предприятиях Украины, методом капиллярного электрофореза на приборе фирмы «Agilent Technologies».

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований были образцы столовых виноматериалов, полученных из винограда Крымского (К) и Одесского (О) регионов. Определение концентраций катионов и анионов в исследуемых образцах проводили с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent CE («Agilent Technologies» Германия).

Метод КЭ основан на разделении ионов в исследуемой пробе благодаря их разной электрофоретичной подвижности в процессе миграции по кварцевому капилляру в электролите под действием электрического поля. Все компоненты пробы движутся в одном направлении к концу капилляра, где расположен высокочувствительный детектор. Идентификацию и количественное определение проводили регистрацией поглощения света в ультрафиолетовой области спектра.

Во время проведения исследований были оптимизированы режимы и параметры КЭ-разделения катионов и анионов – были выбраны кварцевые капилляры длиной 64,5 см для катионов и 80,5 см для анионов; внутренний диаметр обоих капилляров – 50 мкм; диапазон изменения рабочего напряжения от –30 кВ до +30 кВ и температура измерения – 25 °С. Время определения катионов составляет около 5 минут, анионов – около 7 минут. Подготовку пробы к измерениям проводили путем разведения исследуемого образца вина или виноматериала бидистиллированной водой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные экспериментальные данные определения концентрации катионов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $NH_4^+$ ) и анионов ( $SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$  и  $NO_3^-$ ) методом КЭ в образцах столовых вин и купажных виноматериалов, полученных в Крымском и Одесском регионах, представлены в табл. 2. При концентрации компонентов от 1 до 10 мг/дм<sup>3</sup> ошибка определения не больше 15%, от 10 до 100 мг/дм<sup>3</sup> – 10% ( $P = 0,95$ ).

Согласно полученным данным (Табл. 2) видно, что в виноматериалах из винограда Крымского и Одесского регионов содержание катионов и анионов согласуется с литературными данными ряда авторов [2, 3, 9]. Однако, следует отметить, что повышенное содержание ионов хлора и натрия в виноматериале из винограда сорта Ркацители Одесского региона объясняется тем, что виноград, из которого получен образец выращен вблизи моря на засоленных почвах [2, 3].

Кроме того, проводились исследования катионного состава виноматериалов методом капиллярного электрофореза в сравнении с данными, полученными методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) (Рис. 1). Это сравнение показало хорошее соответствие результатов, полученных обоими методами, а величина коэффициента корреляции составила 0,986.



Таблица 2

Концентрации катионов и анионов в образцах столовых вин и купажных виноматериалов

Образец	Концентрация, мг/дм <sup>3</sup>							
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Алиготе К <sub>1</sub>	164	53	8	403	70	81	74	54
Алиготе К <sub>2</sub>	133	23	5	317	61	56	58	43
Ркацители К <sub>1</sub>	191	78	0	516	72	65	85	72
Алиготе К <sub>3</sub>	121	21	12	387	59	69	71	57
Купаж К <sub>1</sub>	181	93	0	431	75	80	88	32
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Купаж К <sub>2</sub>	144	68	0	391	75	68	75	49
Купаж К <sub>3</sub>	189	35	5	384	74	82	73	35
Купаж К <sub>4</sub>	147	29	3	361	81	67	62	22
Ркацители О <sub>1</sub>	238	399	7	549	304	91	74	70
Ркацители О <sub>2</sub>	187	171	0	376	253	48	43	28
Алиготе О <sub>1</sub>	119	105	14	650	109	64	78	20
Мускат О <sub>1</sub>	191	188	0	751	142	73	71	23

Примечание: К<sub>i</sub> и О<sub>i</sub> – Крымский и Одесский регион, соответственно.

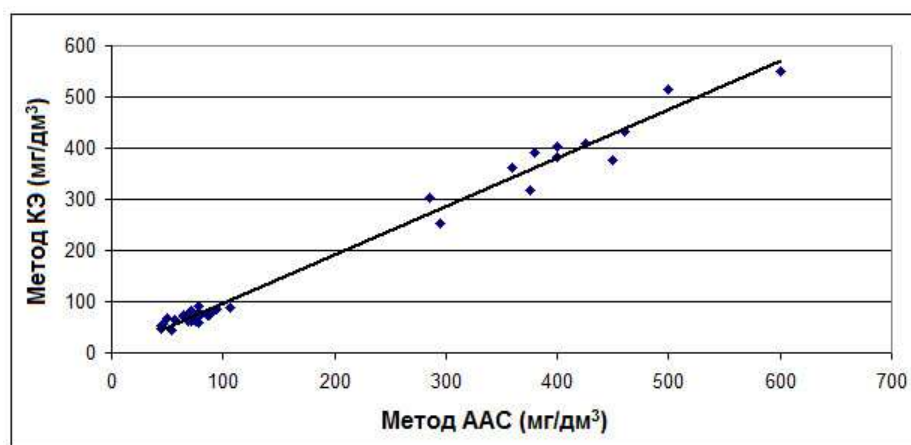


Рис. 1. Корреляционная зависимость данных определения концентрации катионов в виноматериалах методами капиллярного электрофореза и атомно-абсорбционной спектроскопии.

Разработанные методики выполнения измерений концентраций катионов [10] и анионов [11] в виноматериалах и винах методом капиллярного электрофореза прошли апробацию в испытательном центре Национального института винограда и вина («Магарач», Ялта) и могут быть использованы отраслевыми лабораториями

качества и испытательными центрами для оценки качества продукции и определения факта фальсификации виноматериалов.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. Подобраны оптимальные условия определения концентраций катионов и анионов в винах и виноматериалах, произведенных в Крымском и Одесском регионах.
2. Проведено сравнение экспериментальных данных по определению катионов в виноматериалах юга Украины методами капиллярного электрофореза и атомно-абсорбционной спектроскопии.
3. Показана хорошая воспроизводимость результатов с коэффициентом корреляции 0,986 между двумя методами.

#### **Список литературы**

1. Теория и практика виноделия. Т. 2. / Ж. Рибера-Гайон, Э. Пейно, П. Рибера-Гайон [и др.]. – М. : Пищевая промышленность, 1979. – 352 с.
2. Справочник по виноделию / [Под ред. Г.Г. Валуйко, В.Т. Косюры]. – Симферополь : Таврида, 2005. – 590 с.
3. Кишковский З.Н. Химия вина. / З.Н. Кишковский, И.М. Скурихин. – [2-е изд., перераб. и доп.]. – М. : Агропромиздат, 1988. – 254 с.
4. Минеральный состав виноградных вин – признак их аутентичности / Н.С. Аникина, Т.А. Жилякова, В.Г. Гержикова [и др.] // Магарач. Виноградарство и виноделие. – 2010. – № 1. – С. 33–34.
5. Svec F. Capillary Electrochromatography: A Rapidly Emerging Separation Method / F. Svec // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2002. – V. 76. – P. 1–47.
6. Compendium of international methods of wine and must analysis. Volume 1. / [Edition 2014]. – Paris : International Organisation Of Vine And Wine, 2013. – 497 p.
7. Об идентификации подлинности виноградных вин / Н.М. Агеева, Т.И. Гугучкина, Ю.Ф. Якуба [и др.] // *Индустрия напитков*. – 2003. – № 5. – С. 4–6.
8. Агеева Н.М. Анализ катионов металлов в винах Кубани методом капиллярного электрофореза / Н.М. Агеева, Т.И. Гугучкина, А.А. Гугучкин // *Виноград и вино России*. – 2001. – №4. – С. 47–48.
9. Исследование динамики катионного состава в виноматериалах для игристых вин, выработанных из новых сортов винограда селекции НИВиВ «Магарач» / А.С. Макаров, И.П. Лутков, Т.Р. Шалимова // *Магарач. Виноградарство и виноделие*. – 2012. – № 2. – С. 30–32.
10. Методичні вказівки МВВ масової концентрації катіонів ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ) у винах і виноматеріалах методом КЕФ. КД 00334830.083-2012. – Ялта: НІВіВ «Магарач», 2012. – 16 с.
11. Методичні вказівки МВВ масової концентрації аніонів ( $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ) у винах і виноматеріалах методом КЕФ. КД 00334830.082-2012. – Ялта : НІВіВ «Магарач», 2012. – 16 с.

**Жилякова Т.О. Визначення мінерального складу вина та виноматеріалів методом капілярного електрофорезу / Т.О. Жилякова, Н.І. Аристова, Д.О. Панов, Г.П. Зайцев // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 270-276.**

Розроблені та апробовані методики визначення масової концентрації катіонів та аніонів у винах і виноматеріалах Кримського та Одеського регіонів методом капілярного електрофорезу на приладі фірми «Agilent Technologies» (Німеччина).

**Ключові слова:** виноматеріали, вина, капілярний електрофорез, атомно-адсорбційна спектроскопія.

## DETERMINATION OF MINERAL COMPOSITION IN WINE AND WINE MATERIALS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

*Zhilyakova T.A.<sup>1</sup>, Aristova. N.I.<sup>1</sup>, Panov D.A.<sup>2</sup>, Zaitcev G.P.<sup>1</sup>*<sup>1</sup>*National Institute for Vine and Wine "Magarach", Yalta, Crimea, Ukraine;*<sup>2</sup>*Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine**E-mail: golden.heart@mail.ru*

At present alcohol market is supplied defective and sometimes falsified wine products. Inorganic anions and cations in the passing of wine from grapes are an important characteristic of the composition, and hence, the naturalness and authenticity wines. At the moment, to develop control methods is the actual tasks that allow determining the authenticity of wines and wine materials, with minimal time, consumables and labor. Existing methods for the analysis of cation-anion composition require preliminary sample preparation, which increases the cost and time of analysis. One promising noted in the literature is the method of capillary electrophoresis (CE) – method is fast, simple of sample preparation, low spending of reagents and almost unlimited service life of the capillary, which allows for a minimal production cost of analysis. According to published data, this method is widely used by scientists T.I. Guguchkina and N.M. Ageeva and others when determining the authenticity of the wines produced in the south of Russia.

The objects of investigation were samples of table wine produced from grapes Crimea and Odessa regions by capillary electrophoresis on the Agilent CE device (company by «Agilent Technologies»). During this study were adapted and optimized parameters CE-separation of cations and anions in wines and wine materials enterprises of Ukraine: capillary diameters and lengths, the range of operating voltage variation and temperature. Time of cations determination was about 5 minutes, anions – about 7 minutes.

The obtained experimental content of the cations concentration ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $NH_4^+$ ) and anions ( $SO_4^{2-}$ ,  $Cl^-$  и  $NO_3^-$ ) by EC in samples of table wines and blended wine materials from grapes Crimea and Odessa regions are consistent with the literature data, and adapted EC-separation method meets the requirements of International Organisation Of Vine And Wine (OIV). The exception is the high content of chloride ions and potassium cations in wine materials from grapes Rkatsitelli grown in Odessa region near the sea and on saline soils.

The comparison of experimental data to determine the cations in wine materials southern Ukraine by capillary electrophoresis and atomic absorption spectroscopy shows good reproducibility of results, and the correlation coefficient was 0,986.

Developed a technique of measuring mass concentrations of cations and anions in wines and wine materials by the method EC have been approbate in the test center of the National Institute for Vine and Wine "Magarach" (Yalta, Crimea, Ukraine).

**Keywords:** wine materials, wine, capillary electrophoresis, atomic absorption spectroscopy.

### Reference

1. Ribero-Gayon J., Payne E. Ribero-Gayon P., Sudre P., *Theory and practice of winemaking*, **2**, 352 p. (Food Industry, Moscow, 1979).
2. *Directory of winemaking*, ed. Valuyko G.G., Kosyura, **2**, 590 p. (Taurida, Simferopol, 2005).
3. Kishkovsky Z.N., Skurihin I.M., *Chemistry vina*, 254 p. (Agropromizdat, Moscow, 1988).
4. Anikin N.S., Zhilyakova T.A., Gerzhikova V.G., Vladimirov L.G., Semenchuk A.V., Cherkashina A.F., Sarvarova N.N., Gorbunova E.V., Mineral composition of wines – a sign of their authenticity, *Magarach. Viticulture and winemaking*, **1**, 33 (2010).
5. Svec F., Capillary Electrochromatography: A Rapidly Emerging Separation Method, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **76**, 1 (2002).
6. *Compendium of international methods of wine and must analysis*, **1**, 497 p. (International Organisation Of Vine And Wine, Paris, 2013).
7. Ageeva N.M., Guguchkina T.I., Yakub Y.F., Markowski M.G., On identifying the authenticity of wines, *Drinks Industry*, **5**, 4 (2003).
8. Ageeva N.M., Guguchkina T.I., Guguchkin A.A., Analysis of the metal cations in the Kuban wines by capillary electrophoresis, *Grapes and wine in Russia*, **4**, 47 (2001).
9. Makarov A.S., Lutkov I.P., Shalimov T.R., Zhilyakova T.A., Aristova N.I., Study of the dynamics in the cationic composition of base wines for sparkling wines produced from new varieties of grapes selection NIViV "Magarach", *Magarach. Vinogradarstvo and vinodelie*, **2**, 30 (2012).
10. *Metodichni vkazivki MBB masovoi kontsentratsii kationiv ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ) in the wines i vinomaterialah by KEF. CD 00334830.083-2012*, 16 p. (NIViV "Magarach", Yalta, 2012).
11. *Metodichni vkazivki MBB masovoi kontsentratsii anioniv ( $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$ ) in wines i vinomaterialah by KEF. CD 00334830.082-2012*, 16 p. (NIViV "Magarach", Yalta, 2012).

Поступила в редакцию 23.01.2014 г.

УДК 544.431

## ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ РЕАКЦІЇ ГІДРАЗИДУ О,О-ДИФЕНІЛТІОФОСФОРНОЇ КИСЛОТИ З ФЕНІЛІЗОТІОЦІАНАТОМ

*Іванець Л.М., Поляк О. Б., Загричук Г.Я.*

*Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського  
E-mail: Ivanets\_Lyuda@ukr.net*

На основі квантово-хімічних розрахунків вивчена зміна міжатомних відстаней та електронної густини на реакційних центрах молекул гідрозиду О,О-дифенілтіофосфорної кислоти та фенілізотіоціанату під час їх взаємодії. Запропонований стадійний механізм реакції нуклеофільного приєднання.

**Ключевые слова:** гідрозид, фенілізотіоціанат, проміжний комплекс, механізм.

### ВСТУП

Гідрозиди тіофосфорних кислот — мало досліджений, проте перспективний клас сполук. Наявність в гідрозидах кислот фосфору поряд із нуклеофільним атомом Фосфору двох нуклеофільних атомів Нітрогену обумовлює широкі синтетичні можливості цих сполук. Підвищену реакційну здатність гідрозиди проявляють до електрофільних реагентів. Так, реакції фосфоровмісних гідрозидів з ізотіоціанатами призводять до утворення фосфоровмісних тіосемікарбазидів [1].

Реакції даного типу є модельними для вивчення механізму  $A_{\text{N}}2$ -приєднання. В літературі описується механізм реакцій діарилфосфінових і О,О-діарилфосфорних кислот з фенілізотіоціанатами по аналогії з реакціями гідрозидів карбонових кислот з ізоціанатами [2, 3].

Метою наших досліджень було на основі квантово-хімічних розрахунків запропонувати імовірний механізм реакції гідрозиду О,О-дифенілтіофосфорної кислоти з фенілізотіоціанатом.

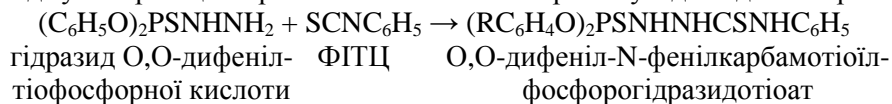
### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження була модель реакції гідрозиду О,О-дифенілтіофосфорної кислоти з фенілізотіоціанатом (ФІТЦ).

Квантово-хімічні розрахунки сполук проводились напівемпіричним методом РМ 3 шляхом повної оптимізації геометрії за допомогою програми Морас 6.0 [4].

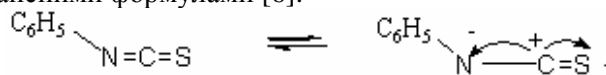
### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Досліджувана реакція перебігає кількісно і необоротно у відповідності з рівнянням:



З метою з'ясування механізму досліджуваної реакції були проведені квантово-хімічні розрахунки параметрів молекул гідразиду О,О-дифенілтіофосфорної кислоти, фенілізотіоціанату, можливого проміжного комплексу і продукту, який утворюється в результаті їх взаємодії. Квантово-хімічні розрахунки можуть використовуватися як джерело інформації про структуру і енергетику учасників реакції, які в принципі неможливо спостерігати експериментально [5].

Реакційним центром гідразиду О,О-дифенілтіофосфорної кислоти є нуклеофільний амінний атом нітрогену. Структура фенілізотіоціанату може бути представлена резонансними формулами [6]:



В ізотіоціанатів з фенільним електроноакцепторним замісником негативний заряд локалізований на атомі Нітрогену. Центральний атом Карбону NCS-групи має сильний електрофільний характер, тому він є реакційним центром в реакції нуклеофільного приєднання до гідразиду.

Враховуючи просторову будову реагентів, слід зазначити, що зближення їх реакційних центрів затруднене через великі розміри ароматичних ядер молекул. Амінний фрагмент гідразиду має тетраедричну форму (108.7°), що зумовлено  $sp^3$ -гібридизацією атома Нітрогену. Ізотіоціанатна група фенілізотіоціанату лінійна (179.5°), тому що атом Карбону знаходиться в стані  $sp$ -гібридизації. Метод квантово-хімічних розрахунків дозволяє поррахувати можливість утворення при максимальному зближенні реакційних центрів проміжного комплексу (рис. 1) і перетворення його в продукт реакції.

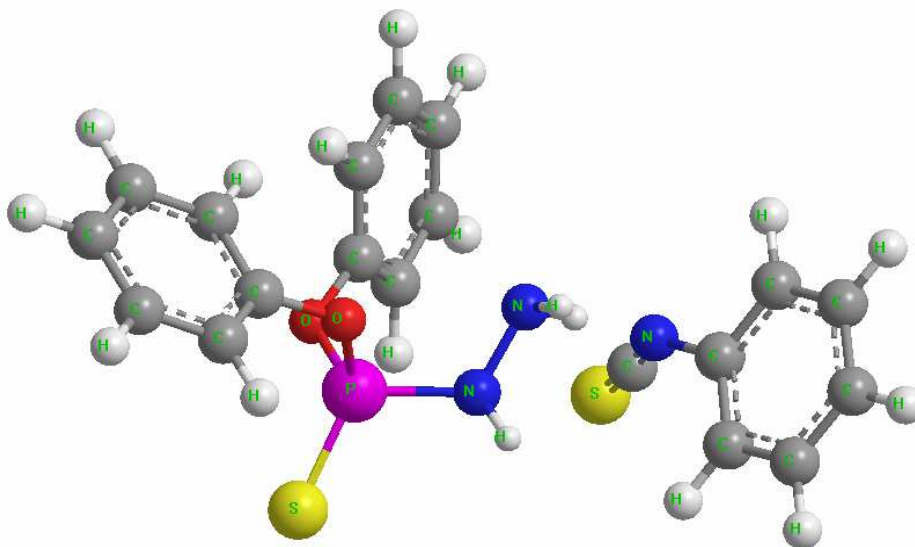


Рис. 1. Просторова модель комплексу гідразид О,О-дифенілтіофосфорної кислоти–фенілізотіоціанат.

Щоб зрозуміти, які зміни відбуваються з реагентами після зближення їх реакційних центрів, розглянемо величини електронної густини на реакційних центрах. Для спрощення на Рис. 2 зображені тільки реагуючі фрагменти молекул з зазначення електронної густини на їх атомах.

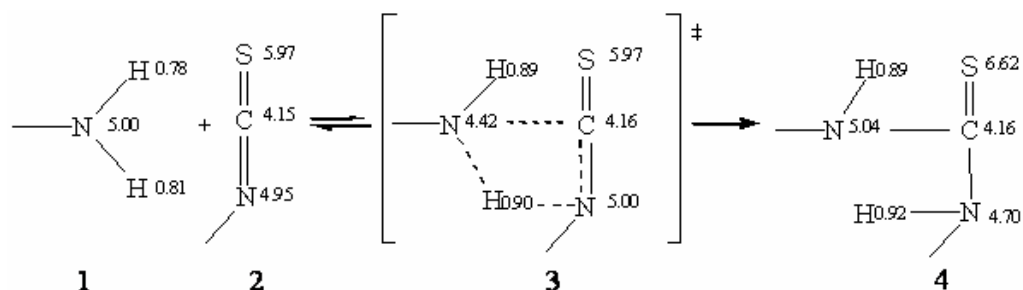


Рис. 2. Електронна густина на реакційних центрах гідрозиду О,О-дифенілтіофосфорної кислоти (1), фенілізотіоціанату (2), проміжного комплексу (3), продукту (4).

На схемі показано, що зближення молекул реагентів відбувається за рахунок електростатичної взаємодії амінного атома Нітрогену гідрозиду (1) з атомом Карбону фенілізотіоціанату (2), а також за рахунок притягання Гідрогену гідрозиду до електронегативного Нітрогену фенілізотіоціанату. Це призводить до перерозподілу електронної густини на реакційних центрах. А саме, Карбон фенілізотіоціанату бере на себе деяку частину електронної густини Нітрогену гідрозиду, в результаті чого електронна густина над ним збільшується, а над Нітрогеном відповідно зменшується (3). Зниження електронної густини на амінному Нітрогені гідрозиду послаблює міцність його зв'язку з атомами Гідрогену, і вони стають більш рухливі. Оскільки в комплексі (3) електронна густина амінного Нітрогену знизилась до 4.42, а Нітрогену ізотіоціанатної групи практично не змінилася і складає 5.00, то Гідроген гідрозиду буде сильніше притягатися саме Нітрогеном ізотіоціанатної групи, утворюючи з ним водневий зв'язок.

Відстань між атомами Нітрогену в системі  $N-H \cdots N$  комплексу (3) складає 0.330 нм. Якщо прийняти, що довжина ковалентного зв'язку  $N-H$  дорівнює 0.102 нм, то довжина зв'язку  $H \cdots N$  складе 0.228 нм. Це значно більше, ніж довжина ковалентного зв'язку між цими атомами. Тим не менше, зв'язок  $H \cdots N$  коротший, ніж сума ван-дер-ваальсівських радіусів, які дорівнюють для Гідрогену і Нітрогену відповідно 0.120 і 0.140 нм, — 0.260 нм. Ця обставина є одним із критеріїв, що вказує на утворення водневого зв'язку між молекулами [7].

В результаті електростатичної взаємодії атомів  $C$  і  $N$  і утворення водневого зв'язку  $H \cdots N$  відбувається порушення спряження в групі  $S=C=N-$  і активація електроннодонорного центру ( $N$ ) фенілізотіоціанату. Зв'язок  $C=N$  починає розриватися, а нові зв'язки  $N-C$  і  $N-H$  — утворюватися (3). За рахунок утворення зв'язку  $N-C$  електронна густина на атомі Нітрогену в продукті (4), порівняно з комплексом (3) підвищується, оскільки він відтягує електрони інших атомів.

Утворення зв'язку  $N-H$  супроводжується поступовим підвищенням електронної густини на атомі Гідрогену в міру його наближення до Нітрогену: 0.81 (1), 0.90 (3), 0.92 (4). Електронна густина на Нітрогені відповідно знижується від 5.0 (3) до 4.7 (4).

Таким чином, на основі квантово-хімічних розрахунків можна запропонувати механізм досліджуваної реакції, який полягає у взаємодії атома Нітрогену аміної групи гідразиду з атомом Карбону ізотіоціанатної групи фенілізотіоціанату і утворенні 4-членного циклічного передреакційного комплексу. Утворення в комплексі нового зв'язку  $C-N$  і розрив кратного зв'язку  $N=C$  в молекулі фенілізотіоціанату роблять можливим перенос протону від аміної групи гідразиду до ізотіоціанатної групи, що завершує процес утворення похідного тіосемікарбазиду.

Порівняємо наші припущення з викладеними в роботі [6], присвяченій вивченню механізму подібної реакції – акридин-9-ілметиламіну з фенілізотіоціанатом (з використанням квантово-хімічного методу *ab initio*). Автор пропонує синхронний та стадійний механізми реакції. Згідно з синхронним механізмом, реакція відбувається через утворення одного перехідного стану, а утворення зв'язків  $C-N$  і  $N-H$  відбувається одночасно. За стадійним механізмом, в першій стадії нуклеофільний аміний нітроген атакує карбон з частковим позитивним зарядом групи  $NCS$ , і через перший перехідний стан утворюється йонний інтермедіат. Він володіє порівняно високою енергією і тому стабілізується шляхом перенесення протону через другий перехідний стан, який перетворюється в продукт реакції. Спроби виявити перехідний стан для синхронного механізму виявилися невдалими. На користь стадійного механізму свідчить те, що на поверхні потенційної енергії були знайдені відповідні стаціонарні і проміжні стани. Утворення зв'язку  $C-N$  є швидкістю лімітуючою стадією.

Результати наших квантово-хімічних розрахунків та експериментальних досліджень [8] не суперечать описаному вище механізму аналогічної реакції. Перенесення протону від аміної групи гідразиду до нітрогену фенілізотіоціанату відбувається після взаємодії реакційних центрів –  $C$  і  $N$  (очевидно, виявлений нами комплекс є інтермедіатом першої стадії).

## ВИСНОВКИ

1. Проведені квантово-хімічні розрахунки параметрів молекул гідразиду  $O,O$ -дифенілтіофосфорної кислоти і фенілізотіоціанату, можливого проміжного комплексу і продукту реакції.
2. Запропонований механізм реакції нуклеофільного присднання. Реакція відбувається через стадію проміжного комплексу. Процес завершується розривом зв'язків  $N-H$  гідразиду і  $C=N$  фенілізотіоціанату та утворенням зв'язків  $C-N$  і  $N-H$  у продукті.



## Список літератури

1. Овруцкий В.М. Гидразиды кислот фосфора / В.М. Овруцкий, Л.Д. Проценко // Успехи химии. – 1986. – Т. 40. – Вып. 4. – С. 652–678.
2. Греков А.П. Физическая химия гидразина / А.П. Греков, В.Я. Веселов. – Киев: Наук. думка, 1979. – 264 с.
3. Зеленин К.Н. Гидразин / К.Н. Зеленин // Соросовский Образовательный Журнал. – 1998. – № 5. – С. 59–65.
4. Stewart J.J. Optimization of parameters for semiempirical methods IV: extension of MNDO, AM 1, and PM 3 to more main group elements / J.J. Stewart // J. Comput. Chem., 1989. – V. 10. – №2. – P. 209.
5. Минкин В.И. Квантовая химия органических соединений. Механизмы реакций / В.И. Минкин, Б.Я. Симкин, Р.М. Миняев – М.: Химия, 1986. – 181 с.
6. Stanislav I. Elucidation of Chemical Phenomena by Means of Computational Chemistry: Diss. zur Doctors der Philosophie: 72724 / Ivan Stanislav – Basel, 2005. – 144 p.
7. Москва В.В. Водородная связь в органической химии / В.В. Москва // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 2. – С. 58–64.
8. Янчук М.І., Іванець Л.М. Кінетика реакцій гідрозидів О,О-діарилтіофосфорних кислот з фенілізотиоціанатом в бензолі / М.І. Янчук, Л.М. Іванець // „Наукові записки” Тернопільського державного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Хімія. – 2003. – № 7. – С. 42–44.

**Іванець Л.Н.** Исследование механизма реакции гидразида О,О-дифенилтиофосфорной кислоты с фенилизотиоцианатом / Л.Н. Иванец, О.Б. Поляк, Г.Я. Загричук // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С.277-282.

На основании квантово-химических расчетов изучено изменение межатомных расстояний и электронной плотности на реакционных центрах молекул гидразида О,О-дифенилтиофосфорной кислоты и фенилизотиоцианата во время их взаимодействия. Предложен стадийный механизм реакции нуклеофильного присоединения.

**Ключевые слова:** гидразид, фенилизотиоцианат, промежуточный комплекс, механизм.

**THE INVESTIGATION OF MECHANISM OF THE REACTION HYDRAZIDE  
O,O-DIPHENYLTHIOPHOSPHORIC ACID WITH  
PHENYLISOTHIOCYANATE**

*Ivanets L.M., Polyak O.B., Zagrichuk G.Ya.*

*I.Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University, Ternopil, Ukraine  
E-mail: Ivanets\_Lyuda@ukr.net*

Reaction between hydrazide O,O-diphenylthiophosphoric acids and phenylisothiocyanate is a model for investigation of  $A_N2$ -addition mechanism. Reaction centers are nucleophilic amine Nitrogen of hydrazide and electrophilic Carbon NCS-group of phenylisothiocyanate.

For the purpose mechanism of the studied reaction were carried out quantum-chemical calculations of the parameters of reactants, possible intermediate complex and product.

The change of the interatomic distances and the electronic density on the reactionary centers of interaction molecules was studied.

The stepwise reaction mechanism of nucleophilic addition is offered.

During the convergence of reactionary centers the electronic density on phenylisothiocyanate's Carbon increases and on hydrazide's amine Nitrogen decreases. The amine bond  $N-H$  weakens, the bond  $N=C$  in phenylisothiocyanate is broken. The 4-member cyclic intermediate complex with new bond  $C-N$  is formed. Interatomic distances in the complex indicate the formation of hydrogen bond  $H \cdots N$ . After that the Proton transfers from the amine group of hydrazide to phenylisothiocyanate's Nitrogen. This completes the formation of the thiosemicarbazide's derivative.

**Keywords:** hydrazide, phenylisothiocyanate, intermediate complex, mechanism.

### References

1. Ovruckij V.M., Procenko L.D. Hydrazides of phosphoric acids, *Russian Chemical Reviews*, **40** (4), 652 (1986).
2. Grekov A.P., Veselov V.Ja. *Fizicheskaja himija gidrazina*, 264 (Naukova dumka, Kiev, 1979).
3. Zelenin K.N. Gidrazin, *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*, **5**, 59 (1998).
4. Stewart J.J. Optimization of parameters for semiempirical methods IV: extension of MNDO, AM 1, and PM 3 to more main group elements, *J. Comput. Chem.*, **10** (2), 209 (1989).
5. Minkin V.I., Simkin B.Ya., Minjaev R.M. *Kvantovaja himija organicheskikh veshhestv. Mehanizmy reakcij*, 181 (Himija, Moskva, 1986).
6. Stanislav I. Elucidation of Chemical Phenomena by Means of Computational Chemistry. Dr. chem. sci. diss. Basel; 2005 (in German).
7. Moskva V.V. Vodorodnaja svjaz' v organicheskoi himii, *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*, **2**, 58 (1999).
8. Janchuk M.I., Ivanec' L.M. Kinytyka reakcij gidrazydiv O,O-diaryltiofosfornyh kyslot z fenilizotiocianatom v benzoli, „Naukovi zapysky” Ternopil's'kogo derzhavnogo pedagogichnogo universytetu im. Volodymyra Gnatjuka. Serija: Himija, **7**, 42 (2003).

Поступила в редакцию 08.02.2014 г.

**UDK 544-43+547.2/9**

## HYDROXIDE CLAYS AS SOLID BASE CATALYSTS

*Kapustina E.V.<sup>1</sup>, Kozlovskiy R.A.<sup>2</sup>, Kapustin A.E.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Priazivskiy State Technical University, Mariupol, Ukraine*

<sup>2</sup>*Russian Chemical-Technological University, Moscow, Russia*

*E-mail: kapustin\_a\_e@pstu.edu*

Heterogeneous base catalysts of a new type have been described. The features of organic syntheses carried out in the presence of clay catalysts are considered. Kinetic equations are obtained and the mechanisms of oxyethylation and aldol condensation are discussed.

**Keywords:** layered double hydroxide clays, base catalysts.

### INTRODUCTION

There are a large number of important chemical processes, which are homogeneously catalysed, in particular polymerisation, oligomerisation, alkylation, hydrogenation and dehydrogenation, oxidation etc. At the same time, catalysts, with proven basic catalytic sites, capable to display the base properties in a wide range of  $pK_a$ , insoluble in the reaction mixture, stable to effects of temperature and substrates, are hardly known. The existing base catalysts [1], such as alkali and alkali-earth metals, their oxides and hydroxides and anion-exchange resins, are thermally and chemically unstable compounds and materials.

The search for heterogeneous base catalysts should be carried out among the substances of inorganic nature, especially, among inorganic anion exchangers [2]. To solve this problem there is the need to:

- understand the main reasons of occurrence of base-catalytic properties of solids
- investigate the parameters that influence basicity and activity of heterogeneous catalysts,
- develop the methods of control of concentration, strength and type of catalytic sites
- develop the methods of control of structure for creation of highly selective catalysts
- investigate the catalytic activity and selectivity in several organic reactions.

### MATERIALS AND METHODS

Layered double hydroxide clays were selected as heterogeneous base catalysts in this work. The methods of catalyst preparation are described in a previous paper [2]. Alcohol oxyethylation and aldol condensation of acetone were investigated as model reactions.

All reagents were classified as "pure for analysis" and all solvents were distilled before use. Glass reactors equipped with a device for temperature control and stirrer were used. The acetone aldol condensation reaction was investigated by determining the remaining acetone concentration.

The oxyalkylation reactions were investigated using a manometric installation [3], enabling to determine the ethylene oxide concentration in the liquid phase by measuring its partial pressure in the gas phase. For all reactions it was initially determined, that the rate of reaction does not depend on the stirrer speed, which says that the reactions are not diffusion-limited.

After execution of experiments the reaction products were analysed by gas chromatography using on internal standard.

The reaction of ethylene oxide with alcohols can proceed in the presence of acidic as well as of basic catalysis; the main distinction is in the quantitative distribution of reaction products. In the presence of base catalysts the reaction rate grows with increase in molecular weight of product, and the molecular mass distribution of products becomes broad. Oxyethylation reactions with homogeneous base catalysts have been well investigated, researches of heterogeneous base catalysts on the other hand started with our works [3–5].

The kinetic experiments of aldol condensation of acetone were conducted in a glass reactor equipped with stirring device and water bath for heating. The catalyst and acetone were loaded in the reactor, and after execution of the reaction the quantity of acetone and the conversion were determined. From literature it is known, that in the given conditions the main product of reaction is diacetone alcohol. Besides we observed dehydration.

The layered hydroxides of Mg-Al, Zn-Cr, as well as the products of their thermal processing at temperatures up to 600 °C were investigated as catalysts.

Determination of basic properties of layered double hydroxides was carried out using procedures reported previously [6]. About 0,1 g of catalyst was put in a closed measuring flask filled with nitrogen gas. A benzene and the corresponding indicator were added at once. The indicator adsorption rate on the surface of catalyst depends on the basicity of catalysts. Carrying out the titration with indicators of different pKa we obtained the strength distribution of basic sites of the catalysts (Mg-Al: pK<sub>a</sub>=7,2–0,92; pK<sub>a</sub>=9,3–0,30; pK<sub>a</sub>=12,2–0,01 mmol/g; Zn-Cr: pK<sub>a</sub>=7,2–0,72; pK<sub>a</sub>=9,3–0,27; pK<sub>a</sub>=12,2–0,05 mmol/g).

## RESULTS AND DISCUSSION

The basic properties of the hydroxides are listed in Table 1.

**Table 1**

### The concentration of Bronsted basic sites (12,2 < H<sub>0</sub> < 17,2)

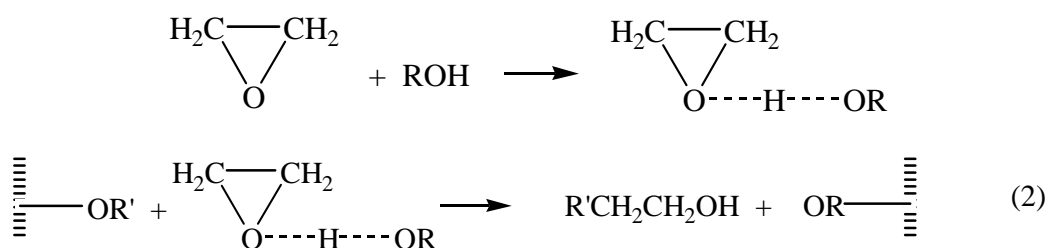
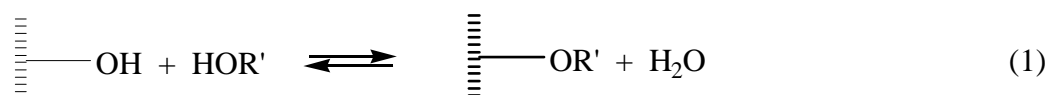
T, °C	100	200	300	400	500	600
Mg <sub>2</sub> -Al	0,95	0,55	0,31	0,08	0,04	–
Zn <sub>2</sub> -Cr	0,75	0,45	0,30	0,13	0,03	-
Mg <sub>2</sub> -Al	-	0,15	0,19	0,17	0,17	0,10
Zn <sub>2</sub> -Cr	-	0,01	0,14	0,22	0,20	0,12

As the alcohol oxyethylation can proceed in the presence of basic as well as acidic catalysts, it is necessary to deactivate the acid sites. The quantity of acid active sites could be determined by the reduction of activity of catalysts after the addition of alkali. The increase in rate of reaction after the addition of more than superstoichiometric quantities of poison shows their total elimination [6]. If the layered double hydroxide had Bronsted base sites in the hydroxide form then anion exchange (1) was observed initially.

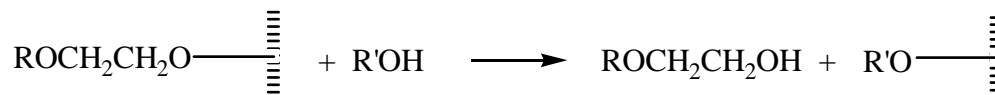
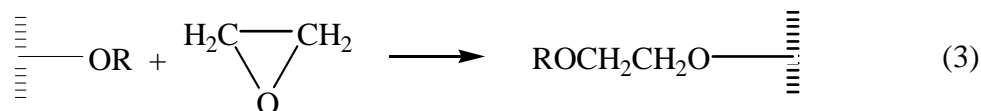
The initial dependence of the oxyethylation reaction rate on the initial ethylene oxide concentration was directly proportional in all cases thus the concentration order in ethylene oxide was equal to 1 in all cases. The dependence of the reaction rate on the current ethylene oxide concentration, especially for high molecular weight alcohols was initially not directly proportional, that is, the temporary order in ethylene oxide was more than 1. There was an increase of the rate constant and the reaction rate was determined by a differential method initially [7].

To explain this fact we assume that the internal space of clays increases by penetration of organic molecules (bulky hydrocarbon radicals), which is indirectly confirmed by the increase of efficiency of layered double hydroxide clays in oxyethylation reactions after a heat treatment in the reactant alcohol. (However, these deviations from first order are insignificant and in oxyethylation process in surplus of alcohol during 1–2 hours may be neglected). The increase of reaction rate with increasing reaction time depends on two processes – the purely catalytic reaction and the process of thickening of hydroxide layers. With increase of temperature larger deviation from first order should not be expected, as these processes have different temperature sensitivity – the enthalpy of clay reconstruction is about  $\Delta H=2$  kcal/mol and the activation energy of the oxyethylation reaction is about 20 kcal/mol.

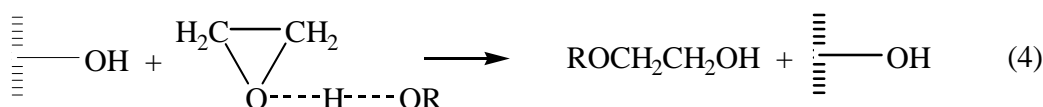
One-parametrical kinetic experiments have shown that the reactions are first concentration order in the layered double hydroxide clay and the two reactants. The following mechanism is assumed:



The interaction of the alcohol reactant with ethylene oxide proceeds through a threemolecular transition state. In the first stage the ethylene oxide ring is activated by formation of hydrogen bonding. The activated C---O bond is opened by nucleophilic attack of the surface alkoxide OR'. Similarly a two-step mechanism can be envisaged:



Equilibrium (1) is defined by the concentration of the alcohol and its acidity. As all alcohols, except methanol, are less acidic than water, reaction according to equation (4) can occur:



From experiments at various temperatures it was established, that the reaction proceeds in the kinetic area and the activation parameters of reaction (Table 2) were determined.

**Table 2**

**Kinetics of alcohol oxyethylation reaction in the presence of Zn-Cr-hydroxide clay as the catalyst at 100 °C**

Alcohol	$k \cdot 10^4 \text{ m}^6/\text{mol}^2 \cdot \text{s}$	$\ln A$	$E, \text{ kJ/mol}$
1-Heptanol	1,71	25,0	96
1-Dodekanol	2,14	16,3	77,3
n-C <sub>17-20</sub> OH	1,06		
i-C <sub>17-20</sub> OH	1,29		

Deceleration of the oxyethylation reaction, connected with deactivation or blocking of sites, was not found, showing about high efficiency of catalysts.

An interesting observation was made when using the calcined products of Zn-Cr-hydroxide clay as catalysts. Depending on the heat treatment all calcined samples has different colouring (red-green-yellow-brown). They all display catalytic activity in oxyethylation reactions, though with increase in calcination temperature the activity decreases. During the process there is change of catalysts colour (the colour changes from colour of catalyst, treated at high temperature, to colour of catalyst with low temperature of activation) and some increase of activity in the course of the reaction takes place. Obviously restoration of hydrotalcite-like structure occurs. Similar observations were made upon addition of stoichiometric amounts of water to the reaction mixture. When calcined at 500 °C Mg-Al-hydroxide clay catalyst showed good activity in reactions of polymerising 2–10 moles of ethylene oxide onto C<sub>4</sub>–C<sub>18</sub> alcohols [8]. Upon increasing calcining time of the catalyst more reaction time was required to achieve the appropriate conversion.

**HYDROXIDE CLAYS AS SOLID BASE CATALYSTS**

Table 3 lists the value of rate constants, obtained on the basis of the initial concentration of reactants and clays [8].

**Table 3**  
**The effective rate constants of oxyethylation of different alcohols at 180<sup>o</sup> C**  
**(Mg-Al-hydroxide clay)**

A L C O H O L S	Calc. time, h	k 10 <sup>4</sup> , m <sup>6</sup> /mol <sup>2</sup> min
1-Dodecanol + 6 EO	8	1,64
1-Dodecanol + 6 EO	4	1,74
1-Dodecanol + EO	4	2,15
1-Dodecanol and 1-tetradecanol mixture + 2 EO	8	1,95
1-Dodecanol and 1-tetradecanol mixture + 2 EO	4	2,96
1-Octanol + 4 EO	8	0,55
1-Octadecanol + 4,6 EO	8	2,35
Secondary octadecanol + 2 EO	4	14,3
Cyclohexanol + 4 EO	4	3,6
1- Butanol + 10 EO + 10 PO	4	12,2

Clays were calcined at 500 °C. EO - ethylene oxide, PO - propylene oxide.

When increasing the treatment temperature of Mg-Al-hydroxide clay catalyst the effective rate constant of oxyethylation of 1-heptanol decreases (Table 4).

**Table 4**  
**The effect of the calcination temperature of Mg-Al-hydroxide in the oxyethylation of**  
**1-heptanol at 100 °C**

Calcination temperature, °C	110	250	400	600
k 10 <sup>4</sup> s, m <sup>6</sup> /kmol <sup>2</sup>	1,5	0,8	0,3	–

The given course of change of the reaction rate can be explained by the change of Bronsted and Lewis active sites upon thermal processing of clay. A comparison of effective rate constant permits to discuss participation of Lewis, as well as Bronsted sites. For all investigated base hydroxide clays the alcohol oxyethylation reaction is described by the kinetic equation:

$$R = -dC_{ed}/dt = k \cdot C_{eo} \cdot C_{alc} \cdot C_{clay} \quad (I)$$

Table 5 shows the rate constants of the third order of oxyethylation reactions catalysed by two base hydroxide clays.

Table 5

**Oxyethylation of alcohols over heterogeneous base clays (100 °C)**

Catalyst	<i>E, kJ/mol</i>	ln A	k, m <sup>6</sup> /kmol <sup>2</sup> ·s
Zn <sub>2</sub> - Cr	96	25,0	0,17·10 <sup>-3</sup>
Mg <sub>2</sub> - Al	95	22,0	0,15·10 <sup>-3</sup>

The aldol condensation of carbonyl compounds, acetone in particular, can serve as another model reaction when studying the base catalytic processes. Here larger molecular weight products are formed, which enables to monitor the course of reaction by the quantity of remaining reagents.

The aldol condensation of acetone was investigated using calcined layered double hydroxide clays as catalysts [10–14], i.e. Mg-Al, Cr-Zn, Ni-Al hydroxides. Before the reactions clays were subjected to heat treatment at 450 °C for 18 h. Such heat treatment results in the total dehydration of the clay and the disappearance of the hydroxide layer.

The clay basicity depends on the cation ratio in the oxide layer, and it is expected that the degree of the isomorphous replacement have a significant influence on the catalytic activity (Table 6).

Table 6

**The influence of the cation ratio in hydroxide clays on catalytic activity in acetone condensation**

Mg(II)/Al(III)	1,33	1,39	2,24	2,27	3,04	6,27
Conversion, %	21,0	37,5	24,6	15,0	22,5	24,2

The size of the initial anion also influences the catalytic activity (Table 7). The clay catalysts exhibit a "memory" effect about their precursor.

Table 7

**The dependence of activity of Zn-Cr-oxide catalyst on the size of the dicarboxylate in the initial hydroxide**

ANION	Conversion of acetone, %
Adipate	29,1
Decadecarboxylate	44,7
Dodecadecarboxylate	55,5

The dicarboxylates in base heterogeneous clay catalysts connect the hydroxide layers, in a perpendicular position, and increase the availability of active centres. It may be noticed that the specific surface of catalyst hardly depends on the structure of the anion. The change of the clay's specific surface, varying with the temperature of heat treatment, does not explain the changes in activity. It is assumed that the number of base sites (Bronsted and Lewis) depends on the processing temperature. The change of effective rate constant of the acetone condensation [12], in relation to the weight of the clay catalyst, is listed in table 8 [7, 17]) together with the concentration of base sites.



Table 8

The dependence of effective rate constant ( $k_{\text{eff}}$ ) on loss of Zn-Cr-hydroxide clay catalyst weight ( $dm$ , %).  $W$  – reaction rate (relat. un.),  $C$  – concentration of base sites ( $\text{kmol/m}^3$ )

$t_{\text{calc}}$ $^{\circ}\text{C}$	$W$	$dm$	$k_{\text{eff}}$	$C$
250	0,70	0,12	0,79	0,14
300	0,85	0,17	0,97	0,17
400	0,90	0,25	1,20	0,21
450	0,70	0,31	1,10	0,20
600	0,56	0,43	0,93	0,12

Calcinated layered double hydroxide clays (oxide catalysts) are subject to deactivation in aldol condensation reactions. The liberated water sorbs on to the high basicity sites upon dehydration of diacetone alcohol. The kinetic equation of the acetone condensation is as follows:

$$R = -dC_{ac}/dt = k \cdot C_{ac} \cdot C_{clay} \quad (II)$$

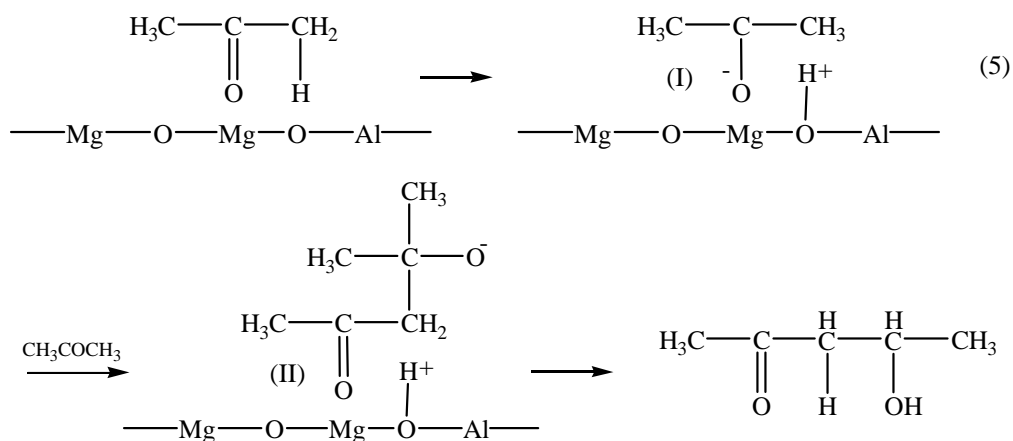
The experiments at various temperatures afforded the activation parameters of the acetone condensation (Table 9).

Table 9

The activation parameters of aldol condensation reaction for layered double hydroxide clays ( $50^{\circ}\text{C}$ )

Catalyst	$E$ , kJ/mol	$\ln A$	$k$ , $\text{m}^6/\text{kmol}^2 \cdot \text{s}$
Zn <sub>2</sub> -Cr	$19,2 \pm 2,4$	$27 \pm 3$	0,16
Mg <sub>2</sub> -Al	$18 \pm 2$	$25,6 \pm 0,7$	0,21

The role of the base sites consists in the formation of the carbanion, which subsequently attacks the carbonyl group of a second acetone molecule to form the dimeric anion (II).



The rate constants for various clays are close and it is interesting to compare them with similar rate constants for the aldol condensation of acetone, proceeding in the presence of some other base heterogeneous catalysts (Table 10). Comparison of the results shows a greater value of the rate constants for the homogeneous process. However because the concentration of active sites in the heterogeneous process is considerably higher, the estimated reaction rate is approximately the same for both processes.

**Table 10**

**The significance of effective rate constants of aldol condensation reaction**  
( $\text{m}^6/\text{kmol}^2 \cdot \text{s}, 50^\circ\text{C}$ )

Catalyst	T, °C	Reactor	k	Reference
MgO	0	Tubular	5,3	[15]
Ba(OH) <sub>2</sub>	100	Mixture	1,3	[16]
MgO-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	300	Tubular	4,6	[9]

### CONCLUSIONS

1. It has been shown the changes of the accessibility of basic sites of the catalysts due to the ion exchange process.
2. The interaction of the alcohol with ethylene oxide proceeds through a threemolecular transition state and activated C---O bond is opened by nucleophilic attack of the surface alkoxide.
3. At the aldol condensation the formation of the carbanion take place, which subsequently attacks the carbonyl group of a second acetone molecule to form the dimeric anion.
4. The correlation between the activity and selectivity of catalysts with a temperature of heat treatment has been shown. It has been found that the presence of moderate strength sites on the surface of catalyst is more important than the presence of strong Lewis sites.

### References

1. Tanabe K., *Catalysis by solid bases and related subjects*. 256 p. (Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1985).
2. Kapustin A.E., Inorganic anion-exchangers, *Successes of Chemistry*, **60**, 1398 (1991).
3. Shvets V.F., Kapustin A.E., Makarov M.G., Reaction ability of compounds with mobile hydrogen atom at interaction with ethylene oxide, *Petrochemistry*, **24**, 68 (1984).
4. Kapustin A.E., Shvets V.F., Makarov M.G., Alcohol oxyethylation in the presence of bentonite, *Petrochemistry*, **26**, 267 (1986).
5. Kapustin A.E., Heterogeneous catalysts for oxyethylation reaction. Ph. D. Thesis Moscow chemical-technological institute, 1984.
6. Staroverov D.V., Kapustin A.E., 1987. The influence of catalyst acidity on the process of alcohol oxyethylation. *Catalysis and catalysts*, **25**, 78 (1987).
7. Kapustin A.E., The catalytic activity of pyroaurite and the nature of basic sites, *J. Phys. Chem.*, **43**, 1465 (1989).
8. Bahler A., Endres H., Verwendung von calcinierten Hydrotalciten als Katalysatoren für die Ethoxylierung bzw Propoxylierung. *Pat. 3843713* Germany, (1989).

9. Reichle W.T., Catalysts for aldol condensation. *Pat.* 4458026 USA, 1984.
10. Reichle W.T., Anionic clay minerals. *Chemtech.* **16**, 58 (1986).
11. Reichle W.T., Kang S.Y., Everhardt D.S., The nature of the thermal decomposition of a catalytically active anionic clay mineral. *J. Catal.*, **101**, 352 (1986).
12. Reichle W.T., Catalytic reactions by anionic clay minerals. *J. Catal.*, **94**, 547 (1985).
13. Koteswara Rao K., Figueras F., Aldol condensations by novel Mg-Al-O-t-Bu hydrotalcite. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 3555 (1998).
14. Figueras F., Basic properties of the mixed oxides obtained by thermal decomposition of hydrotalcites containing different metallic compositions. *J. Catal.*, **173**, 370 (2000).
15. Zhang G., Hattori H., Tanabe K., Aldol addition of acetone, catalysed by solid base catalysts. *Appl. Catal.*, **36**, 189 (1988).
16. Barrios J., Marinas J.M., Sinisterra J.V., Ba(OH)<sub>2</sub> as the catalyst in organic reactions. VI. Influence of catalyst structure and basicity in the aldol condensation. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **95**, 107 (1986).
17. Dyer A., Kozlovsky R., Kapustin A. General principles for Basic Heterogeneous Catalysts Creation. *International Symposium on Acid-Base catalysis IV (ABC-IV)*, (2001).

**Капустина Е.В. Гидроксидные глины в качестве основных катализаторов / Е.В. Капустина, Р.А. Козловский, А.Е. Капустин // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С.283-291.**

Описаны основные гетерогенные катализаторы нового типа. Изучены особенности протекания процессов органического синтеза в присутствии глинистых катализаторов. Получены кинетические уравнения реакций оксиприлирования и альдольной конденсации, обсуждены механизмы протекающих реакций.

**Ключевые слова:** слоистые двойные гидроксидные глины, основные катализаторы.

**Капустіна О.В. Гидроксидні глини як основні каталізатори / О.В. Капустіна, Р.О. Козловський, О.Є. Капустін // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 283-291.**

Описані основні гетерогенні каталізатори нового типу. Вивчені особливості протікання процесів органічного синтезу у присутності глинистих каталізаторів. Отримані кінетичні рівняння реакцій оксиприливання і альдольної конденсації, обговорені механізми протікаючих реакцій.

**Ключові слова:** шаруваті подвійні гидроксидные глины, основні каталізатори.

*Поступила в редакцію 21.01.2014 г.*

**УДК 541.64:547.466**

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ С L-ЦИСТЕИНОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ**

*Панова Э.П., Османова А.А.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: mendes@inbox.ru*

Потенциометрическим методом изучено взаимодействие селенита натрия с L-цистеином в кислых, нейтральных и щелочных растворах. Установлено, что в области существования цистеина в виде цвиттер-иона (рН=3–7) происходит восстановление селена при мольном соотношении цистеин–селенит, равном 4:1. Спектрофотометрическим методом определен максимум поглощения наноразмерного селена – 250 нм.

**Ключевые слова:** цистеин, цистин, цвиттер-ион, селенит натрия, потенциометрия и спектрофотометрия.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Селен и его соединения играют решающую роль в физиологических процессах, и изменение их содержания оказывает прямое влияние на здоровье человека, приводя к развитию ряда заболеваний. Селен обладает очень сильным антиканцерогенным действием, причем не только предотвращает, но и приостанавливает развитие злокачественных опухолей [1]. В настоящее время существует несколько форм препарата селена – селенит и селенат натрия, синтетический селенометионин, селеноцистеин и другие. Нынешняя фармакология отдает предпочтение препаратам, в которых данный микроэлемент находится в виде соединений с органическими реагентами, так как их биологическая активность на порядок выше. Несмотря на это, неорганические формы селена легче выводятся из организма и их потребление в рекомендуемых дозах менее опасно. При очень низких концентрациях селена в воде его частицы адсорбируют атигены и антитела [2, 3]. Наиболее перспективным является применение наноселена с размером частиц менее 40 нм. Основное преимущество наноселена по сравнению с другими формами – меньшая токсичность, что позволяет применять его в дозах, превышающих суточную потребность. Поэтому поиски методов получения наноселена являются актуальными [4, 5].

Одним из методов получения наноселена является восстановление селенита натрия или селенистой кислоты аскорбиновой кислотой при рН=3,3 в водной среде [6]. Методом амперометрического титрования было исследовано взаимодействие соединений селена(IV) с тиомочевинной и аллилтиомочевинной. Показано, что в сернокислой и солянокислой средах образуется аморфный селен [7]. В ряде работ в качестве восстановителей соединений селена(IV) использовали серосодержащую

аминокислоту – цистеин. В 2,5 М растворе серной кислоты при взаимодействии селенита натрия образуется растворимый бесцветный комплекс селена(II) –  $\text{Se}(\text{Cys})_2$  [8]. Панкратовым А.Н. [9] было рассмотрено взаимодействие селенистой и селеновой кислот с цистеином методом функционала плотности. В ходе расчетов выяснилось, что в системе цистеин–селенистая и цистеин–селеновая кислоты образуются по четыре комплекса с участием карбоксильной группы цистеина. При комплексобразовании не блокируется тиольная группа аминокислоты, служащая реакционным центром биохимически важных процессов замещения атомов серы на селен [9]. В работе Qian Li [10] был рассмотрен синтез наночастиц селена для малых концентраций селенита натрия с цистеином. Аминокислоту использовали в качестве восстановителя и модификатора поверхности. Монодисперсные и однородные сферические наночастицы селена со средним диаметром 100 нм были синтезированы при отношении цистеина и селенита натрия 4:1 [10].

Таким образом, в литературе рассмотрено получение элементарного селена преимущественно в кислых средах. Целью данной работы было изучение взаимодействия селенита натрия с цистеином потенциометрическим методом при различных значениях рН.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы селенит натрия (х.ч.) и L-цистеин производства «Synex Pharma». Селенит натрия – белый кристаллический порошок, хорошо растворим в воде. Водные растворы бесцветны, прозрачны, малоустойчивы, не выдерживают кипячение. L-цистеин – белый порошок со слабым специфическим запахом, растворим в воде. Растворы нестойкие, окисляются кислородом воздуха с выпадением осадка (цистин). Растворы вышеуказанных веществ пригодны для работы в день приготовления. Для достижения необходимого рН использовали 0,1 М раствор серной кислоты и 0,04 М раствор едкого натра.

Исследование проводили на универсальном иономере ЭВ-74 с платиновым индикаторным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения. Спектры поглощения растворов селенита натрия и цистеина, взятых в отношении 1:2, 1:4, 1:8, получены на спектрофотометре СФ-46 в кварцевых кюветах ( $l=1$  см) при температуре 23 °С в интервале длин волн 200–700 нм. Для установления количественного соотношения при взаимодействии селенита натрия с цистеином был использован метод изомольных серий (метод Остромысленского–Жоба) [11]. Для составления серий использовали  $5 \cdot 10^{-3}$  М водные растворы, которые смешивали и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, при постоянном перемешивании. В полученных растворах измеряли потенциал платинового электрода на иономере ЭВ-74.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерной особенностью цистеина является наличие в его молекуле реакционноспособной сульфгидрильной группы (–SH). При определенных условиях цистеин легко отдает водород и тогда две молекулы образуют через дисульфидную группу (–S–S–) аминокислоту цистин. Цистеин и цистин легко превращаются друг в

друга, и этот переход представляет собой окислительно-восстановительный процесс. В тоже время селенит-ион легко восстанавливается до элементарного селена [12]. Поэтому для изучения взаимодействия селенита натрия с цистеином при различных значениях pH нами был выбран потенциометрический метод анализа. Он позволяет проводить титрование в окрашенных и мутных средах, достигая достаточной точности при определении конечной точки титрования.

Экспериментально было установлено, что наиболее четкое изменение потенциала индикаторного электрода наблюдается на платиновом электроде. В процессе титрования цистеина селенитом натрия в сернокислой среде при  $\text{pH} < 2,0$  образуется бесцветный растворимый комплекс Se–дисульфида (Cys–Se–Cys). При увеличении  $\text{pH} > 3,0$  наблюдается частичное образование красно-оранжевого осадка селена, а для малых концентраций (меньше  $5 \cdot 10^{-3}$  М) – образование коллоидного селена с диаметром частиц до 100 нм. Полное восстановление селена из селенита натрия происходит в области существования цистеина в виде цвиттер-иона ( $\text{pH}=5,0-5,2$ ).

На рис. 1 представлены кривые титрования раствора цистеина (0,04 М) селенитом натрия (0,02 М) при  $\text{pH}=5,1$ . При титровании различных количеств цистеина (0,005–0,100 моль/л) на кривой титрования наблюдается один скачок, соответствующий отношению цистеин–селенит, равному 4:1. При увеличении  $\text{pH} > 6,0$  вновь происходит неполное восстановление селенит-иона и раствор становится бесцветным. Следует отметить, что полученные данные вполне согласуются с диаграммой распределения ионных форм цистеина при различных значениях pH [13]. Таким образом, образование наноразмерного селена происходит в интервале  $\text{pH}=3,0-7,0$ , а именно в области существования цистеина в цвиттер-иона ( $\text{pK}_i=5\pm 2$ ) [12].

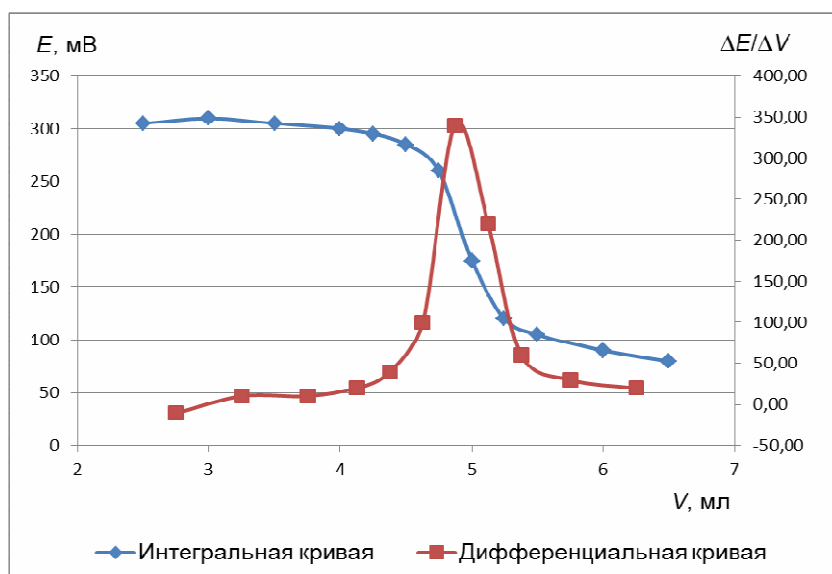


Рис. 1. Кривые потенциометрического титрования цистеина ( $C=0,04$  М,  $V=10$  мл) селенитом натрия (0,02 М).

Из рис. 2 видно, что при отношении цистеина и селенита, равном 4:1, наблюдается максимум поглощения при  $\lambda=250$  нм, что соответствует образованию наноселена.

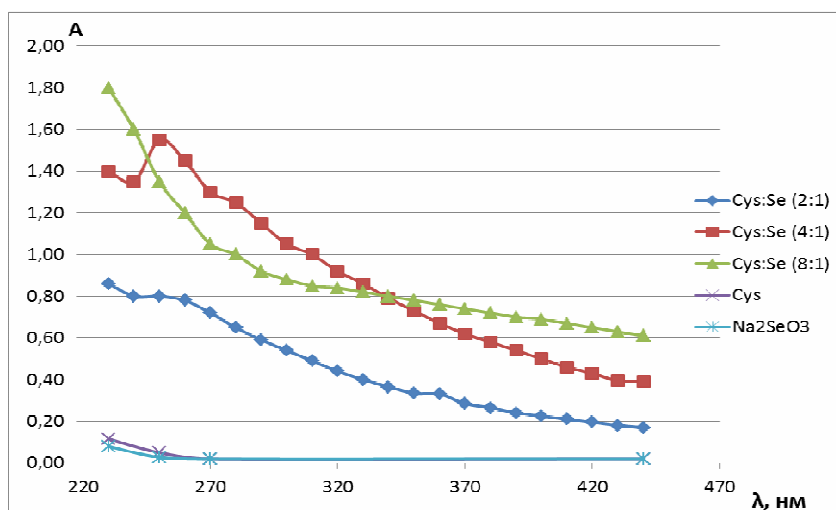


Рис. 2. Зависимость оптической плотности от длины волны для смеси цистеин–селенит натрия (по  $5 \cdot 10^{-3}$  М).

Полученное соотношение компонентов подтверждается и изучением изомолярных серий. На рис. 3 показана изомолярная кривая изменения потенциала платинового электрода для смеси в зависимости от концентрации селенита натрия. Перегиб на кривой соответствует мольному отношению селенит–цистеин 1:4.

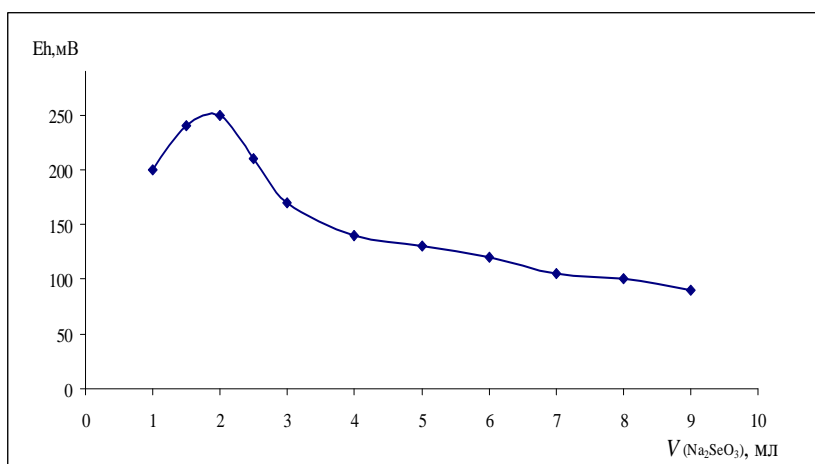


Рис. 3. Зависимость изменения потенциала платинового электрода от объема селенита натрия в изомолярных сериях ( $V=10$  мл,  $C=5 \cdot 10^{-3}$  М).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Потенциометрическим методом установлено, что при  $pH < 3,0$  и  $pH > 7,0$  образуются бесцветные комплексы цистеина с селенитом натрия.
2. В области существования цистеина в виде цвиттер-иона ( $pH = 3,0 - 7,0$ ) происходит восстановление селена при отношении цистеин–селенит, равном 4:1.

## Список литературы

1. Селен. Некоторые аспекты химии, экологии и участия в развитии патологии (обзор) / В.В. Вапиров, М.Э. Шубина, Н.В. Вапирова [и др.]. - Петрозаводск: ПетрГУ, 2000. – 68 с.
2. Гмошинский И.В. Микроэлемент селен: роль в процессах жизнедеятельности / И.В. Гмошинский, В.К. Мазо, В.А. Тутельян, С.А. Хотимченко // Экология моря. – 2000. – № 54. – С. 5–19.
3. Решетняк Л.А. Селен и здоровье человека (обзор литературы) / Л.А. Решетняк, Е.О. Парфенова // Экология моря. – 2000. – № 59. – С. 20–25.
4. Громова О.А. Селен – впечатляющие итоги и перспективы применения / О.А. Громова, И.В. Гоголева // Медицина неотложных состояний. – 2010. – № 6 (31). – С. 124–128.
5. Zhaung J.S. Biological effects on nano red elemental selenium / J.S. Zhaung // Biofactors. – 2001. – Vol. 15. – 27–38.
6. Валуева С.В. Влияние соотношения компонентов комплекса селен: поливинилпирролидон на формирование и морфологические характеристики наноструктур / С.В. Валуева, Л.Н. Боровикова, А.И. Киппер // Журнал физической химии. – 2008. – Т. 82, №6. – С. 1131–1136.
7. Закарян Ш.С. Амперометрическое титрование селена(IV) тиомочевинной / Ш.С. Закарян, Г.Г. Дарбинян, Г.Н. Шапошникова, А.Г. Хачатрян // Химический журнал Армении. – 2003. – Т. 56, №1-2. – С. 52–56.
8. Исследование неферментативного взаимодействия селена и серебра с цистеином и глутатионом с помощью приборного комплекса МХ-5310 / А.В. Новиков, Г.Н. Кошелева, Р.А. Бубляев [и др.] // Научное приборостроение. – 2008. – Т.18, №4. – С. 79–87.
9. Панкратов А.Н. Взаимодействие L-цистеина с селенистой и селеновой кислотами: исследование методом теории функционала плотности / А.Н. Панкратов, Н.А. Бычков, О.М. Цивилева // Журн. структурной химии. – 2010. – Т. 51, №1. – С. 15–21.
10. Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine / Q. Li, T. Chen, F. Yang [et al.] // Materials letters. – 2010. – Vol. 64, №5. – P. 614–617.
11. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – [5-е изд.]. – Л.: Химия, 1986. – 432 с.
12. Слесарев В.И. Химия: Основы химии живого: учебник для вузов / В.И. Слесарев. [3-е изд.]. – СПб: Химиздат, 2005. – 784 с.
13. Котова Д.Л. Спектрофотометрическое определение аминокислот в водных растворах: учеб. пособие / Д.Л. Котова, Т.А. Крысанова, Т.В. Елисеева; под ред. О.А. Тихомирова. – Воронеж, 2004. – 55 с.

**Панова Е.П. Дослідження взаємодії селеніту натрію з L-цистеїном потенціометричним методом / Е.П. Панова, О.О. Османова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 292-298.**

Потенціометричним методом вивчена взаємодія селеніту натрію з L-цистеїном в кислих, нейтральних і лужних розчинах. Встановлено, що в області існування цистеїну у вигляді цвіттеріону ( $pH = 3 - 7$ ) відбувається відновлення селену при мольних співвідношеннях цистеїн-селеніт, рівних 4:1. Спектрофотометричним методом визначено максимум поглинання нанорозмірного селену – 250 нм.

**Ключові слова:** цистеїн, цистин, цвіттер-іон, селеніт натрію, потенціометрія і спектрофотометрія.



STUDY OF INTERACTION SODIUM SELENITE WITH L-CYSTEINE BY  
POTENTIOMETRIC METHOD*Panova E.P., Osmanova A.A.**Tavrida National V.I. Vernadsky University, Simferopol, Crimea, Ukraine**E-mail: mendes@inbox.ru*

Selenium and its compounds play a crucial role in physiological processes and change of their contents has a direct effect on human health, leading to the development of diseases. Currently, there are several forms of selenium – selenite and sodium selenite, synthetic selenomethionine, selenocysteine and etc. The most promising application is selenium nanoparticles (Nano-Se) with particle sizes less than 40 nm. It has a low toxicity and can be used in doses exceeding the daily requirement.

One method of synthesis Nano-Se by reducing sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) or selenic acid with ascorbic acid at pH 3.3 in an aqueous medium. Several studies as reducing agents selenium(IV) was used sulfur containing amino acid – cysteine. Colorless soluble complex of selenium(II)  $\text{Se}(\text{Cys})_2$  forms in 2.5 M sulfuric acid solution by reacting sodium selenite. In work Qian Li was considered for the synthesis of selenium nanoparticles from sodium selenite (low concentrations) with L-cysteine.

Study the interaction of sodium selenite ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) with L-cysteine by the potentiometric method at different pH values has been demonstrated in this study. Selenite ion is easily reduced to elemental selenium by oxidation-reduction mechanism. Therefore, potentiometric method of analysis to study the interaction of sodium selenite with L-cysteine has been chose. The study was conducted at a pH-meter with a platinum indicator and Ag/AgCl reference electrode.

During the titration, the cysteine by sodium selenite in sulfuric acid at pH less than 2.0 is formed colorless soluble complex Se-disulfide (Cys–Se–Cys, 2:1). Forming nanosize selenium occurs in a pH range of 3.0–7.0, namely in the existence of cysteine as zwitterion (pH=5±2).

The reducing selenite ion by cysteine occurs at a ratio of 1:4 has been found by spectrophotometric and method of isomolar series. By increasing the pH of greater than 6.0 happens again incomplete reducing of selenite ion and the solution becomes colorless.

**Keywords:** cysteine, cystine, zwitterion, sodium selenite, potentiometric and spectrophotometric methods.

**References**

1. Vapirov V.V., Shubin M.E., Vapirova N.V., Belichenko V.I., Shubin I.V. *Selenium. Some aspects of the chemistry, ecology, and participation in the development of pathology (review)*, 68 p. (Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, 2000).
2. Gmshinsky I.V., Mazo V.K., Tutelian V.A., Khotimchenko S.A. The trace element selenium: a role in the life, *Ecology Sea*, **54**, 5 (2000).
3. Reshetnyak L.A., Parfenov E.O. Selenium and human health (review), *Ecology Sea*, **59**, 20 (2000).
4. Gromov O.A., Gogoleva I.V. Selenium – impressive results and prospects of application, *Emergency Medicine states*, **Vol. 6 (31)**, 124 (2010).
5. Zhaung J.S. Biological effects on nano red elemental selenium, *Biofactors*, **Vol. 15**, 27 (2001).

6. Valuev S.V., Borovikova L.N., Kipper A.I. Effect of the ratio of components selenium polyvinylpyrrolidone on the formation and morphological characteristics of nanostructures, *Journal of Physical Chemistry*, **Vol. 82 (6)**, 1131 (2008).
7. Zakaryan S.S., Darbinyan G.G., Shaposhnikov G.N., Khachatryan A.G. The amperometric titration of selenium (IV) with thiourea, *Chemical Journal of Armenia*, **Vol. 56 (1-2)**, 52 (2003).
8. Novikov A.V., Koshelev G.N., Bublyayev R.A., Manoylov A.V., Koz'min Yu.P., Krasnov N.V., Mirgorodskaya O.A. The study of non-enzymatic interaction of selenium and silver with cysteine and glutathione using instrument complex MX-5310, *Scientific Instrumentation*, **Vol. 18 (4)**, 79 (2008).
9. Pankratov A.N., Bychkov N.A., Tsivileva O.M. Interaction of L-cysteine and selenium selenous acids: a study by density functional theory, *Journal of Structural Chemistry*, **Vol. 51 (1)**, 15 (2010).
10. Q. Li, T. Chen, F. Yang, J. Liu, W. Zheng Facile and controllable one-step fabrication of selenium nanoparticles assisted by L-cysteine, *Materials letters*, **Vol. 64 (5)**, 614 (2010).
11. Bulatov M.I., Kalinkin I.P. *Practical Guide of photometric methods of analysis* [5th ed.], 432 p. (Khimiya, Leningrad, 1986).
12. Slesarev V.I. *Chemistry: Principles of Chemistry living: a textbook for high schools* [3rd ed.], 784 p. (Himizdat, St. Petersburg, 2005).
13. Kotova D.L., Krysanova T.A., Eliseev T.V. (edit Tikhomirov O.A.) *Spectrophotometric determination of amino acids in aqueous solutions: studies manual*, 55 p. (Voronezh, 2004).

Поступила в редакцию 28.01.2014 г.

УДК 581.2.07

**ВЛИЯНИЕ РЖАВЧИННОГО ГРИБА *UROMYCES GERANII* (DC.) LEV.  
НА ФЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФЕНОЛЬНЫЙ СОСТАВ  
*GERANIUM SANGUINEUM* L. (GERANIACEAE)**

*Присянникова И.Б., Гришковец В.И., Федотова А.Ю.*

*Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: arhanisomenon@mail.ru*

Приведены данные по влиянию ржавчинного гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на состояние ценопопуляции *Geranium sanguineum* L. Изучено влияние гриба на распространенность и интенсивность поражения *G. sanguineum*. Выявлена зависимость феноспектра растения-хозяина от стадии развития *U. geranii*. Изучено влияние *U. geranii* на содержание фенольных соединений в растениях *G. sanguineum*.

**Ключевые слова.** ржавчинный гриб *Uromyces geranii*, питающее растение *Geranium sanguineum*, распространенность и интенсивность поражения, феноспектры, фенольные соединения.

**ВВЕДЕНИЕ**

Климат Крымского полуострова в целом благоприятен для развития как сосудистых растений, так и для трофически связанных с ними грибов-паразитов и сапрофитов. Ржавчинные грибы (порядок Uredinales, класс Teliomycetes, отдел Basidiomycota) являются облигатными паразитами высших растений и насчитывают 7798 видов [1]. В настоящее время для Горного Крыма приводится 116 видов ржавчинных грибов [2]. Сведения об уредофлоре Крыма постоянно пополняются новыми данными. Изучение взаимодействия гриба-паразита и растения-хозяина, а также уточнение биологических особенностей жизненного цикла паразитического организма является актуальной научной проблемой.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Целью нашей работы явилось изучение влияния ржавчинного гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на состояние ценопопуляции *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae). Исследования проводили в окрестностях пгт. Научный Бахчисарайского района АР Крым на вершине одного из отрогов горы Сель-Бухра (658,2 м н.у.м.) в течение 2011–2013 гг. на двух однородных пробных площадях по 100 м<sup>2</sup> каждая. Нами были случайным образом выделены по 20 учетных площадок площадью 1 м<sup>2</sup>. Природная растительность известняковой горы Сель-Бухра представлена дубовопушистым-можжевелевым редколесьем [3], где *G. sanguineum* образует довольно крупные многочисленные куртины.

Согласно картосхеме географического районирования Крыма пгт. Научный расположен в Горном Крыму [4]. Общий ареал *G. sanguineum* – европейско-

средиземноморский, вид распространен преимущественно в Горном Крыму. Биоморфа: аэропедофит, литофит; поликарпическая летне-зимнезеленая полурозеточная трава с симподиальным ветвлением побегов, кистекорневая, среднекорневищная, ранне-среднелетняя. Экоморфа: ксеромезофит; сциогелиофит; гликофит; медоносное, витаминоносное, техническое, довольно часто встречаемое в Горном Крыму растение [5].

Идентификацию образцов *U. geranii* на листьях *G. sanguineum* проводили стандартным методом с помощью определителя [6], а название растения-хозяина представлено по литературе [7]. Объект изучения – растения *G. sanguineum*, пораженные ржавчинным грибом *U. geranii*. Варианты опыта: контроль – здоровое растение, опыт – пораженное грибом *U. geranii*. Распространение и развитие болезни рассчитывали с использованием общепринятых в фитопатологии методов [8].

С целью выявления возможных фунгицидных свойств нового препарата (нанобиокомпозита на основе серебра и природных биополимеров), разработанного на базе Биотехнологического центра Таврического национального университета им. В.И. Вернадского [9], на протяжении двух вегетационных сезонов 2011–2012 гг. нами была проведена трехкратная (с интервалом в 10 дней) обработка заложенных учетных площадок указанным веществом в течение мая–июня путем опрыскивания надземной массы растений.

**Определение фенольных соединений.** Растительный материал высушивали в хорошо проветриваемом помещении при комнатной температуре до состояния ломкости. Растения были разделены на листья и стебли, каждый образец был тщательно размельчен, а затем перетерт с песком до порошкообразного состояния для максимального извлечения экстрагируемых веществ. Экстракцию проводили 70% водным раствором изопропилового спирта в соотношении 1:10 при температуре 100 °С. Далее экстракт был охлажден и настоян в течение суток.

**Хроматографические методики. Одномерная хроматография.** ТСХ-анализ выполняли на пластинках «Silufol» (Чехословакия). Экстракты органов растения двух образцов нанесли на хроматографическую пластину. Одномерный ТСХ-анализ проводили параллельно в двух системах: хлороформ-метанол-вода (7:3:0,5) и хлороформ-метанол-аммиак (7:3:1).

**Двумерная хроматография.** Двумерный ТСХ-анализ экстрактов проводился на пластинках «Silufol», разделение веществ в направлении «1» осуществлялось в нейтральной хроматографической системе растворителей, а разделение в перпендикулярном направлении «2» – осуществлялось в щелочной системе растворителей. В качестве нейтральной системы использовали смесь хлороформ-метанол-вода (7:3:0,5); в качестве щелочной хлороформ-метанол-25%-ный водный аммиак (6:4:1). Детектировали флюоресценцию и разделение фенольных соединений излучением УФ-лампы со светофильтром, выделяющим длинноволновое УФ-излучение (365 нм) [10, 11]. Полученные данные обрабатывались общепринятыми методами математической статистики при уровне достоверности  $P=0,05$  [12].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биотрофный ржавчинный гриб *U. geranii* на *G. sanguineum* относится к семейству Русциниaceae. Спермогонии развиваются на обеих сторонах листьев, в небольших группах среди эциев на желтых пятнах, шаровидные, мелкие, 135–150 мкм шириной, оранжевые или коричневые (рис. 1).

Эции развиваются на нижней стороне листьев, на жилках и черешках, в округлых или продолговатых неплотных группах на небольших округлых или удлинённых, утолщённых, желтых или коричневых пятнах, иногда расположенные по кругу, округлые, 0,2–0,3 мм в диаметре, желтые. Эциоспоры – эллипсоидные или яйцевидные, 22–38 x 18–25 мкм, оранжевые; оболочка около 2 мкм толщиной, бесцветная, густо- и мелкобородавчатая. Урединии на нижней стороне листьев, реже на черешках, стеблях и цветоножках, редко рассеянные или в небольших группах, иногда расположенные по кругу, на желтовато-красноватых, или коричневых пятнах, округлые или продолговатые, 1–2 мм длиной, порошачие, коричневые. Телии подобны урединиям, но только более темноокрашенные. Телиоспоры эллипсоидные или округлые, 26–40 x 21–25 мкм; оболочка около 2–3 мкм толщиной, каштаново-бурая, гладкая, с проростковой порой на вершине, прикрытой бесцветным полушаровидным сосочком 6–9 мкм шириной и 5–9 мкм высотой, ножка короткая, бесцветная, ломкая. Нами отмечено наличие деформаций в виде искривлений и уплотнений на пораженных грибом *U. geranii* органах растения-хозяина (рис. 1).



Рис. 1. Ржавчинный гриб *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на листьях *Geranium sanguineum* L. (фото ориг.): спермогонии на верхней стороне листа; эции на нижней стороне листа.

Как видно из данных таблицы 1, средний показатель распространения болезни (Р) в 2011 году в популяции *G. sanguineum* на всех пробных площадях составил 99,2%; в 2012 году мы наблюдали снижение этого показателя до 26,8%. Интенсивность поражения растений (R) также снизилась с 27,2% в 2011 году до 3,2% в следующем году, соответственно.

**Таблица 1**  
**Характеристика распространенности и степени поражения *Geranium sanguineum* L. ржавчинным грибом *Uromyces geranii* (DC.) Lév.**

Год	Среднее количество растений, шт/м <sup>2</sup>	Распространённость заболевания (Р), %	Интенсивность поражения (R), %
2011	70,8±2,1	99,2±2,6	27,2±0,9
2012	50,1±1,6	26,8±0,7	3,2±0,1
2013	58,2±1,2	31,2±0,6	6,1±0,3

В 2013 году мы наблюдали незначительное увеличение распространенности и интенсивности поражения растений по сравнению с предыдущим годом.

Снижение численности заболевших растений и показателей распространения и интенсивности их поражения в 2012–2013 гг. по сравнению с вегетационным сезоном 2011 года мы связываем с естественными ежегодными флюктуациями инфекционного природного фона, который зависят от ряда факторов: погодных условий, количества инфекционного начала, численности восприимчивых растений на единицу площади. На протяжении трех лет исследования показатель густоты стояния растений-хозяина на пробной площади имел тенденцию к снижению в 2012–2013 гг. на 16,7 шт/м<sup>2</sup> по сравнению с первым годом наблюдения, что на 23,6 % меньше, чем в 2011 году. В первую очередь, снижение плотности растений на единицу площади могло стать решающим фактором при уменьшении распространенности и степени поражения растений в последующие два года наблюдений. На протяжении трех лет исследования было установлено, что гриб и растение ежегодно образуют ассоциированную пару. Трехкратная обработка (с интервалом в 10 дней) путем опрыскивания бионанопрепаратом надземной массы растений в течение мая–июня на протяжении двух вегетационных сезонов 2011–2012 гг. не вызвала достоверных изменений распространенности и интенсивности заболевания по сравнению с контрольным вариантом.

Сопоставление фенологического спектра *G. sanguineum* с фазами спороношений гриба *U. geranii*, показало, что спорогонии гриба закладываются в фазу бутонизации питающего растения, эции развиваются в фазу цветения *G. sanguineum*, а урединии и телии формируются в период созревания плодов. Максимум пораженности *G. sanguineum* при этом приходится на май (за три года наблюдений), что совпадает с периодом массового цветения *G. sanguineum* (рис. 2 и 3).

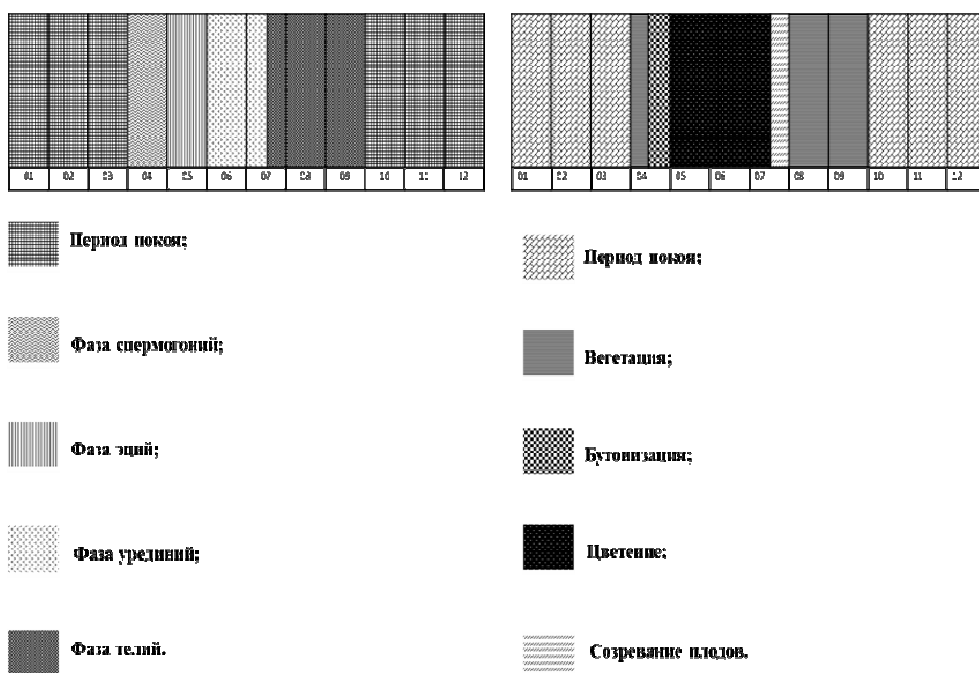


Рис.2.Фенологический спектр спороношений *Uromyces geranii* (DC.) Lev.

Рис.3.Фенологический спектр спороношений *Geranium sanguineum* L.

В последнее время большое внимание исследователи уделяют изучению связи между химическим строением и фунгитоксичной активностью фенольных соединений растений. Это необходимо для более глубокого понимания роли фенолов как факторов устойчивости растений к грибным заболеваниям, а также для использования активных форм этих соединений для защиты растений, человека и животных [13].

В ходе исследований нами был проведен хроматографический анализ экстрактов листьев и стеблей, отражающих состав фенольных соединений контрольных и опытных вариантов.

Анализ одномерных хроматограмм экстрактов стеблей, показал отсутствие существенных различий между контрольными и опытными вариантами в составе фенольных соединений *G. sanguineum* (рис. 4). При сравнительном анализе экстрактов листьев контрольного и опытных вариантов, в опыте было обнаружено полярное соединение с сине-голубым цветом флюоресценции (предположительно производное бензойной или коричной кислоты), которое отсутствовало в контроле и в экстрактах стеблей всех вариантов. Обработка надземной части растений-хозяев бионанопрепаратом серебра не выявила различий в составе фенольных соединений между вариантами опытов 1 и 2 (рис. 4).

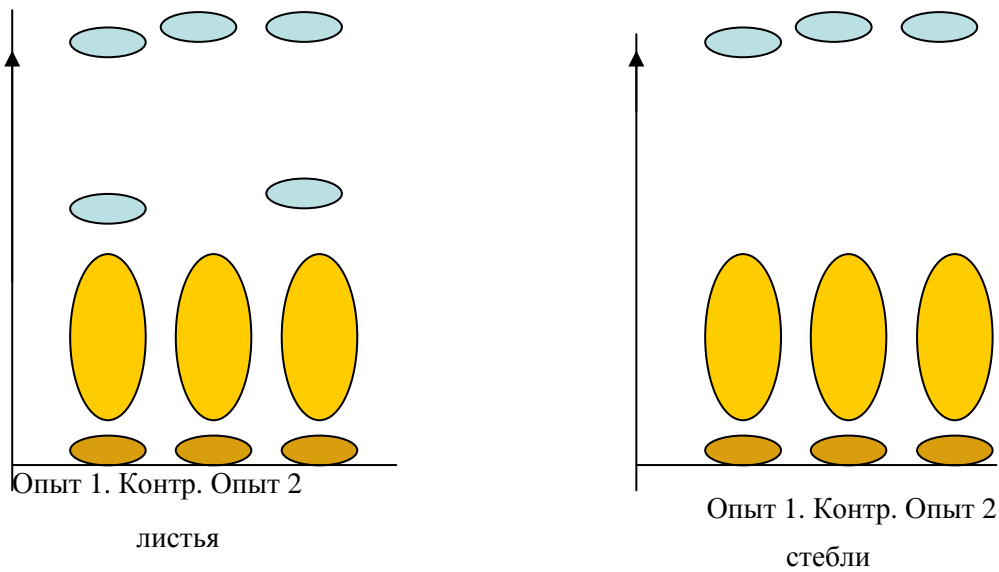


Рис. 4. Хроматограммы листьев и стеблей *Geranium sanguineum*: контроль – здоровые растения; опыт 1 – растения, пораженные *Uromyces geranii*; опыт 2 – растения, пораженные *U. geranii* и обработанные бионанопрепаратом серебра.

Для более тщательного исследования экстрактов пораженных листьев, мы воспользовались методом двумерной тонкослойной хроматографии, который позволяет проводить разделение перекрывающихся хроматографических зон в различных направлениях, с целью более достоверного определения класса веществ, которыми отличались растительные образцы эксперимента. Во втором направлении разделение экстракта проводили в щелочной системе хлороформ-метанол-аммиак в соотношении (7:3:1). Двумерная хроматограмма показала наличие в пораженных ржавчинным грибом *U. geranii* листьях сильно полярных фенольных соединений сложного строения, которые предположительно можно отнести к гликозидам флавонолов и халконов. При УФ-облучении эти вещества флуоресцировали оранжевым и ярко-желтым цветами.

Для более детальной идентификации обнаруженных фенольных соединений на фоне инфекции в данной работе был проведен более тщательный эксперимент по выявлению состава фенольных соединений в различных органах растений, таких как листовые пластинки, черешки, стебли. Нами были выделены фрагменты растений, имеющие явные признаки поражения ржавчинным грибом *U. geranii*. Были проанализированы одномерные хроматограммы листьев (листовых пластинок и черешков) и стеблей питающего растения.

При рассмотрении фенольного состава экстракта пораженных листьев *Geranium sanguineum* были отмечены окрашенные зоны с коричневой и желтой флуоресценцией (предположительно халконы и ауроны). Кроме того, было зафиксировано соединение с сине-голубым цветом флуоресценции (предположительно производное бензойной или оксикоричной кислоты), которое



отсутствовало в контрольном образце. Это отличие было замечено как для проб за 2011 год, так и за 2012 год; следует также отметить, что данная хроматографическая зона за 2012 год менее четко выражена, по сравнению с предыдущим годом. Вариант опыта с обработкой препаратом бионаносеребра не отличалась от опыта 1 (зараженные ржавчиной растения без обработки нанопрепаратом).

На хроматограмме экстрактов черешков листьев за 2011–2012 гг. также было выявлено качественное различие в содержании компонента с голубой флюоресценцией у зараженных и отсутствие его у здоровых растений.

При анализе одномерных хроматограмм экстрактов стеблей за 2011–2012 годы, нами были отмечены хроматографические зоны с коричневой и желтой окраской (предположительно халконы и ауроны). Но качественных различий между контрольными образцами и пораженными грибом-паразитом не наблюдалось, голубая флюоресценция, обнаруженная в листьях пораженных растений, в стеблях отмечена не была.

В целом, ржавчинный гриб *U. geranii* проявил органотропную специализацию, поражая, преимущественно, листья растения-хозяина, нежели стебли, на которых нами были отмечены лишь единичные симптомы заболевания. В составе фенольных соединений стеблей растений не выявлено существенных отличий между контрольным и опытным вариантом. Обработка растений *G. sanguineum* препаратом нанобиосеребра не оказала влияния на химический состав фенольных соединений стеблей и листьев в сравнении с пораженными растениями без обработки данным препаратом.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены распространенность и интенсивность поражения ценопопуляции *G. sanguineum* ржавчинным грибом *U. geranii* вершине горы Сель-Бухра (Горный Крым) и установлено, что ассоциированная пара: гриб-растение образуется ежегодно.
2. Сопоставление фенологического спектра *G. sanguineum* с фазами спороношений гриба *U. geranii*, показало, что спермогонии закладываются в фазу бутонизации, эции развиваются в фазу цветения растения, а урединии и телии формируются в период созревания плодов. За три года наблюдений (2011–2013 гг.) выявлено, что максимум пораженности *G. sanguineum* приходится на май, что совпадает с периодом массового цветения растения-хозяина.
3. Анализ фенольных соединений *G. sanguineum* с помощью тонкослойной хроматографии показал, что под влиянием ржавчинного гриба *U. geranii* образуется компонент с голубой флюоресценцией (предположительно производное бензойной или оксикоричной кислоты), который отсутствует в здоровых листьях. Такие же закономерности, но менее четко прослеживаются и для черешков листьев растения-хозяина. В составе экстракта листьев растения-хозяина, пораженных *U. geranii*, были обнаружены окрашенные зоны фенольных соединений с коричневой и желтой флюоресценцией (предположительно гликозиды халконов и ауранов), которые отсутствовали в контрольном варианте.

4. Обробка рослин *G. sanguineum* препаратом біонаносеребра не виявила яких-либo отличий в хімічному складі фенольних сполук стебел і листків в порівнянні з ураженими *U. geranii* рослинами без обробки препаратом.

#### Список літератури

1. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. — Wallingford: CAB International, 2008. — 784 p.
2. Гриби природних зон Криму / [Дудка І. О., Гелюта В. П., Тихоненко Ю. А. та інш.]; під ред. І. О. Дудки. — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 452 с. (Інститут ботаніки ім М.Г. Холодного НАНУ).
3. Григора І.М. Рослинність України (еколого-ценотичний, флористичний та географічний нарис) / Григора І.М., Соломаха В.А. □ К.: Фітосоціоцентр, 2005. — 452 с.
4. Дидух Я.П. / Растительный покров Горного Крыма (структура, динамика, эволюция и охрана.). — Киев: Наукова думка, 1992. □ 256 с.
5. Голубев В.Н. Биологическая флора Крыма / Голубев В.Н.—Ялта: ГНБС, 1996 — 300 с.
6. Купревич В.Ф. Определитель ржавчинных грибов СССР / Купревич В.Ф., Ульянищев В.И.— Минск: «Наука и техника», 1975.— 485 с.
7. Ена А.В. Природная флора Крымского полуострова / Ена А.В. □ Симферополь: Ореанда, 2012 — 232 с.
8. Семенкова И. Г. Фитопатология / И.Г. Семенкова, Э.С. Соколова. □ Москва: Академия, 2003 — 480 с.
9. Юркова И.Н. Нанобиокompозиты на основе серебра и природных биополимеров / И.Н. Юркова, И.А. Бугара, Э.П. Панова // Міжнародний науково-практичний форум "Наука і бізнес – основа економічного розвитку [Збірник тез доповідей, 11-12 жовтня 2012 р.]. — Дніпропетровськ (Україна). — 2012. — С. 152–154.
10. Набиванець Б. И. Хроматографический анализ./ Б.И. Набиванець, Е.А. Мазуренко [Пособие для вузов] — Киев. Вища школа, 1979 — 264 с.
11. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография /Ю. Кирхнер; [Пер. с англ. Д. Н. Соколова и М. И. Яновского, под ред. В. Г. Берёзкина.]. □ М.: Мир, 1981. — 616 с.
12. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин — М.: Высшая школа, 1983 — 293 с.
13. Movlyanov S.M. Phenolic compounds of *Geranium sanguineum* / S.M. Movlyanov, Sh.Yu. Islambekov, F.G. Kamaev, A.I. Ismailov // Chemistry of Natural Compounds. — 1994. — Vol. 30, № 1. — P. 33-38.

**Присяннікова І.Б. Вплив іржастого гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lev. на фенологічні показники і фенольний склад *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae) / І.Б. Присяннікова, В.І. Гришковець, О.Ю. Федотова // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. — 2014. — Т. 27 (66), № 1. — С. 299-308.**

Наведено дані щодо впливу іржастого гриба *Uromyces geranii* (DC.) Lév. на стан ценопопуляції *Geranium sanguineum* L. Вивчено вплив гриба на поширеність і інтенсивність ураження *G. sanguineum*. Виявлено залежність феноспектру рослини-хазяїна від стадії розвитку *U. geranii*. Досліджено вплив *U. geranii* на вміст фенольних сполук у рослинах *G. sanguineum*.

**Ключові слова.** іржастий гриб *Uromyces geranii*, живильна рослина *Geranium sanguineum*, поширеність і інтенсивність ураження, феноспектри, фенольні сполуки.

INFLUENCE OF THE RUST FUNGUS *UROMYCES GERANII* (DC.) LEV. ON INDICATORS OF THE PHENOLOGICAL AND PHENOLIC COMPOSITION OF *GERANIUM SANGUINEUM* L. (GERANIACEAE)

*Prosyannikova I.B., Grishkovets V.I., Fedotova A.Y.*

*National V.I. Vernadsky Taurida University, Simferopol, Ukraine  
E-mail: aphanisomenon@mail.ru, vladgri@ukr.net*

The investigation was carried out in the vicinity of Nautsniy in Bakhchisaray region of Crimea on the top of one of the spurs on Sel-Buhra mountain top (658.2 m above the sea level, the Crimean Mountains) on two homogeneous test areas, 100 m<sup>2</sup> each. The natural vegetation of the limestone Mountains of Sel-Buhra is represented with pubescent oak and juniper sparse wood, where *G. sanguineum* forms rather large and multiple curtains. The spread and the intensity of lesions of *G. sanguineum* coenopopulations by the rust fungus *U. geranii* was studied, as well as the associated pair of fungus-plant, which is annually produced, was found. The comparative analysis of phenological spectrum of *G. sanguineum* with phases of sporophores *U. geranii*, showed that spermogonia are formed in the budding stage and aecia develop on the plants in the flowering stage, while uredinia and telia are formed during the ripening season. For more than three years of research (from 2011 to 2013), it was revealed that the largest lesion of *G. sanguineum* takes place in May, which coincides with the period of mass flowering of the host plant.

The analysis of phenolic compounds of *G. sanguineum* by TLC revealed that a component with a blue fluorescence is formed (hypothetically, it is a derivative of benzoic or hydroxycinnamic acid) under the influence of *U. geranii* rust fungus. This component is absent from healthy leaves. The same less clearly traced consequences are traced in petioles of the host plant. Inside the leaf extract of the host plant affected by *U. Geranii* there were found the colored zones of phenolic compounds with brown and yellow fluorescence (presumably chalcone glycosides and auronones) which were absent in the control variant.

The treatment of the plants *G. sanguineum* by bionanosilver drug revealed no differences in the chemical composition of phenolic compounds in stems and leaves in comparison to the infected plants *U. geranii* left without drug treatment.

**Keywords:** *Uromyces geranii* rust fungus, *Geranium sanguineum* host plant, the spread and intensity of lesions, phenological spectrum, phenolic compounds.

#### References

1. Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 10th ed., 784 p. (CAB International, Wallingford, 2008).
2. Dudka I. O., Geluta V.P., Tichonenko Y.A. that insh. ed. I.O. Dudka. *Fungi natural areas Crimea (Institute of botany named after M.G. Cholododny)*, 452 p. (Phytosotsiotsentr, Kiev, 2004) (in Ukrainian).
3. Grigora I.M., Solomaha V.A. *Vegetation Ukraine (Ecoh-tsenotichny, floristichny that geografichny Naris)*, 452 p. (Phytosotsiotsentr, Kiev, 2005). (in Ukrainian).
4. Didukh Y.P. *Vegetation cover of the Crimean Mountains (structure, dynamics, and evolution of security.)*, 256 p. (Naukova Dumka, Kiev, 1992). (in Russ.).

5. Golubev V.N. *Biological flora of Crimea*, 300 p. (GNBS, Yalta, 1996). (in Russ.).
6. Kuprevich V.F., Ulyanischev V.I. *Determinant of rust fungi of the USSR*, 485 p. (Science and Technology, Minsk, 1975). (in Russ.).
7. Yena A.V. *Natural flora of the Crimean Peninsula*, 232 p. (N. Oreanda, Simferopol, 2012). (in Russ.).
8. Semenkova I.G., Sokolova E.S. *Phytopathology*, 480 p. (Academy, Moscow, 2003). (in Russ.).
9. Jurkova I.N., Bugara I.A., Panova E.P. Nanobiocomposites based on silver and natural biopolymers. International scientific and practical forum of Science and Business - the basis of economic development (A book of abstracts, 11-12 October 2012), Dnipropetrovs'k (Ukraine ). P. 152-154 (2012). (in Russ.).
10. Nabivanets B.I., Mazurenko E.A. *Chromatographic analysis*. Handbook for universities, 264 p. (Visha School, Kiev, 1979). (in Russ.).
11. Kirchner Y., Sokolov D., Janowski M., ed. V.G. Berezkina. *TLC*, 616 p. (Mir, Moscow, 1981). (in Russ.).
12. Lakin G.F. *Biometrics*, 293 p. (Higher School, Moscow, 1983) (in Russ.).
13. Movlyanov S.M., Islambekov Sh.Yu., Kamaev F.G., Ismailov A.I. Phenolic compounds of *Geranium sanguineum*. *Chemistry of Natural Compounds*, **30** (1), 33 (1994).

Поступила в редакцию 20.01.2014 г.

УДК 547.918:547.551:543.42

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С БРОМГЕКСИНОМ

Филонова О.В.<sup>1</sup>, Лекарь А.В.<sup>1</sup>, Ветрова Е.В.<sup>1</sup>, Максименко Е.В.<sup>1</sup>, Яковишин Л.А.<sup>2</sup>,  
Гришковиц В.И.<sup>3</sup>, Борисенко С.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИИ физической и органической химии Южного федерального университета,  
Ростов-на-Дону, Россия

<sup>2</sup>Севастопольский национальный технический университет, Севастополь, Украина

<sup>3</sup>Таврический национальный университет имени В.И. Вернадского, Симферополь, Украина  
E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением впервые исследовано комплексобразование бромгексина (BG) с тритерпеновыми гликозидами  $\alpha$ -хедерином (3-*O*- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -L-арабинопиранозидом хедерагенина, гликозидом **1**) и хедерасапонином С (3-*O*- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -L-арабинопиранозил-28-*O*- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -D-глюкопиранозидом хедерагенина, гликозидом **2**). Масс-спектры ESI-MS подтверждают наличие различных комплексов между молекулами гликозида **2** и BG. Пики ионов комплексов гликозида **1** с BG в масс-спектрах не обнаружены.

**Ключевые слова.** масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением, тритерпеновые гликозиды,  $\alpha$ -хедерин, хедерасапонин С, бромгексин, молекулярный комплекс.

### ВВЕДЕНИЕ

Бромгексин (бисольвон, флегамин, *N*-(2-амино-3,5-дибромбензил)-*N*-метилциклогексиламин, BG, рис. 1) – муколитическое и отхаркивающее средство. BG снижает вязкость бронхиального секрета за счет деполяризации его кислых полисахаридов и стимуляции секреторных клеток слизистой оболочки бронхов, а также способствует образованию сурфактанта. При использовании BG возможны различные аллергические реакции и диспепсические явления [1].

Комплексообразование лекарственных веществ растительными тритерпеновыми гликозидами позволяет снизить их терапевтические дозы и побочные эффекты, а также способствует повышению растворимости [2–4]. Для исследования молекулярных комплексов гликозидов широко используют метод масс-спектрометрии [5–9].

В данной работе в качестве перспективных комплексообразователей гидрохлорида BG рассмотрены тритерпеновые гликозиды  $\alpha$ -хедерин (гликозид **1**) и хедерасапонин С (гликозид **2**) (рис. 1), являющиеся одними из самых распространенных сапонинов растений семейства аралиевых (*Araliaceae* Juss.). Гликозид **1** представляет собой 3-*O*- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -L-

арабинопиранозид хедерагенина, а гликозид **2** – 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\alpha$ -L-арабинопиранозил-28-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид хедерагенина. Анализ комплексообразования проведен на основе метода масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

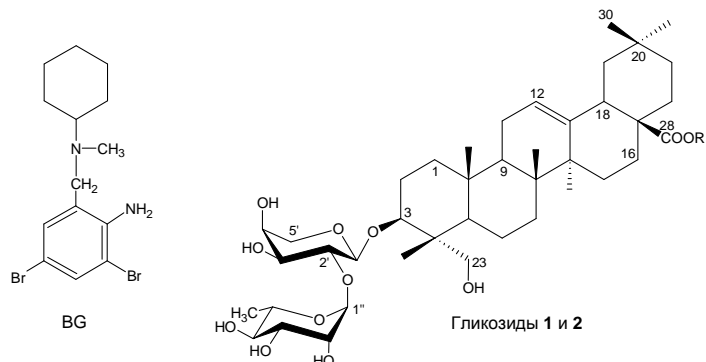


Рис. 1. Бромгексин (BG) и тритерпеновые гликозиды  $\alpha$ -хедерин (гликозид **1**; R=H) и хедерасапонин С (гликозид **2**; R= $\leftarrow$  $\beta$ Glc<sub>p</sub>-(6 $\leftarrow$ 1)- $\beta$ Glc<sub>p</sub>-(4 $\leftarrow$ 1)- $\alpha$ Rha<sub>p</sub>).

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тритерпеновые гликозиды **1** и **2** выделяли из листьев плющей крымского *Hedera taurica* Carag. и канарского *Hedera canariensis* Willd. (Araliaceae Juss.). Методики выделения и установления строения приведены в работах [10, 11].

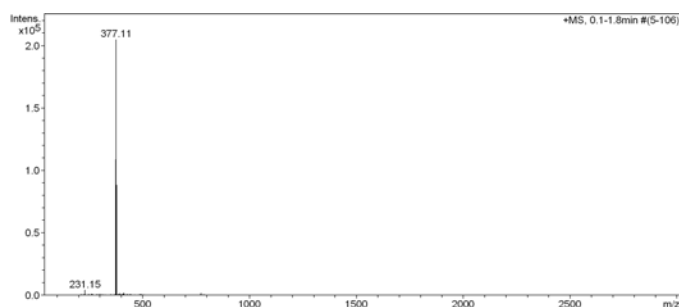
Комплекс с гликозидом **1** получали путем смешивания растворов, содержащих по 1 ммоль гликозида и 1 ммоль гидрохлорида BG, а с гликозидом **2** – в молярном соотношении 1:2 соответственно (растворитель – смесь 70 % водного раствора C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH и CHCl<sub>3</sub> в соотношении 3:1 по объему). Полученную смесь выдерживали при 40 °С в течение 1,5 ч при постоянном перемешивании. Органические растворители отгоняли в вакууме.

Измерения проведены на масс-спектрометре Bruker Daltonics micrOTOF-Q с ионизацией электрораспылением. Использовали программное обеспечение micrOTOFcontrol™2.2. Калибровка масс-спектрометра выполнена с использованием калибровочного раствора для электрораспыления (Electrospray Calibrant Solution) фирмы Fluka. Детектирование отрицательных и положительных ионов выполнено в интервале  $m/z$  от 50 до 3000. Согласно характеристикам прибора точность измерений на micrOTOF-Q II достигает выше 1–2 ppm, точность определения масс 2 мДа. Напряжение на капилляре распылителя  $\pm$ 4200 В, параметры газа-осушителя (азот квалификации «ос.ч.», 5 л/мин, 200 °С) оптимизированы для детектирования пиков ионов ассоциатов. Для прямого ввода использованы растворы веществ в метаноле (фирма Merck, квалификация HPLC/MS) в концентрации 0,2 мг/мл ( $10^{-7}$ – $10^{-6}$  М). Соотношения  $m/z$  и относительные интенсивности пиков ионов ( $I$ , %) приведены в табл. 1.

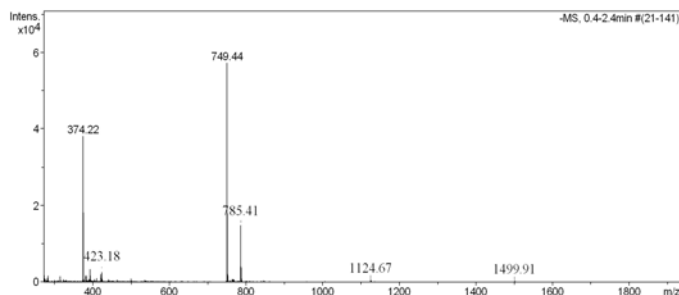
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что в масс-спектрах положительных ионов индивидуального гидрохлорида BG и его смесей с гликозидами **1** и **2** он присутствует в виде протонированной формы  $[M^{BG}+H]^+$  с  $m/z$  377,11. При этом пик иона  $[M^{BG}+H]^+$  является основным в изученных масс-спектрах положительных ионов (табл. 1).

В масс-спектре положительных ионов (рис. 2А), регистрируемом для смеси гидрохлорида BG с гликозидом **1**, наблюдаются слабоинтенсивные пики однозарядных протонированных и катионированных  $K^+$  и  $Na^+$  мономеров, а также катионированных двухзарядных тримеров гликозида **1**. Данные пики характерны для гликозида **1** и практически всегда присутствуют в масс-спектрах положительных ионов с его участием [12].



А



Б

Рис. 2. Масс-спектр смеси гликозида **1** и гидрохлорида BG в режиме регистрации положительных (А) и отрицательных (Б) ионов.

В масс-спектре отрицательных ионов (рис. 2Б), полученном для смеси гидрохлорида BG и гликозида **1**, пик максимальной интенсивности соответствовал однозарядному депротонированному иону гликозида **1**  $[M^1-H]^-$  с  $m/z$  749,44. Кроме того, идентифицирован двухзарядный депротонированный ион  $[M^1-2H]^{2-}$  с  $m/z$  374,22, а также депротонированные димер, тример и тетрамер гликозида **1**. Помимо пиков, характерных для гликозида **1**, присутствуют пики ионов с  $m/z$  785,41, 392,21, 273,46, 410,19 и 1535,97, демонстрирующие взаимодействие гликозида **1** с ионами хлора  $Cl^-$  с образованием одно-, двух и трехзарядных продуктов.

Каких либо пиков, характерных для комплексов между гликозидом 1 и ВГ, в масс-спектрах их смеси не обнаружено.

Таблица 1  
Масс-спектры смесей гидрохлорида ВГ с гликозидами 1 и 2

Ион	Соотношение $m/z$	$I_{\text{отн}}, \%$
<i>Гидрохлорид ВГ</i>		
$[M^{\text{BG}}+H]^+$	377,11	100
<i>Смесь гидрохлорида ВГ и гликозида 1</i>		
$[M^{\text{BG}}+H]^+$	377,11	100
$[M^1+H]^+$	751,67	0,03
$[M^1+Na]^+$	773,65	0,76
$[M^1+K]^+$	789,63	0,03
$[3M^1+2Na]^{2+}$	1148,96	0,01
$[3M^1+2K]^{2+}$	1156,95	0,02
$[M^1-2H]^{2-}$	374,22	98,9
$[M^1-H]^-$ или $[2M^1-2H]^{2-}$	749,44	100
$[4M^1-2H]^{2-}$	1499,91	0,31
$[3M^1-2H]^{2-}$	1124,67	0,8
$[M^1+Cl]^-$	785,41	25,9
$[M^1+Cl-H]^{2-}$	392,21	5,8
$[M^1+2Cl-H]^{3-}$	273,46	2,83
$[M^1+2Cl]^{2-}$	410,19	1,66
$[2M^1+Cl]^-$	1535,97	0,07
<i>Смесь гидрохлорида ВГ и гликозида 2</i>		
$[M^{\text{BG}}+H]^+$	377,11	100
$[M^2+K+H]^{2+}$	630,46	0,03
$[M^2+Cl]^-$	1255,66	100
$[M^2+2Cl]^{2-}$	645,32	99,1
$[M^2+Cl-H]^{2-}$	627,33	0,6
$[3M^2+2Cl]^{2-}$	1867,01	2,78
$[2M^2+M^{\text{BG}}+Cl-H]^{2-}$	1427,75	0,17
$[3M^2Cl+3M^{\text{BG}}Cl-3H]^{3-}$	1663,58	1,7
$[3M^2+4M^{\text{BG}}+5Cl-3H]^{3-}$	1777,96	0,1
$[4(M^2+M^{\text{BG}}Cl)-3H]^{3-}$	2172,95	0,2

Для изучения комплексообразования ВГ с гликозидом 2 исследованы масс-спектры соответствующих смесей (рис. 3). В масс-спектре положительных ионов основной пик принадлежал протонированной молекуле ВГ с  $m/z$  377,11. Гликозид 2 представлен в виде двузарядного иона в комплексе с калием  $[M^2+K+H]^{2+}$ , причем интенсивность данного пика мала.

Положительно заряженных ионов комплексов гликозида 2 с ВГ не зафиксировано. В тоже время в масс-спектре отрицательных ионов наблюдали пики разнообразных ионов, содержащих хлор (табл. 1). В результате анализа пиков в масс-спектре отрицательных ионов отмечены различные продукты взаимодействия



гликозида **2** с ионами Cl<sup>-</sup>. Так, например, основные пики принадлежали одно- ( $m/z$  1255,66) и двузарядным ( $m/z$  645,32) анионированным молекулам гликозида **2** с включением одного и двух ионов Cl<sup>-</sup> ( $[M^2+Cl]^-$  и  $[M^2+2Cl]^{2-}$ ). Присутствующий в спектре пик  $m/z$  627,33 депротонированного иона  $[M^2+Cl-H]^{2-}$  имел интенсивность существенно ниже (только 0,6 %). Впервые зафиксировано формирование достаточно устойчивого иона, состоящего из тримера гликозида **2**  $[3M^2+2Cl]^{2-}$  ( $m/z$  1867,01). Интенсивность его пика составляет 2,78 %.

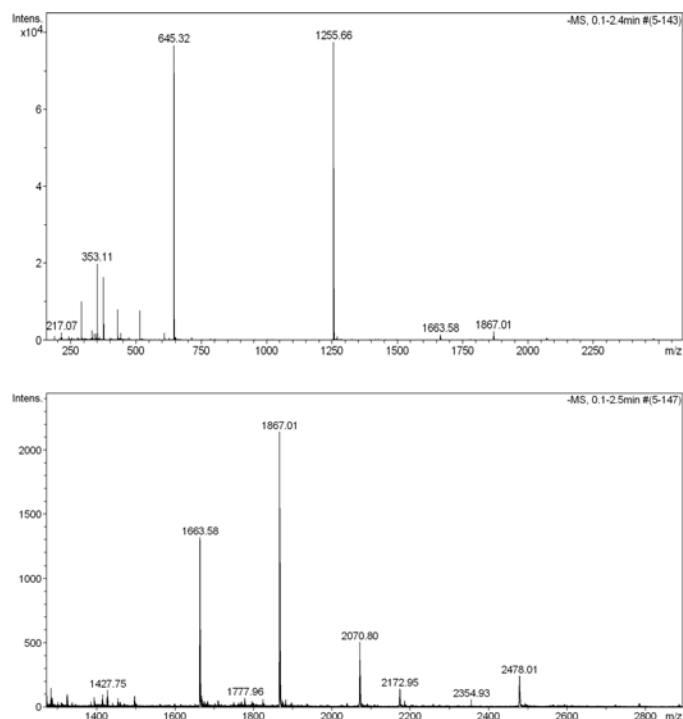


Рис.3. Масс-спектр смеси гликозида **2** и гидрохлорида BG в режиме регистрации отрицательных ионов.

Зафиксированы пики ионов комплексов, в которых три молекулы гликозида **2** связаны с тремя и четырьмя молекулами BG. Более устойчивым оказался комплекс с эквимолекулярным соотношением гликозида и BG. Интенсивность пика иона  $[3M^2Cl+3M^{BG}Cl-3H]^{3-}$  в 17 раз больше, чем у иона  $[3M^2+4M^{BG}+5Cl-3H]^{3-}$  (рис. 3).

На рис. 4 представлен образец изотопного распределения для пика с  $m/z$  1663,58 в масс-спектре отрицательных ионов, идентифицированного для трехзарядного иона комплекса гликозида **2** с BG  $[3M^2+3M^{BG}+2Cl-3H]^{3-}$ .

Также зафиксированы пики комплексов димера и тетрамера гликозида **2** с включением одной  $[2M^2+M^{BG}+Cl-H]^{2-}$  и четырех  $[4(M^2+M^{BG}Cl)-3H]^{3-}$  молекул фармакона.

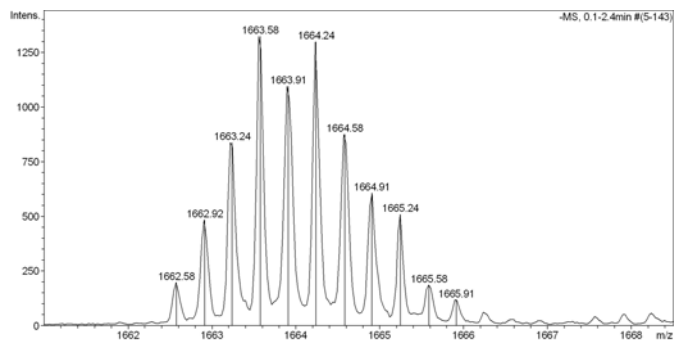


Рис. 4 Изотопное распределение пика  $m/z$  1663,58 в масс-спектре отрицательных ионов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Впервые метод масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением применен для исследования комплексообразования тритерпеновых гликозидов с ВГ.
2. В масс-спектрах смесей гликозидов с ВГ зафиксированы пики ионов различных самоассоциатов молекул гликозидов **1** и **2**.
3. Все ионы комплексов гликозида **2** с ВГ содержат хлор. Наиболее устойчивым является комплекс, включающий по три молекулы гликозида **2** и ВГ.
4. Пики ионов комплексов гликозида **1** с ВГ в масс-спектрах не обнаружены.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-03-01318, 13-03-12271 (ОФИ-м) и гос. задания ВУЗам на 2013 год (проект 3.5193.2011).

### Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. – [13-е изд.]. – Харьков: Торсинг, 1997. – Т. 1. – 560 с.
2. Толстикова Т.Г. На пути к низкодозным лекарствам / Т.Г. Толстикова, А.Г. Толстиков, Г.А. Толстиков // Вестник РАН. – 2007. – Т. 77, № 10. – С. 867–874.
3. Tolstikova T.G. The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents / T.G. Tolstikova, M.V. Khvostov, A.O. Bryzgalov // Mini Rev. Med. Chem. – 2009. – Vol. 9, № 11. – P. 1317–1328.
4. Polyakov N.E. Glycyrrhizic acid as a novel drug delivery vector: synergy of drug transport and efficacy / N.E. Polyakov, T.V. Leshina // Open Conf. Proc. J. – 2011. – Vol. 2. – P. 64–72.
5.  $^{252}\text{Cf}$  Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub, S.A. Aksonov [et al.] // Rapid Commun. Mass Spectrom. – 2000. – Vol. 14. – P. 819–823.
6. Pilipenko V.V. Mass spectrometry study of plant steroid glycosides and their interactions with biomolecules / V.V. Pilipenko, L.F. Sukhodub // Biopolym. Cell. – 2002. – Т. 18, № 2. – С. 139–141.
7. Электроспрей-ионизационная масс-спектрометрия смесей тритерпеновых гликозидов с парацетамолом / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко [и др.] // Журн. прикл. спектр. – 2010. – Т. 77, № 5. – С. 668–672.

8. Масс-спектрометрия молекулярного комплексообразования тритерпеновых гликозидов с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот / А.В. Лекарь, Е.В. Ветрова, Н.И. Борисенко [и др.] // Биоорган. химия. – 2011. – № 5. – С. 679–684.
9. Molecular complexation of ivy saponins with some drugs and biologically active substances / L.A. Yakovishin, V.I. Grishkovets, G. Schroeder, N.I. Borisenko // Functionalized molecules – synthesis, properties and application; ed. V.I. Rybachenko. – Donetsk: Schidnyj vydavnyczyj dim, 2010. – Chapter 4. – P. 85–103.
10. Тритерпеновые гликозиды *Hedera taurica* I. Структура таурозида E из листьев *Hedera taurica* / А.С. Шашков, В.И. Гришковец, А.А. Лолойко [и др.] // Химия природ. соедин. – 1987. – № 3. – С. 363–366.
11. Тритерпеновые гликозиды *Hedera canariensis* I. Структура гликозидов L-A, L-B<sub>1</sub>, L-B<sub>2</sub>, L-C, L-D, L-E<sub>1</sub>, L-G<sub>1</sub>, L-G<sub>2</sub>, L-G<sub>3</sub>, L-G<sub>4</sub>, L-H<sub>1</sub>, L-H<sub>2</sub> и L-I<sub>1</sub> из листьев *Hedera canariensis* / В.И. Гришковец, Д.Ю. Сидоров, Л.А. Яковичин [и др.] // Химия природ. соедин. – 1996. – № 3. – С. 377–383.
12. Самоассоциация и комплексообразование тритерпеновых гликозидов и холестерина / Л.А. Яковичин, Н.И. Борисенко, М.И. Руднев [и др.] // Химия природ. соедин. – 2010. – № 1. – С. 45–48.

**Філонова О.В.** Мас-спектрометрія молекулярного комплексоутворення тритерпенових глікозидів з бромгексином / О.В. Філонова, Г.В. Лекарь, О.В. Вітрова, О.В. Максименко, Л.О. Яковішин, В.І. Гришковець, С.М. Борисенко // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 309-316.

Методом мас-спектрометрії з іонізацією електророзпиленням вперше досліджено комплексоутворення бромгексину (BG) з тритерпеновими глікозидами  $\alpha$ -хедерином (3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопіранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабінопіранозидом хедерагеніну, глікозидом **1**) та хедерасAPONІНОМ C (3-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопіранозил-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-арабінопіранозил-28-*O*- $\alpha$ -*L*-рамнопіранозил-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопіранозил-(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\beta$ -*D*-глюкопіранозидом хедерагеніну, глікозидом **2**). Мас-спектри ESI-MS підтверджують наявність різноманітних комплексів між молекулами глікозиду **2** та BG. Піки іонів комплексів глікозиду **1** з BG у мас-спектрах не знайдено.

**Ключові слова.** мас-спектрометрія з іонізацією електророзпиленням, тритерпенові глікозиди,  $\alpha$ -хедерин, хедерасAPONІН C, бромгексин, молекулярний комплекс.

## MASS SPECTROMETRY OF TRITERPENE GLYCOSIDES MOLECULAR COMPLEXATION WITH BROMHEXINE

*Filonova O.V.<sup>1</sup>, Lekar A.V.<sup>1</sup>, Vetrova E.V.<sup>1</sup>, Maksimenko E.V.<sup>1</sup>, Yakovishin L.A.<sup>2</sup>,  
Grishkovets V.I.<sup>3</sup>, Borisenko S.N.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia*

<sup>2</sup>*Sevastopol National Technical University, Sevastopol, Ukraine*

<sup>3</sup>*Taurida V.I. Vernadsky National University, Simferopol, Ukraine*

*E-mail: chemseventu@rambler.ru*

Bromhexine (bisolvon, flegamin, *N*-(2-amino-3,5-dibromobenzyl)-*N*-methylcyclohexanamine, BG) is widely used as a mucolytic and expectorant. BG usually well tolerated, but it can cause allergies and dyspepsia. BG slightly soluble in water and ethanol.

One possible method for reducing therapeutic doses of drugs, increasing their solubility, and expanding the spectrum of biological activity is to form clathrates with plant triterpene glycosides.

Triterpene glycosides  $\alpha$ -hederin (hederagenin 3-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinopyranoside, glycoside **1**) and hederasAPONIN C (hederagenin 3-*O*- $\alpha$ -*L*-

rhamnopyranosyl-(1→2)-*O*- $\alpha$ -*L*-arabinopyranosyl-28-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnopyranosyl-(1→4)-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-(1→6)-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, glycoside **2**) are suggested as perspective molecular complexing agents. Glycosides **1** and **2** were discovered in representatives of most species of the ivy genus *Hedera L.*

We prepared molecular complexes of ivy triterpene glycoside with hydrochloride of BG. Using a method of electrospray ionization mass spectrometry, the complexation of hydrochloride BG with glycosides **1** and **2** was investigated for the first time.

The mass spectra of mixtures of glycosides with BG were recorded peaks of ions of different of glycosides **1** and **2** self-associates. In mass spectra ion peaks of complexes glycoside **1** with BG are not detected. All ions of glycoside **2** complexes with BG contain chlorine. The complex comprising three molecules of glycoside **2** and BG is more stable.

**Keywords:** electrospray ionization mass spectrometry, triterpene glycosides,  $\alpha$ -hederin, hederasaponin C, bromhexine, molecular complex.

### References

1. Mashkovskii M.D., *Drugs*, 2 vols., 13 ed., **1**, 560 p. (Torsing, Kharkov, 1997). (in Russ.).
2. Tolstikova T.G., Tolstikov A.G., Tolstikov G.A., On the way to low-dose drugs, *Vestnik RAN*, **77** (10), 867 (2007).
3. Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Bryzgalov A.O., The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents, *Mini Rev. Med. Chem.*, **9** (11), 1317 (2009).
4. Polyakov N.E., Leshina T.V., Glycyrrhizic acid as a novel drug delivery vector: synergy of drug transport and efficacy, *Open Conf. Proc. J.*, **2**, 64 (2011).
5. Pilipenko V.V., Sukhodub L.F., Aksyonov S.A., Kalinkevich A.N., Kintia P.K., <sup>252</sup>Cf Plasma desorption mass spectrometric study of interactions of steroid glycosides with amino acids, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 819 (2000).
6. Pilipenko V.V., Sukhodub L.F., Mass spectrometry study of plant steroid glycosides and their interactions with biomolecules, *Biopolym. Cell.*, **18** (2), 139 (2002).
7. Lekar A.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Electrospray-ionization mass spectrometry of mixtures of triterpene glycosides with paracetamol, *J. Appl. Spectr.*, **77** (5), 615 (2010).
8. Lekar' A.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Mass spectrometry of triterpene glycosides molecular complexation with purine bases of nucleic acids, *Rus. J. Bioorgan. Chem.*, **37** (5), 609 (2011).
9. Yakovishin L.A., Grishkovets V.I., Schroeder G., Borisenko N.I., Molecular complexation of ivy saponins with some drugs and biologically active substances, in *Functionalized molecules – synthesis, properties and application*, edited by Rybachenko V.I. (Schidnyj vydavnyczyj dim, Donetsk, 2010), 85 p.
10. Shashkov A.S., Grishkovets V.I., Loloiko A.A., Chirva V.Ya. Triterpene glycosides of *Hedera taurica* I. Structure of tauroside E from the leaves of *Hedera taurica*, *Khim. Prirod. Soedin.*, **3**, 363 (1987).
11. Grishkovets V.I., Sidorov D.Yu., Yakovishin L.A., Arnautov N.N., Shashkov A.S., Chirva V.Ya. Triterpene glycosides of *Hedera canariensis* I. Structures of glycosides L-A, L-B<sub>1</sub>, L-B<sub>2</sub>, L-C, L-D, L-E<sub>1</sub>, L-G<sub>1</sub>, L-G<sub>2</sub>, L-G<sub>3</sub>, L-G<sub>4</sub>, L-H<sub>1</sub>, L-H<sub>2</sub>, and L-I<sub>1</sub> from the leaves of *Hedera canariensis*, *Khim. Prirod. Soedin.*, **3**, 377 (1996).
12. Yakovishin L.A., Borisenko N.I., Rudnev M.I., Vetrova E.V., Grishkovets V.I., Self-association and complexation of triterpene glycosides and cholesterol, *Khim. Prirod. Soedin.*, **1**, 45 (2010).

Поступила в редакцию 25.01.2014 г.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

- Аристова  
Надежда Ивановна** Национальный институт винограда и вина "Магарач"; к.т.н., н.с. отдела аналитических исследований, стандартизации и метрологии, e-mail: magarach@rambler.ru
- Белалов  
Вадим Вадимович** Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: vadim.belalov@mail.ru
- Богатина  
Нина Ильинична** Физико-технический институт низких температур НАН Украины, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, e-mail: n\_bogatina@rambler.ru
- Борисенко  
Сергей Николаевич** НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, кандидат химических наук, старший научный сотрудник
- Боровков  
Андрей Борисович** Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины, к.б.н., с.н.с., e-mail: spirit2000@ua.fm
- Бригас О.П.** Институт агроэкології і природокористування НААН, к.б.н., зав. лабораторією моніторингу агробіоресурсів
- Брошко  
Евгений Олегович** Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины, отдел эволюционной морфологии позвоночных, аспирант, e-mail: y.broshko@gmail.com
- Валиев  
Энвер Велиуллаевич** РВУЗ «Крымский инженерно-педагогический университет», кафедра профессиональной педагогики и электромеханики, старший преподаватель, e-mail: envervaliyev@ukr.net
- Ветрова  
Елена Владимировна** НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
- Вишневский  
Виталий  
Вячеславович** Институт проблем математических машин и систем НАН Украины, ведущий научный сотрудник, кандидат технических наук, e-mail: vit.vizual@gmail.com
- Вовчук  
Ирина Леонидовна** Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, д.б.н., профессор кафедры биохимии биологического факультета, e-mail: irvov@mail.ru
- Вяткина  
Оксана Валерьевна** Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и физической химии, e-mail: oksana\_vyatkina@list.ru

<b>Гришковец Владимир Иванович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой физической и аналитической химии
<b>Гудвиллович Ирина Николаевна</b>	Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины, к.б.н., м.н.с., e-mail: gudirina2008@yandex.ru
<b>Дашкевич Юлия Олеговна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, ведущий специалист кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий
<b>Дягилева Юлия Олеговна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., ассистент кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: yulia_dyagileva@mail.ru
<b>Жижина Марина Николаевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, ведущий специалист кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: zhizhina-biol@ukr.net
<b>Жилякова Татьяна Александровна</b>	Национальный институт винограда и вина "Магарач"; к.б.н., с.н.с., нач. отдела аналитических исследований, стандартизации и метрологии, e-mail: golden.heart@mail.ru
<b>Загричук Григорій Ярославович</b>	Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського, кандидат хімічних наук, доцент кафедри загальної хімії
<b>Засць Наталія Сергіївна</b>	Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, аспірантка кафедри фізіології людини і тварин, e-mail: _nz_8@ukr.net
<b>Зайцев Алексей Сергеевич</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры биохимии, e-mail: zaycevfl@mail.ru
<b>Зайцев Георгий Павлович</b>	Национальный институт винограда и вина "Магарач"; младший научный сотрудник испытательного центра по контролю качества пищевой продукции "Магарач", e-mail: gorg-83@mail.ru
<b>Ибрагимова Эвелина Энверовна</b>	РВУЗ «КИПУ», к.б.н., ст. преподаватель кафедры биологии, экологии и безопасности жизнедеятельности
<b>Иванець Людмила Миколаївна</b>	Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського, кандидат хімічних наук, доцент кафедри загальної хімії, e-mail: Ivanets_Lyuda@ukr.net
<b>Изюмская Анна Александровна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, магистр факультета биологии и химии

<b>Йолкіна Наталія Маратівна</b>	Кримського факультету Запорізького національного університету, кандидат біологічних наук, доцент кафедри фізичного виховання, спорту і здоров'я людини, e-mail: nataleiolkina@gmail.com
<b>Капустин Алексей Евгеньевич</b>	Приазовский государственный технический университет, д.х.н., кафедра химической технологии и инженерии, зав. кафедрой, e-mail: kapustin_a_e@pstu.edu
<b>Капустина Елена Валентиновна</b>	Приазовский государственный технический университет, к.х.н., кафедра химической технологии и инженерии, доцент, e-mail: kapustina_e_v@pstu.edu
<b>Кейван М.П.</b>	Інститут агроєкології і природокористування НААН, к.б.н., вчений секретар
<b>Козлитин Анатолий Мефодьевич</b>	Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А, профессор кафедры «Природная и техносферная безопасность», доктор технических наук, e-mail: kammov@gmail.com
<b>Козловский Роман Анатольевич</b>	Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, д.х.н., кафедра технологии основного органического и нефтехимического синтеза, профессор, e-mail: rakozlovskiy@mail.ru
<b>Коношенко Світлана Володимирівна</b>	Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського, доктор біологічних наук, професор кафедри біохімії
<b>Коренюк Иван Иванович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Корж Александр Павлович</b>	Запорожский национальный университет, к.б.н., доцент
<b>Костюк Александра Сергеевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., старший преподаватель кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: alexkostyuk@mail.ru
<b>Куленкова Анна Андреевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Куличенко Александр Михайлович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., старший научный сотрудник кафедры физиологии человека и животных и биофизики

<b>Кучер Евгения Николаевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий, e-mail: evgenia.kucher@gmail.com
<b>Лекарь Анна Владимировна</b>	НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, младший научный сотрудник
<b>Ляшенко Валентина Петрівна</b>	Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара, доктор біологічних наук, професор кафедри фізіології людини і тварин, e-mail: lyschenkov@mail.ru
<b>Ляшенко Тарас Петрович</b>	ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, доцент кафедри фізіології людини і тварин, к.б.н.
<b>Максименко Елена Владимировна</b>	НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, зав. Лабораторией
<b>Масберг Ігор Валентинович</b>	Інститут агроєкології і природокористування НААН, аспірант
<b>Мельникова Оксана Зеноновна</b>	Запорожский государственный медицинский университет, кандидат биологических наук, доцент кафедры медицинской физики, биофизики и высшей математики, e-mail: melnikovaoz@mail.ru
<b>Найдич Сергей Иванович</b>	Крымский инженерно-педагогический университет, кандидат биологических наук, доцент кафедры физического воспитания, e-mail: tournesi@rambler.ru
<b>Оберемок Владимир Владимирович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, ст.преподаватель кафедры биохимии, с.н.с., e-mail: genperc@mail.ru
<b>Оглобля Олександр Володимирович</b>	ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, доцент кафедри біофізика, к.б.н.
<b>Омельченко Александр Владимирович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, ведущий специалист кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологи, e-mail: omelav@ukr.net
<b>Османова Адиля Ахтемовна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, студентка 5 курса кафедры общей и физической химии
<b>Отраднава Милена Искендеровна</b>	Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., ассистент кафедры «Природная и техносферная безопасность», e-mail: risavalasava@yandex.ru



<b>Отурина Ирина Павловна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологии
<b>Павленко Владимир Борисович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор, заведующий кафедрой общей психологии
<b>Панов Денис Александрович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского; к.х.н., доцент кафедры общей и физической химии, e-mail: panovda@crimea.edu
<b>Панова Элеонора Павловна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.х.н., доцент кафедры общей и физической химии, e-mail: mendes@inbox.ru
<b>Поляк Ольга Богданівна</b>	Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського, кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри фармацевтичної хімії
<b>Присянникова Ирина Борисовна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологии
<b>Ржевская Виктория Степановна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологии
<b>Рогачева Светлана Михайловна</b>	Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А., зав. кафедрой «Природная и техносферная безопасность», доктор биологических наук, e-mail: smro13@land.ru
<b>Савина Ксения Дмитриевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры спортивных игр и гимнастики
<b>Симагина Анна Олеговна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологии
<b>Ситник Марина Ивановна</b>	Таврический национальный университет им. В. И. Вернадского, студентка факультета биологии и химии
<b>Соловйова Ольга Вікторівна</b>	Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського Національної академії наук України, кандидат біологічних наук, науковий співробітник, e-mail: kozl_ya_oly@mail.ru
<b>Сышко Галина Дмитриевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры теории и методики физической культуры

<b>Темурьянц Наталья Арменаковна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики, e-mail: timur328@gmail.com
<b>Теплицкая Людмила Михайловна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры ботаники, физиологии растений и биотехнологии
<b>Тимуш Ирина Яковлевна</b>	КРУ «Дом Ребенка Елочка», практический психолог
<b>Тихонова Олена Андріївна</b>	Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського Національної академії наук України, кандидат біологічних наук, молодший науковий співробітник, e-mail: tihonoval@mail.ru
<b>Трибрат Наталья Сергеевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., ассистент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Туманянц Каринэ Николаевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, научный сотрудник по ПНИЛ, старший преподаватель кафедры медико-биологических основ физической культуры, e-mail: timur328@gmail.com
<b>Федотова Александра Юрьевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, магистр 5 курса факультета биологии и химии, кафедра ботаники и физиологии растений и биотехнологии
<b>Филонова Ольга Владимировна</b>	НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, младший научный сотрудник
<b>Хрипун Александр Яковлевич</b>	КРУ «Дом Ребенка Елочка», главный врач
<b>Хусаинов Денис Рашидович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Цапенко Петро Костянтинович</b>	ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, асистент кафедри фізіології людини і тварин, к.б.н.
<b>Челядина Наталья Станиславовна</b>	Институт Биологии Южных морей национальная академия наук Украины, отдел аквакультуры и морской фармакологии, м.н.с.
<b>Черетаев Игорь Владимирович</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, канд. биол. наук, м.н.с. кафедры физиологии человека и животных и биофизики

<b>Чмелева Светлана Ивановна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., доцент кафедры ботаники и физиологии растений и биотехнологий
<b>Чуян Елена Николаевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, д.б.н., профессор кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Шейкина Надежда Валерьевна</b>	Национальный фармацевтический университет, кандидат биологических наук, ассистент, e-mail: sheykina@ukr.net
<b>Шейх-Заде Мамет-Исмет</b>	РВУЗ «Крымский инженерно-педагогический университет», кафедра профессиональной педагогики и электромеханики, кандидат физико-математических наук, доцент
<b>Шилина Виктория Викторовна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, аспирант кафедры физиологии человека и животных и биофизики
<b>Эмирова Диляра Энверовна</b>	РВУЗ «КИПУ», преподаватель, заведующая лабораторией природоведения кафедры биологии, экологии и безопасности жизнедеятельности
<b>Юркова Ирина Николаевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Биотехнологический центр, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, e-mail: nanosilver@rambler.ru
<b>Яковишин Леонид Александрович</b>	Севастопольский национальный технический университет, кандидат химических наук, доцент кафедры физики (цикл химии), e-mail: chemsevntu@rambler.ru.
<b>Ярмолук Наталья Сергеевна</b>	Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, к.б.н., старший преподаватель кафедры медико-биологических основ физической культуры, e-mail: nat_yarm@mail.ru

## СОДЕРЖАНИЕ

### БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

- Белалов В.В., Дягилева Ю.О., Хрипун А.Я., Тимуш И.Я., Куленкова А.А., Павленко В.Б.**  
ОСОБЕННОСТИ ВОСПРИЯТИЯ МУЖСКОЙ И ЖЕНСКОЙ РЕЧИ У ДЕТЕЙ-СИРОТ ВОЗРАСТОМ ДВУХ С ПОЛОВИНОЙ - ТРЕХ С ПОЛОВИНОЙ ЛЕТ ..... 3
- Брошко Е.О.**  
НЕКОТОРЫЕ СТРУКТУРНО-БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ ..... 12
- Vogatina N.I., Sheykina N.V.**  
INFLUENCE OF DIFFERENT RELATIVE ORIENTATION OF STATIC AND ALTERNATIVE MAGNETIC FIELDS AND CROSS ROOTS ON THEIR GRAVITROPIC REACTION ..... 24
- Боровков А.Б., Гудвиллович И.Н.**  
ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КВАЗИНЕПРЕРЫВНОЙ КУЛЬТУРЫ *DUNALIELLA SALINA* TEOD. ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОСВЕЩЕННОСТИ ..... 29
- Вовчук И.Л.**  
ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОГО И ОПУХОЛЕВОГО ЭНДОМЕТРИЯ ..... 39
- Засць Н.С., Ляшенко В.П., Бурцева Д.О., Лукашев С.М., Мельнікова О.З.**  
АДАПТАЦІЙНІ РЕАКЦІЇ НЕЙРОСИНАПТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕРГОТРОПНОЇ ЗОНИ ГІПОТАЛАМУСА ЩУРІВ ЗА УМОВ ЛУЖНОГО РАЦІОНУ ..... 46
- Ибрагимова Э.Э.**  
МИТОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КОРНЕВОЙ МЕРИСТЕМЫ *ALLIUM SERA* L. ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ ПЕСТИЦИДОВ И ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ..... 56
- Йолкіна Н.М., Коношенко С.В.**  
ПОКАЗНИКИ МЕТАБОЛІЗМУ ОКСИДУ АЗОТУ В ЕРИТРОЦИТАХ ХВОРИХ НА ЕРИТРЕМІЮ ..... 64
- Корж А.П.**  
СОВРЕМЕННОЕ ОХОТНИЧЬЕ ХОЗЯЙСТВО КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ФАУНЫ ..... 71
- Куличенко А.М.**  
ОСОБЕННОСТИ СВЯЗЕЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ АМИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУР СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНОГО СО СПЕКТРАЛЬНОЙ МОЩНОСТЬЮ РИТМОВ ЭЭГ, ОТВЕДЕННОЙ В СИММЕТРИЧНЫХ ОТВЕДЕНИЯХ ДВУХ ПОЛУШАРИЙ ..... 81

<b>Кучер Е.Н.</b> РЕПРОДУКТИВНОЕ УСИЛИЕ И РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТАКТИКИ ВИДОВ РОДА <i>SERHALANTHERA</i> RICH. В КРЫМУ .....	93
<b>Найдич С.И.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ГАЗООБМЕНА ЧЕЛОВЕКА ВО ВРЕМЯ ИНТЕНСИВНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОЙ ГАЗОВОЙ СРЕДЫ .....	102
<b>Оберемок В.В., Зайцев А.С.</b> СОВРЕМЕННЫЕ ИНСЕКТИЦИДЫ: ИХ ПРЕИМУЩЕСТВА, НЕДОСТАТКИ И ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ДНК-ИНСЕКТИЦИДОВ (ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ) .....	112
<b>Омельченко А.В., Юркова И.Н., Жижина М.Н.</b> СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ.....	127
<b>Отраднава М.И., Рогачева С.М., Козлитин А.М., Вишневский В.В.</b> ВЛИЯНИЕ ТАБАКОКУРЕНИЯ НА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УРОВНЯХ ГЕОМАГНИТНОЙ АКТИВНОСТИ.....	136
<b>Ржевская В.С., Отурина И.П., Теплицкая Л.М.</b> ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ. ....	145
<b>Савина К.Д., Сышко Г.Д.</b> ВЕГЕТАТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИНУСОВОГО УЗЛА У ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ В УСЛОВИЯХ ВЕСТИБУЛЯРНЫХ РАЗДРАЖЕНИЙ.....	161
<b>Симагина Н.О., Изюмская А.А.</b> БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ <i>ARTEMISIA VULGARIS</i> L.....	170
<b>Соловйова О.В., Тихонова О.А.</b> НАКОПИЧЕННЯ НАФТОВИХ ВУГЛЕВОДНІВ МАСОВИМИ ВИДАМИ ЧОРНОМОРЬСЬКИХ МОЛЮСКІВ В УМОВАХ ПОРТОВИХ АКВАТОРІЙ.....	178
<b>Темурьянц Н.А., Костюк А.С., Туманянц К.Н., Ярмолук Н.С.</b> РОЛЬ ДОФАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МЕХАНИЗМАХ ИЗМЕНЕНИЯ НОЦИЦЕПЦИИ ПРИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОМ ЭКРАНИРОВАНИИ.....	186
<b>Трибрат Н.С., Чуян Е.Н.</b> МИОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА КОЖИ ПРИ ДЕЙСТВИИ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ .....	197
<b>Цапенко П.К., Оглобля О.В., Лященко Т.П.</b> УЧАСТЬ ПРОСТАГЛАНДИНІВ У РЕАЛІЗАЦІЇ ВПЛИВУ БОМБЕЗИНУ НА МЕМБРАННИЙ ПОТЕНЦІАЛ ГЕПАТОЦИТІВ.....	207

<b>Челядина Н.С.</b> ИНДИВИДУАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ МЕДИ В МЯГКИХ ТКАНЯХ <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i> LAM. В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛА И СТАДИИ ЗРЕЛОСТИ ГОНАД .....	215
<b>Чмелева С.И., Кучер Е.Н., Дашкевич Ю.О., Ситник М.И.</b> ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ЦИРКОН НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ПОЧВЕННОЙ ЗАСУХИ .....	223
<b>Шилина В.В., Хусаинов Д.Р., Черетаев И.В., Коренюк И.И.</b> ИЗМЕНЕНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА АСПИРИНА НА ФОНЕ ИНТОКСИКАЦИИ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ПРИ БЛОКИРОВАНИИ D <sub>2</sub> -РЕЦЕПТОРОВ .....	232
<b>Эмирова Д.Э.</b> ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДА БИ-58 НА ЛЮМБРИЦИД В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ .....	241

## ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

<b>Бригас О.П., Масберг І.В., Кейван М.П.</b> СУЧАСНИЙ СТАН ВИРОБНИЦТВА ПРОДУКЦІЇ СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА ТА РОЗРАХУНОК ЕМІСІЇ ХІМІЧНО АКТИВНОГО АЗОТУ У ГАЛУЗІ ТВАРИНИЦТВА АВТОНОМНОЇ РЕСПУБЛІКИ КРИМ .....	247
<b>Валиев Э.В., Шейх-Заде М.И.</b> МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ПОГРЕШНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНСТАНТЫ РАВНОВЕСИЯ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ С ВОДОРОДНОЙ СВЯЗЬЮ В СЛУЧАЕ САМОАССОЦИИ ДОНОРА ПРОТОНА .....	256
<b>Вяткина О.В.</b> МЕТОДЫ ПОВЫШЕНИЯ И СТАБИЛИЗАЦИИ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ ЧЕРНОЙ .....	261
<b>Жулякова Т.А., Аристова Н.И., Панов Д.А., Зайцев Г.П.</b> ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ВИНА И ВИНМАТЕРИАЛОВ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА .....	270
<b>Іванець Л.М., Поляк О. Б., Загрчук Г.Я.</b> ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ РЕАКЦІЇ ГІДРАЗІДУ О,О-ДИФЕНІЛТІОФОСФОРНОЇ КИСЛОТИ З ФЕНІЛІЗОТІОЦІАНАТОМ .....	277
<b>Карустіна Е. V., Kozlovskiy R. A., Kapustin A. E.</b> HYDROXIDE CLAYS AS SOLID BASE CATALYSTS .....	283
<b>Панова Э.П., Османова А.А.</b> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ С L-ЦИСТЕИНОМ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ .....	292

<b>Присянникова И.Б., Гришковец В.И., Федотова А.Ю.</b> ВЛИЯНИЕ РЖАВЧИННОГО ГРИБА <i>UROMYCES GERANII</i> (DC.) LEV. НА ФЕНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ФЕНОЛЬНЫЙ СОСТАВ <i>GERANIUM</i> <i>SANGUINEUM</i> L. (GERANIACEAE) .....	299
<b>Филонова О.В., Лекарь А.В., Ветрова Е.В., Максименко Е.В., Яковишин Л.А., Гришковец В.И., Борисенко С.Н.</b> МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С БРОМГЕКСИНОМ .....	309
<b>СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ.....</b>	317
<b>СОДЕРЖАНИЕ .....</b>	324